

「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用」

平成14年度採択研究代表者

相沢 慎一

((株)計測技研 特別顧問)

「生物ナノマシーン回転運動の一般化作動機構の解明」

1. 研究実施の概要

べん毛モーターのエネルギー変換の仕組みを理解するため、インプットであるプロトンの流れとアウトプットであるべん毛回転のトルクを直接比較しなければならない。バクテリアの呼吸速度および外液のpH変化からプロトン流を見積もるために、野生株とMot変異株を用いて実験し、その結果べん毛モーターでのプロトン消費は呼吸速度に大きく影響することがわかった。

一方、Motタンパク質のアミノ酸置換による実験からは、トルク発生に直接関与するとされるアミノ酸の電荷を中性にしても運動性があったことから、従来の静電的相互作用に基づく回転モデルは一部否定された。新たなモデル構築が必要である。

2. 研究実施内容

べん毛モーターのエネルギー変換の仕組みを理解するためには、インプットであるプロトンの流れとアウトプットであるべん毛回転のトルクを直接比較しなければならないが、現在の研究はアウトプットであるトルク計測に片寄っている。すなわち、べん毛の回転速度などはミリ秒の精度で計測されているが、プロトンの流れとなるとせいぜいオーダー（桁合わせ）計測だけであって、たとえばモーターに流れ込むイオンの数などについては確固としたデータがない。バクテリア1匹の呼吸系から汲み出されるプロトンが一体どのような経路で細胞内に帰っていくのか調べることは、計測装置の改良や計測精度の向上した今日極めて重要になってきている。

プロトン流の計測は決して単純ではなく、数段の異なる実験を積み重ねることではじめて可能になる。プロトンの汲出し口である呼吸系を調べ、単位時間あたりいくらのプロトンが汲出されるか見積もる。そのためには、細胞膜に含まれるチトクローム量を精密に定量しなければならない。

チトクロームの吸収スペクトルを測定する独自の計測装置を開発している東大総合科学の小倉尚志助教授との共同研究の結果、野生株とMot変異株とでは呼吸速度に変化が見られた。用いた菌株はサルモネラ菌の野生株SJW1103およびMot変異株（MotAB株SJW2966、MotA株SJW3014、MotB株SJW3017）である。これらの菌株の酸素消費速度を計測したところ、

いずれのMot変異株でも呼吸速度の低下が見られた。これらのことから、野生株では呼吸系から放出されたプロトンは直に近くのべん毛モーターに消費されていることが示唆された。

大腸菌H⁺駆動型べん毛において、回転子FliGと固定子MotA間の荷電アミノ酸残基を介した相互作用がトルク発生過程に重要であるという静電的相互作用モデルが提唱されている。そこで、Na⁺駆動型モーターの固定子PomAと固定子FliGの対応する荷電残基に変異導入を行いそれら残基の役割を調べた。

それぞれの荷電残基を単独で置換した変異体や二重あるいは三重変異を導入したが、完全に機能を失うものはほとんどなく、すくなくともNa⁺駆動型モーターの回転には、特定の静電的相互作用が必須ではないと考えられた。また、回転子のFliGにGFPを融合させた蛋白質が機能的であることも示し、べん毛基部にGFPによる蛍光ドットを観察した。

前述のように、特定の荷電残基が回転に必要なではないらしいことから、保存されている以外の荷電残基に変異を導入して、機能が失われるものがあるかを調べる必要がある。回転子のFliGにGFPを融合した状態で機能することが分かったので、この蛍光部位が回転しているかを検出する系を開発する。これはモーター特性やモーター蛋白質の細胞膜上での分布を調べる上で有用な系となると考えられる。

3. 研究実施体制

相沢グループ

- ① 研究分担グループ長：相沢 慎一（(株)計測技研、特別顧問）
- ② 研究項目：プロトン駆動力のエナジェティックスとCリングの構造解析

本間グループ

- ① 研究分担グループ長：本間 道夫（名古屋大学、教授）
- ② 研究項目：Mot複合体の構造解析および細胞膜上での分布解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Makinoshima, H., Aizawa, S.-I., Hayashi, H., Miki, T., Nishimura, A., and Ishihama, A., **Growth phase-coupled alterations in cell structure and function of Escherichia coli.** (2003) J. Bacteriol. **185**, 1338-1345
- Blocker, A., Komoriya, K., and Aizawa, S.-I., **Type III secretion systems and bacterial flagella: Insights into their function from structural similarities.** (2003) PNAS, **100**, 3027-3030

- Chen Yona-Nadler, Tatiana Umanski, Shin-Ichi Aizawa, Devorah Friedberg and Ilan Rosenshine, **Integration host factor (IHF) mediates repression of flagella in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*.** (2003) *Microbiology* **149**, 877-884.
- Kobayashi, K., Saitoh, T., Shah, D.S.H. , Ohnishi, K., Goodfellow, I.G. , Sockett, R.E., and Aizawa, S.-I., **Purification and characterization of the flagellar basal body of *Rhodobacter sphaeroides*.** (2003) *J.Bacteriol.* **185**, 5295-5300
- Lee, S.K., Stack, A., Katzowitsch, E., Aizawa, S.-I., Suerbaum, S., and Josenhans, C., ***Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5.** (2003) *Microbes & Infections*, **5**, 1345-1356.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：0件）