

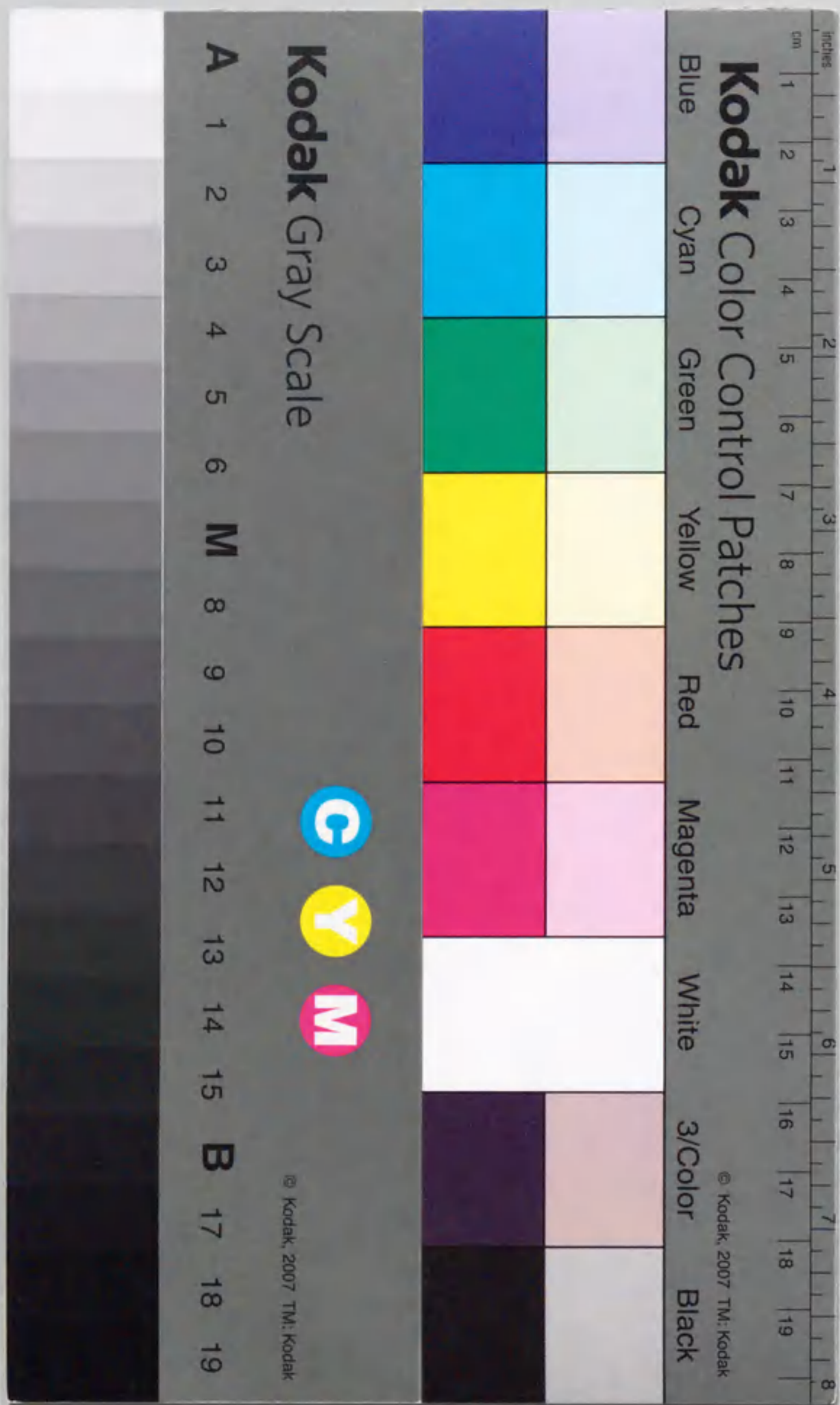
博士論文

特異的阻害剤を用いた細菌鞭毛モーターの
エネルギー変換機構に関する研究

名古屋大学理学部分子生物学科

渥美龍男

平成5年1月



①

博士論文

特異的阻害剤を用いた細菌鞭毛モーターのエネルギー変換機構に関する研究

名古屋大学理学部分子生物学科

渥美龍男

平成5年1月

要 旨

細菌の鞭毛モーターは、イオンの電気化学的ポテンシャルエネルギーを回転という力学的エネルギーに変換する分子機械である。共役イオンの違いによって、 H^+ 駆動型と Na^+ 駆動型の2種類の存在が知られているが、何れについてもそのエネルギー変換の機構はほとんど明らかになっていない。本研究において私は、 Na^+ 駆動型鞭毛モーターについて、エネルギー変換ユニットに特異的に作用する阻害剤を用いて解析を行い、次の事実を明らかにした。

1. *Bacillus firmus* などの好アルカリ性細菌の Na^+ 駆動型鞭毛モーターは、動物細胞の Na^+ チャネルの阻害剤であるアミロライドにより、特異的に、また Na^+ と拮抗的に阻害されるので、鞭毛モーターのエネルギー変換ユニットの変異株の分離に有用であると考えられてきた。しかし、アミロライドは、遅効的ではあるが好アルカリ性 *Bacillus* の生育阻害も起こすために、変異株の分離に使用困難であることを見いだした。そこで、生育阻害を起こさない阻害剤の探索を行い、アミロライドの誘導体の1つであるフェナミルが、好アルカリ性 *Bacillus* の Na^+ 駆動型鞭毛モーターを特異的に阻害するが、生育阻害は全く起こさないことを見いだした。生育阻害を起こさないことと対応して、膜電位、菌体内 pH、 Na^+ を共役イオンとするアミノ酸の能動輸送などは、フェナミルによって全く影響を受けなかった。また、阻害の速度論的解析から、フェナミルによる阻害はアミロライドとは異なり Na^+ と非拮抗的であること、また、阻害効果は溶液のイオン強度に影響されないことなどが分かった。フェナミルの持つこれらの性質は、 Na^+ 駆動型鞭毛モーターの特異的阻害剤として広い用途があることを示している。実際、生育条件の異なる種々の菌株の持つ Na^+ 駆動型鞭毛モーターについて、フェナミルが特異的阻害剤として使用できることを見いだした。

2. フェナミル存在下でも鞭毛モーターの回転が阻害されない変異株を、好アルカリ性 *Bacillus* から分離した。アミロライドとフェナミルの阻害機構の差異から予想されたとおり、変異株のアミロライドに対する感受性は変化していなかった。これらの結果は、フェナミルの作用部位がアミロライドのそれとは異なることを示している。しかし、アミロライドとフェナミルの構造的類

似性からフェナミルも Na^+ 駆動型鞭毛モーターのエネルギー変換部位に作用していると考えられるので、分離した変異株はエネルギー変換ユニットに変異を持つと判断される。

3. アミロライドとフェナミルの作用機作の違いに注目して考えると、アミロライドでも変異株の分離が可能になれば、エネルギー変換ユニットの多様な変異株が分離可能になると期待される。そこで、アミロライドによって生育阻害を受けない菌株の探索を行った。その結果、海洋性細菌である *Vibrio alginolyticus* の極毛を駆動している Na^+ 駆動型鞭毛モーターは、2 mM アミロライドにより pH 7.0 でも pH 8.5 でもほぼ完全に阻害されるが、pH 7.0 の時には菌の生育がそれほど影響を受けないことを見いだした。また、速度論的解析から、アミロライドは pH 7.0 の時にこの極毛モーターに対して Na^+ と拮抗的に阻害を起こすことが分かった。従って、pH 7.0 の条件下でアミロライドを用いることで、ビブリオ菌の Na^+ 駆動型鞭毛モーターについてエネルギー変換ユニットの変異株が分離可能となった。

4. ビブリオ菌は、培地の粘性が上昇すると極毛の他に形態的に異なる側毛を発現するが、この側毛を回転させているモーターのエネルギー源はまだ解明されていない。そこで、*V. alginolyticus* の近縁種である腸炎ビブリオ菌 (*V. parahaemolyticus*) では、極毛のみを持つ変異株 RS313 株と、側毛のみを持つ変異株 ML34 株が分離されているので、それを用いて解析を進めた。RS313 株の運動には培地中の Na^+ が必須であり、また、アミロライドで阻害を受けたことから、この菌の持つ極毛モーターも Na^+ 駆動型であることが分かる。これに対して、ML34 株の運動は培地中の Na^+ 濃度に依存せず、また、アミロライドやフェナミルで阻害を受けなかったことから、側毛モーターが H^+ 駆動型であることが示唆された。そこで、 H^+ イオノフォアである CCCP による運動阻害を解析し、CCCP が RS313 株の運動を阻害しない条件でも ML34 株の運動を阻害する、すなわち、側毛モーターが H^+ 駆動型であることを示した。一方、野生株で両鞭毛が同時に存在するときには、運動は両者の和として現れることを見いだした。したがって、ビブリオ菌では、極毛モーターは Na^+ 駆動型、側毛モーターは H^+ 駆動型であり、1つの菌体で共役イオンの異なった2種類の鞭毛モーターが同時に機能できることが明らかとなった。

本報告は、細菌の鞭毛運動のメカニズムを明らかにするべく、まず鞭毛の構造と運動のメカニズムを明らかにし、次に鞭毛のエネルギー変換機構を明らかにし、最後に鞭毛の制御機構を明らかにすることを目的とした。本報告は、鞭毛の構造と運動のメカニズムを明らかにし、次に鞭毛のエネルギー変換機構を明らかにし、最後に鞭毛の制御機構を明らかにすることを目的とした。本報告は、鞭毛の構造と運動のメカニズムを明らかにし、次に鞭毛のエネルギー変換機構を明らかにし、最後に鞭毛の制御機構を明らかにすることを目的とした。

本研究において見いだされた、生育阻害を起こさずに Na^+ 駆動型鞭毛モーターを特異的に阻害する2つの方法（フェナミルの使用と pH 7.0 でのアミロライドの使用）は、鞭毛モーターのエネルギー変換ユニットの解析に有効な変異株の分離を容易にしたものである。また、ビブリオ菌が共役イオンの異なる2種類の鞭毛モーターを1個体で同時に機能できるという発見により、2種類のモーターを1つの菌体に於て比較しながら解析できるという他に類を見ない実験系が確立できたことは、鞭毛モーターの解析に新たな道を開くものである。

目 次

序 論	1
実験材料と実験方法	9
結 果	
第一章 Na ⁺ 駆動型鞭毛モーターに対するフェナミルの作用機作の解析と フェナミルを用いた鞭毛モーターの変異株の分離	13
第二章 <i>Vibrio alginolyticus</i> の Na ⁺ 駆動型鞭毛モーター及び 生育に対するアミロライドの影響	30
第三章 ビブリオ菌の持つ2種類の鞭毛モーターのエネルギー源の解析	36
考 察	44
謝 辞	47
付 記	48
引用文献	49

序 論： 研究の背景と目的

1. 細菌の鞭毛モーターのエネルギー源について

大腸菌などの細菌は、らせん構造を持つ鞭毛を回転させて液体培地中を遊泳する。細菌の鞭毛は、鞭毛基部にあり、原形質膜の中に埋め込まれた鞭毛モーターにより、スクリューとして回転され推進力を作っている（図 I）。生物において、このような回転する運動器官は他に例がなく、その回転のメカニズムに興味を持たれている。

回転のメカニズムを考える上で重要な要素の一つに、回転を起こすエネルギー源があげられる。筋肉や精子の鞭毛など、生物の運動器官の多くは ATP を直接のエネルギー源としている。しかし、1974 年に Adler らのグループが、細菌の鞭毛モーターの回転のエネルギー源が、ATP ではないことを示した。そして、1977 年に今栄らのグループと Berg らのグループが、枯草菌や連鎖球菌の鞭毛モーターはプロトン駆動力（即ち膜を介した H^+ の電気化学的ポテンシャル差 $\Delta \tilde{\mu}_{H^+}$ 、以下 H^+ 駆動力と記す）に従う H^+ の内向きの流れをエネルギー源にしている（図 II の A）ことを発見した。その後、大腸菌など中性領域で生育する菌はいずれも H^+ 駆動力をエネルギー源とする鞭毛モーターを持つことが分かった（総説 [1] 参照）。

一方、pH 10 前後のアルカリ性領域で良く生育する好アルカリ性細菌では、菌内の pH を 7~8 に維持している [2, 3] ため、pH 差が逆向きにかかっており、その結果 H^+ 駆動力（膜電位と pH 差の和）が非常に小さい環境で生育していることになる。好アルカリ性細菌の鞭毛モーターのエネルギー源の解析から、1981 年に今栄らはそのエネルギー源が H^+ 駆動力ではなく Na^+ 駆動力であることを示した（図 II の B）。その後、海洋性細菌の *Vibrio alginolyticus* も Na^+ 駆動型鞭毛モーターを持つことが示された（総説 [3] 参照）。従って、鞭毛モーターは中性で生育する枯草菌などの持つ H^+ 駆動型と好アルカリ性細菌などの持つ Na^+ 駆動型の 2 つのタイプに分類される。

ところで、好アルカリ性細菌の中には中性でも生育できるものがあるが、中性で生育させても、アルカリ性で生育させても、鞭毛モーターのエネルギー

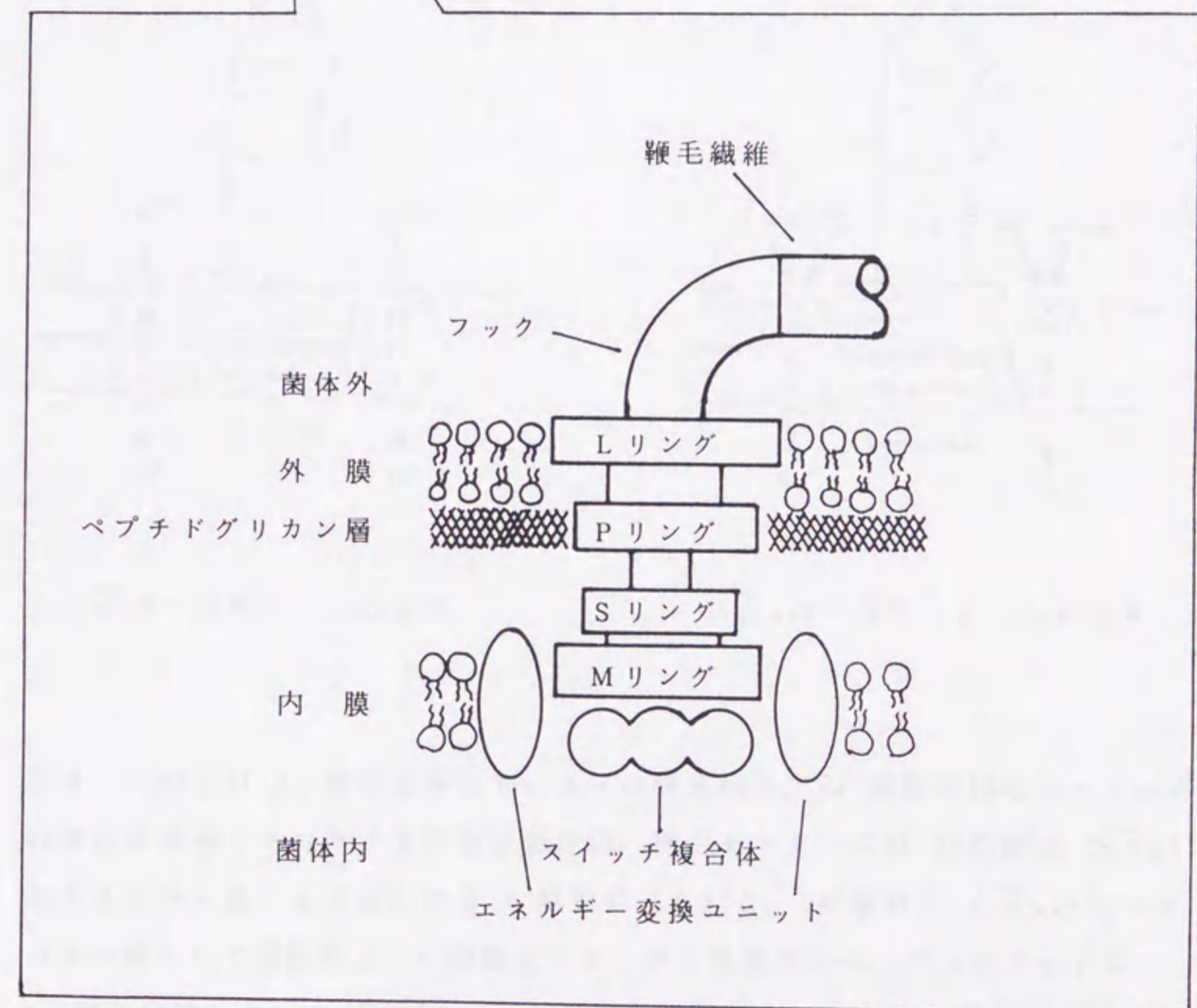
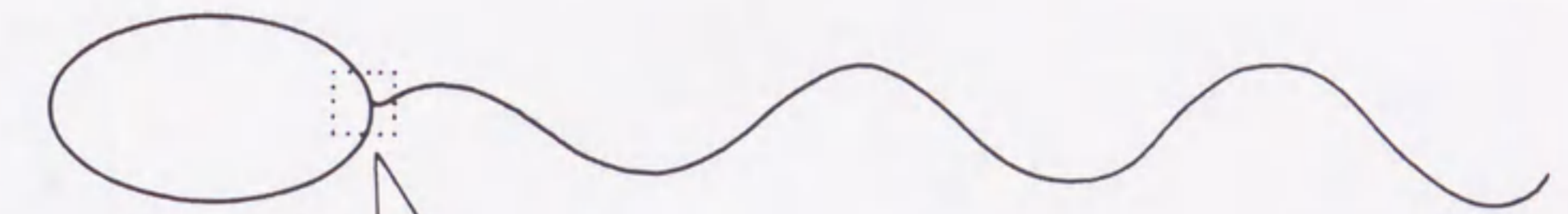
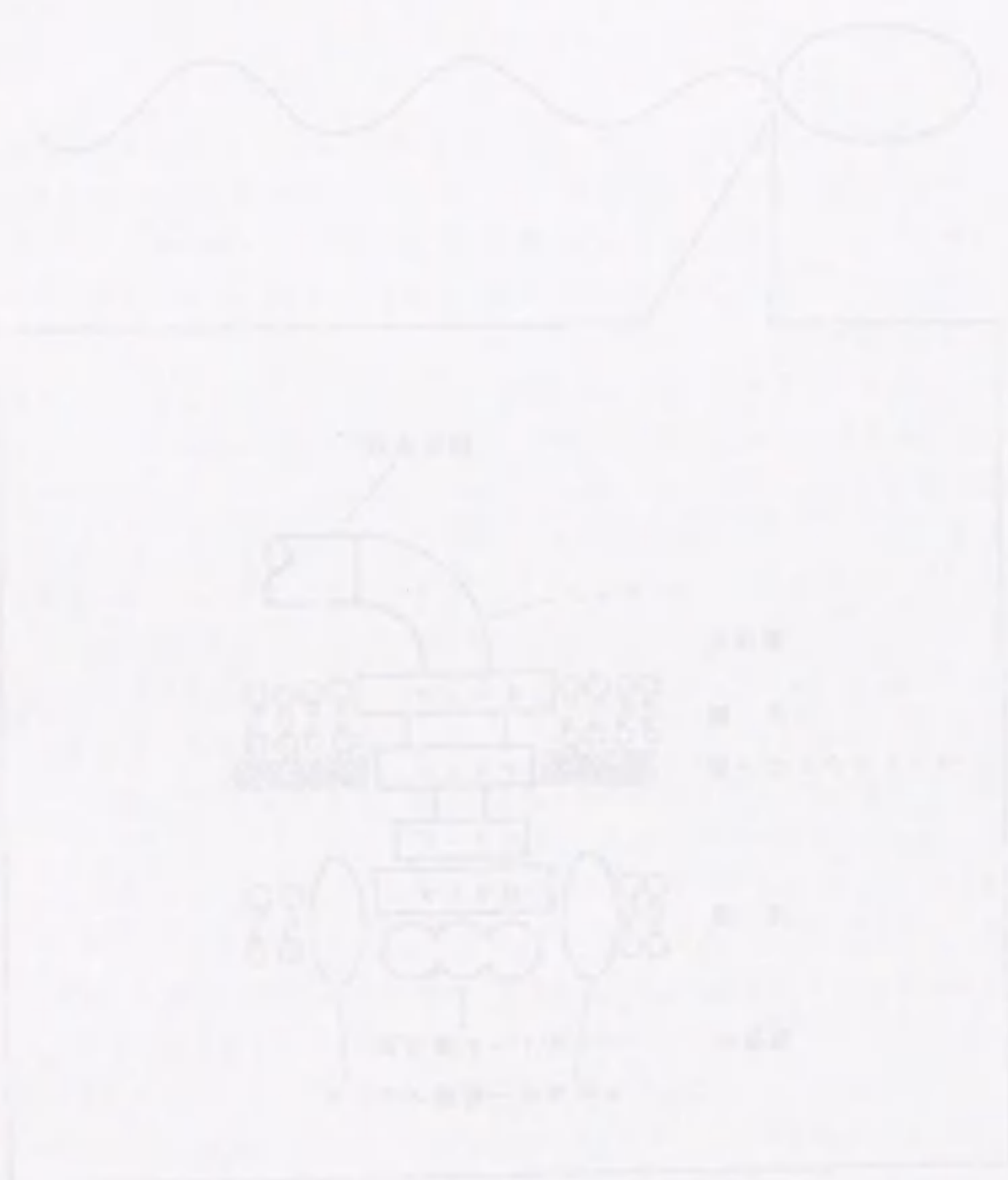
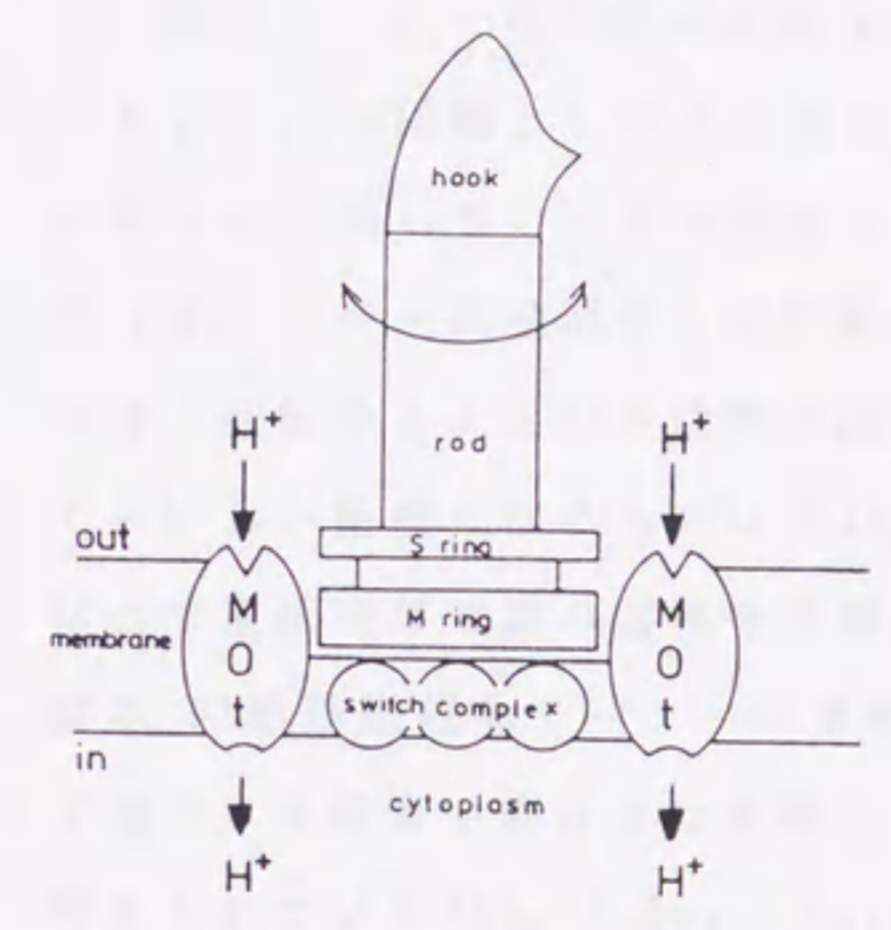


図 I 大腸菌などのグラム陰性菌の鞭毛モーター。細菌の鞭毛は運動器官として機能している。鞭毛の根元には原形質膜の中に埋まっている鞭毛モーターがあり、鞭毛をスクリューとして回転させることにより推進力を作っている。枯草菌などのグラム陽性菌では外膜がないので、外側のL、Pリングはない。

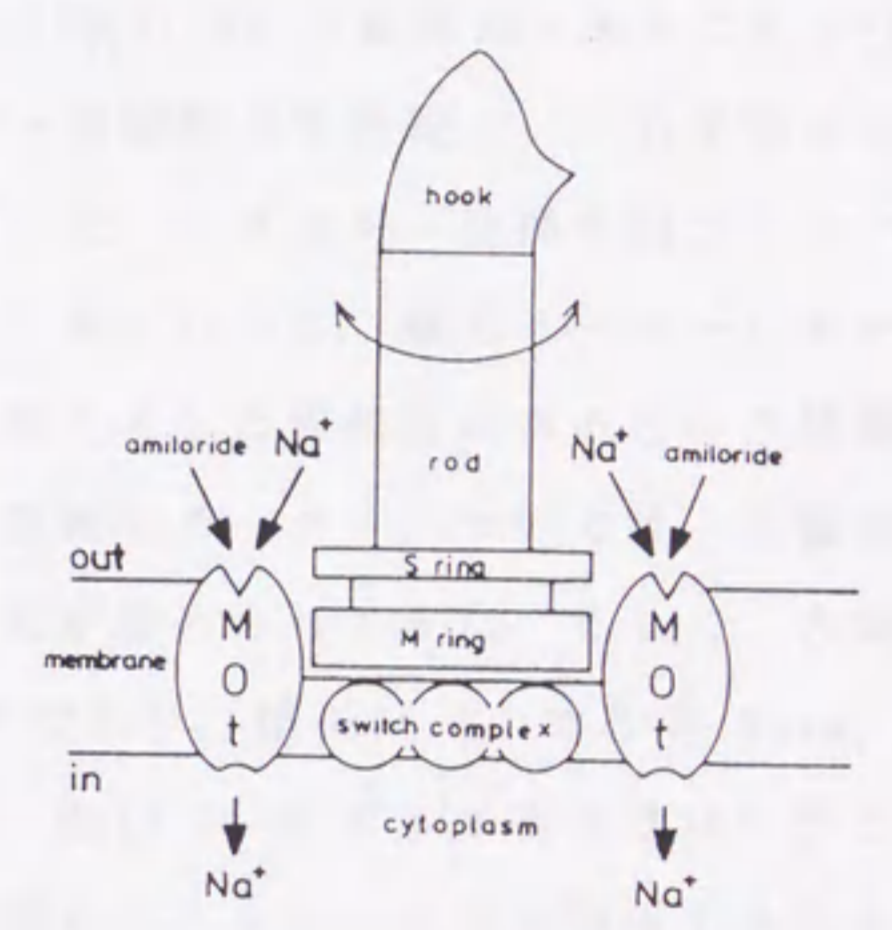


A



$$\Delta \tilde{\mu}_{H^+} = \Delta \Psi - Z \cdot \Delta p H$$

B



$$\Delta \tilde{\mu}_{Na^+} = \Delta \Psi - Z \cdot \Delta p N a$$

図II H⁺及び Na⁺駆動型鞭毛モーターの模式図と、Na⁺駆動型鞭毛モーターの特異的阻害剤アミロライドの作用想定図。鞭毛モーターには H⁺駆動力 $\Delta \tilde{\mu}_{H^+}$ をエネルギー源として回転する H⁺駆動型 (A) と、Na⁺駆動力 $\Delta \tilde{\mu}_{Na^+}$ をエネルギー源として回転する Na⁺駆動型 (B) の2種類がある。アミロライドは Na⁺駆動型鞭毛モーターに対して、H⁺駆動型鞭毛モーターの Mot (エネルギー変換ユニット) に相当するたんばくに結合して、Na⁺の流入を妨げるにより回転を阻害していると考えられている。なお、図中 $\Delta \Psi$ は膜電位、 $\Delta p H$ は菌体内外の pH 差、 $Z = 2.3 \cdot (R T / F)$ で、R は気体定数、T は絶対温度、F はファラデー定数を表す。

源は Na^+ 駆動力であることが、杉山ら[4]によって明らかにされた。したがって、鞭毛モーターのイオン共役系は、生育環境の変化に関係なく、 H^+ 駆動型と Na^+ 駆動型に固定されていることが分かる。

2. Na^+ 駆動型鞭毛モーターの特異的阻害剤について

鞭毛モーターの回転のエネルギー源が H^+ 又は Na^+ の駆動力であることが分かると、次の段階としてどの様にしてイオンの駆動力を回転という力学的エネルギーに変換しているかが問題となる。そこで、エネルギー変換を担うタンパク（エネルギー共役部位）の同定が必要になる。しかし、鞭毛モーターにおいては「回転する」という活性の他には、共役イオンと親和性があるという特徴ぐらいしか指標になるものはない。 H^+ 駆動型鞭毛モーターについては、大腸菌などで遺伝的な知識の蓄積を背景にして研究が進められてきた。そして、大腸菌の H^+ 駆動型鞭毛モーターの構成タンパクであり、膜タンパクである MotA（図 II）を過剰生産させた実験などにより、MotA が H^+ チャンネルではないかと考えられている[5]。しかし、MotA がどの様にエネルギー共役に関係するのかの解析はほとんど進んでいない。

一方、 Na^+ 駆動型鞭毛モーターでは、エネルギー共役部位は Na^+ と親和性を持つので、この特徴を利用すれば H^+ 駆動型モーターとは異なった解析が可能であると考えられる。もし、モーターの Na^+ との相互作用部位に、 Na^+/H^+ 交換輸送系や Na^+ チャンネルなどの Na^+ との相互作用部位の構造と類似性があれば、既に利用されている Na^+/H^+ 交換輸送系や Na^+ チャンネルの特異的阻害剤が、 Na^+ 駆動型鞭毛モーターにも阻害作用を及ぼすことが期待される。この様な考えに基づき杉山ら[6]は Na^+/H^+ 交換輸送系や、 Na^+ チャンネルの阻害剤として知られており、図 III に示すような構造をしたアミロライド[7]が好アルカリ性 *Bacillus* の持つ Na^+ 駆動型鞭毛モーターを特異的に、しかも、 Na^+ と拮抗的に阻害することを見いだした。したがって、アミロライドはエネルギー変換部位の Na^+ と結合する部位、つまり Na^+ チャンネルに結合して Na^+ の流入を阻害することにより、 Na^+ 駆動型鞭毛モーターの回転を阻害していると考えられる（図 II）。

この化合物は、2,4,6-トリアミノ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミンの誘導体として知られている。この化合物は、2,4,6-トリアミノ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミンの誘導体として知られている。

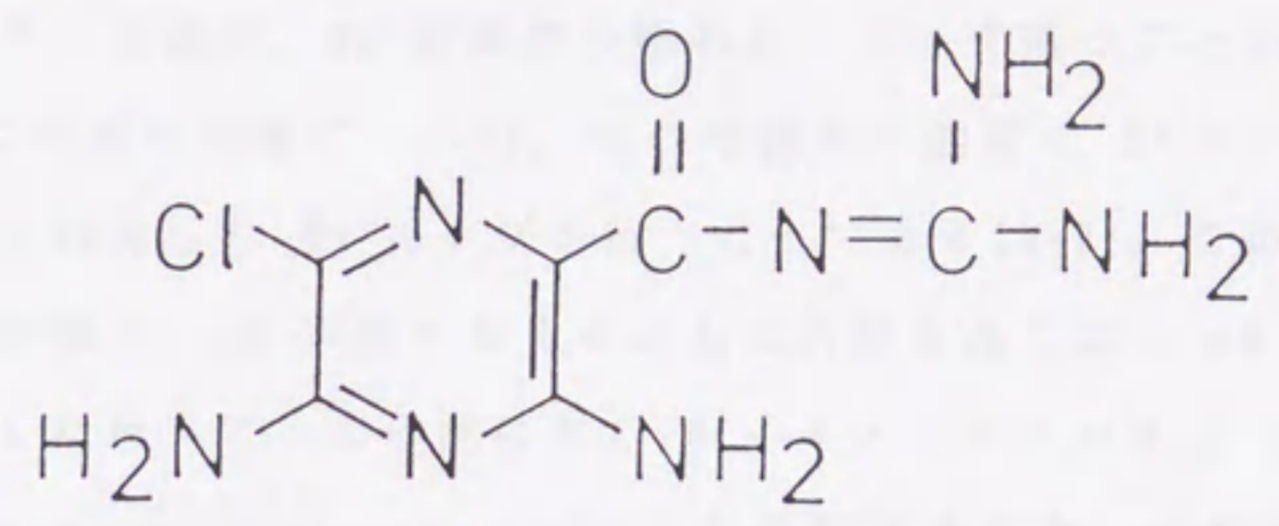
この化合物は、2,4,6-トリアミノ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミンの誘導体として知られている。

この化合物は、2,4,6-トリアミノ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミンの誘導体として知られている。この化合物は、2,4,6-トリアミノ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミンの誘導体として知られている。

この化合物は、2,4,6-トリアミノ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミンの誘導体として知られている。この化合物は、2,4,6-トリアミノ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミンの誘導体として知られている。

この化合物は、2,4,6-トリアミノ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミンの誘導体として知られている。

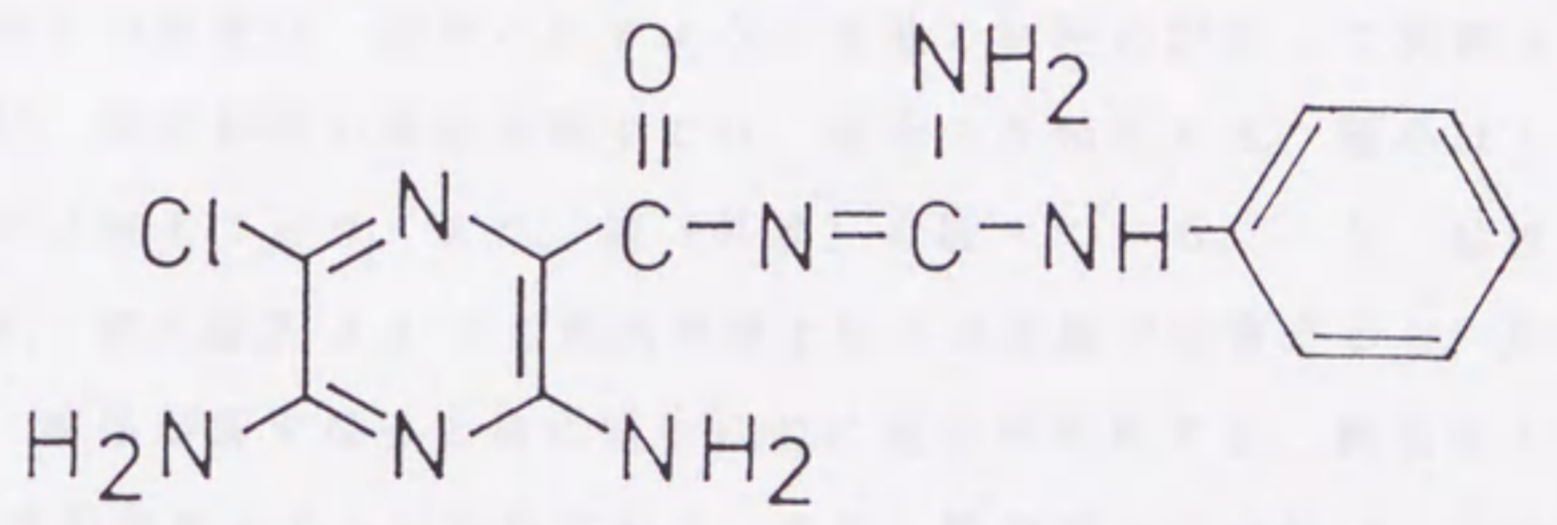
この化合物は、2,4,6-トリアミノ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミンの誘導体として知られている。



アミロライド

この化合物は、2,4,6-トリアミノ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミンの誘導体として知られている。

この化合物は、2,4,6-トリアミノ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミンの誘導体として知られている。



フェナミル

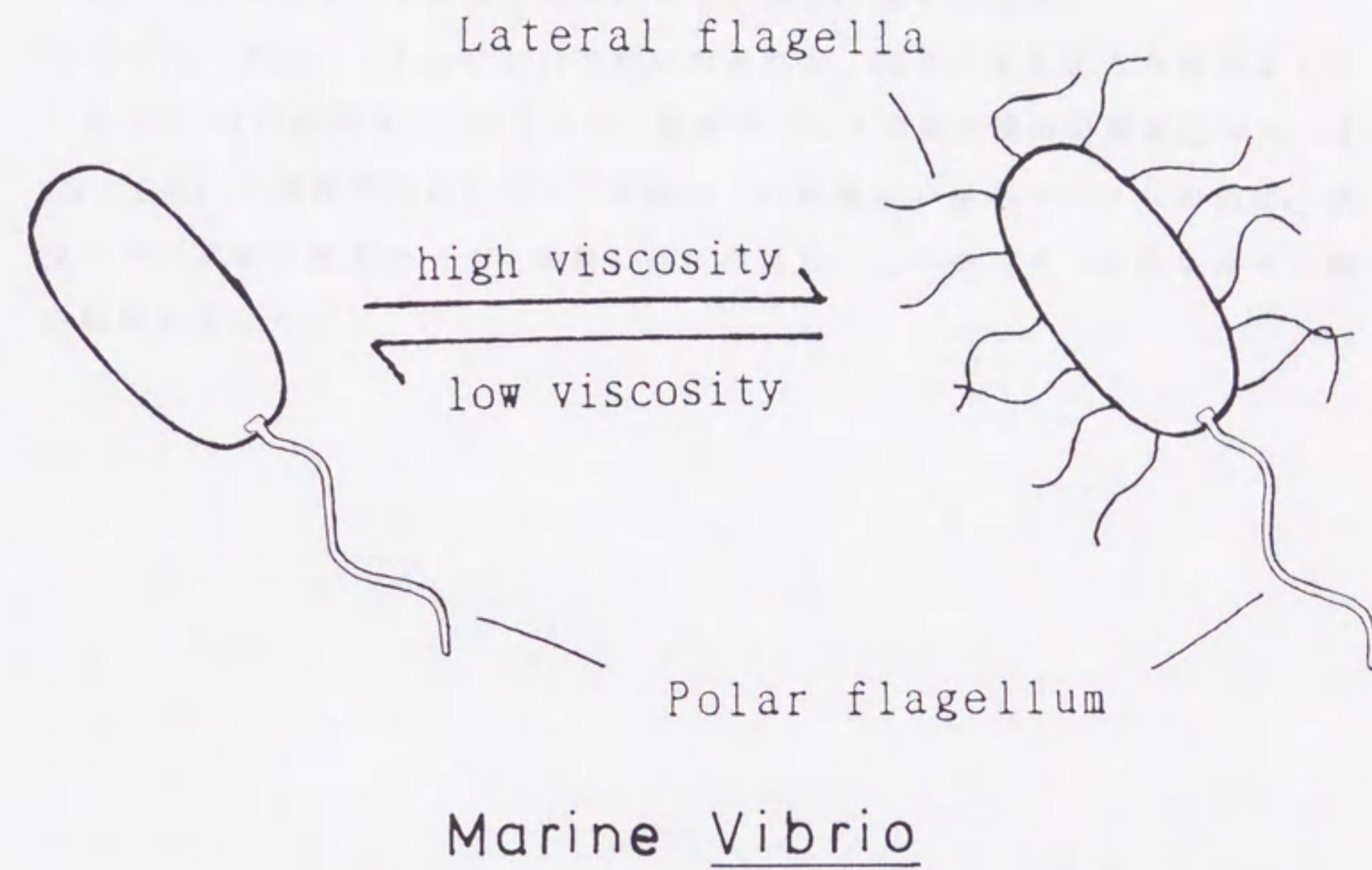
この化合物は、2,4,6-トリアミノ-1,3,5-トリアジン-2-イルアミンの誘導体として知られている。

図III アミロライドとその誘導体フェナミルの構造式。

3. ビブリオ菌の持つ2種類の鞭毛モーターと呼吸と共役した Na⁺ポンプについて

海洋性のビブリオ菌は、Na⁺駆動型の極毛モーターを持つことが明らかになっている[3]。この菌の特徴の一つは、その呼吸系に通常のH⁺ポンプを持つだけでなく、呼吸と共役したNa⁺ポンプを持つことである[8-9]。このNa⁺ポンプは中性では活性が低く、pHが高くなるとともに活性も高くなりpH 8.5で活性は十分に高い。したがって、この菌に対しH⁺イオノフォアである carbonyl-cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) を作用させると、中性ではH⁺駆動力とH⁺駆動力から二次的に形成されるNa⁺駆動力の両方が喪失するため、極毛モーターの回転も停止する。これに対してpH 8.5では、CCCPを加えるとH⁺駆動力は0となるが、Na⁺駆動力は維持されるので極毛モーターの回転は停止しない。これは、CCCPを加えてもNa⁺ポンプの働きにより膜電位が維持されるが、CCCPの作用により膜電位と釣り合ってH⁺駆動力が0になるまでH⁺が流入するためである[10]。従って、この菌ではH⁺駆動力とNa⁺駆動力を分離して扱うことができるという、エネルギー論的解析を行う上で大きな利点を持っていることになる。

ビブリオ菌のもう1つの特徴は、極毛の他に形態的に異なる側毛を持つことである[11]。側毛の発現は、図IVに示すように培地の粘性に対応して制御されている[12, 13]。粘性が低い液体培地中では、極毛のみ発現する。極毛は1菌体につき一本だけ生えており、また、鞘(外膜)を被っている。一方、粘性の高い液体培地や、寒天濃度1.5%の寒天培地上などの表面で生育すると、形態変化が起こり、菌体が長くなると共に極毛の他に側毛が発現する。側毛は1菌体につき100本程度生えるといわれており、また、鞘を被っていない。この側毛により菌体は高粘性の液体培地中を遊泳したり、寒天濃度1.5%の寒天培地などの表面を動き回り、スワームを形成することが知られている[11-13]。この様に極毛と側毛は、形態的にも機能的にも異なるものであるが、最近になって、側毛も鞭毛モーターにより回転している事が分かった[12]。極毛モーターはNa⁺駆動型であるが、この側毛を回転させている鞭毛モーター(側毛モーター)については、殆ど研究されておらず、そのエネルギー源も不明である。



図IV 海洋細菌のビブリオ菌の2種類の鞭毛の模式図。培地の粘性が低い時は極毛のみ発現しているが、培地の粘性が高くなると極毛の他に側毛が多数発現することが知られている。



4. 研究目的

以上のような背景のもとに、私は種々の阻害剤を解析に利用できる Na^+ 駆動型鞭毛モーターに注目し、そのエネルギー変換機構の解析を試みた。まず、アミロライドを用いてエネルギー変換ユニットに変異を持つ株の分離を試みたが、アミロライドが生育阻害を起こすことを見いだしたために、

(1) アミロライドの誘導体の中から生育阻害を起こさないものの探索、

(2) アミロライドで生育阻害が起きない条件、菌株の探索

を行った。次に、(1)において見いだされた、図Ⅲに示すような構造をしたフェナミル[7]を用いて、エネルギー変換ユニットの変異株の分離を行った。また、(2)の過程で用いたピブリオ菌が Na^+ 駆動型の極毛モーターの他に、共役イオン不明の側毛モーターを持つ点に注目し、そのモーターのエネルギー源の解析を行った。

実験材料と実験方法

1. 菌株と生育条件

好アルカリ性細菌に関する実験には、主に *Bacillus firmus* RAB 株 [14] のストレプトマイシン耐性変異株を用いた。ストレプトマイシン耐性菌は、200 μ g/ml のストレプトマイシンを含む寒天培地上で生育する突然変異株として分離し、RA-1 と命名した。必要に応じて好アルカリ性 *Bacillus* の 202-1 株、YN-1 株、8-1 株、*Bacillus alcalophilus* ATCC 27647 株 [15] 及び YN-2000 株 [4] を用いた。その他、中性菌として、枯草菌 RM-125 株 [16]、*Bacillus sphaericus* 9602 株 [17]、及び大腸菌 RP487 株 [18] を用いた。海洋性のビブリオ菌は *Vibrio alginolyticus* の野生株 138-2 株、Na⁺ポンプ欠損株 NapI 株 [10]、腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) の野生株 BB22 株、極毛のみ持つ変異株 RS313 株 (*laf-313::mini-Mu lux tet^r*) 及び側毛のみ持つ変異株 ML34 株 (*fla-340::mini-Mu lac tet^r*) [13] を用いた。なお、ML34 株の側毛は培地の粘性によらず常に発現している [13]。

好アルカリ菌の培養には特に断わらない限り AB-4 培地 (pH 9.5) [15] を用いた。一部の実験では、RA-1 株は AB-5 培地 (1 l 当り polypeptone 5 g, yeast extract 0.75 g, glucose 5 g, KH₂PO₄ 0.75 g を溶解させたものに 0.01 % MgCl₂, 0.5 mM NaCl, 23 mM K₂CO₃ を加えたもの: pH 9.5) で培養した。原子吸光法により測定した AB-5 培地の Na⁺濃度は 5 mM である。中性菌はトリプトン培地 (1 % tryptone, 0.5 % NaCl) に 10 mM DL-lactate を加えたもので培養した。

海洋性ビブリオ *V. alginolyticus* は、500 mM NaCl の代わりに 50 mM NaCl, 250 mM KCl を含む complex medium [10] で培養した。また、腸炎ビブリオは特に断わらない限りディフコ社製の 2216 marine broth で培養した。培地の粘性を上げる場合には、polyvinylpyrrolidone-360 (PVP) [13] を加えた。

培養は各培地において腸炎ビブリオは 30°C で、その他の菌株は 35°C で振とう培養し、濁度を No. 66 のフィルターをつけた Klett-Summerson colorimeter により測定した。

2. 遊泳速度の測定

遊泳速度の定量は、今栄らの方法[15]に準じて行った。又、必要に応じて、再生画面をコマ送りにし、菌の動きを直接画面からトレースして遊泳速度を測定した。

対数増殖後期の菌を遠心により集菌し、遊泳培地に懸濁して菌の濃厚溶液を作る。好アルカリ性細菌の場合には、遊泳培地として、 Na^+ 5 mM を含む TG 培地[15] (25 mM Tris-HCl (pH 9.5), 5 mM glucose) を用いた。中性菌の場合には、50 mM KCl を含む TG 培地 (pH 7.5) を用いた。海洋性ビブリオ菌の場合には特に断わらない限り、必要に応じて 50 mM NaCl を含む TG 培地 (pH 7.5, pH 8.5)、又は HEPES 緩衝溶液 (50 mM HEPES-choline (pH 7.0), 10 mM MgCl_2 , 5 mM glucose) を用いた。

遊泳速度の測定は、菌の濃厚溶液を目的の条件の Na^+ 濃度及び試薬を含む遊泳培地に 200 倍に希釈して測定した。 Na^+ 濃度を変化させる場合には適量の塩化コリンまたは KCl を加えてイオン強度を一定に保った。ビブリオ菌の遊泳速度を測定する場合は必要に応じて 10 mM にセリンを加え、菌の遊泳方向の変化を抑制した[19]。遊泳培地の粘性を上げる必要がある場合には PVP を加えた。一部の実験では生育培地中の菌を直接遊泳速度の測定に用いた。測定は全て 25°C で行った。

3. 遊泳速度の速度論的解析

Na^+ 駆動型鞭毛モーターによる遊泳速度、 Na^+ 濃度及び阻害剤の関係に対する速度論的解析は杉山ら[6]により報告されている以下に示す方法により行った。 Na^+ 駆動型鞭毛モーターでは、モーターを通して菌体内に流れ込む Na^+ の流入速度が遊泳速度に反映されているはずである。そこで、遊泳速度から Na^+ の流入速度を見積ることにした。

まず、菌の遊泳速度が Na^+ の内向きの流れの関数であると仮定する。液体中を一定速度 v で泳いでいる菌は、菌形を半径 r の球で近似すると、粘性抵

抗に対して単位時間あたり $6\pi\eta rv^2$ の仕事をする。但し η は液体の粘性係数である。一方、単位時間あたりモーターを通る Na^+ の内向きの流れを J とすると、単位時間当り菌が受け取るエネルギーは $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+} \cdot J$ となる。このエネルギーが鞭毛モーターによって、効率 ε で推進エネルギーに変換されるとすると、推進エネルギーが全て粘性に対する仕事に使われるため、

$$\varepsilon \cdot \Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+} \cdot J = 6\pi\eta rv^2$$

となる。これを J について解くと、

$$J = \frac{6\pi\eta rv^2}{\varepsilon \cdot \Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}}$$

となる。すなわち Na^+ の内向きの流れ J は $\frac{v^2}{\varepsilon \cdot \Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}}$ に比例する。

この様にして見積った Na^+ の流入速度を酵素反応における反応速度に相当するものと考え、速度論的解析を行う。

4. 膜電位、菌体内 pH 及び α -アミノイソ酪酸の能動輸送活性の測定

膜電位、菌体内 pH 及び α -アミノイソ酪酸 (AIB) の能動輸送活性は、フィルター法を用いて測定した [15]。

膜電位の測定は AB-5 培地で培養した RA-1 株を遠心して (8000 rpm, 5分) 集菌し、新鮮な AB-5 培地に懸濁して、菌濃度を 1 ml 当り菌数 3×10^8 (蛋白量 1 ml 当り 0.11 mg) に調製する。各濃度にフェナミルを加え、35°C で 4 分間保温振とうした後、 $[^3\text{H}]$ triphenylmethylphosphonium ($[^3\text{H}]$ TPMP $^+$; 5 μM , 50 mCi/mmol) を加え、5 分間後に試料を濾過した。菌体内 pH の測定は同様にして、菌濃度を 1 ml 当り菌数 2×10^8 に調節した試料を用い、 $[^{14}\text{C}]$ methylamine (20 μM , 1 mCi/mmol) を加えて測定した。

AIB の能動輸送活性の測定は、同様に培養した菌を AB-5 培地の代わりに NaCl 5 mM、塩化コリン 45 mM を含む TG 培地 (pH 9.5) に懸濁し、菌濃度を 1 ml 当り菌数 8×10^8 に調製する。フェナミルを加えてから 6 分間保温振とうした後 $[^{14}\text{C}]$ AIB (100 μM , 0.2 mCi/mmol) を加え保温振とうし、5 分後に試

料を濾過した。

5. 変異株の分離

鞭毛モーターのフェナミル感受性が変化した変異株の分離には、変異誘起剤として ethyl methanesulfonate (EMS) [20]を用いた。RA-1 株を 150 mM NaCl を含む 25 mM トリス緩衝溶液 (pH 7.5) に懸濁し、菌濃度を 1 ml 当り 9×10^8 に調製する。7.6 ml の 1 M トリス緩衝溶液 (pH 7.4) と 0.4 ml の EMS を混合しておき、それに調製した菌懸濁液を 2 ml 加え、35°C で 5 分間保温振とうする。その後 AB-5 培地に 30 倍に希釈し、一晚 35°C で振とう培養した。次に、50 μ M フェナミルを含む寒天濃度 0.45% の AB-5 軟寒天培地上に一滴ずつ接種し、35°C で 12 時間培養した。野生株はこの条件下で全く swarm を形成しないので、明瞭な swarm を形成するものを変異株として分離し、純化した。分離した変異株については、ストレプトマイシン耐性及び、RA-1 株の運動を特異的に阻害する抗 RA-1 鞭毛抗体に対する感受性を調べ、RA-1 株由来のものであることを確認した。

6. 薬品及び抗鞭毛抗体

アミロライド及び PVP は米国 SIGMA 社の製品を用いた。フェナミル [7] は元メルク社の Cragoe 博士に合成していただいた。[3 H]TPMP $^+$ は、エール大学の Macnab 博士からいただいた。その他のアイソトープ標識化合物はデュポン社 (DuPont, NEN Research Products (Boston, Mass)) の製品を用いた。抗 RA-1 鞭毛抗体は精製した RA-1 の鞭毛をうさぎに注射して調製した。

結 果

第一章 Na^+ 駆動型鞭毛モーターに対するフェナミルの作用機作の解析と フェナミルを用いた鞭毛モーターの変異株の分離

1-1 好アルカリ性 *Bacillus* RA-1 株の生育に対するアミロライド 及びフェナミルの影響

好アルカリ性細菌の鞭毛モーターは、動物細胞の持つ Na^+ チャネルや、 Na^+/H^+ 交換輸送系の阻害剤として知られるアミロライド及びその誘導体により特異的かつ Na^+ と拮抗的に阻害される[6]。したがって、アミロライドによって阻害を受けなくなった鞭毛モーターを持つ変異株を分離すれば、エネルギー共役部位に変異を持つものも分離出来ると期待される。しかし Na^+ 駆動型鞭毛モーターを持つ *Bacillus firmus* RA-1 株の生育は、アミロライドにより阻害されることが分かった。図1-1 Aに示す様に、 Na^+ 5 mMの生育培地中で対数増殖中の RA-1 株に、鞭毛モーターの回転をほぼ阻害する終濃度 0.4 mMのアミロライドを加えると、30分は生育を続けるが、その後生育が完全に阻害された。また、結果は示さないが、 Na^+ 濃度を 150 mMまで増加させても菌の泳ぎは回復するが、生育は回復しなかった。さらに他の好アルカリ性 *Bacillus* YN-1 株、202-1 株でも同様の結果が得られた。これらの結果からアミロライドによる生育阻害は、アミロライドが細胞膜を透過し、菌体内で何等かの二次的作用を起こした結果と考えられる。アミロライド存在下で生育中の菌を顕微鏡で観察すると、菌が分裂せずに細長くのびたり、菌形が異常になっていた。したがって、アミロライドは少なくとも細胞壁の合成に影響を与えていることは確かである。

いずれにせよ、アミロライドを使って変異株を分離することは極めて困難である。そこでアミロライドの誘導体の中から、鞭毛モーターの回転は阻害するが生育阻害を起こさないものの探索を行った結果、図IIIに示したフェナミル[7]が RA-1 株の生育をほとんど阻害しないことが分かった。図1-1 Bに示すように、 Na^+ 5 mMの生育培地中で対数増殖している RA-1 株に、フェナミルを

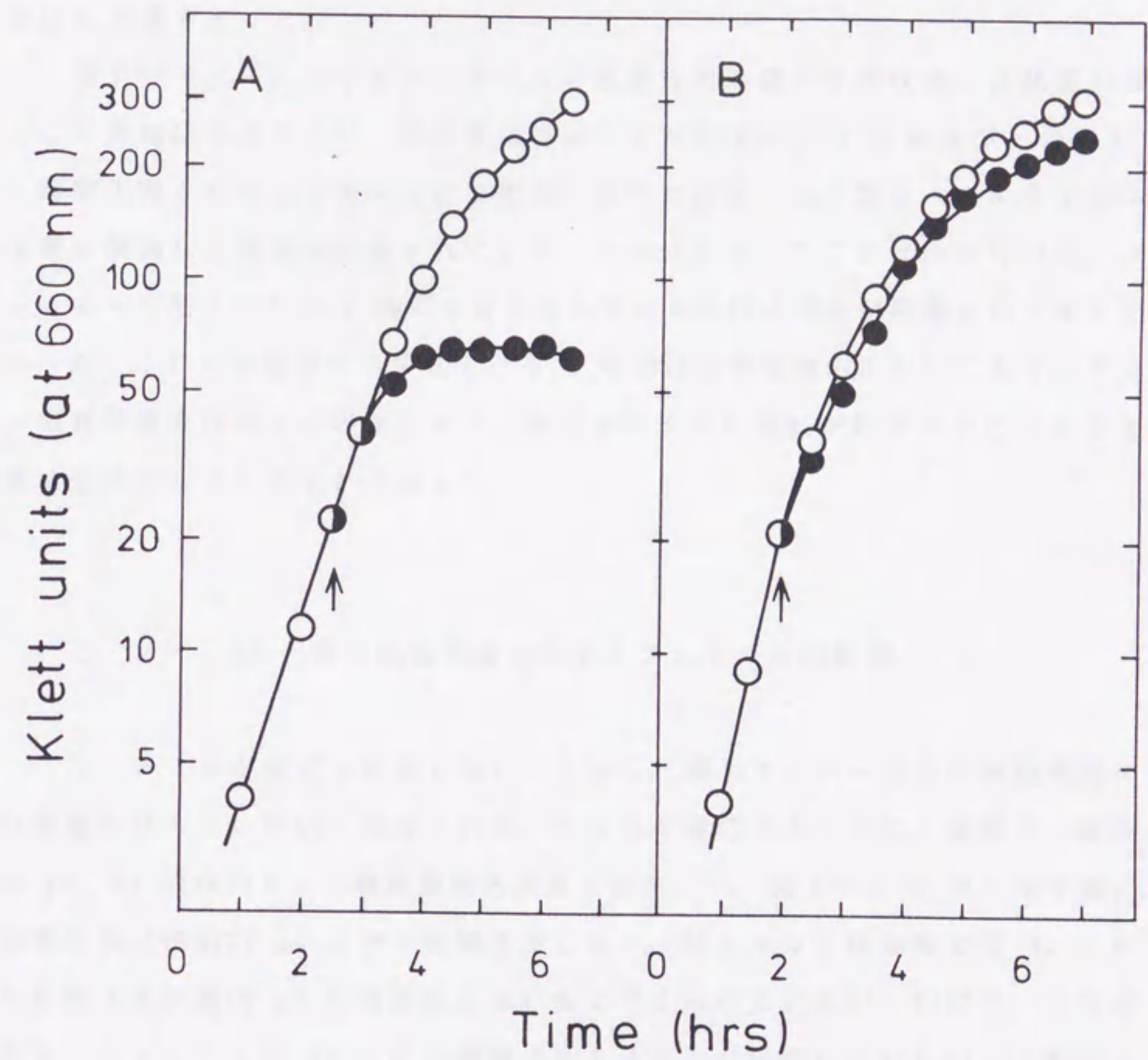
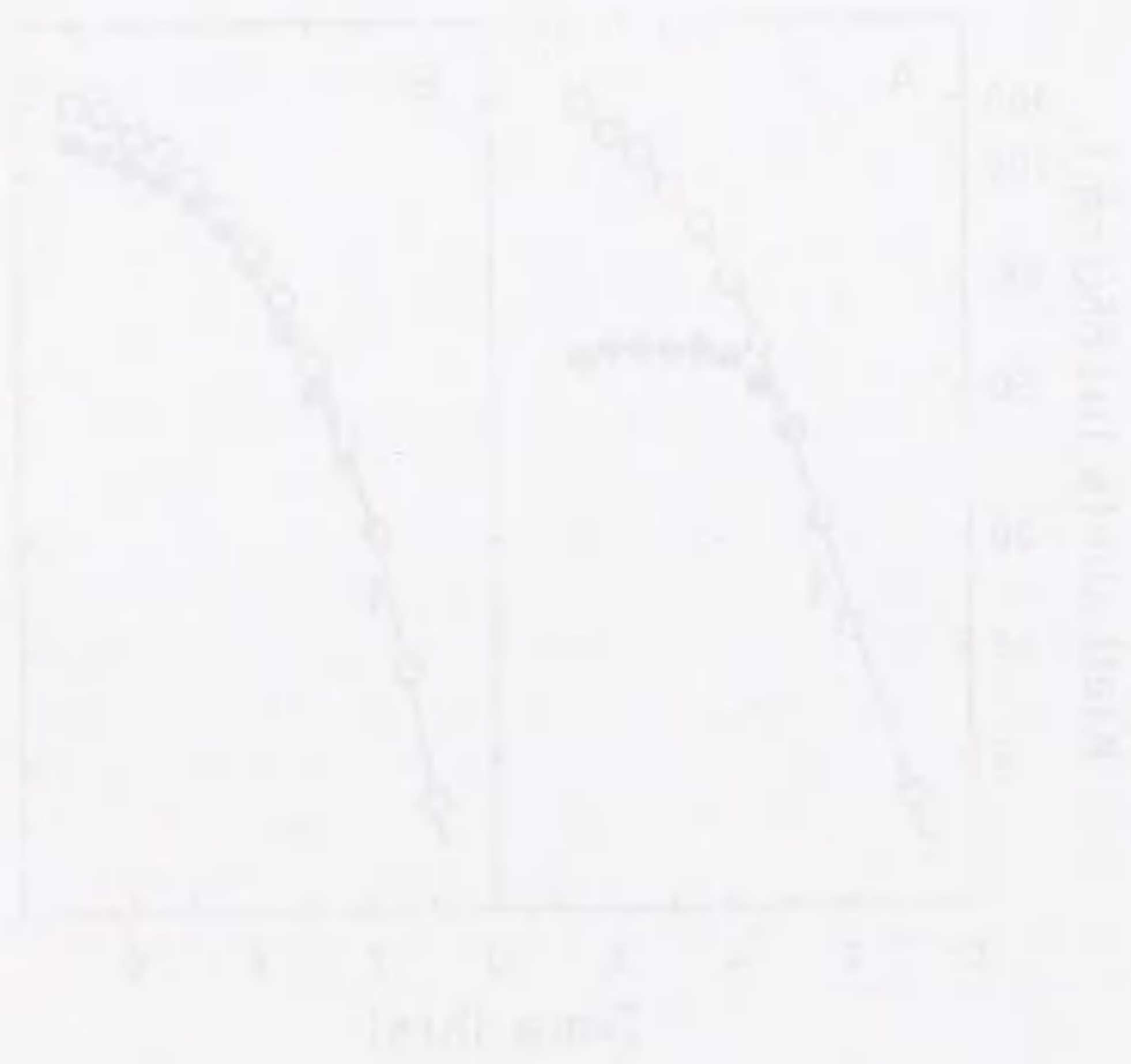


図1-1 好アルカリ性 *Bacillus* RA-1 株の生育に対するアミロライド及びフェナミルの影響。AB-5 培地中 (pH 9.5) で生育中の菌に、矢印で示した時間に 0.4 mM のアミロライド (A) 又は 50 μ M のフェナミル (B) を加えた。(○) は何も加えないもの、(●) はアミロライド又はフェナミルを加えたものを示す。



50 μM に加えてもほとんど正常に生育が続いた。この条件下で、菌の遊泳は直ちにしかも完全に阻害されが、菌形には異常は起こらず、寒天培地上での集落形成も正常であった。

鞭毛モーターに対するフェナミルの阻害作用が菌の生育状態には関係しないことを確認するために、各濃度にフェナミルを加えて 5 分後及びそのまま 1 時間生育させた後の遊泳速度を生育培地中で測定した。図 1-2 に示す様に、生育に関係なく運動が阻害されていることが分かる。ここには示さないが、フェナミルを加えてから 6 時間生育させた後にも同様に運動が阻害されたままであった。これらの結果から少なくとも 6 時間は生育培地中においてもフェナミルの有効濃度はほとんど変化せず、鞭毛モーターの回転が阻害されたままで正常に生育することが明かとなった。

1-2 RA-1 株の細胞機能に対するフェナミルの影響

フェナミルが生育を阻害しないことから、鞭毛モーター以外の細胞機能には影響を与えていないと期待される。この点を確認するために、膜電位、細胞内 pH、 Na^+ 依存的アミノ酸能動輸送活性を測定した。図 1-3 A, B に示す様に、膜電位及び細胞内 pH は全く影響を受けない。好アルカリ性細菌では Na^+/H^+ 交換輸送系が菌内 pH の調整をしていると考えられている [2, 3] ので、この結果は、フェナミルが Na^+/H^+ 交換輸送系をほとんど阻害していないことを示している。また図 1-3 C に示す様に、 Na^+ 依存的アミノ酸能動輸送活性もほとんど影響を受けないので、 $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ はほぼ正常に保たれていると考えられる。

このように、フェナミルが存在しても各細胞機能はほぼ正常に保たれていることが確認できた。したがって、フェナミルによる鞭毛モーターの阻害は、エネルギー源である $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ の低下や菌内 pH の変化によるタンパク質の変性などによる二次的な影響によるものではなく、直接的でかつ特異的なものと結論される。

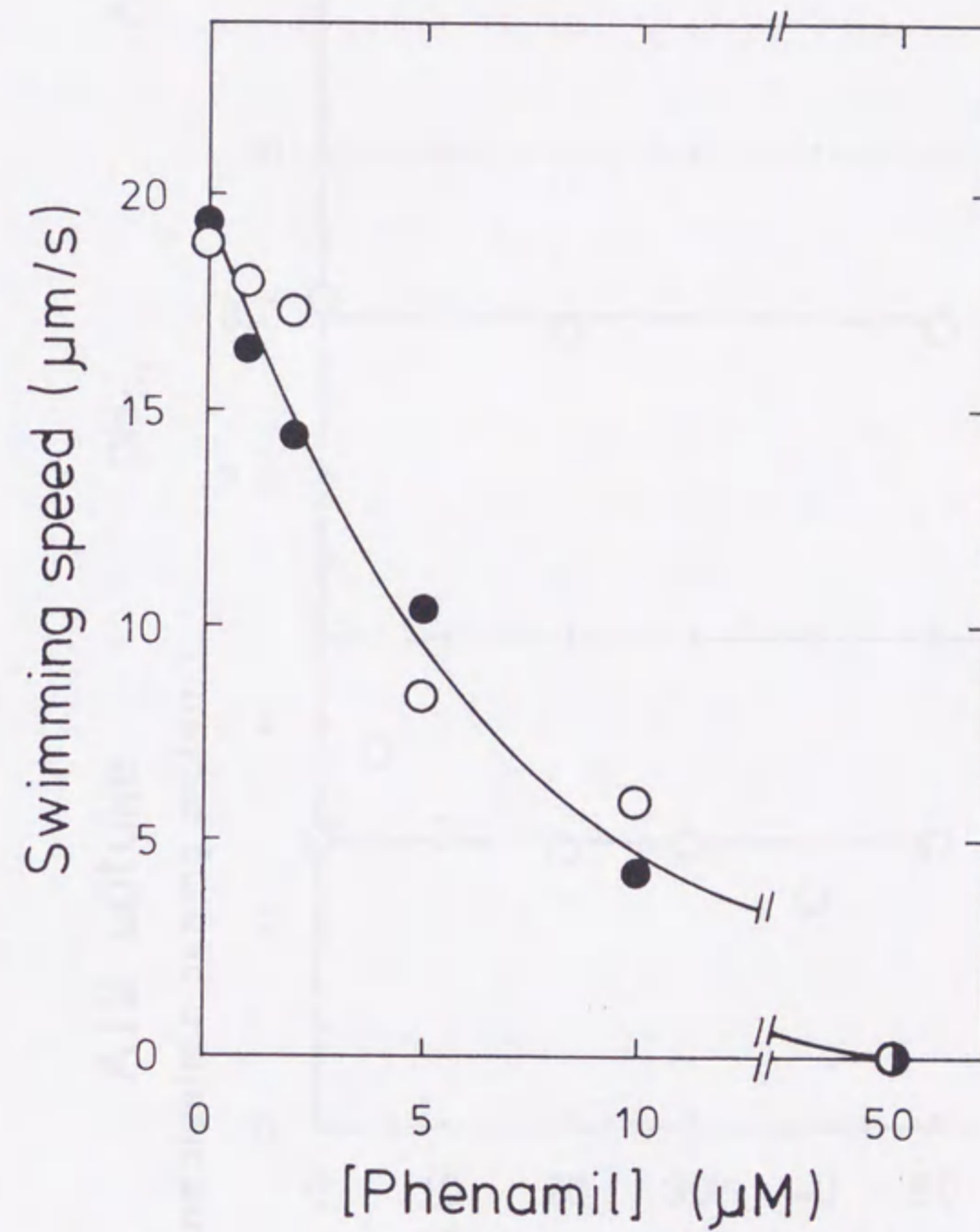


図 1-2 フェナミルを各濃度を含む AB-5 培地 (pH 9.5) で生育中の RA-1 株の遊泳速度。図 1-1 B の矢印で示す時刻に、各濃度にフェナミルを加え、培養を続けた。フェナミルを加えてから 5 分後 (○) 及び 1 時間後 (●) の遊泳速度を測定した。

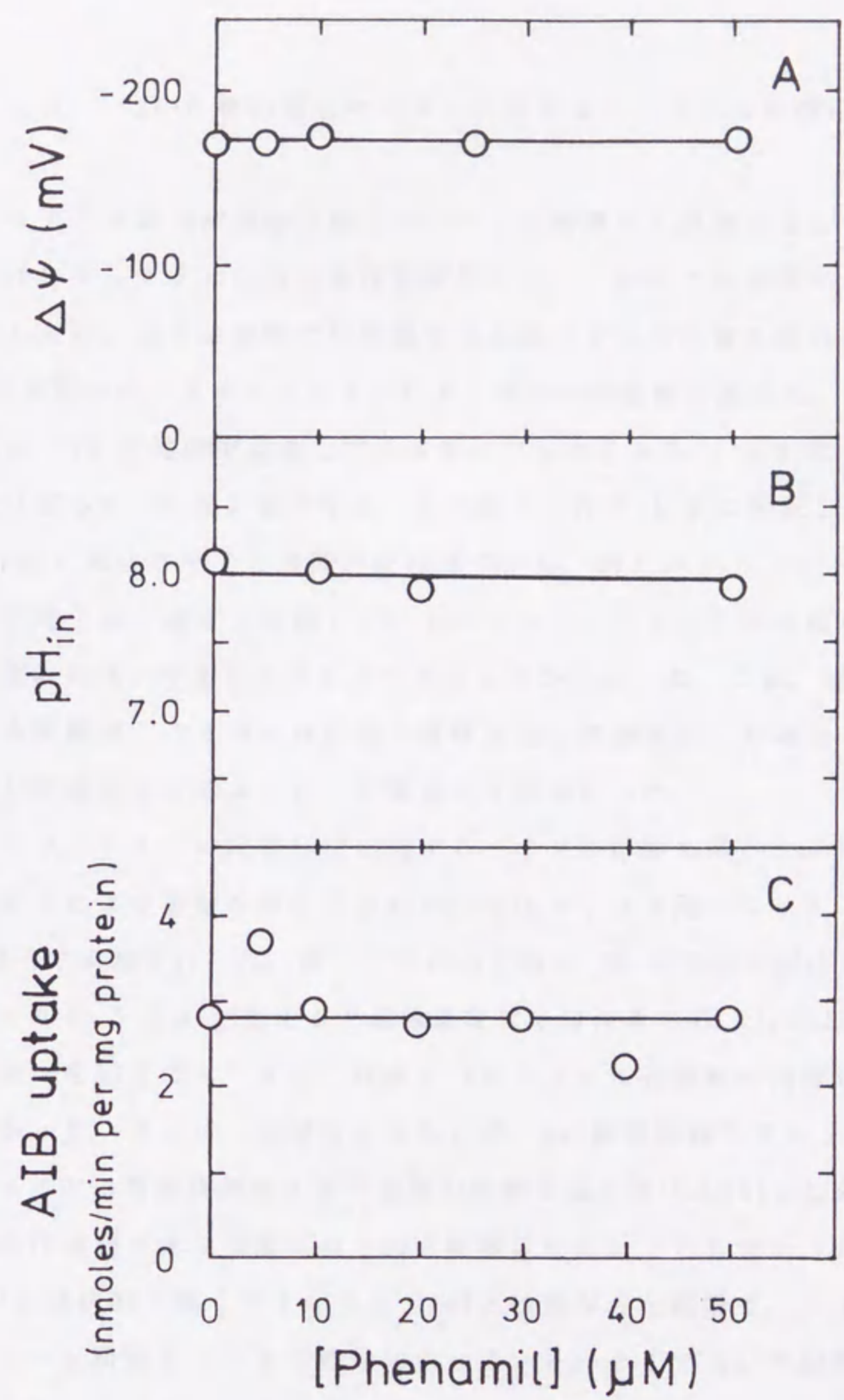
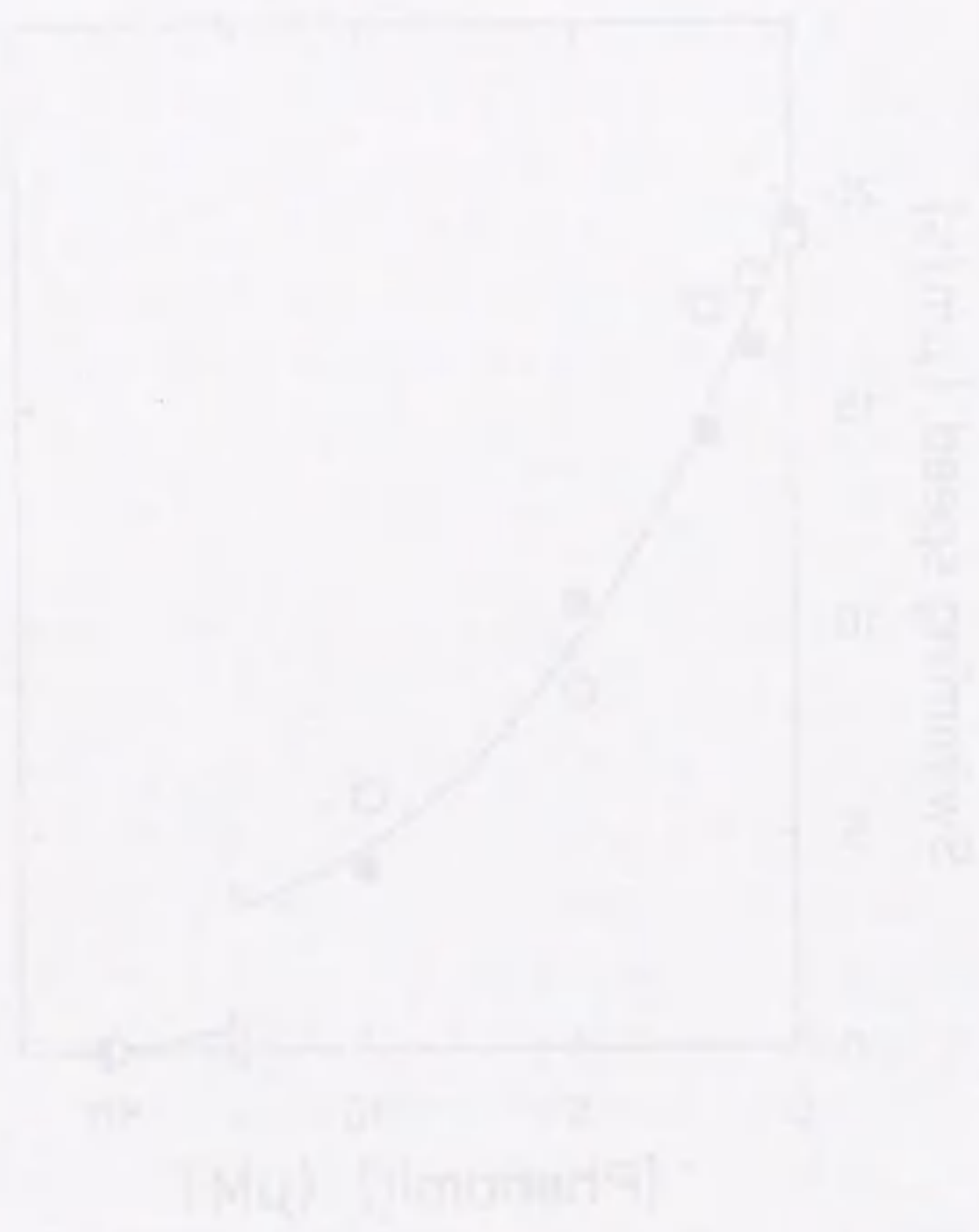


図1-3 各細胞機能に対するフェナミルの影響。A) 膜電位。AB-5 培地 (pH 9.5) に各濃度にフェナミルを加え、 $[^3\text{H}]\text{TPMP}^+$ の取り込み量で測定。B) 菌体内 pH。AB-5 培地にフェナミルを加え、 $[^{14}\text{C}]\text{methylamine}$ の取り込み量の測定および、外液 pH の pH メーターによる測定から、菌体内 pH を求めた。C) AIB の取り込み。AIB の取り込みは他のアミノ酸の影響を除くため TG 培地中 (NaCl 5 mM、塩化コリン 45 mM、pH 9.5) で行った。

1-3 RA-1株の鞭毛モーターに対するフェナミルの作用機作

フェナミルが Na^+ 駆動型鞭毛モーターを特異的に阻害することがわかったので、次にフェナミルの作用機作を解析した。これまでの測定には AB-5 培地を使用した。以下の実験では培地中の各種イオンの影響を除外するために TG 培地を用いた。まずフェナミルによる阻害の可逆性を調べた。図 1-4 に示すように、TG 培地中で遊泳している菌にフェナミルを $5 \mu\text{M}$ に加えると、遊泳速度は直ちに 50% に減少する。2 分後にそれを 5 倍に希釈してフェナミルを $1 \mu\text{M}$ に減少させると遊泳速度は速やかに、初めからフェナミルを $1 \mu\text{M}$ に加えた時と同じ値まで回復した。したがって、フェナミルの阻害作用は可逆的で、比較的速い平衡によるものであることが分かった。なお、途中で 5 倍にうすめる実験は、うすめる前に他の実験と同じ菌濃度にした場合と、うすめた後で同じ菌濃度になるようにした場合で大差無かった。

次にフェナミルの阻害作用に対するイオンの影響を調べた。なお、イオン強度の変化による影響を除外するため、塩化コリンを用いてイオン強度を 55 mM に保って実験を行った。図 1-5 に示す様に TG 培地中で遊泳している菌に、フェナミルを $5 \mu\text{M}$ に加えると遊泳速度は半分に落ちる。しかし、 K^+ 、 Li^+ などのイオンを加えても、また、同様に Na^+ を加えても運動の回復はほとんど起こらなかった。さらに、結果は示さないが、 Na^+ 駆動型鞭毛モーターに対するアミロライドの阻害作用がイオン強度の影響を強く受ける[6]のに対して、フェナミルの作用はイオン強度にほとんど影響されないことも分かった。この結果は、 Na^+ と拮抗的に働くアミロライド[6]とは異なった機構で、フェナミルが鞭毛モーターを阻害している可能性を示している。そこで Na^+ の影響をさらに詳しく調るために、フェナミル濃度を変化させて遊泳速度の Na^+ 依存性を調べた。なお、イオン強度は塩化コリンで 50 mM に保って実験を行った。

図 1-6 A に示すように、フェナミルを加えないときは Na^+ 濃度の増加と共に遊泳速度も上昇し、 Na^+ 10 mM でほぼ飽和し、 Na^+ 50 mM では $25 \mu\text{m/s}$ に達する。フェナミルを 1, 2, 5, 10 μM と加えると遊泳速度は減少するが、 Na^+ 濃度を 50 mM まで増加させても泳ぎは回復しない。ここには示さないが、 Na^+ 濃度を 150 mM にしても泳ぎはほとんど回復しない。これらの結果に基づき、

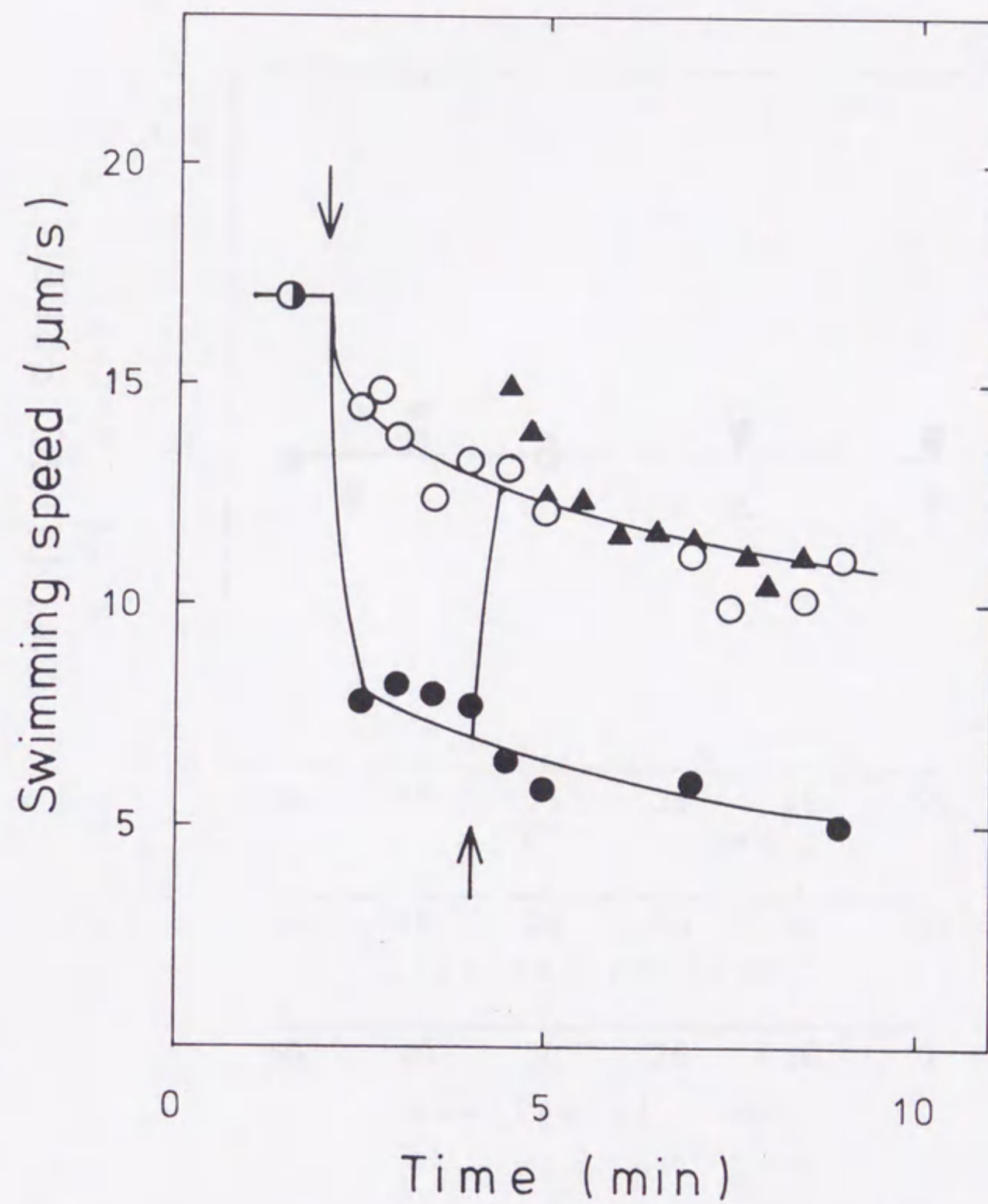


図1-4 フェナミルの鞭毛モーターに対する障害の可逆性。NaCl 5 mM、塩化コリン 45 mM を含む TG 培地 (pH 9.5) で遊泳中の RA-1 株に、始めの矢印で示す時刻にフェナミルを 1 μ M (○) 又は、5 μ M (●) に加えた。次の矢印で示した時刻に、フェナミルを 5 μ M に加えた試料を 5 倍に希釈してフェナミル濃度を 1 μ M にした (▲)。



SWIMMING SPEED
(% OF CONTROL)

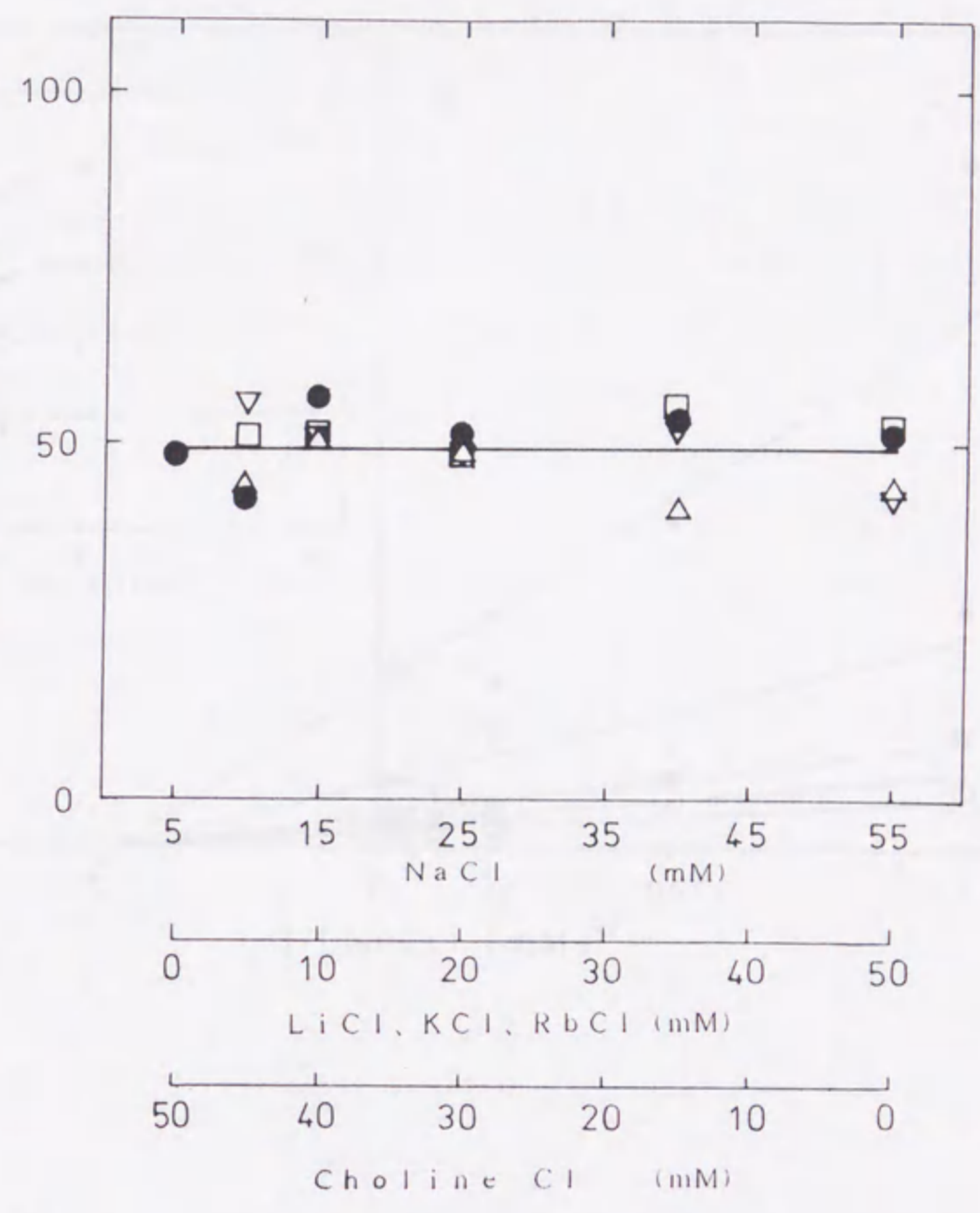


図1-5 フェナミルの鞭毛モーター阻害に対する陽イオンの影響。NaCl 5 mM の TG 培地に NaCl (●)、LiCl (△)、KCl (□)、RbCl (▽) を種々の濃度に加えた後、フェナミルを 5 μM に加えた。フェナミルを加えないときの値を 100 % として表示してある。但し Na⁺については終濃度は 5 mM から 55 mM である。なお、イオン強度の影響を除外するため塩化コリンを用いて塩強度を 55 mM に合わせて測定した。

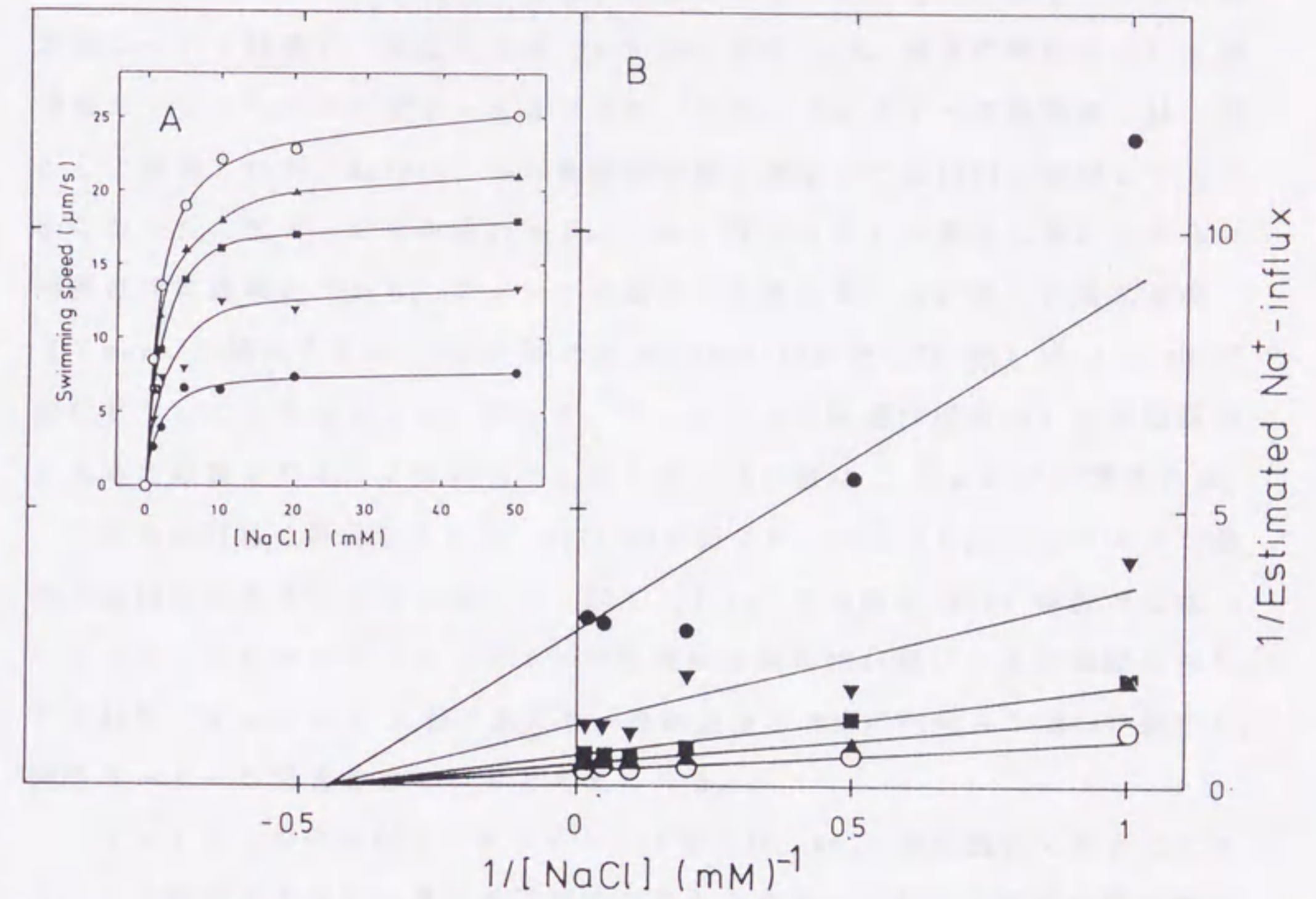


図1-6 フェナミルによる RA-1 株の遊泳阻害効果に対する Na^+ 濃度の影響。菌を、各濃度に NaCl を含む TG 培地 (pH 9.5) に懸濁した。次に、フェナミルを $0 \mu\text{M}$ (○), $1 \mu\text{M}$ (▲), $2 \mu\text{M}$ (■), $5 \mu\text{M}$ (▼), $10 \mu\text{M}$ (●) と加え、1 分後に遊泳速度を測定した。なお、溶液のイオン強度は塩化コリンを用いて 50 mM に合わせた。(A) は測定値を示し、(B) は (A) で示した測定値を、実験材料と実験方法の項で示した杉山らの方法 [6] で処理した後、両逆数プロットしたものである。縦軸はモーターを通過して流れ込む Na^+ の推定量の逆数で、単位は $\text{V} \cdot \text{s}^2 \cdot \mu\text{m}^{-2}$ 。横軸は Na^+ 濃度の逆数。なおシンボルは (A) と同じ。

鞭毛モーターに対する Na^+ とフェナミルの関係をはっきりさせるために、杉山ら[6]により報告された速度論的解析を行った。

フェナミルが Na^+ の内向きの流れを阻害していると考え、図1-6Aの測定値について計算し、推定される Na^+ の流入速度と Na^+ 濃度の関係について両逆数プロットしたのが図1-6Bである。なお、エネルギー変換効率 ε は一定として計算したが、Meister らが連鎖状球菌で測定した値[21]を使用しても大差なかった。図1-6Bからわかるように、各フェナミル濃度において両者の関係はほぼ直線的であり、フェナミル濃度の上昇に従い Na^+ 流入の最大速度 (V_{\max}) が減少するが、 Na^+ に対する Michaelis 定数 (K_m 値) は 2.2 mM で変化しないことが分かった。従って、フェナミルの阻害作用は Na^+ と非拮抗的であると結論される。この場合フェナミルの K_i 値は 1.5 μM と計算された。

さらに同様の仮定を用いて、Hill の直線プロットを行い、フェナミルの阻害に協同性があるかどうか調べた(図1-7)。その結果 Hill 係数はほぼ 1 になった。したがって、フェナミルの阻害には協同性が無いことが確認された。すなわち、フェナミル 1 分子あたり一定の割合で Na^+ の内向きの流れが減少し、鞭毛モーターが阻害されていると考えられる。

フェナミルの作用がアミロライドとは異なり、 Na^+ と非拮抗的であることから、その作用点が互いに異なる可能性が考えられる。しかし、両者の構造的類似性(図III)から、フェナミルも Na^+ 駆動型鞭毛モーターのエネルギー変換ユニットに作用するが、アミロライドとは異なる部位で作用している可能性が考えられる。

1-4 他の菌株の持つ鞭毛モーターに対するフェナミルの効果

アミロライドの鞭毛モーターに対する阻害効果が溶液のイオン強度に影響される[6]のに対して、フェナミルの阻害効果はイオン強度の影響を受けないことから、フェナミルは、生育に異なるイオン強度を要求する種々の菌株に対して広く使用することができる。そこで、RA-1 株以外の菌株について、遊泳に対するフェナミルの影響を調べた(表1)。

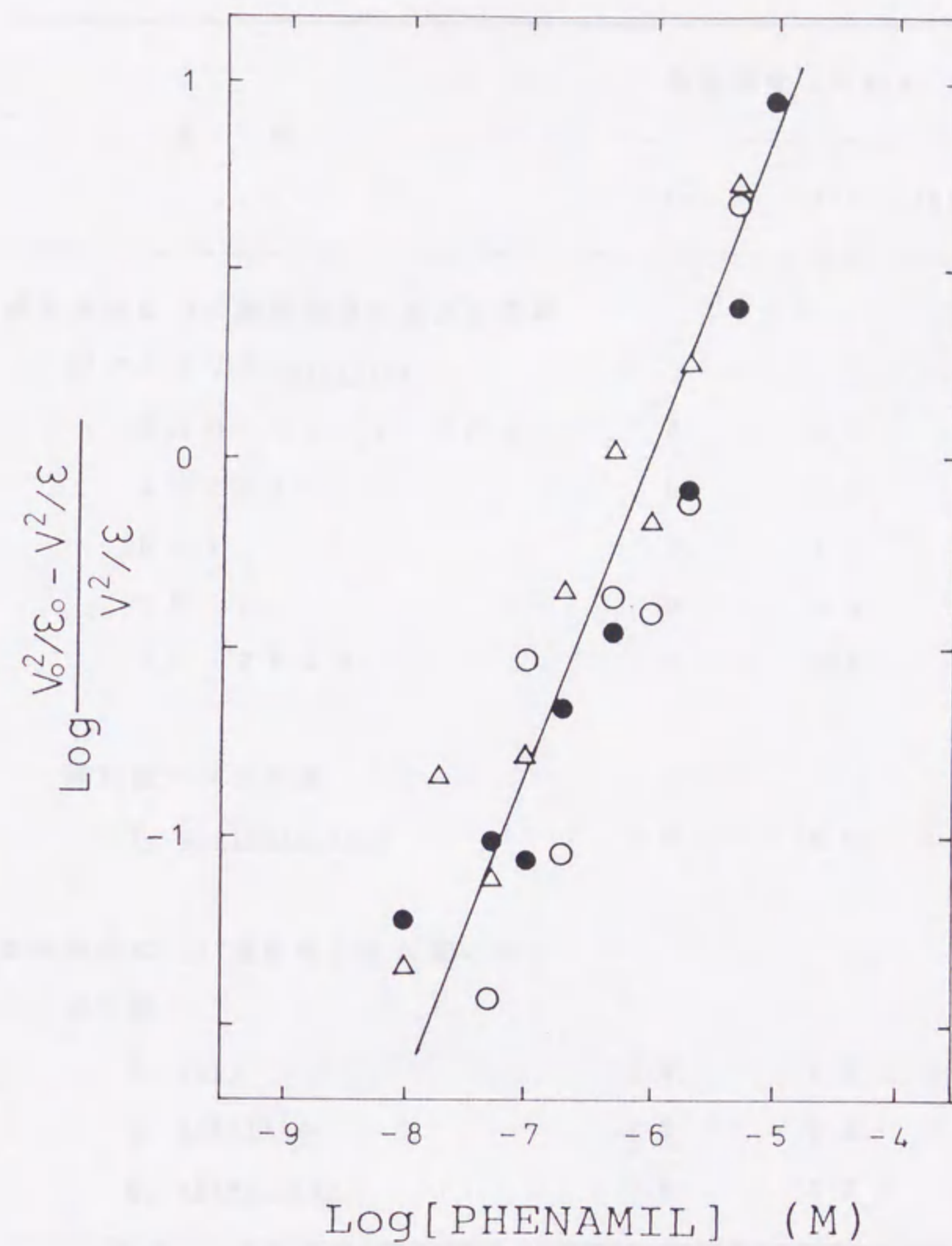


図1-7 モーターを通る Na⁺の流入に対するフェナミルの阻害の Hill プロット。図1-6と同様にして Na⁺の流入量を推定し、そのフェナミルによる阻害の Hill プロットを NaCl 5 mM、塩化コリン 45 mM の TG 培地中 (○)、NaCl 50 mM の TG 培地中 (●)、Na⁺ 5 mM の AB-5 培地中 (△) で測定したものについて行った。

表1 色々な菌株の遊泳速度に対するフェナミルの効果

菌 株	遊泳速度 ($\mu\text{m/s}$) [注1]		
	-Na ⁺	+Na ⁺	+Na ⁺ +フェナミル
遊泳速度に Na ⁺ 濃度依存性がある菌株			
好アルカリ性 <i>Bacillus</i>			
RAB (RA-1) [注2]	0	22	0
202-1	0	41	0
8-1	0	19	0
YN-1	0	28	6
YN-2000	0	21	6
海洋性ビブリオ菌			
<i>V. alginolyticus</i>	0	69	1
遊泳速度に Na ⁺ 濃度依存性がないもの			
中性菌			
<i>E. coli</i>	28	29	33
<i>B. subtilis</i>	22	21	22
<i>B. sphaericus</i>	35	37	36

注1 遊泳速度は TG 培地中で測定した。培地の pH は、好アルカリ性細菌の場合は 9.5、中性菌及びビブリオ菌の場合は 7.5 である。好アルカリ性細菌と中性菌の場合には 50 mM KCl (-Na⁺) 又は、50 mM NaCl (+Na⁺) を加えた。ビブリオ菌の場合には 400 mM KCl (-Na⁺) 又は、400 mM NaCl (+Na⁺) を加えた。フェナミルは終濃度 100 μM になるように加えた。

注2 遊泳速度は pH 7.5 においても顕著な Na⁺濃度依存性を示し、しかも 100 μM フェナミルにより完全に阻害された。

まず、 Na^+ 駆動型鞭毛モーターを持っていることが分かっている[3, 4, 10, 15]、偏性好アルカリ性 *Bacillus* の RAB 株、202-1 株、8-1 株、YN-1 株、通性好アルカリ性 *Bacillus* の YN-2000、及び、海洋性ビブリオ菌の *Vibrio alginolyticus* の極毛モーターは、いずれもフェナミルによって顕著な阻害を受けた。一方、 H^+ 駆動型鞭毛モーターを持っていることが分かっている[1]、大腸菌 (*E. coli*) や中性で生育する *Bacillus* 属の菌株の遊泳はフェナミルによって阻害を受けなかった。結果は示さないが、少なくともこの実験に使用した濃度のフェナミルは、これらの菌株の生育にも影響を与えなかった。これらの結果から、フェナミルは Na^+ 駆動型鞭毛モーターを特異的に阻害し、 H^+ 駆動型鞭毛モーターには影響を与えないことが分かった。

1-5 フェナミルを用いた鞭毛モーターの変異株の分離と解析

フェナミルが Na^+ 駆動型鞭毛モーターを特異的に阻害することが分かったので、次にフェナミルを用いてエネルギー変換ユニットの変異株の分離を行った。フェナミルを $50 \mu\text{M}$ に含む軟寒天培地上で、RA-1 株はほとんど swarm しない。そこで、RA-1 株を EMS 処理した後、この条件で swarm する変異株を選別し、RA-23, 24, 26, 27, 30 と命名した。図 1-8 は分離した変異株を $50 \mu\text{M}$ フェナミルを含む軟寒天培地上に接種し、 37°C で 12 時間保温培養したものである。野生株がほとんど swarm しないのに対して、変異株は、種々の大きさに swarm している。

Swarm の大きさは、菌の遊泳速度の他に遊泳時の方向転換頻度や生育速度などの違いにより大きく左右されるため、swarm の大きさからは定性的なことしか分からない。そこで、これらの変異株について、溶液中における遊泳速度のフェナミル濃度依存性を調べた。図 1-9 に示すように、TG 培地中では、野生株の遊泳速度は $50 \mu\text{M}$ フェナミルにより完全に阻害されるのに対して、軟寒天培地上で大きな swarm を形成していた RA-30 株は、 $400 \mu\text{M}$ までフェナミルを加えても遊泳速度は完全には 0 にはならず、フェナミルに対する感受性の変化した変異株が分離できたことが確認できた。さらに、変異株は RA-27 株

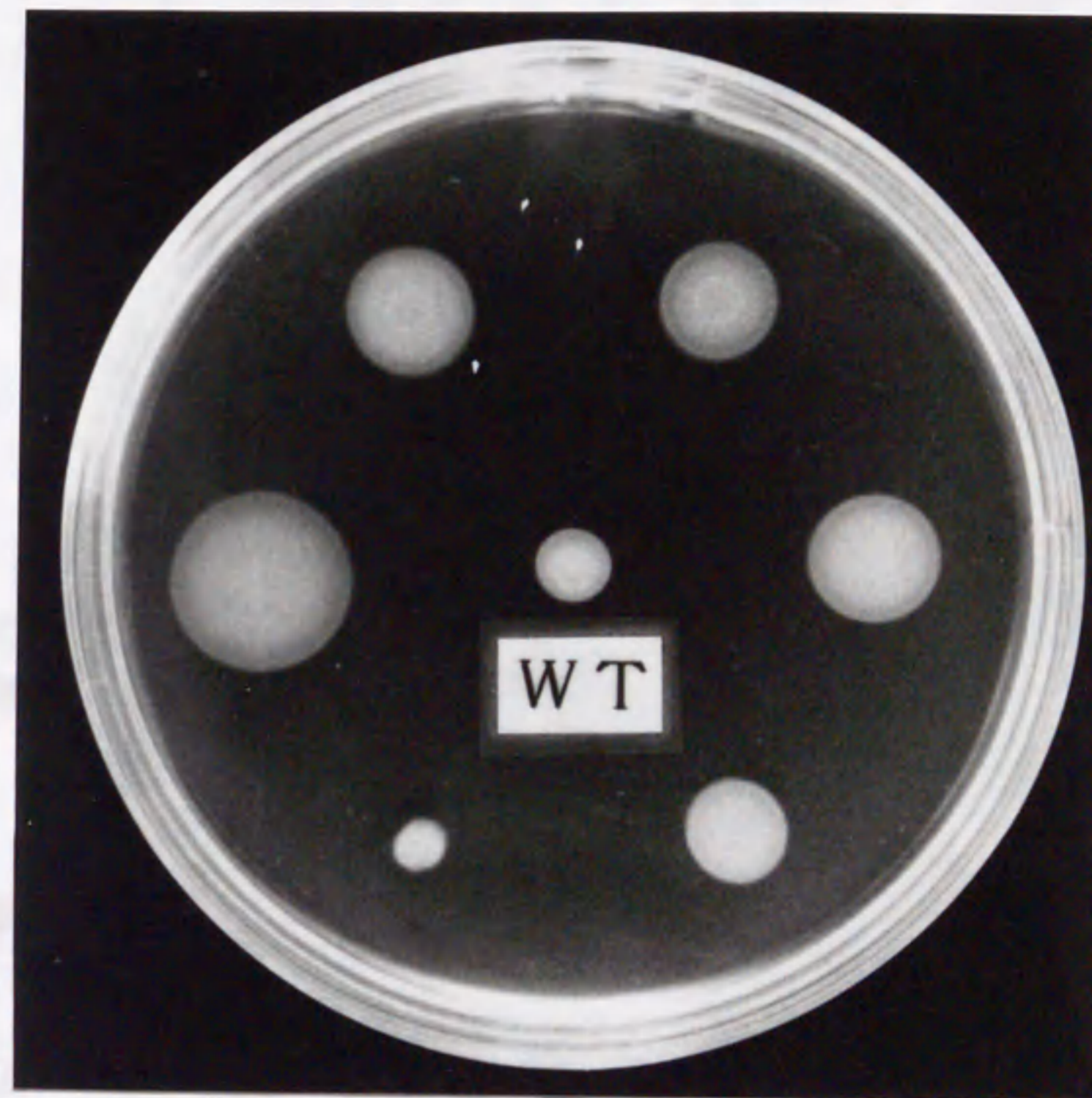


図 1-8 フェナミルを用いて分離した変異株を 50 μ M フェナミルを含む軟寒天培地上 (AB-5) に接種し、37°C で 12 時間培養したもの。中央が野生株 RA-1。左上から反時計回りに RA-23、RA-24、RA-25、RA-26、RA-27、RA-30。なお、RA-25 株は他の変異株と同時に分離したが、フェナミルに対する感受性に変化がみられなかったもの。

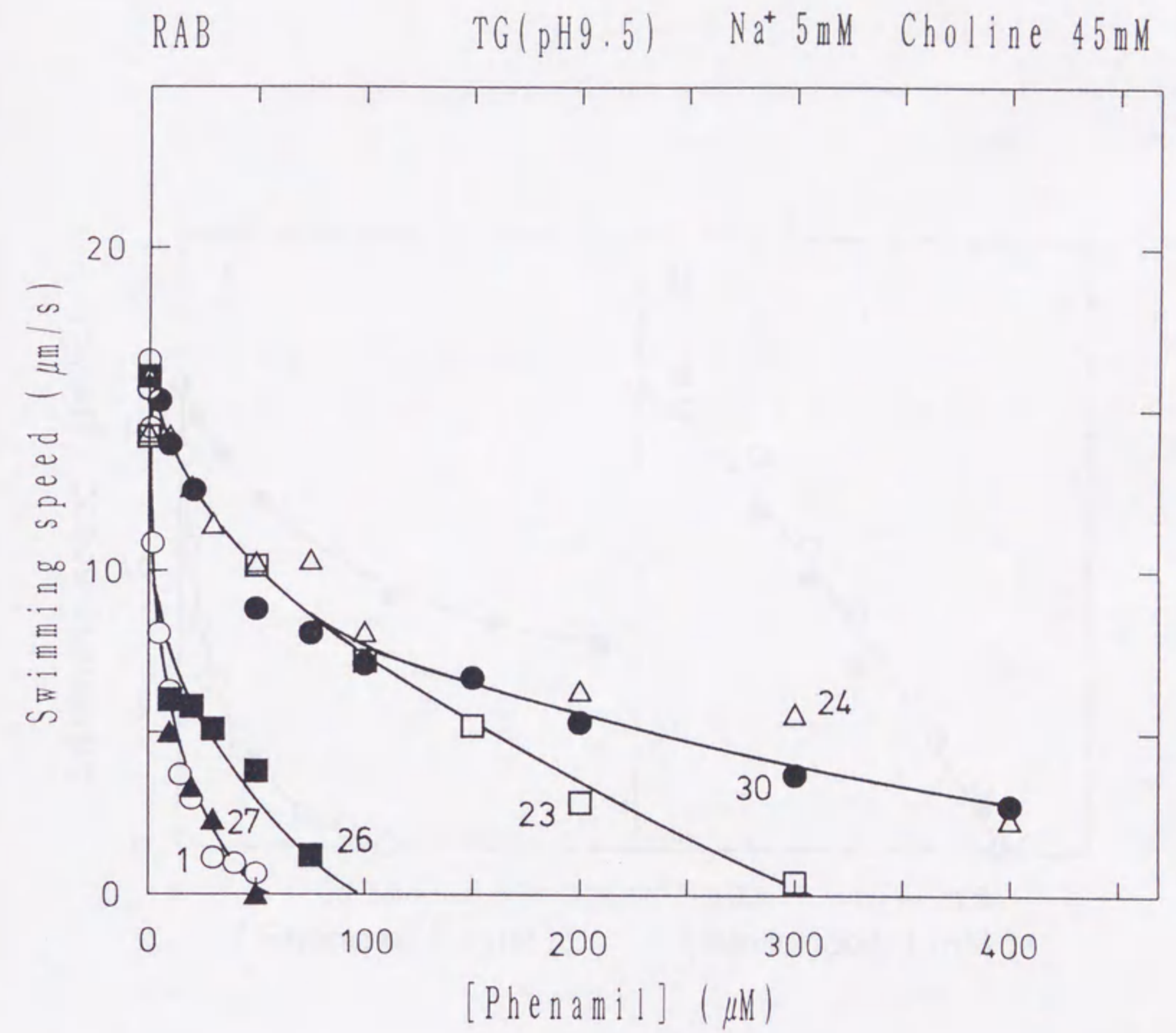


図1-9 フェナミルを用いて分離した変異株の遊泳速度に対するフェナミルの影響。NaCl 5 mM、塩化コリン 45 mM を含む TG 培地中 (pH 9.5) においてフェナミル濃度を変化させて遊泳速度を測定した。図中記号は RA-1 (○)、RA-23 (□)、RA-24 (△)、RA-26 (■)、RA-27 (▲)、RA-30 (●)。

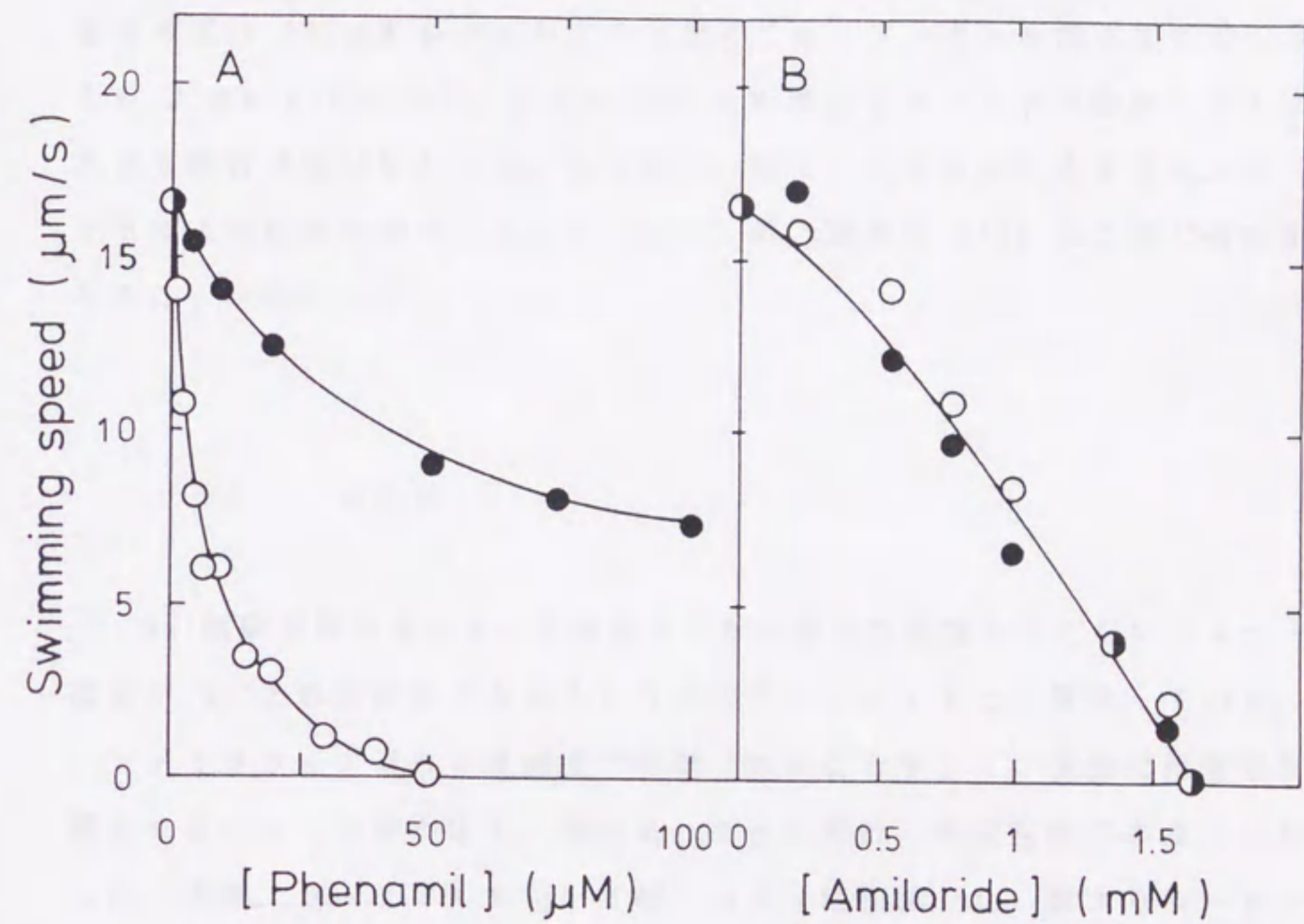
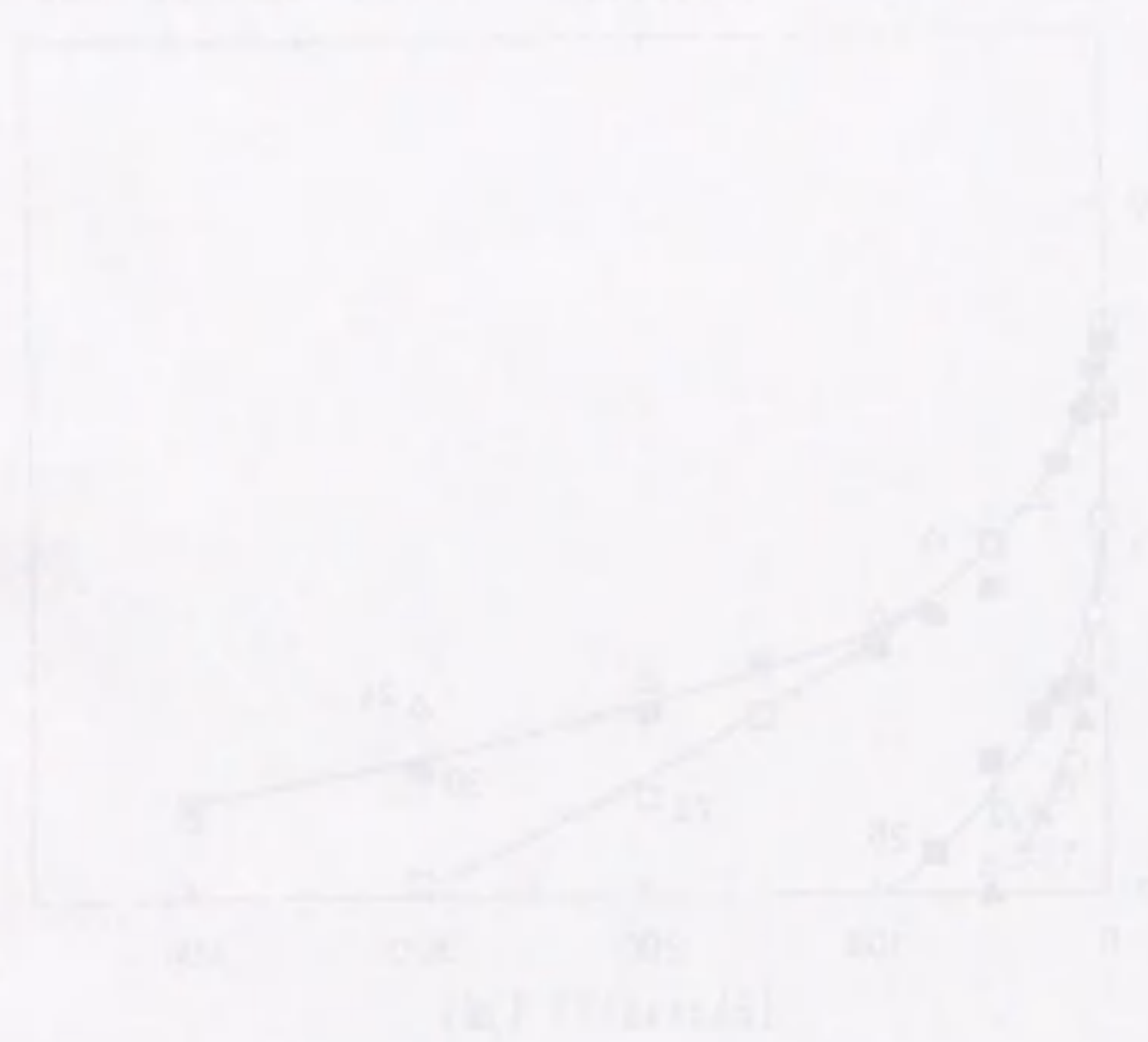
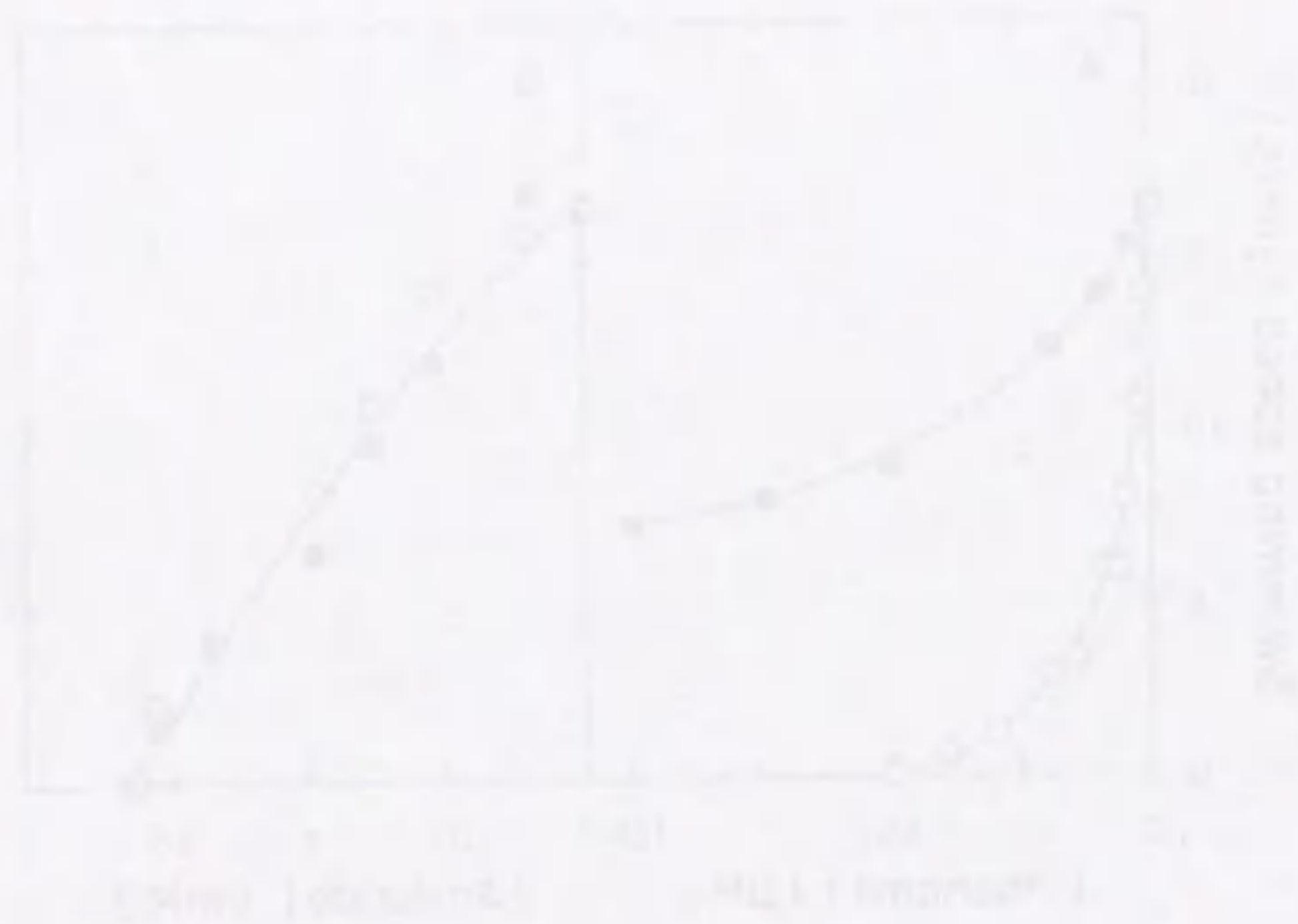


図1-10 野生株 RA-1 株 (○) と変異株 RA-30 株 (●) の遊泳速度に対するアミロライドおよびフェナミルの影響。NaCl 5 mM、塩化コリン 45 mM を含む TG 培地中 (pH 9.5) に懸濁した菌に各濃度のフェナミル (A) 又はアミロライド (B) を加え遊泳速度を測定した。



のように野生株とあまり変化が無いものや、RA-23 株のように 300 μM フェナミルで遊泳速度が 0 になるものなど、フェナミルに対する感受性が各々異なる株が分離できることが分かった。

次に、フェナミルに対する感受性が著しく変化した RA-30 株について詳しい解析を行った。図 1-10 A に示すように NaCl 5 mM、塩化コリン 45 mM を含む TG 培地中で、野生株 RA-1 株の遊泳速度はフェナミル濃度の上昇と共に減少し、50 μM フェナミルにおいて 0 になった。一方、変異株 RA-30 株の遊泳速度は 50 μM にフェナミルを加えても、フェナミル無添加の時の半分以上の 9 μm/s であった。さらに 100 μM までフェナミルを添加してもさほど大きな阻害は受けなかった。ところが、図 1-10 B に示すように、アミロライドによる阻害を調べたところ、RA-30 株の遊泳は RA-1 株と同じ様に阻害されることが分かった。

1-6 まとめ

Na⁺駆動型鞭毛モーターを阻害するが生育には影響を与えないフェナミルは、阻害が Na⁺と拮抗的であるという点でアミロライドとは異なっている。しかし、アミロライドよりも低濃度で有効であることやイオン強度で阻害効果が影響されないなど用途が広く、鞭毛モーターの解析に大変有用であることが分かった。実際、フェナミルを用いて好アルカリ性細菌 RA-1 株よりモーターのフェナミル感受性が低下した変異株が分離できたことで、鞭毛モーターのエネルギー変換ユニットの解析に有効であることが明かとなった。

第二章 Vibrio alginolyticus の Na⁺駆動型鞭毛モーター及び 生育に対するアミロライドの影響

第一章で述べた様に、アミロライドとフェナミルは好アルカリ性 Bacillus の Na⁺駆動型鞭毛モーターのエネルギー変換ユニット上の互いに異なる部位に結合して作用することが示唆された。したがって、フェナミルだけでなくアミロライドでも変異株の分離が可能になれば、エネルギー変換ユニットの多様な変異株の分離が可能になると考えられる。そこで、アミロライドによってモーターの回転は阻害されるが、生育は阻害されない菌株の探索を行った。その結果、Vibrio alginolyticus の極毛を回転させている Na⁺駆動型鞭毛モーター [3, 10] はアミロライドにより阻害されるが、生育条件によっては菌の生育は阻害されないことを見いだした。

2-1 Vibrio alginolyticus の Na⁺駆動型鞭毛モーター及び 生育に対するアミロライドの影響

この実験では、V. alginolyticus の持つ呼吸と共役した Na⁺ポンプの影響を除くために、Na⁺ポンプ欠損株 (NapI 株) [10] を用いて解析を進めた。Complex 培地で生育させた極毛のみを持つ [12] NapI の遊泳は、図 2-1 に示すように Na⁺ 50 mM を含む遊泳培地中では pH 7.0、pH 8.5 のいずれにおいてもアミロライドにより阻害を受ける。また、阻害効果は pH に影響されず、いずれも 2 mM アミロライドによりほとんど完全に阻害を受けた。すなわち、V. alginolyticus の極毛モーターに対するアミロライドの効果は、培地の pH により影響を受けないことが分かる。

次に、この濃度のアミロライドが菌の生育にどのような影響を与えるかを調べた。図 2-2 B に示すように、Na⁺ 50 mM を含む pH 8.5 の complex 培地中で生育している菌に、2 mM アミロライドを加えると菌の生育は速やかにしかも完全に阻害された。ところが、図 2-2 A に示すように pH 7.0 では、同じ

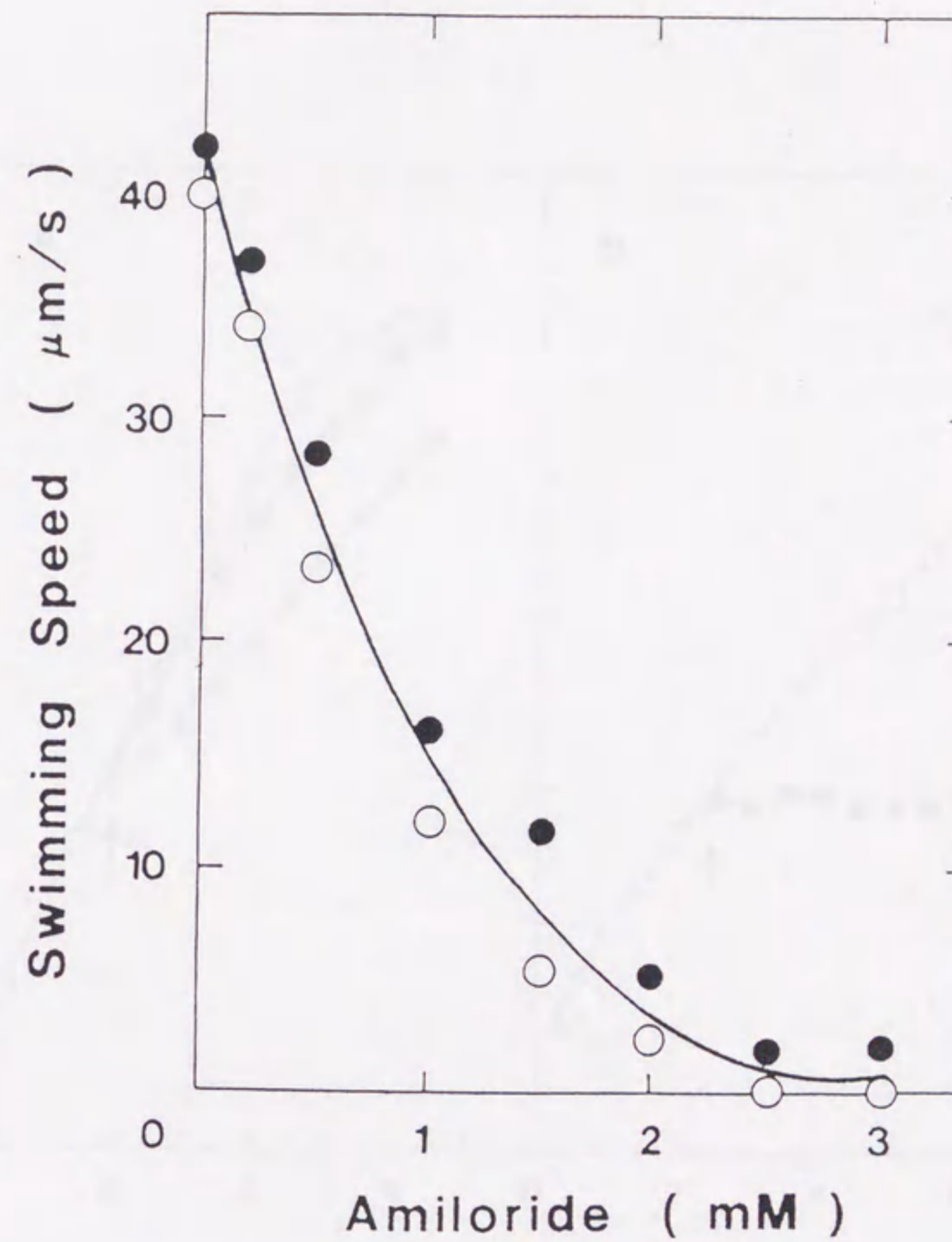


図2-1 *V. alginolyticus* の Nap1 株の遊泳に対するアミロライドの影響。
 NaCl 50 mM、KCl 250 mM を含む HEPES 緩衝溶液 (50 mM HEPES-KOH, 5 mM
 glucose) 中の菌に種々の濃度のアミロライドを加え、1 分以内に遊泳速度を測
 定した。遊泳培地の pH は 7.0 (○) 又は 8.5 (●) である。なお、菌の遊泳
 方向変化を抑制するためアミロライド添加後直ちに 10 mM セリンを加えている。

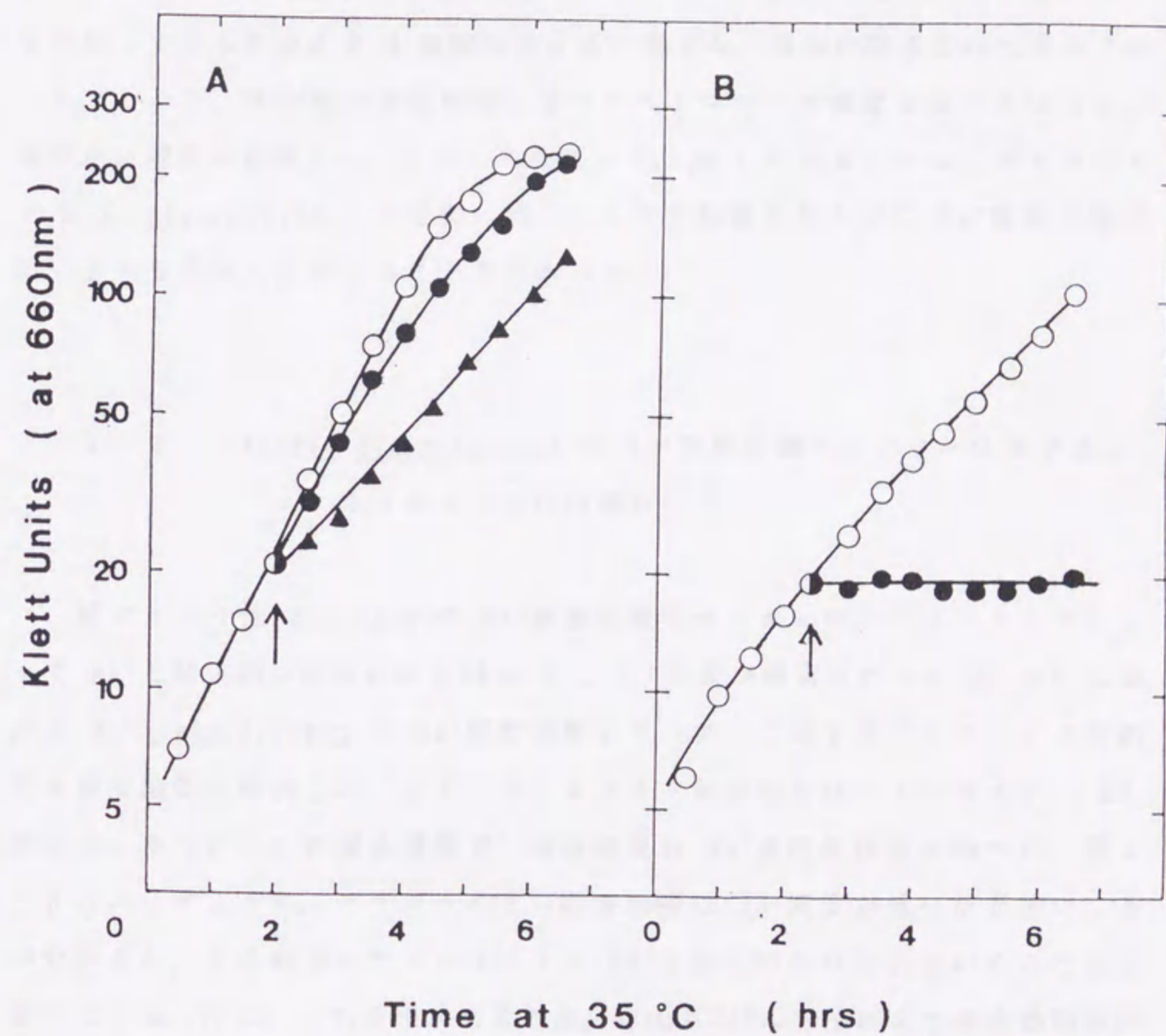
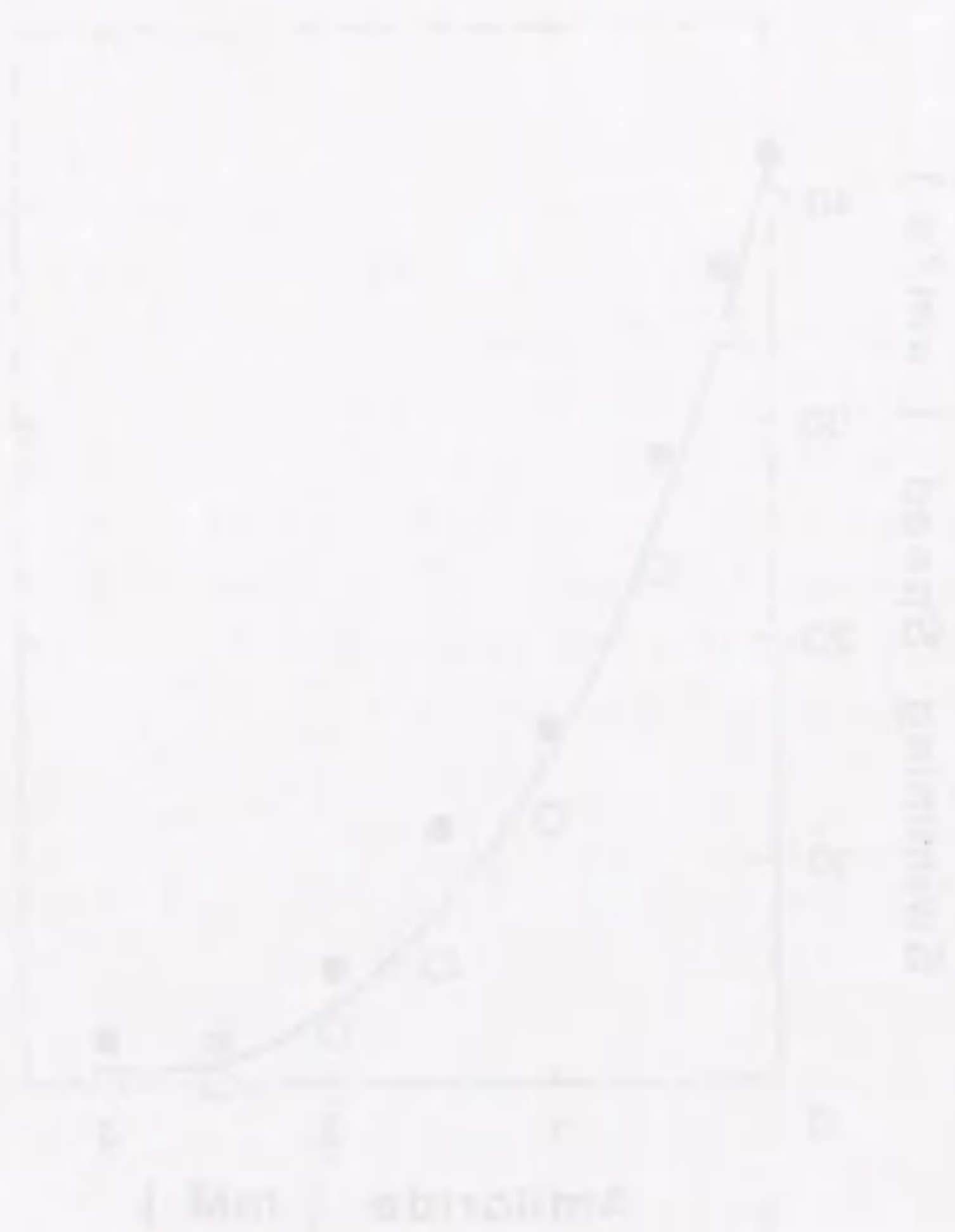


図 2-2 アミロライドによる NapI 株の生育阻害における pH 依存性。菌は、NaCl 50 mM、KCl 250 mM を含む Complex 培地で 35°C で生育させた。(A) が pH 7.0、(B) が pH 8.5 における結果。図中矢印で示した時刻にアミロライドを 0 mM (○)、2 mM (●)、3 mM (▲) に加えた。

2 mM にアミロライドを加えても、菌の生育にはほとんど影響を与えなかった。また、3 mM にアミロライドを加えたときにも、アミロライドを加えないときの半分の生育速度を示した。この時、アミロライド添加により菌の遊泳は速やかにしかもほぼ完全に阻害されていた。さらに、2 mM 及び 3 mM にアミロライドを添加してからそのまま 4 時間生育させた菌でも、遊泳は阻害されたままであった。しかし、その菌を遊泳培地に薄めてアミロライド濃度を減少させると、速やかに遊泳が回復した。これらの結果から、pH 7.0 においては、アミロライドは *V. alginolyticus* の生育に対してあまり影響を与えずに Na⁺駆動型鞭毛モーターを完全に阻害することが分かった。

2-2 *Vibrio alginolyticus* の Na⁺駆動型鞭毛モーターに対するアミロライドの作用機作

好アルカリ性 *Bacillus* の Na⁺駆動型鞭毛モーターは、アミロライドによって Na⁺と拮抗的に阻害される[6]。そこで、生育が阻害されない pH 7.0 の条件で *V. alginolyticus* の Na⁺駆動型鞭毛モーターに対するアミロライドの効果を速度論的に解析した。まず、アミロライド無添加及びアミロライド 1 mM を添加した pH 7.0 の遊泳培地で、遊泳速度の Na⁺濃度依存性を調べた。図 2-3 A に示すように、アミロライドの阻害効果は Na⁺濃度が低いほど強いことが分かるが、この結果はアミロライドが Na⁺と拮抗的に作用していることを示唆している。次に、これを確かめるため、杉山ら[6]の方法により速度論的解析を行った。図 2-3 B は Na⁺の流入速度と遊泳培地の Na⁺濃度の関係について両逆数プロットしたものである。アミロライドを添加しないときは両者の関係は直線的で、Na⁺に対する Michaelis 定数 (Km 値) は 9 mM と計算された。1 mM アミロライド存在下では両者の関係は同じく直線的であり、Na⁺に対する Km 値は 330 mM と増加していたが、Na⁺流入の最大速度 (V_{max}) は変化していなかった。これらの結果から、pH 7.0 においてアミロライドは Na⁺と拮抗的に *V. alginolyticus* の Na⁺駆動型鞭毛モーターの回転を阻害していると結論された。

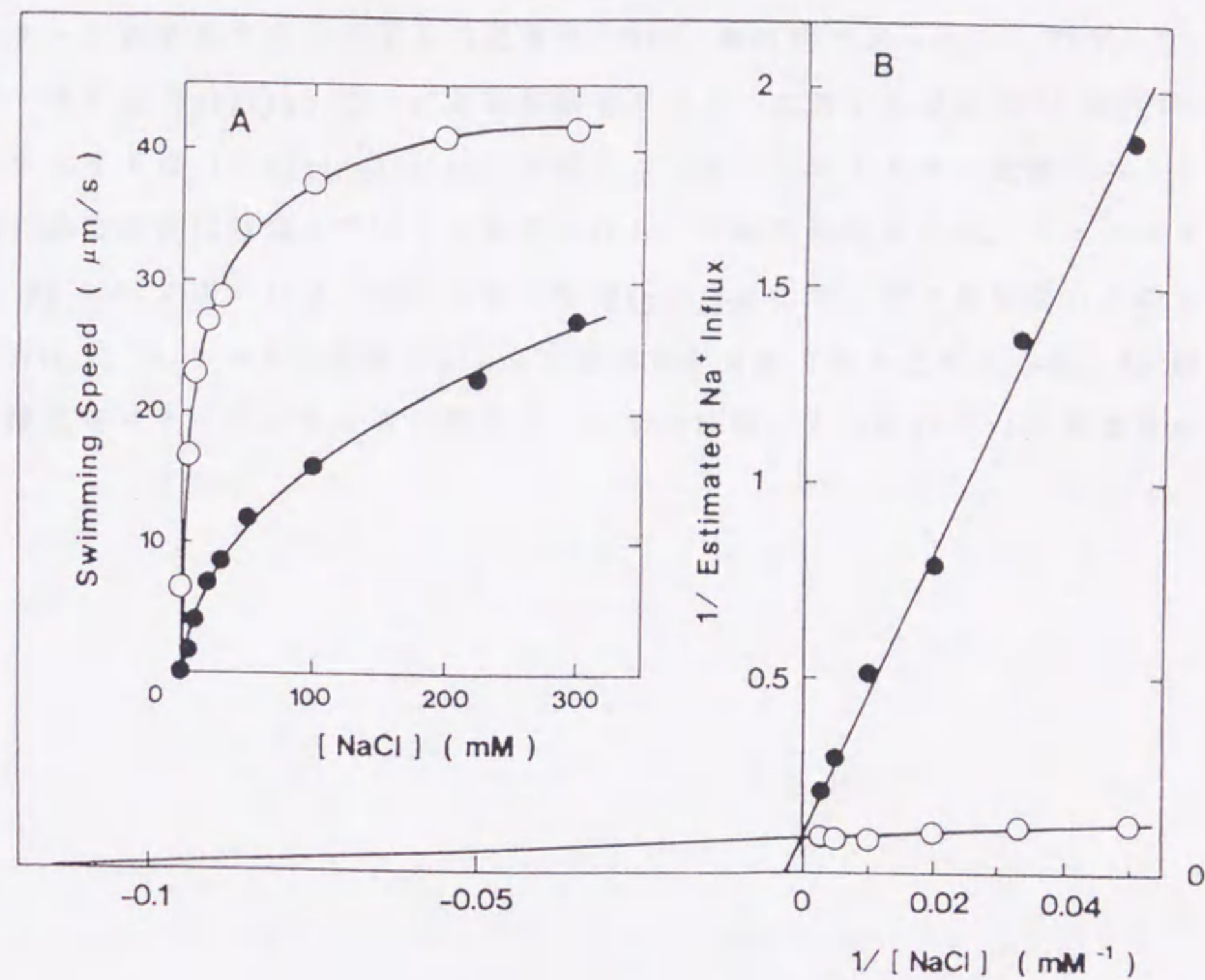


図2-3 アミロライドによる Nap1 株の遊泳阻害効果に対する Na^+ 濃度の影響。菌を、各濃度に NaCl を含む HEPES 緩衝溶液 (50 mM HEPES-KOH (pH 7.0), 5 mM glucose) に懸濁した。アミロライドを 0 mM (○)、1 mM (●) と加え、1 分後に遊泳速度を測定した。図2-1と同様に 10 mM セリンを添加した。なお、溶液のイオン強度は塩化コリンを用いて 300 mM に合わせた。(A) は測定値を示し、(B) は (A) で示した測定値を、実験材料と実験方法の項で示した杉山らの方法[6]で処理した後、両逆数プロットしたものである。縦軸はモーターを通して流れ込む Na^+ の推定量の逆数で、単位は $\text{V} \cdot \text{s}^2 \cdot \mu\text{m}^{-2}$ 。横軸は Na^+ 濃度の逆数。なおシンボルは (A) と同じ。

アミロライドは pH 7.0 では、*V. alginolyticus* の生育をあまり阻害せず
 に Na⁺駆動型の極毛モーターの回転を阻害することが分かった。しかも、極毛
 モーターに対するアミロライドの阻害は、Na⁺と拮抗的であった。したがって、
 好アルカリ性 *Bacillus* の Na⁺駆動型鞭毛モーターに対する場合[6]と同様に、
 アミロライドは *V. alginolyticus* の極毛モーターのエネルギー変換ユニット
 の Na⁺結合部位に結合していると考えられる。これらの結果から、アミロライ
 ドを pH 7.0 で用いれば、好アルカリ性 *Bacillus* にフェナミルを用いたのと
 同じ方法で、エネルギー変換ユニットの変異株が分離できると考えられ、Na⁺駆
 動型鞭毛モーターのエネルギー変換ユニットの解析に大いに役立つと考えられ
 る。

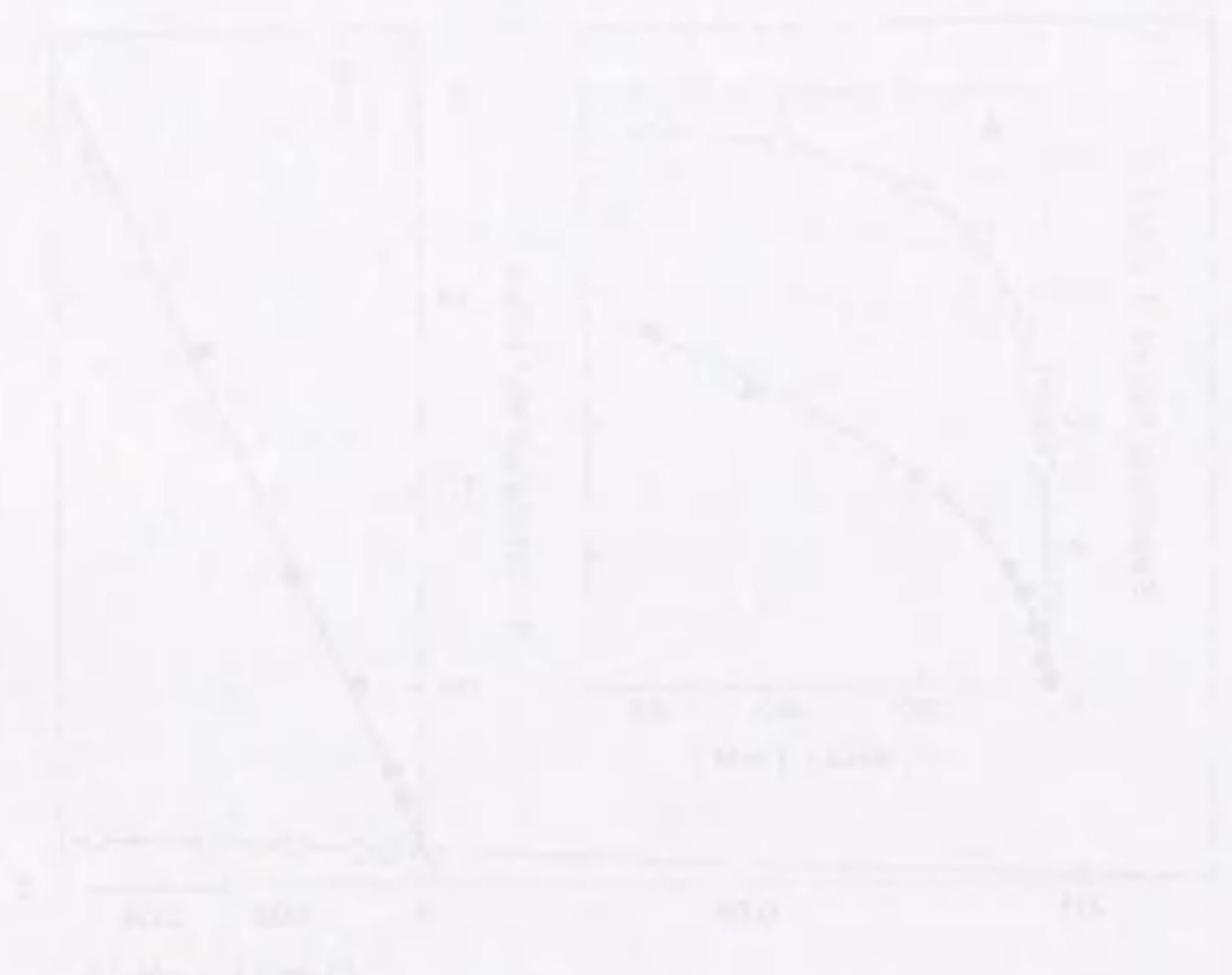


Figure 2 shows the effect of amiloride on the growth and flagellar motility of *V. alginolyticus*. The left graph plots the optical density (OD) at 600 nm against the concentration of amiloride (μM). The right graph plots the flagellar motility (measured as the percentage of motile cells) against the concentration of amiloride (μM). Both graphs show that amiloride inhibits both growth and motility in a dose-dependent manner.

第三章 ビブリオ菌の持つ2種類の鞭毛モーターのエネルギー源の解析

序論で述べたように、ビブリオ菌は培地の粘性が上昇すると、極毛の他に機能的にも形態的にも異なる側毛が多数発現する[12, 13]ことが知られている。極毛モーターは Na^+ 駆動型である[3, 10]が、側毛モーターのエネルギー源については未だ明らかにされていない。そこで、側毛モーターのエネルギー源を調べることにした。第二章で用いた *Vibrio alginolyticus* では、側毛の発現は培地の粘性を変化させることにより調節できるが、極毛は常に発現している[12, 13]ために、このままでは極毛の影響が大きく実験が極めて困難である。そこで、*V. alginolyticus* の近縁種の腸炎ビブリオ (*V. parahaemolyticus*) で分離されている、極毛のみ発現する変異株 RS313 (Fla^+Laf^-) 株及び側毛のみ発現する変異株 ML34 (Fla^-Laf^+) 株[13]を用いて実験を進めた。なお、ML34 株では、粘性に関係なく常に側毛が発現している[13]ことが分かっている。

3-1 腸炎ビブリオ菌の極毛モーター、側毛モーターの回転の Na^+ 濃度依存性

まず、RS-313 株および ML-34 株の遊泳速度の Na^+ 濃度依存性を調べた。図3-1 Aに示すように極毛のみ発現している RS313 株では、遊泳速度に顕著な Na^+ 濃度依存性があり、 Na^+ 無添加の時には、全く遊泳がみられなかった。したがって、腸炎ビブリオの極毛モーターのエネルギー源は *V. alginolyticus* の極毛モーター[3, 10]と同様に、 Na^+ 駆動力をエネルギー源にしていることが分かった。これに対して側毛のみ発現している ML34 株では、 Na^+ を添加しなくても $20 \mu\text{m/s}$ で遊泳し、 Na^+ 濃度を上昇させても遊泳速度は変化しなかった。すなわち、側毛モーターは Na^+ 濃度依存性を示さなかった。ML34 株の遊泳を測定するときには、側毛の脱落を少しでも少なくするために 10% polyvinylpyrrolidone-360 (PVP) を加えたが、PVP を加えずに測定した場合にもほぼ同様の結果が得られている。したがって、側毛モーターのエネルギー源は Na^+ 駆動力以外ではないかと考えられる。

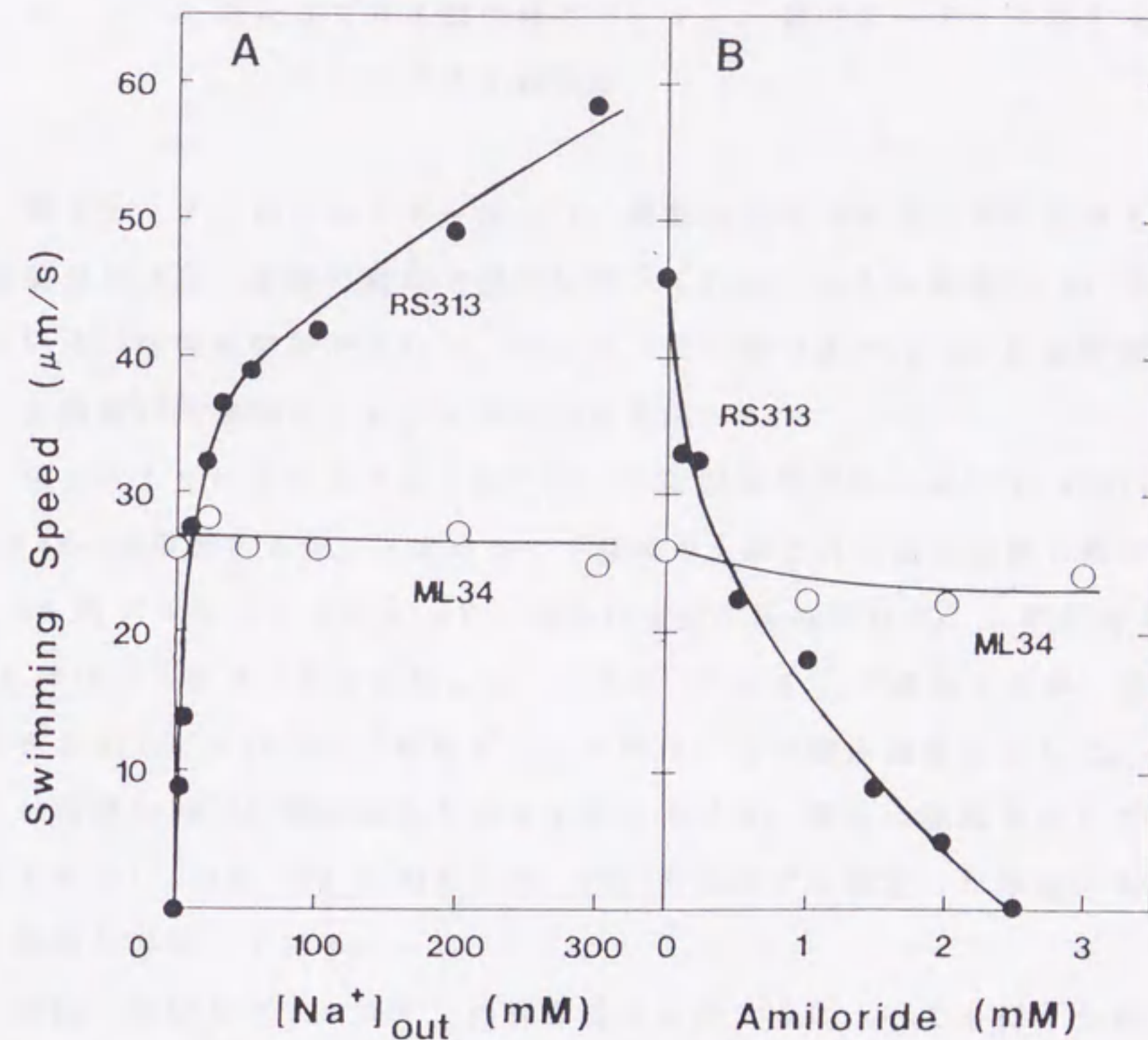


図3-1 腸炎ビブリオ菌の極毛、側毛、両鞭毛モーターの Na⁺要求性とアミロライドに対する感受性。極毛のみ持つ変異株 RS313 株 (●) は 2216 培地を用いて 30°C で培養した。側毛のみ持つ変異株 ML34 株 (○) も同様にして培養したが、培地の粘性を上昇させるために 10 % PVP を添加した [13]。ML34 株の遊泳速度を測定する際には側毛の脱落を防ぐために遊泳培地に 10 % PVP を添加した。A) HEPES 緩衝溶液 (50 mM HEPES-choline (pH 7.0), 10 mM MgCl₂, 5 mM glucose) 中で遊泳速度の Na⁺濃度依存性を測定した。イオン強度は KCl を用いて 300 mM に合わせた。B) 遊泳速度に対するアミロライドの影響。NaCl 50 mM、KCl 250 mM を含む HEPES 緩衝溶液 (50 mM HEPES-KOH (pH 7.0), 5 mM glucose) に懸濁した菌に種々の濃度のアミロライドを加え、1 分以内に遊泳速度を測定した。

3-2 腸炎ビブリオ菌の極毛モーター、側毛モーターに対する アミロライドの効果

側毛モーターのエネルギー源が Na^+ 駆動力以外であると考えられるが、上の結果だけでは、実験の過程で混入が避けられないような微量の Na^+ で回転するという可能性を排除できない。そこで、第二章で述べた Na^+ 駆動型鞭毛モーターの特異的阻害剤アミロライドの効果調べた。

図3-1 Bに示すように、 Na^+ 50 mM の遊泳培地中において RS313 株は $45 \mu\text{m/s}$ で遊泳するが、アミロライド濃度の上昇と共に遊泳速度も減少し、2.5 mM のアミロライドによって、遊泳は完全に阻害された。これに対して、ML34 株はアミロライドを添加しないときは $25 \mu\text{m/s}$ で遊泳するが、アミロライドを添加してもほとんど影響を受けずほぼ一定の遊泳速度を示した。図3-1 Aと同様に ML34 株の遊泳を測定するときには、側毛の脱落を少しでも少なくするために 10% PVP を加えたが、PVP を加えずに測定した場合にもほぼ同様の結果が得られている。

同様の実験をアミロライドの誘導体フェナミルについても行ったが、このとき、RS313 株の遊泳は $20 \mu\text{M}$ のフェナミルで完全に阻害されたが、ML34 株の遊泳は $100 \mu\text{M}$ までフェナミルを加えても全く影響を受けなかった。これらの結果は、実験中に混入する極微量の Na^+ によって ML34 株の運動が引き起こされているわけではないことを示している。したがって、極毛モーターのエネルギー源が Na^+ 駆動力であるのに対して、側毛モーターの駆動力は Na^+ 駆動力ではないと結論される。

3-3 腸炎ビブリオ菌の側毛モーターに対する H^+ イオノフォア CCCP の効果

側毛モーターが H^+ 駆動型モーターであるかどうか調べるために、 H^+ イオノフォアである carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) の効果を調べた。表2に示すように、極毛のみ持つ RS313 株の遊泳速度は、pH 7.0 では

表2 腸炎ビブリオ菌の RS313 株及び ML34 株の遊泳に対する CCCP と HQNO の効果

培地の pH (注)	CCCP (μ M)	HQNO (μ M)	遊泳速度 (μ m/s)	
			RS313 (Fla ⁺ Laf ⁻)	ML34 (Fla ⁻ Laf ⁺)
7.0	0	0	6.0	2.6
	2.0	0	7.0	0
8.5	0	0	5.8	2.3
	2.0	0	5.1	0
	0	2.0	5.0	2.5
	2.0	2.0	0	0

注 遊泳速度は 2216 培地中で測定した。培地の pH は HCl (pH 7.0) 又は、K₂CO₃ (pH 8.5) を加えて合わせた。

20 μ M CCCP の添加により著しく減少した。ところが、pH 8.5 ではほとんど阻害を受けない。これは、pH 8.5 では Na^+ ポンプの活性が高いために CCCP を加えると H^+ 駆動力は消失するが Na^+ 駆動力は保たれているため[10]と考えられる。そこで、 Na^+ ポンプの特異的阻害剤である 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide (HQNO) [8]を加えると、期待したように遊泳が阻害された。この結果は、pH 8.5 においては、CCCP 存在下でも Na^+ ポンプの働きにより Na^+ 駆動力が維持されていることを示すものである。

一方、側毛のみ生えている ML34 株では、pH 7.0、pH 8.5 の何れにおいても 20 μ M CCCP を加えることにより遊泳が完全に阻害された。pH 8.5 では CCCP が存在しても Na^+ 駆動力は維持され、 H^+ 駆動力のみが消失することから、この結果は、側毛モーターが Na^+ 駆動力ではなく H^+ 駆動力により回転していることを示すものである。

3-4 極毛と側毛を同時に持つ腸炎ビブリオ菌野生株の運動

腸炎ビブリオ菌の野生株では、培地の粘性が低いと極毛のみ発現するが、培地の粘性が高いと極毛と側毛の両方が発現する[12, 13]。同一菌体に2種類の鞭毛が同時に存在する時どのような性質を示すか興味を持たれるので、野生株を用いてその運動の解析を行った。

図3-2は、BB22株の遊泳速度の Na^+ 濃度依存性を示している。粘性の低い通常の液体培地で生育させた極毛のみ持つBB22株の遊泳は、RS313株と同様に Na^+ を添加しない時には遊泳せず、また、顕著な Na^+ 濃度依存性を示した。これに対して、PVPを加えて粘性を高くした液体培地で生育させ極毛と側毛の両方を持つBB22株の遊泳は、弱い Na^+ 濃度依存性を示したが、 Na^+ を添加しない時にも遊泳速度は0にはならなかった。

次に、アミロライド及びCCCPの効果調べた。粘性の低い培地で生育させたBB22株の振舞いはRS313株と同様で、アミロライドにより遊泳を阻害され、pH 8.5ではCCCPにより遊泳を阻害されない。しかし、粘性が高い培地で生育させたBB22株はこれとは異なった振舞いをした。図3-3に示すように

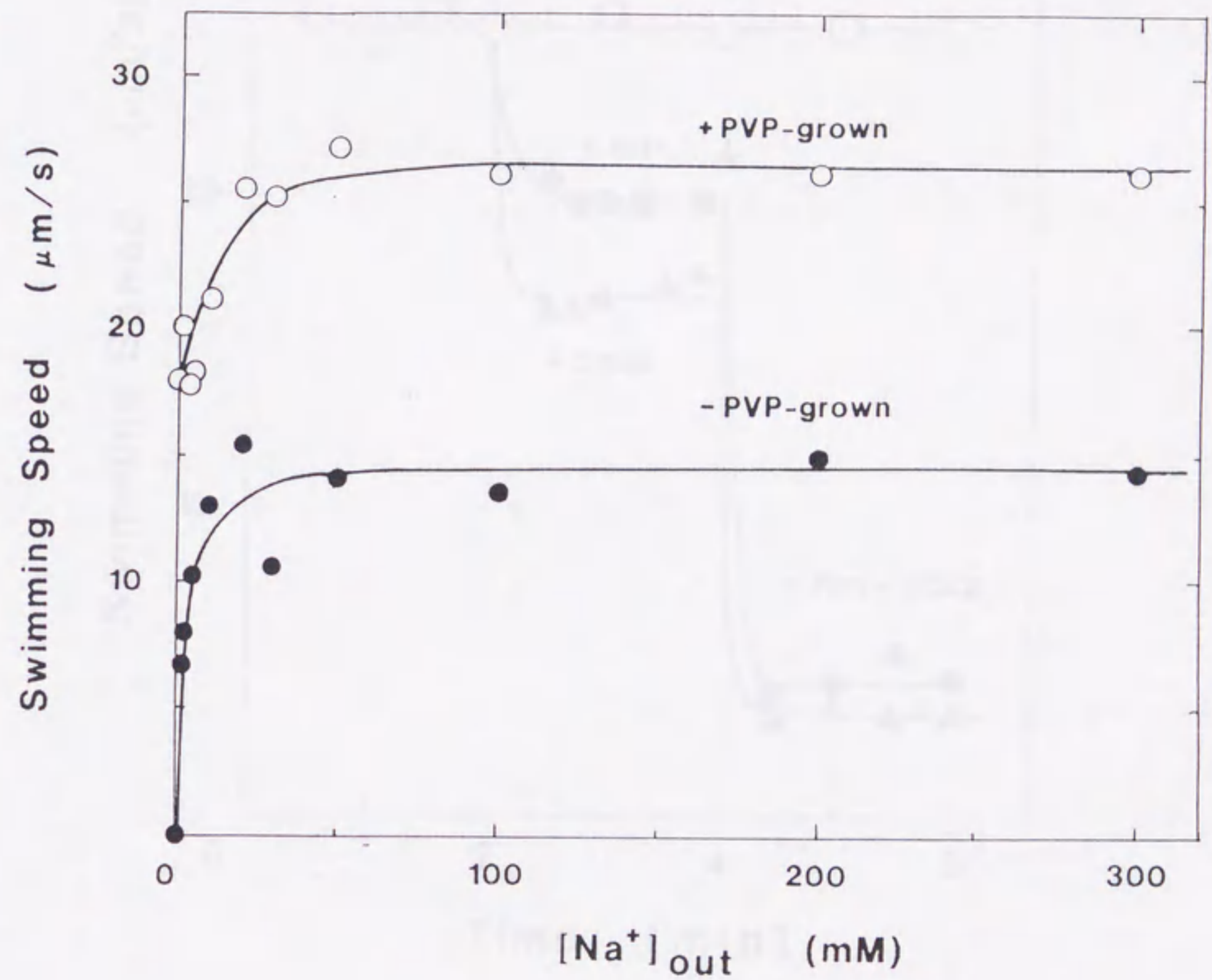


図3-2 10% PVP 添加 (○) 又は、無添加 (●) の 2216 培地で生育させた腸炎ビブリオの野生株 (BB22 株) の遊泳速度の Na^+ 濃度依存性。遊泳速度の測定には 10% PVP を加えた 2216 培地を用いた。

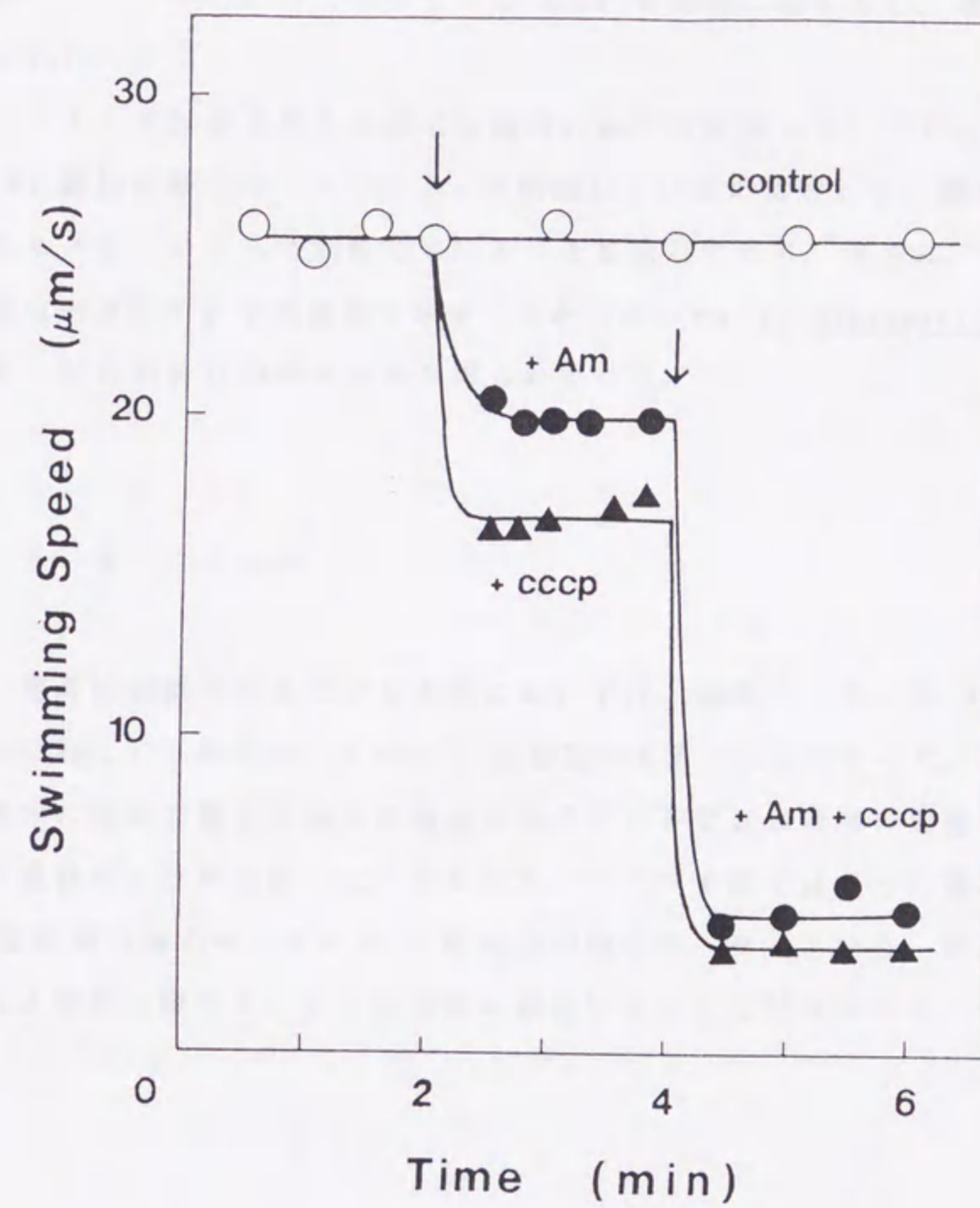


図3-3 粘性の高い培地で生育させた腸炎ビブリオ菌の野生株 (BB22 株) の遊泳速度に対するアミロライド及び CCCP の影響。菌の培養には 10% PVP を加えた 2216 培地を用いた。遊泳速度の測定には 50 mM NaCl、250 mM KCl を含む TMG 培地 (25 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl₂, 5 mM glucose) を用いた。始めの矢印で示した時刻に 3 mM アミロライド (●) 又は 50 μM CCCP (▲) を加え、次の矢印で示した時刻に 50 μM CCCP (●) 又は 3 mM アミロライド (▲) を加えた。



pH 8.5 における遊泳はアミロライド又は CCCP により部分的にしか阻害を受けなかった。しかし、アミロライドと CCCP を同時に加えると、遊泳は著しく阻害された。

これらの結果は極毛と側毛の両方の鞭毛が発現している野生株では、極毛が Na^+ 駆動型鞭毛モーターによって回転しているのに対して、側毛は H^+ 駆動型鞭毛モーターによって回転していることを示しており、さらに、両方の鞭毛の機能は遊泳に対して加算的であることが分かった。*V. alginolyticus* の野生株でも、定性的には同様の結果が得られている。

3-5 まとめ

海洋性細菌であるビブリオ菌においては、極毛モーターが Na^+ 駆動型であるのに対して、側毛モーターは H^+ 駆動型であることが分かった。さらに、1つの菌体に極毛と側毛の両方の鞭毛が生えているときには菌の運動は両者の和として現れることが分かった。すなわち、ビブリオ菌では1つの菌体において Na^+ 駆動型の極毛モーターと H^+ 駆動型の側毛モーターという、共役イオンの異なる2種類の鞭毛モーターが同時に機能できることが分かった。

考 察

細菌は鞭毛モーターによりらせん形の鞭毛をスクリューとして回転させ推進力を作っている。このような回転する運動器官は他に例がなく、鞭毛モーターの存在自体にも興味を持たれているが、現在一番大きな興味を引いているのはこのモーターがいかにしてイオンの電気化学的ポテンシャルエネルギーを回転という力学的エネルギーに変換しているかという点である。この問題を解決するには、まずエネルギー変換を担っているタンパクの同定が必要である。大腸菌などの H^+ 駆動型鞭毛モーターにおいては遺伝的な知識の蓄積を背景として解析が進められ、膜タンパクである MotA がエネルギー変換部位であるということが強く示唆されているが、MotA には H^+ と相互作用するという点以外の特徴が見受けられず、また、MotA と特異的に相互作用する阻害剤も発見されていないため、解析が進んでいない。これに対して、好アルカリ性 *Bacillus* などの持つ Na^+ 駆動型鞭毛モーターでは、エネルギー変換を担うタンパクに Na^+ と相互作用するという特徴があり、また、アミロライドという特異的阻害剤がすでに見出されているなど、解析に有利な点が多い。

本研究で明らかにしたように、アミロライドは好アルカリ性 *Bacillus* の生育阻害を起こすが、その誘導体であるフェナミルは生育阻害を起こさずに Na^+ 駆動型鞭毛モーターを特異的に阻害する。このフェナミルの性質を利用して、好アルカリ性 *Bacillus* の Na^+ 駆動型鞭毛モーターのエネルギー変換ユニットの変異株を、フェナミル耐性の運動能を持つ株として分離することが出来た。また、この変異株は運動のフェナミル耐性の程度が多様であることから、エネルギー変換ユニットの多数の変異株が分離できたと考えられ、今後の遺伝子レベルでの解析に役立つと期待される。

フェナミル耐性の運動能を持つ株として分離した好アルカリ性 *Bacillus* の変異株について、アミロライドおよびフェナミルによる運動阻害の解析を行った結果、アミロライドとフェナミルはエネルギー変換ユニット上の相異なる部位に作用していることが明かとなった。また、さらに、本研究で、pH 7.0 ではアミロライドがビブリオ菌の生育を阻害せずに Na^+ 駆動型鞭毛モーターを阻害することを示したが、この条件下でアミロライドを用いれば、フェナミル耐

性のエネルギー変換ユニットとは別のタイプの変異株が分離できると考えられ、エネルギー変換ユニットのさらに詳細な解析に役立つと期待できる。

ビブリオ菌は、粘性の低い通常の液体培地で生育させると Na^+ 駆動型鞭毛モーターにより回転する極毛のみを持つが、粘性が高い条件に移すと極毛の他に側毛が多数発現する。この側毛を駆動するモーターについて腸炎ビブリオ菌の側毛のみを持つ変異株を用いて解析を行い、側毛モーターが H^+ 駆動型鞭毛モーターであることを明らかにした。また、野生株で極毛と側毛が同時に存在する条件下では、これら2種類の鞭毛モーターが一つの菌体で同時に機能していることも明らかにした。この発見は、ビブリオ菌を用いることで共役イオンの異なる2種類の鞭毛モーターについて1つの菌体で比較しながら解析できることを示しており、鞭毛モーターのエネルギー論的解析に新たな実験系を確立したことになる。

ビブリオ菌の極毛は、海水のような粘性の低い条件での遊泳に適し、側毛は、粘性の高い条件での運動に適している。この機能が異なる2種類の鞭毛の必要性については、海洋性ビブリオ菌が、ある時は海水中を遊泳し、またある時は生物や無生物の表面に付着するという生活様式と関係が深いと考えられている。しかし、なぜこのような環境の違いに応じて、二つの異なるエネルギー源を使い分けているのであろうか。進化論的立場から推測すると、海水中の遊泳に最適な運動機能を持っていた海洋性細菌が、 H^+ 駆動型鞭毛モーターを持つ大腸菌のような細菌の運動機能を後から獲得したのかも知れない。この考え方は極毛と側毛が形態的に異なっている[12, 13]こととも矛盾しない。又、ビブリオ菌が、呼吸と共役した H^+ ポンプと Na^+ ポンプの2種類のポンプを持つこともビブリオ菌が2種類の細菌に由来するためかもしれない。しかし、側毛の発現は菌形の変化も含めたかなり大規模な形態変化を伴うことから、今日のビブリオ菌ができた過程は、それほど単純なものではないと考えられる。一方、エネルギー論的立場から考えると次のような説明が可能である。ビブリオ菌に限らず、細菌では菌体内の pH をほぼ一定 (pH 7.5 付近) に保っている。海水中では pH が 8.2 前後であるために、菌体内外の pH 差が逆転しており、pH 差と膜電位の和である H^+ 駆動力が小さくなる。この H^+ 駆動力の持つ弱点を補うために、ビブリオ菌はアルカリ側で活性の高い呼吸と共役した Na^+ ポンプを持っ

ており、そのポンプの働きによって維持される Na^+ 駆動力をアミノ酸輸送など膜上の多くの機能の重要なエネルギー源として利用している [8-10]。したがって、pH が 8.2 前後の海水中では、鞭毛モーターも H^+ 駆動型よりは Na^+ 駆動型の方がエネルギー的に有利なわけである。これに対して、プランクトンや魚などの表面粘液質の pH が海水よりも酸性に偏っているとすれば、 Na^+ ポンプの活性は低下し Na^+ 駆動力が小さくなるのに対して、 H^+ 駆動力は逆に大きくなるから、このような条件下での移動には H^+ 駆動型鞭毛モーターを使った方がエネルギー的に有利であろう。最後に、側毛の発現に対する極毛の役割との関連も考えられる。培地の粘性を上昇させると極毛の回転が抑制され側毛が発現する。極毛の変異株を用いた解析から、極毛モーターは回転計として機能しており、極毛が回転しているという信号がなくなると、側毛の発現が誘導されると考えられている [12, 13]。回転計がどのようにして側毛遺伝子の発現調節を行っているのかは全く明かとなっていないが、極毛モーターと側毛モーターの共役イオンの違いがこの機能とも何か関係があるのかも知れない。側毛の発現は菌体の伸長を伴う大規模な形態変化をもたらすことを考えると、ビブリオ菌に共役イオンの異なる 2 種類の鞭毛モーターが存在するという今回の発見は、単に鞭毛モーターのエネルギー論や、鞭毛遺伝子の発現だけでなく広く細胞分化の制御という点にも関連するかもしれない。

謝 辞

大学院に入学して以来常に親切な御指導と助言をしていただいた今栄康雄教授に心から感謝いたします。また、菌株を分与していただいた、Aono, R., Horikoshi, K., Kitada, M., Krulwich, T. A., McCarter, L., Nosoh, Y., Tokuda, H. 博士、ならびに、フェナミルを合成していただいた Cragoe, Jr., E. J. 博士に感謝いたします。物理化学的実験に際しては、小林尚友博士に助言をいただきました。第二章の実験の一部は分子生物第四講座の前川幸代さんに手伝っていただきました。杉山滋博士、川岸郁朗博士には有意義な議論をしていただきました。また、西岡典子さんには作図の一部を手伝っていただきました。皆様に感謝いたします。第四講座を始め、分子生物学科の皆様には御世話になりました。また、久保田郁夫校長を始めとする鈴鹿工業高等専門学校の皆様にも御理解と御協力をいただきました。どうもありがとうございました。

付 記

本論文の一部は既に下記の論文として発表済みである。

1. Atsumi, T., Sugiyama, S., Cragoe, E. J., Jr., and Imae, Y. (1990)
Specific inhibition of the Na⁺-driven flagellar motors of alkalophilic Bacillus strains by the amiloride analog phenamil.
J. Bacteriol. 172, 1634-1639.
2. Atsumi, T., McCarter, L., and Imae, Y. (1992) Polar and lateral flagellar motors of marine Vibrio are driven by different ion-motive forces. Nature 355, 182-184.
3. Atsumi, T., Maekawa, Y., Tokuda, H., and Imae, Y. (1992)
Amiloride at pH 7.0 inhibits the Na⁺-driven flagellar motors of Vibrio alginolyticus but allows cell growth.
FEBS Lett. 314, 114-116.

引用文献

- [1] Macnab, R. M. (1987) in "Escherichia coli and Salmonella typhimurium" (Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umberger, H. E. ed.) pp. 70-83 and 732-759, American Society for Microbiology, Washinton, D. C.
- [2] Krulwich, T. A., Hicks, D. B., Seto-Young, D. and Guffanti, A. A. (1988) *Crit. Rev. Microbiol.* 16: 15-36.
- [3] Imae, Y. and Atsumi, T. (1989) *J. Bioenerg. Biomembr.* 21: 705-716.
- [4] Suguyama, S., Matsukura, H., Koyama, N., Nosoh, Y. and Imae Y. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 852: 38-45.
- [5] Blair, D. F. and Berg, H. C. (1990) *Cell* 60: 439-449.
- [6] Sugiyama, S., Cragoe, Jr., E. J. and Imae, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 8215-8219.
- [7] Kleyman, T. R. and Cragoe, Jr., E. J. (1988) *J. Membrane Biol.* 105: 1-21.
- [8] Tokuda, H. and Unemoto, T. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 10007-10014.
- [9] Tsuchiya, T. and Shinoda, S. (1985) *J. Bacteriol.* 162: 794-798.
- [10] Tokuda, H., Asano, M., Shimamura, Y., Unemoto, T., Sugiyama, S. and Imae, Y. (1988) *J. Biochem.* 103: 650-655.
- [11] Allen, R. D. and Baumann, P. (1971) *J. Bacteriol.* 107: 295-302.
- [12] McCarter, L. and Silverman, M. (1990) *Molec. Microbiol.* 4: 1057-1062.
- [13] McCarter, L., Hilmen, M. and Silverman, M. (1988) *Cell* 54: 345-351.

- [14] Krulwich, T. A., Guffanti, A. A., Bornstein, R. F. and Hoffstein, J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 1885-1889.
- [15] Imae, Y., Matsukura, H. and Kobayasi, S. (1986) *Methods Enzymol.* 125: 582-592.
- [16] Uozumi, T., Hoshino, T., Miwa, K., Horinouchi, S., Beppu, T. and Arima, K. (1977) *Mol. Gen. Genet.* 152: 65-69.
- [17] Imae, Y. and Strominger, J. L. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 1493-1499.
- [18] Parkinson, J. S. and Revello, P. T. (1978) *Cell* 15: 1221-1230.
- [19] Yoshida, S., Sugiyama, S., Hojo, Y., Tokuda, H. and Imae, Y. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 20346-20350.
- [20] Osborn, M., Person, S., Phillips, S. and Funk, F. (1967) *J. Mol. Biol.* 26: 437-447.
- [21] Meister, M., Lowe, G. and Berg, H. C. (1987) *Cell* 49: 643-650.

副論文

1. Atsumi, T., Sugiyama, S., Cragoe, E. J., Jr., and Imae, Y. (1990)
Specific inhibition of the Na⁺-driven flagellar motors of alkalophilic Bacillus strains by the amiloride analog phenamil.
J. Bacteriol. 172, 1634-1639.
2. Atsumi, T., McCarter, L., and Imae, Y. (1992) Polar and lateral flagellar motors of marine Vibrio are driven by different ion-motive forces. Nature 355, 182-184.
3. Atsumi, T., Maekawa, Y., Tokuda, H., and Imae, Y. (1992)
Amiloride at pH 7.0 inhibits the Na⁺-driven flagellar motors of Vibrio alginolyticus but allows cell growth.
FEBS Lett. 314, 114-116.