3P197

細菌べん毛軸受けLP リングタンパク質の発現とリング形成

○松波 秀行¹、難波 啓一^{1,2} (¹JST・ICORP・超分子ナノマシン、² 阪大院・生命機能)

バクテリアのべん毛はフィラメント、フック、基部体から構成されている。基部体はモーターで生じた回転トルクをフィラメントに伝達するための中心的な役割を担っており、約10種類のべん毛タンパク質から成り立っている。基部体はまた、LPリング、MSリング、それらを繋ぐロッドの、3つのサブ複合体に分けることができる。LPリングはそれぞれ、細胞の外膜に位置するリポタンパク質FlgHとペプチドグリカン層に位置するFlgIがリング状の強固な複合体を形成し、外膜を貫通して、高速で回転するロッドの軸受けとして機能している。そのため、LPリングは化学的に非常に安定なタンパク質複合体を形成している。これまでにサルモネラ菌より精製したLPリングを用いて二次元結晶化および電子顕微鏡による解析は行われているが、LPリングの菌体当たりのコピー数がべん毛の本数に等しく数個程度であるため、タンパク質試料を大量に調製することが難しく、原子レベルの分解能をめざした構造解析はあまり進んでいない。そこで大腸菌を用いた大量発現系を構築することでこの問題を解決することを試みてきた。FlgHとFlgIは共に細胞内ではN末端にシグナル配列を持つ前駆型タンパク質として翻訳された後、Sec輸送系の働きでペリプラズム領域に輸送される。まず、前駆型および成熟型としてタンパク質が発現できるようなプラスミドを構築し、精製のためのアフィニティータグも導入した。大腸菌ホスト株や培養条件を検討した結果、FlgHとFlgIの両者とも前駆型および成熟型として発現していることを電気泳動によって確認することができた。現在、両タンパク質のアフィニティータグ精製およびリング状オリゴマー構造の形成の有無や両タンパク質間の相互作用の可能性を検討している。

H.Matsunami and K.Namba: Expression and Oligomerization of Bacterial Flagellar LP-ring Proteins

3P199

サルモネラ菌べん毛モーター固定子タンパク質MotBのペリプラズム側断片の解析

○小嶋 誠司¹、古川 進朗¹、南野 徹¹、難波 啓一^{1,2} (¹JST・ICORP・超分子ナノマシン、² 阪大院・生命機能)

細菌のべん毛モーターは、細胞膜の内外に形成されるプロトンまたはナトリウムイオンの電気化学ポテンシャル差をエネルギー源とし、固定子を形成する膜タンパク質 MotA/MotB 複合体の中をイオンが流れる際に回転力が発生する。このエネルギー変換機構はほとんど分かっていないが、固定子にプロトンが作用する際の固定子内構造変化によりトルクが発生するモデルと、それを支持する結果が報告されている。一方、MotA/B 複合体がモーターの固定子として機能するには、モーター中の適切な場所に「固定」される必要がある。これまで MotB のペリプラズム側に存在するペプチドグリカン結合モチーフがその役割を担っていると推測されてきたが、実態はまだ何も分かっていない。そこで我々は MotA/B 複合体がどのようにモーター中にセットされるのかを明らかにするために、このモチーフを含み、膜貫通部分を含まない可溶性の MotB ペリプラズム側断片を作成した。断片の N 末端側には、発現後ペリプラズム領域に輸送されるように PelB のリーダーペプチドを融合させ、更に発現量を制御できる系を確立した。断片を野生株中で発現させたところ、IPTG で誘導した場合に菌の運動能の阻害が見られた。これは、大量発現した MotB 断片がモーター中の固定子結合部位に結合したために、本来その部位に固定されるべき野生型 MotA/B 複合体が結合できず、回転力の発生が阻害されたためと考えられた。生化学的解析により、この MotB 断片が 2 量体を形成することも明らかになった。大量発現および精製が容易なために結晶化を進めている。年会ではペプチドグリカン結合モチーフとモーターへのターゲティングの関係、ペプチドグリカンとの結合の解析、そして X 線結晶構造解析へ向けた取り組みについても報告したい。

S. Kojima, Y. Furukawa, T. Minamino and K. Namba: Study of the periplasmic fragment of MotB, a stator component of the flagellar motor from Salmonella

3P198

Dynamic residue pairing for the universal joint mechanism of the flagellar hook

○Samatey Fadel^{1,2}、松波 秀行¹、今田 勝巳^{1,2}、長島 重広¹、北尾 彰朗³、難波 啓一^{1,2} (¹ICORP・JST、² 阪大院・生命機能、³ 東大・分生研)

The bacterial flagellar hook is a helical assembly of about 120 copies of a single protein FlgE (42 kDa, 402 residues) and a short, coiled tubular segment that connects the flagellar motor to the long helical filament. Its function as a universal joint to transmit the motor torque to the helical propeller is essential for chemotactic behaviours of bacteria. We reported the X-ray crystal structure of a 31-kDa core fragment of FlgE named FlgE31 (residues 71-363) and an atomic model of the straight hook built by docking the FlgE31 model to a density map obtained by electron cryomicroscopy and image analysis. The mechanism that allows the smoke-ring motion of the coiled hook with relatively large bending flexibility was revealed by molecular dynamics simulation of extension and compression of a 3 subunits protofilament model. Domains of axially interacting FlgE subunits were found to slide on each other, enabling the hook to keep its curvature during the rotation of the coiled hook. We hereby report a dynamic residue pairing, through a continual change in hydrogen bonding partners, between the ampersand motif in domain D1 of one subunit and domain D2 of an axially neighbouring subunit along the protofilament. We will also report on dynamic residue pairing in the putative D2-D2 interactions that are presumed to produce the curvature of the hook.

F.A.Samatey, H.Matsunami, K.Imada, S.Nagashima, A.Kitao and K.Namba: Dynamic residue pairing for the universal joint mechanism of the flagellar hook

3P200

サルモネラ菌べん毛モーター固定子 MotA/MotB 複合体のプロトン透過経路

○蔡 榮淑¹、小嶋 誠司²、南野 徹^{1,2}、上池 伸徳²、難波 啓一^{1,2} (¹ 阪大院・生命機能・ナノ生体科学、² JST・ICORP・超分子ナノマシン)

サルモネラ菌は、運動器官であるべん毛モーターを回転させることにより、水の中を自由に泳ぎ回ることができる。その回転トルクは細胞内外で生じるプロトンの電気化学ポテンシャル差をエネルギー源とし、固定子である MotA/MotB 複合体と回転子である C リングとの間の相互作用により発生すると考えられている。これまでの研究から、サルモネラ菌 MotB の 33 番目のアスパラギン酸残基がプロトンの授受に重要であることが示された。しかしながら、MotA/B 複合体におけるプロトン透過経路およびそのエネルギー変換機構については未だ不明である。べん毛モーターの回転には、1 回転あたり約 1000 個のプロトンが必要であると推定されている。回転速度が 300Hz の時、毎秒約 30 万個のプロトンが MotA/B 複合体を通過することになる。一方、サルモネラ菌体内で MotA/B 複合体を単独に大量発現させても、細胞増殖には全く影響がない。このことは、MotA/B 複合体がべん毛モーターに組み込まれない限り、そのプロトン透過活性が著しく抑制されているものと示唆される。しかしながら、そのメカニズムも明らかではない。今回、我々は MotA/B 複合体のプロトン透過およびその活性制御機構を解明するために、プロトン透過活性が低下したと思われる motB(D33E) 変異体から偽復帰変異体を単離した。DNA シークエンス解析の結果、その抑圧変異が motA 及び motB 内に存在することが判明した。現在、レシオメトリック pH 感受性蛍光蛋白質を用いた 2 波長励起 1 波長測光 蛍光イメージング法により、野生型および様々な変異型 MotA/B 複合体を発現する菌体でのプロトン透過活性の計測を行っている。

YS.Che, T.Minamino, S.Kojima, N.Kami-ike and K.Namba: Proton translocation in the MotA/MotB stator complex of the bacterial flagellar motor