

損成を待つ海綿性ポリオ 藍透べん毛の研究

吉成三朗

①

報告番号 甲第 4129 号

学位論文

鞘膜を持つ海洋性ビブリオ菌極べん毛の研究

名古屋大学大学院理学研究科

古野正朗

1998年6月

<要旨>

多くの細菌はべん毛と呼ばれる運動器官を持ち、液体中を泳ぎまわったり、固体表面を移動したりする。べん毛は、菌体表面から生えているらせん状の繊維であり、細菌はこのらせん状繊維を根元にあるモーターによってスクリューの様に回転させ推進力を得ている。大腸菌や枯草菌などのべん毛と異なり、海洋性ビブリオ菌 *Vibrio alginolyticus* の極べん毛は、鞘と呼ばれる膜構造に被われた特徴的な形態を持っている。鞘膜は、電子顕微鏡観察では菌体外膜から連続しているように見えるが、膜の詳しい構造や膜に含まれる構成成分など、詳細な研究は行われていない。本研究では、鞘をもつ極毛に対して、生化学的、遺伝学的解析を行った。

当研究室において、*V. alginolyticus* のべん毛に関する様々な変異株が単離されている。そのなかに、極毛の長さに関する変異株、すなわち野生型の約2倍の長さの極毛を持つ長極毛株 NMB90 および VIO578、約1/2の長さの極毛を持つ短極毛株 YM43 があった。まずはじめに、これらの変異株についてべん毛の長さと遊泳速度を調べた。野生株および短極毛株ではべん毛の長さが非常によく揃っていたのに対して、長極毛株ではばらつきが大きかった。また、短極毛株、長極毛株共に野生型に比べて遊泳速度が低下していた。べん毛の長さと遊泳速度の相関関係を調べたところ、短極毛株では、長さが野生型のべん毛長に近い菌では遊泳速度は野生株とほぼ同じ値を示した。このことから短極毛株の遊泳速度の低下はべん毛の長さの減少が原因であると結論された。一方、長極毛株では、野生株と同じような長さのべん毛を持つ菌でも、遊泳速度は極端に低かった。これは、長極毛繊維のらせん形状が野生株と異なることによるものと推定された。

次に、べん毛の形状変化の原因を探るため、極毛を構成するタンパク質について調べた。海洋性ビブリオ菌の極毛には少なくとも5種類のタンパク質が存在していた。極毛繊維と鞘膜を分離してその構成成分を調べたところ、べん毛繊維は少なくとも2種類のフラジェリン PF47 と PF45 から構成されていることが明らかになった。また、鞘膜に存在すると考えられる3種類のタンパク質 PF60、PF44、PF18 を見いだした。長極毛株においては、PF47 フラジェリン、鞘膜タンパク質 PF60、PF18 の量が増えていることがわかった。極毛繊維における2種類のフラジェリンの量比の違いが野生株と長極毛株のべん毛の形状を変化させる原因であることが示唆された。

以上の結果から、長極毛株では、タンパク質構成、べん毛の形状、運動能の低

下など多くの性質が変化していることがわかった。この長極毛株の変異についてさらに情報を得るため、運動能復帰株を単離した。復帰株は、運動能、極毛の長さ、フラジェリン量比がほぼ野生株並みのものと、これらの性質が全て元の変異株と野生株の間であるものとの2種類に分かれた。したがって、長極毛株の変異は、複数の性質に同時に影響すると考えられた。次に、ビブリオ菌染色体から、長極毛株の運動能を回復する DNA 断片をクローニングした。この DNA 断片をもつプラスミドを長極毛株に移入したところ、運動能、極毛の長さ、フラジェリン量比が、すべて野生株並みになった。この DNA 断片は、近縁種の *Vibrio parahaemolyticus* の極毛モーター遺伝子 *motX* の転写調節領域と高いホモロジーを示した。欠失プラスミドの解析から、長極毛の変異がべん毛遺伝子群の発現制御に関わっている可能性が示された。

上述のように、長極毛株では、極毛の鞘膜に存在する PF60 タンパク質の量が顕著に増加していた。そこで、この PF60 について研究を進め、構造遺伝子 *pfsA* のクローニングを行った。極べん毛を大量に調製し、そこから PF60 タンパク質を精製した後、分解ペプチドの N 末端アミノ酸配列を決定した。この配列に基づき、PCR プライマーを合成し *pfsA* の一部を増幅した。これをプローブとしてビブリオ菌染色体 DNA をスクリーニングし、*pfsA* の全長をクローニングした。*pfsA* は N 末端にシグナルペプチドをもつ 491 アミノ酸からなる推定分子量約 54 kDa の未知のタンパク質をコードしていた。このことから、鞘膜結合タンパク質 PF60 は、Sec 系膜透過装置を介して輸送されることが示唆された。

本研究から、海洋性ビブリオ菌の鞘膜を持つ極べん毛について新たな知見が得られた。特に、鞘膜に存在するタンパク質の遺伝子を初めてクローニングしたことは、鞘膜の構造および機能の解明への手がかりとなる有意義な成果である。

<略語一覽>

Cm	<u>chl</u> or <u>am</u> phenicol
HAP	<u>h</u> ook <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein
orf	<u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame
PAGE	<u>p</u> oly <u>a</u> crylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis
PF	<u>p</u> olar <u>f</u> lagellar component
<i>pfsA</i>	<u>p</u> olar <u>f</u> lagellar <u>s</u> heath protein A
PVDF	<u>p</u> oly <u>v</u> inylidene <u>d</u> ifluoride
pof	<u>p</u> olar <u>f</u> lagella
SD	<u>S</u> hine- <u>D</u> argarno
SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
Tet	<u>t</u> etracycline

<目次>

要旨

略語一覧

目次

第1章 序論

第2章 材料と方法

第3章 長さの異なる極毛をもつ変異株のべん毛の長さとの運動

第4章 べん毛構成タンパク質の解析

第5章 長極毛株の変異を抑圧する遺伝子のクローニング

第6章 極毛鞘膜結合タンパク質 PF60 の構造遺伝子のクローニング

第7章 結論と展望

引用文献

付記

謝辞

<第1章 序論>

1.1 はじめに

多くの細菌はべん毛と呼ばれる運動器官を持ち、液体中を泳ぎまわったり、固体表面を移動したりする。べん毛は、菌体表面から生えているらせん状の繊維であり、細菌はこのらせん状繊維を根元にあるモーターによってスクリューの様に回転させ推進力を得ている。細菌の持つべん毛は種により本数や形態が様々である。大腸菌 *Escherichia coli*、サルモネラ菌 *Salmonella typhimurium*、枯草菌 *Bacillus subtilis* などは周毛性であり、菌体の周囲に数本のべん毛を持つ (Kreig & Holt, 1984)。これらのべん毛は遊泳時には束を形成し推進力を発生する。これに対して、多くのビブリオ属細菌やコーロバクター属細菌および緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* などは極毛性の単べん毛を持つ。また、*Helicobacter pylori* や *Vibrio fischeri* など、極毛性の多べん毛を持つ細菌もある。さらに多くの細菌のべん毛繊維が菌体外に露出しているのに対して、ビブリオ属細菌などのべん毛繊維は「鞘 (sheath)」と呼ばれる膜構造に被われている。

生物界で唯一の回転運動器官であるこのべん毛について、これまで多くの研究がなされてきた。特にサルモネラ菌、大腸菌やコーロバクター属細菌において、その構造、構成タンパク質、遺伝子群やその発現、また回転モーターの機構などについて詳細な研究が進んでいる。一方、特徴的な形態である「鞘」をもつべん毛については詳細な構造はわかっていない。私はこの「鞘」に被われたべん毛の構造に興味を持ち、海洋性ビブリオ菌 *Vibrio alginolyticus* の極べん毛を対象として研究を行った。

この章では、まず、細菌べん毛の構造と機能について、解析の進んだサルモネラ菌・大腸菌を中心に概観する。次に、それらとは異なる複雑な形態やタンパク質構成をもつべん毛について紹介する。さらに、海洋性ビブリオ菌の2種類のべん毛（とくに鞘をもつ極毛を中心に）の構造と機能についての知見をまとめ、本研究への導入としたい。

1.2 べん毛の構造と構成タンパク質

図 1-1 にサルモネラ菌のべん毛構造を模式的に示した (Macnab, 1992)。一般に

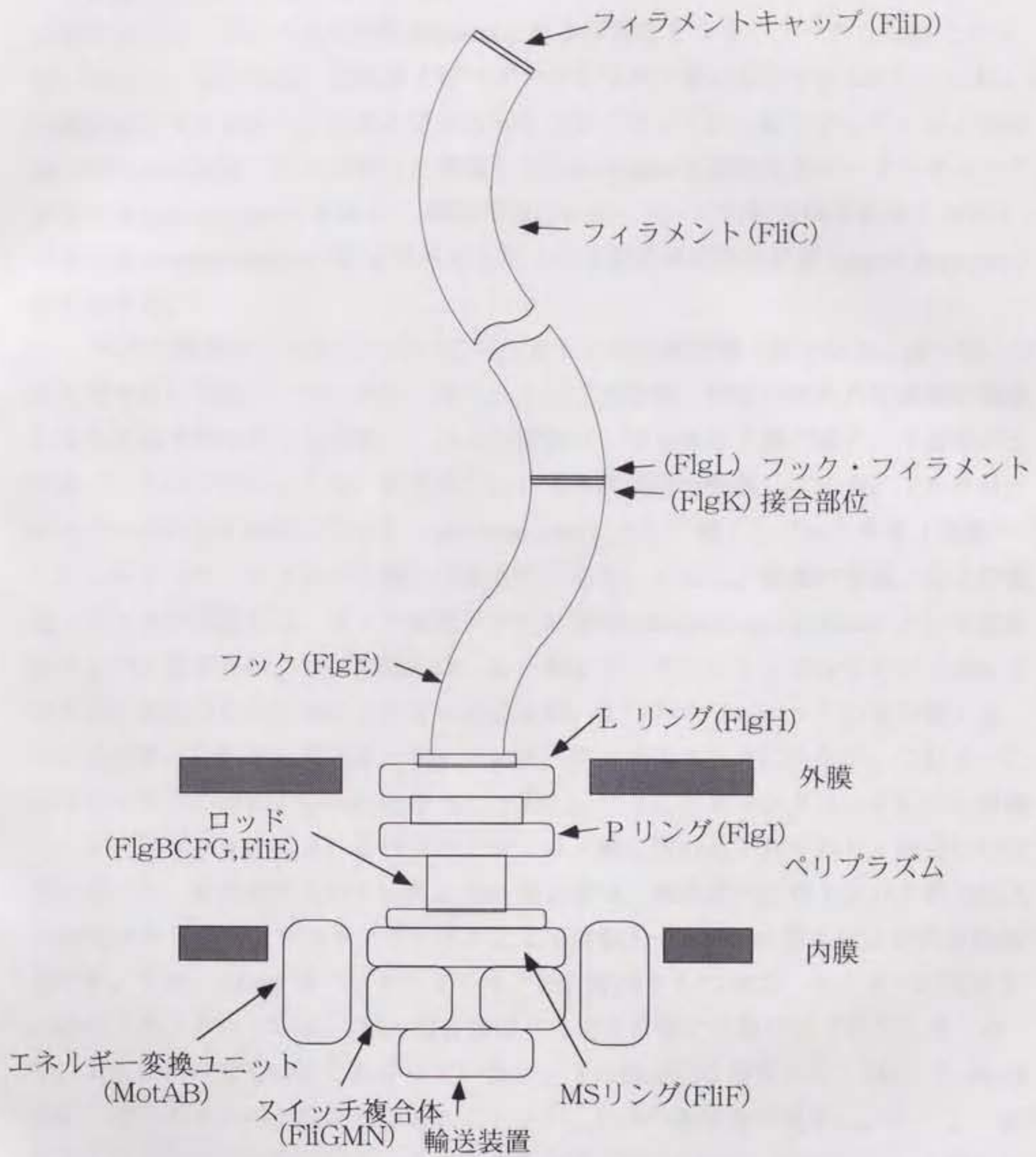


図 1-1 サルモネラ菌のべん毛模式図

グラム陰性菌のべん毛は細菌表層膜系内に埋まった基部体 (basal body) と菌体外に長く伸びるらせん型のべん毛繊維 (filament) および両者をつなぐフック (hook) とから成っている。基部体は、外膜およびペプチドグリカン層に結合する LP リングおよび内膜に結合する MS リングおよびそれらをつなぐロッドから成り立っている。基部体の周りには水素イオンの流入と共役してべん毛回転を駆動するモータータンパク質複合体 (mot complex) があり、細胞質側にはモーターの回転方向を制御するスイッチ複合体 (switch complex) およびべん毛タンパク質特異的排出装置 (export apparatus) が存在する。

べん毛繊維は、べん毛においてもっとも大きな構造物 (長さは $5 \mu\text{m} \sim 10 \mu\text{m}$ にも達する) であり、べん毛モーターによって受動的に回転させられて菌体に推進力を与えるプロペラとして働く。べん毛繊維は、サルモネラ菌の場合、1種類のサブユニット (フラジェリン) が重合し、らせん状構造を形成している。フックは、モーターの回転を繊維に伝える「universal joint」として働く。フックも唯1種類のサブユニット (フックタンパク質) の重合体である。ただし、繊維の先端、および繊維とフックの境界には、フック付随タンパク質 (hook-associated proteins) という微量のタンパク質が存在する。基部体は、L、P、MS リングという3つのリング (MS リングは、形態的には2つのリングに見えるが、1つのサブユニットの重合体) をロッドが貫いた形をしている。MS リングとロッドはフックにつながっており、これがモーターの回転子 (rotor) となる。一方、L リングと P リングは、それぞれ外膜 (リポポリサッカライド) とペプチドグリカン層に埋め込まれており、軸受けの役割を果たす。基部体のまわりにある Mot 複合体は、細胞膜内在型タンパク質 (MotA と MotB) からなり、プロトンチャネルとして回転力 (torque) の発生に決定的な役割を果たす。また、MotB はペプチドグリカン結合配列をもつので、モーターの固定子 (stator) と考えられている。Mot 複合体はべん毛を単離する際にはずれてしまうので、未だにその構造はよくわかっていない。主に機能的な解析から、MotA と MotB という2つのタンパク質からなるユニットが、1つの基部体の周りに、8~10個程度存在すると考えられている。スイッチ複合体は FliG、FliM、FliN という3種のタンパク質からなり、MS リングの細胞質側にある (C リング)。これは、Mot 複合体とともに回転力の発生に関わっている。また、走化性のシグナルに応じてモーターの回転方向を変換するスイッチとしても働く。基部体の細胞質側には、後述するべん毛特異的タンパク質輸送に関わる排出装置もあるはずであるが、今のところその構造は明らかになっていない。

1.3 べん毛形成と遺伝子発現制御

べん毛の部品は、べん毛の根本から先端に向けて作られていく (図1-2)。まず初めに膜タンパク質である FliF から成る MS リングが作られる。MS リングは基部体の中心となる構造でべん毛形態形成の最初の段階で電子顕微鏡により観察される (Kubori *et al.*, 1992; Ueno *et al.*, 1992; Ueno *et al.*, 1994)。次に、MS リングのまわりに C リング (スイッチ複合体の3つの部品 (FliG, FliM, FliN) を含む) と呼ばれる円筒状の枠の様な形が作られる (Driks & DeRosier, 1990)。スイッチ遺伝子の欠損によりこれ以降の構造が作られないことから、スイッチ複合体はべん毛回転の向きを変化させる機能のみでなく、べん毛構造を保つ上で重要な働きをもつと考えられている (Kubori, *et al.*, 1992)。

べん毛構造の大部分は細胞膜より外側に位置しているので多くの部品は細胞膜を透過しなければならない。ほとんどのべん毛タンパク質は、Sec 系膜透過装置により認識されるシグナルペプチド配列をもっていないので、べん毛特異的なチャネルにより運ばれると考えられる (Homma *et al.*, 1990)。べん毛繊維やフックの中心部にある中空構造がそのチャネルであるといわれている (Mimori *et al.*, 1995; Morgan *et al.*, 1995)。チャネルの入り口にはべん毛タンパク質を特異的に選択し輸送するべん毛排出装置があると考えられるが構造はわかっていない。べん毛特異的な ATPase である FliI はこの装置のコンポーネントのひとつと考えられている (Dreyfus *et al.*, 1993; Vogler *et al.*, 1991)。

MS リングの内側にべん毛特異的排出装置が配置されるとべん毛タンパク質の輸送が始まる。FlgB、FlgC、FlgG、FlgF はロッドを形成する (Homma *et al.*, 1992)。ロッドが完成すると、先端へのフックの重合が始まる。しかしフックの成長は、おそらく外膜の障害のために、すぐに止まる (Kubori, *et al.*, 1992)。この障害は P リング (FlgI) と L リング (FlgH) が外膜に穴をあけることにより乗り越えられる。FlgI と FlgH は他のべん毛タンパク質とは異なり、シグナルペプチドをもち Sec 系膜透過装置に依存して分泌されることが考えられている。P リングおよび L リングが形成されると、フックの重合が再開するが、これには FlgD とよばれるタンパク質が重要な役割をもつ。FlgD は伸長するフックの先端に位置し、重合の間、フックタンパク質 FlgE

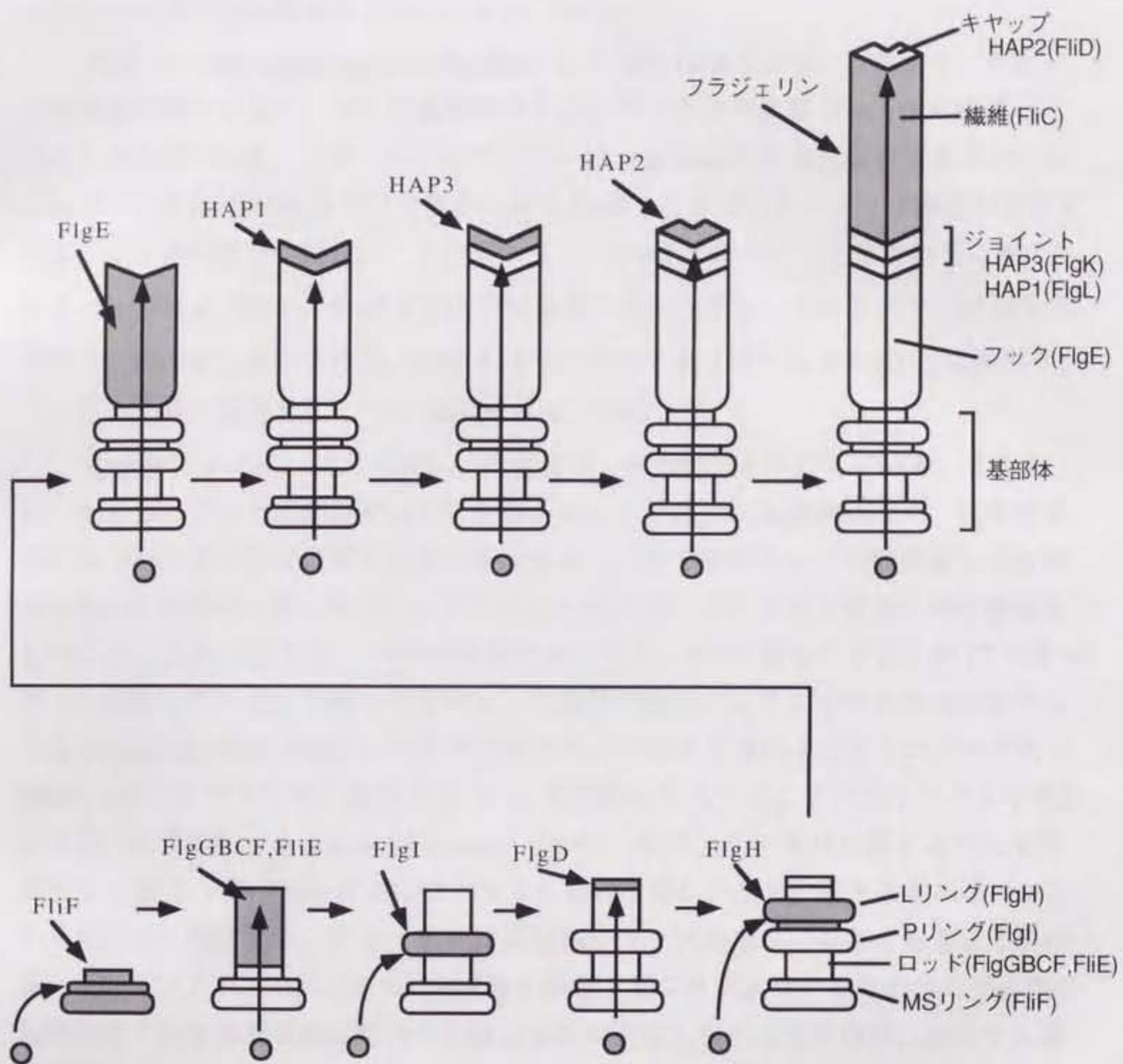


図 1-2 べん毛の形態形成

サルモネラ菌のべん毛の形態形成の段階を示した。

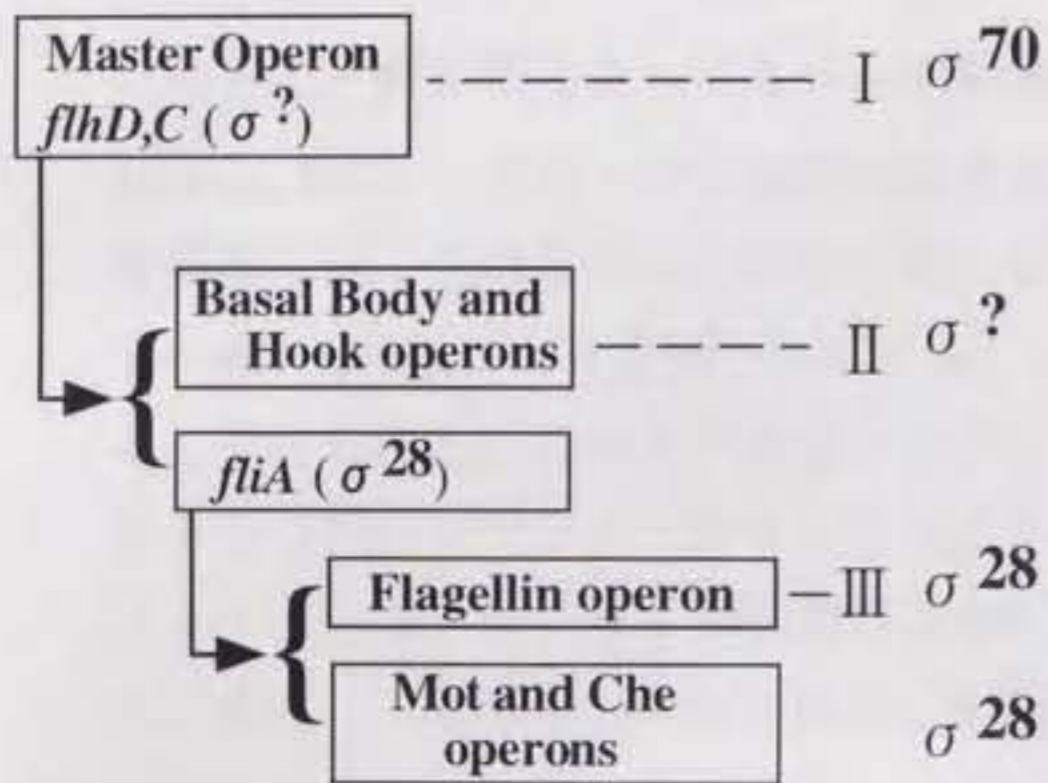
は FlgD のキャップの下に挿入される。フックが完成すると、FlgD は FlgK という別のタンパク質に置き換わる (Ohnishi *et al.*, 1994)。

FlgK は HAP1 (hook associated protein) とよばれ HAP 3 (FlgL) と共にフックとべん毛繊維の間をつなぐ。べん毛繊維はフラジェリンタンパク質 (FliC) から成るべん毛の主要部分である。フラジェリンモノマーは、*in vitro* では自己重合できるが、*in vivo* での重合には FliD タンパク質から成る HAP 2 とよばれるキャップ構造が必要である。フックの場合と同様に、フラジェリンは HAP 2 のキャップ構造の下に重合される (Ikeda *et al.*, 1993)。HAP 2 の欠失変異株では、フラジェリンモノマーは重合できずに培地の中に放出される。HAP 2 はフックのキャップである FlgD とは異なり、べん毛の先端に構造として残る (Ikeda, *et al.*, 1993)。

興味深いことに、べん毛遺伝子の発現は、形態形成と共役している。すなわち、基部体とフックの構造が完全にできあがるまではべん毛繊維形成や、化学感覚受容体やシグナル伝達に関する遺伝子 (後者の 2 種類は明らかに回転機能とは直接関係ない) の発現は起こらない。これはべん毛の遺伝子の発現が厳密な階層構造をもつことによる (図 1-3)。サルモネラにおいては、約 50 個もの遺伝子が 17 のオペロンを形成している。これらのオペロンは発現の順番により 3 つのクラスに分けられる (Kutsukake *et al.*, 1990)。マスターオペロンに属する遺伝子によりコードされる FlhD、FlhC はクラス II に属するオペロンを活性化することにより全てのべん毛遺伝子を最上位で支配する (Liu & Matsumura, 1994)。次に、クラス II に属するべん毛特異的な σ 因子 σ^{28} (FliA) が下位のクラスあるいは同じクラスに属する他のオペロンの発現を正に調節する。クラス II には基部体やフックの形成に関与する遺伝子群が属している。クラス III にはべん毛繊維を形成するフラジェリンを含めべん毛形成の最終段階である繊維形成に関与する遺伝子群や完成したべん毛の機能に関与する遺伝子群が属している。クラス III に属する FlgM は FliA の anti-sigma 因子として働く。FlgM は FliA シグマ因子に結合し、FliA の RNA ポリメラーゼ・コア酵素への結合を阻害することでクラス III 遺伝子群の発現を負に制御する。フックが完成すると、FlgM はフックおよび基部体構造の中を通過して菌体外に排出され、その結果、細胞内の FlgM 濃度が減少し FliA が活性化されてクラス III の発現が開始されると考えられている。

Caulobacter crescentus においても、べん毛遺伝子群の発現のカスケードが明らかになっている (図 1-3)。この菌は、細胞周期と連動してべん毛を形成する。染色体

Salmonella typhimurium
Escherichia coli



Caulobacter crescentus

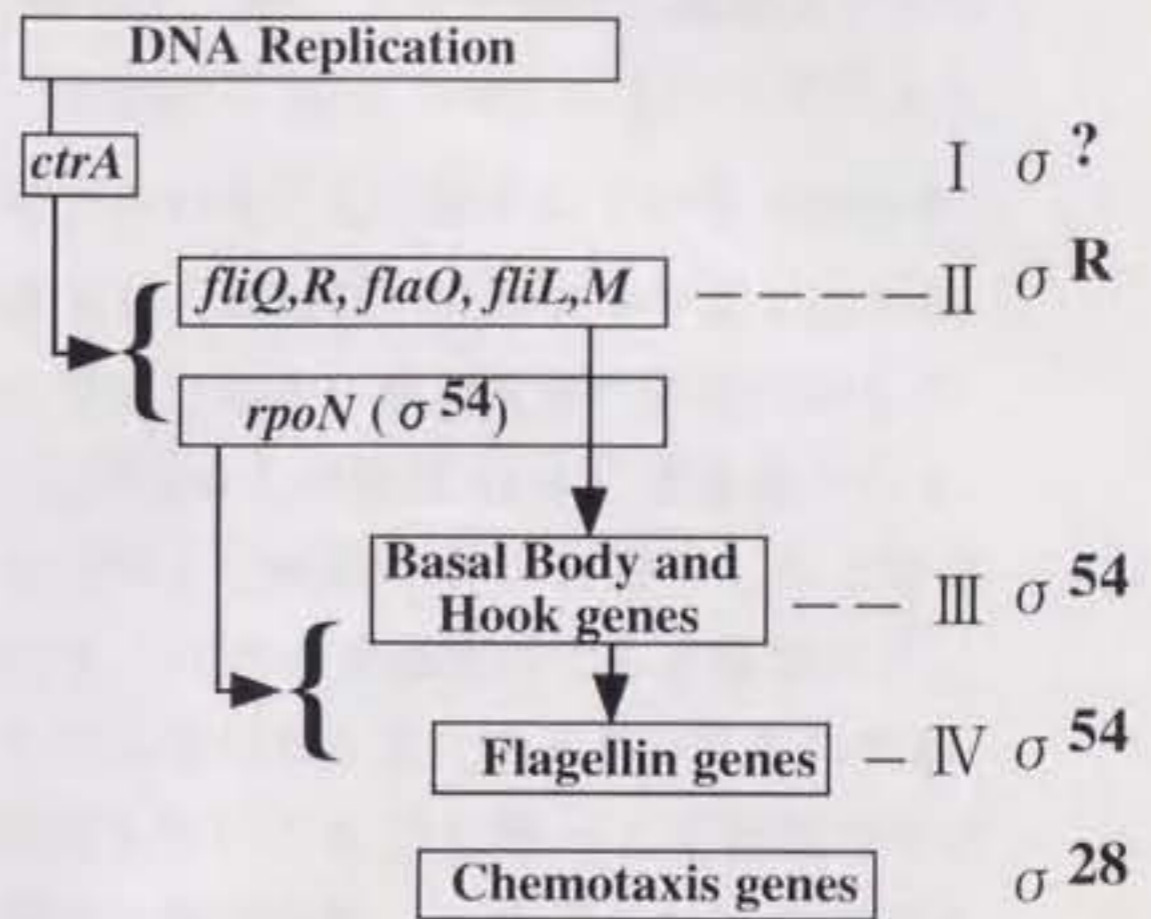


図 1-3 べん毛発現のカスケード・モデル

コーロバクター(左)と大腸菌(右)のべん毛発現のカスケード・モデルを示した。

DNAの複製が引き金となり、MSリングとスイッチタンパク質の遺伝子群および σ 因子が活性化される。次にこの σ 因子により基部体とフックの重合に関する遺伝子群およびフラジェリンの発現が活性化される。サルモネラ菌と異なり、フラジェリン遺伝子の発現には、 σ^{28} ではなく σ^{54} が用いられている。

1.4 ベン毛繊維の形と長さ

ベン毛繊維のらせんは、通常左巻きであるが、pH、イオン強度、温度などの環境の変化によりらせんの巻き方が逆転することがある (Iino, 1985)。またフラジェリンのアミノ酸変異によってもベン毛繊維の形が変わることが知られている (Jones & Aizawa, 1991)。このらせん形状の変化は多型変換と呼ばれ、サルモネラ菌では方向転換時にベン毛の束がほぐれるために必要な機構である。多型変換の機構は朝倉のBi-stableモデルにより説明されている。ベン毛のらせん繊維は11本の素繊維からなると考えられる。このモデルはフラジェリンがベン毛繊維の中でR型とL型と呼ばれる2つのコンフォメーションとることができ、11本の素繊維のうち2種類のコンフォメーションからなる素繊維の割合によりベン毛の形が変化するというものである。最近、このモデルの妥当性が、X線回折をもちいたR型L型ベン毛繊維のサブユニット配置の解析、高分解能でのベン毛繊維の構造解析、N末端またはC末端を限定酵素分解したフラジェリンによるベン毛繊維とのサブユニット配置の比較などの実験によって支持されている (Mimori *et al.*, 1996; Mimori, *et al.*, 1995; Yamashita *et al.*, 1995)。

ベン毛繊維やフックの長さは、どのようにして決まるのであろうか。ベン毛繊維を形成するフラジェリンは前述したベン毛特異的排出装置により輸送される。サルモネラ菌においてはベン毛繊維の伸長速度はベン毛の長さの値に対して指数関数的に減少することが報告されている。これはフラジェリンモノマーがベン毛の中空部分を通る際に生じる摩擦力の大きさがベン毛の長さに応じて増加するためであると考えられている。ベン毛の長さはフラジェリンの供給量により決まると考えられている (Iino *et al.*, 1974)。サルモネラ菌のFliS変異株では野生株より短いベン毛を形成することが報告されている。FliSは、ベン毛特異的なシャペロンとして働き、フラジェリンの輸送を促進すると考えられている。また最近FliSがFlgM輸送の負の制御因子としても働くことが示された。前述したように、anti-sigma因子であるFlgM

が菌体外に排出されることにより、FliA によるフラジェリン遺伝子の発現が活性化される。したがって、FliS 変異株で短いべん毛が形成されるのは、フラジェリンの供給量が減少していることによると考えられる。サルモネラ菌の場合、べん毛の長さは菌体により非常にばらつきがあり、またひとつの菌体のべん毛の本数が増えると長さが減少する。これはフラジェリンの供給量が特にべん毛の長さで連動していないためと考えられる。したがって、べん毛の長さを制御するための積極的な機構は存在していないと思われる。

これに対してフックの長さは比較的よく揃っている。サルモネラ菌の野生株の場合フックの長さは $55 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$ である。(Hirano *et al.*, 1994)。しかしこの分布(約10%)はタバコモザイクウイルスやスファージの tail などの「分子ものさし(ruler)」による長さの調節を行うものに比べれば正確性に欠けるように見える(Katsura & Hendrix, 1984)。フックの長さ決定にこのような正確な「ものさし」分子は存在するのだろうか。フックの長さの調節に関わる2つの遺伝子 *fliK* と *flhB* が知られている(Hirano *et al.*, 1994; Kutsukake *et al.*, 1994)。*fliK* の欠損株ではポリフック(polyhook)と呼ばれる異常に長いフックが生じる。*fliK* 遺伝子変異株の解析から FliK の長さとポリフックの間には関係はみられなかった。FliK は「分子ものさし」としては機能していないと考えられる(Muramoto *et al.*, 1998)。また、*flhB* の変異によりポリフックを生じることがある。しかしながら、*flhB* はべん毛形成の初期段階で必要であり欠損株ではべん毛基部体形成ができない(Kubori *et al.*, 1992)。さらに FliB は細胞膜に局在していることから FliB は「分子ものさし」分子ではなくべん毛排出装置の一部ではないかと考えられる。沓掛らはフックのタンパク質をコードする *flgE* が属するクラス II 遺伝子群の発現にも FliA-FlgM 調節系が働いていることを示した(Kutsukake, 1997; Kutsukake *et al.*, 1994)。このことは、FlgM がフックタンパク質 FlgE の発現制御を行い、フックの長さ制御に関わっている可能性を示している。

1.5 複数のフラジェリンからなるべん毛繊維

細菌の中には、*Rhizobium*、*Caulobacter*、*Campylobacter*、*Vibrio*、*Bdellovibrio*、*Helicobacter*、あるいは多くの古細菌などのように、2種類以上のフラジェリンから成るべん毛繊維をもつものがある。複数のフラジェリンのべん毛内での局在は種によって異なる。たとえば、*Bdellovibrio bacteriovorus* べん毛繊維は基部体側では 28

kDa のフラジェリンから、また先端部分では 29.5 kDa のフラジェリンから構成される。このべん毛繊維は基部体近くと先端部分でべん毛らせんの形状が異なるが、これはフラジェリンの構成の違いであると考えられている (Thomashow & Rittenberg, 1985)。また、*Caulobacter crescentus* のべん毛ではらせんの形状は単一であるが、基部体に近い部分から先端にかけて約 29 kDa、27 kDa、25 kDa のフラジェリンのそれぞれから構成される 3 つの部分から構成されていることがわかっている (Driks *et al.*, 1989; Koyasu *et al.*, 1981)。 *Helicobacter pylori* のべん毛では基部体側は 56 kDa のフラジェリン、先端部分は 57 kDa のフラジェリンから構成されていると考えられている (Kostrzynska *et al.*, 1991)。これらに対して、*Rhizobium lupini* のべん毛は、「複合べん毛 (complex flagella)」と呼ばれ、2 種類の異なるフラジェリンサブユニットが対を形成しながら重合し、べん毛繊維を構成している (Trachtenberg *et al.*, 1986)。この特徴的な構造のため、電子顕微鏡によりべん毛の表面にらせん模様が観察される (Krupski *et al.*, 1985)。また、*Campylobacter coli* の場合、主要な FlaA フラジェリンから成るべん毛繊維の全体に、少量の FlaB フラジェリンが均等に局在していると考えられている (Guerry *et al.*, 1991)。

1.6 鞘を持つべん毛

グラム陰性細菌のべん毛の中には「鞘 sheath」と呼ばれる構造を持つものがある (表 1-1)。1950 年代に、*Vibrio cholerae* において電子顕微鏡観察により鞘の存在が明らかにされた (Shewan & Bennett, 1974)。鞘は菌体外膜から連続した膜構造を持ちべん毛繊維全体を被っていると考えられている (図 1-4)。しかしながら、菌体外膜のリポサッカライド (LPS) に対する抗体が、べん毛の鞘膜に反応しないことが *V. cholerae* において報告されている (Hranitzky *et al.*, 1980)。したがって、鞘膜は、菌体外膜の単なる延長ではないと考えられる。

鞘膜に含まれる成分についてはこれまでに数例の報告しかない。*V. cholerae* において、65 kDa、60 kDa、56.5 kDa の 3 種類のタンパク成分が鞘膜に含まれることが報告されている (Hranitzky, *et al.*, 1980)。これらのタンパク質に対する抗体は鞘膜と細胞表層の両方に反応する。また、*Vibrio anguillarum* において、べん毛鞘膜抗原の発現にかかわる遺伝子 *virA* および *virB* が報告されている。この遺伝子欠損株の解析が

表 1-1 細菌のべん毛の種類と形態

	グラム 染色	べん毛の種類	鞘の有無	備考
<i>Vibrio alginolyticus</i>	陰性	極毛 (単毛) 側毛 (周毛)	有	Na ⁺ 駆動 (極毛) H ⁺ 駆動 (側毛)
<i>Vibrio cholerae</i>	陰性	極毛 (単毛)	有	
<i>Vibrio fisheri</i>	陰性	極毛 (複数)	有	
<i>Pseudomonas andropogonis</i>	陰性	極毛 (単毛)	有	
<i>Campylobacter fetus</i>	陰性	極毛 (単毛)	無	複合べん毛
<i>Rhizobium lupini</i>	陰性	周毛	無	複合べん毛
<i>Escherichia coli</i>	陰性	周毛	無	H ⁺ 駆動
<i>Bacillus subtilis</i>	陽性	周毛	無	H ⁺ 駆動
<i>Bacillus firmus</i>	陰性	周毛	無	Na ⁺ 駆動

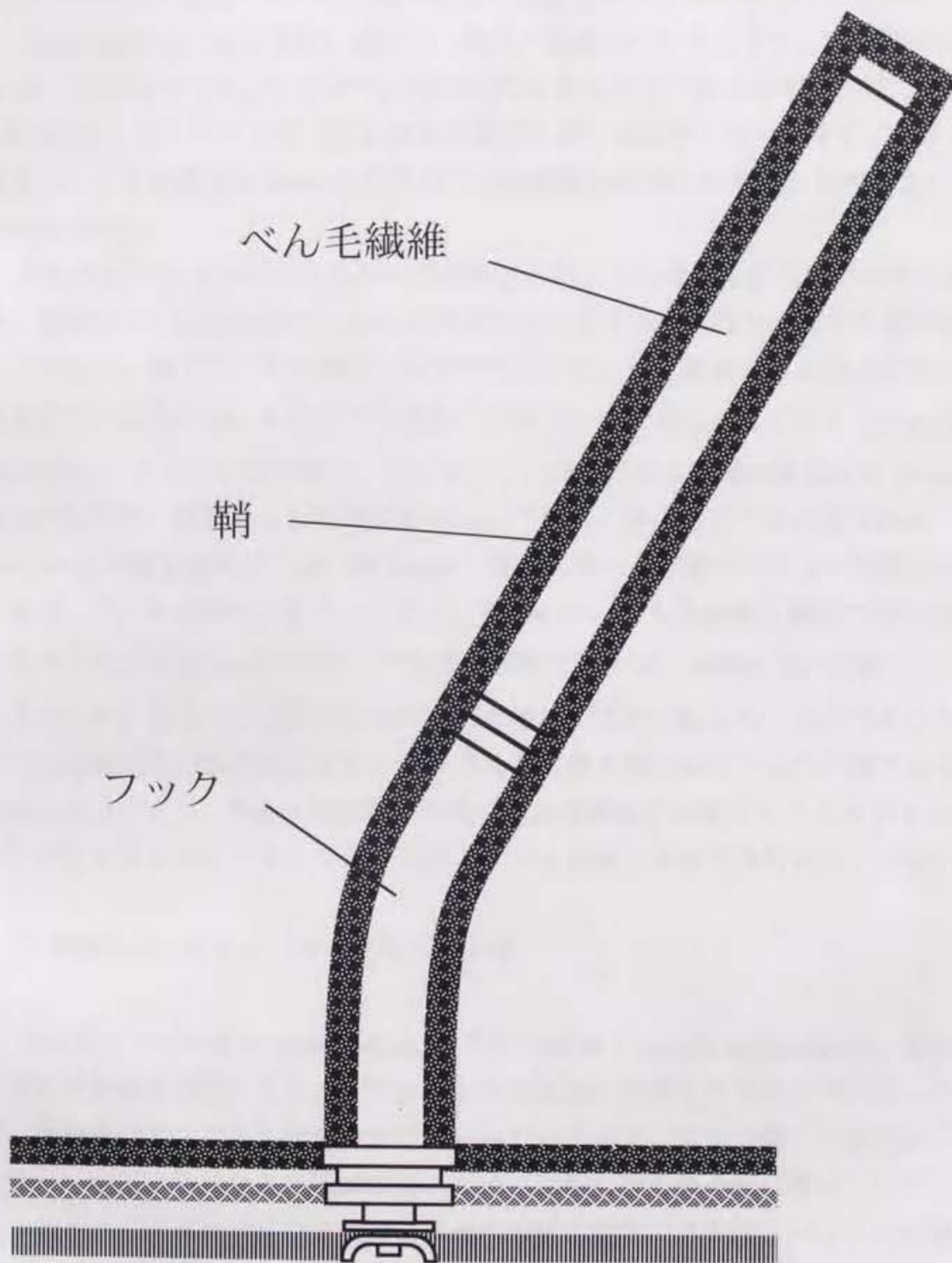


図 1-4 鞘膜をもつべん毛の模式図

ら魚類への感染の過程において鞘膜が重要な役割をもつことが示されている。

Helicobacter pylori は鞘膜に被われた複数の極毛性べん毛をもつ。免疫学的な解析から、29 kDa のタンパク質がべん毛の鞘膜に含まれていることが示されている (Luke, 1995)。このモノクローナル抗体は菌体外膜とは反応しない。またこのタンパク質をコードする遺伝子 *hpaA* の欠失株では鞘膜構造は保たれることが報告されている (Jones, 1997)。

回転器官としてのべん毛において鞘膜はどのような役割を担っているのであろうか。前述のように *Rhizobium lupini* は通常のべん毛のほかに複合べん毛と呼ばれるべん毛を持つ。複合べん毛は鞘膜には被われていないが、通常のべん毛より太くまた強度が高く粘性の高い条件下での運動に有利であると考えられている (Maruyama et al., 1978)。ビブリオ属の場合、べん毛のコア部分である繊維の直径は約 15 nm であるのに対して、鞘膜を含む直径は約 30 nm である。海洋性ビブリオ菌 *Vibrio alginolyticus* の遊泳速度は、60~80 $\mu\text{m/s}$ と非常に早い。鞘膜がべん毛の回転力の伝達に寄与しているのかもしれない。また、Fuerst は、べん毛繊維と鞘膜の間の回転問題を提唱している (Fuerst, 1980)。べん毛が回転する際に、鞘膜も共に回転しているのであろうか、あるいは鞘膜の内側でべん毛繊維だけが回転しているのであろうか。べん毛基部体の基本構造が鞘を持つべん毛と鞘を持たないべん毛の間でよく似ていることなどから、Fuerst は鞘膜の内側でべん毛繊維が回転するモデルがもっともらしいと考えている。しかしながらこのモデルを実証する研究は行われていない。

1.7 2種類のべん毛をもつ海洋性ビブリオ菌

海洋性ビブリオ菌 *V. alginolyticus* やその近縁種 *V. parahaemolyticus* は、夏の間は、海水中を泳ぎまわったり、プランクトンの表面に付着して生活している。この菌は、動物性プランクトンの外骨格をつくっているキチン質を分解して利用する能力を持っている。冬になると低温に弱いため、海底に棲む魚介類に寄生して冬を越す。このように海洋性ビブリオ菌は、海水中と他の生物の体表面という2つの異なる環境下で生活する (Kaneko & Colwell, 1973)。海水中を泳ぎまわるときのビブリオ菌 (遊走細胞) は、直径 0.5 μm 長さ 2 μm の短い桿型をしており、菌体極部にある1本の極毛で遊泳している (図 1-5)。一方、動物性プランクトンなど粘液質の体表面に付着すると、隔壁形成が抑制されて菌の長さが 30 μm にも達する多核の細胞

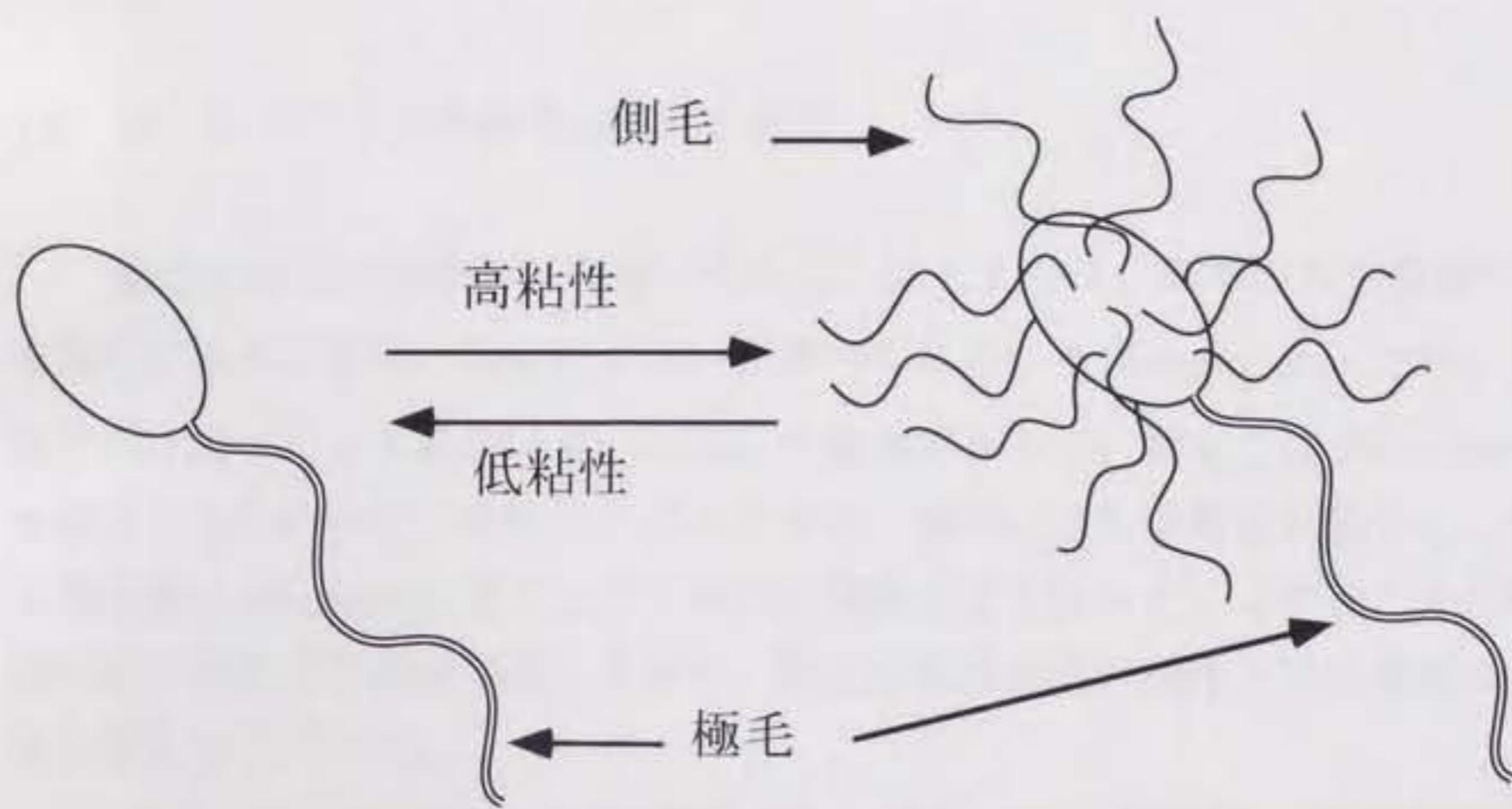


図 1-5 海洋性ビブリオ菌のべん毛発現

海洋性ビブリオ菌は、通常一本の極毛をもつ（左側）が魚の体表面など高粘性の環境では極毛に加えて多数の側毛を発現する（右側）。

(群遊細胞)に変化する。この時、極毛とは形態的に異なった側毛が菌体周囲に多数発現してくる (McCarter & Silverman, 1990)。側毛はその表面への付着や表面での移動に関与していることがわかっている (Belas & Colwell, 1982; Shinoda & Okamoto, 1977)。極毛は外膜から連なる鞘をかぶっており、直径は 24 ~ 30 nm、鞘内のコア部分の直径は 14 ~ 16 nm、波長は 1.5 μm である (図 1-6)。一方、側毛は鞘を被っておらず、直径は 14 ~ 15 nm、波長は 0.9 μm である (Belas & Colwell, 1982)。

1.8 海洋性ビブリオ菌極毛の構造と機能

極毛と側毛は機能的にも違いがある。極毛または、側毛のみを発現する変異株を用いて極毛と側毛の機能的な違いが調べられている (Atsumi *et al.*, 1996)。低い粘性下では極毛による運動は 60 $\mu\text{m}/\text{sec}$ で遊泳できるが、側毛では 20 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 程度でしか遊泳できなかった。粘性が上がるにつれ、極毛による運動能は低下し、側毛による運動能は 40 $\mu\text{m}/\text{sec}$ まで上昇し極毛の運動能を上回った。このことから極毛は粘性の低い条件での遊泳に適しており、側毛は粘性が高い条件下での運動に適していると考えられている。

また、突然変異株を用いた解析から、極毛は Na^+ 駆動型、側毛は H^+ 駆動型モーターにより回転することが知られている (Atsumi *et al.*, 1992; Kawagishi *et al.*, 1995)。最近、我々の研究室で海洋性ビブリオ菌 *V. alginolyticus* における遺伝子解析系が確立され、 Na^+ 駆動型モーターの構成タンパク質をコードする遺伝子が単離された。これまでに、*pomA*、*pomB*、*motY* の 3 つの遺伝子がクローニングされている (Asai *et al.*, 1997; Okunishi *et al.*, 1996)。また、近縁種の *V. parahaemolyticus* では *motX* と *motY* の 2 つのモーター遺伝子がクローニングされている (McCarter, 1994; McCarter, 1994)。*PomA*、*PomB* は、それぞれ 4 回膜貫通型、1 回膜貫通型で、大腸菌 (H^+ 駆動型) の *MotA*、*MotB* と相同性をもつ。*MotX*、*MotY* (ともに 1 回膜貫通型) は他の細菌では見つかっていないが、べん毛の回転に必須である。

粘性の高い条件下で側毛が発現することから、ビブリオ菌の菌体は粘性の上昇を何らかの方法で感じていると考えられる。興味深いことに、そのセンサーは極毛自身である (McCarter *et al.*, 1988; McCarter & Silverman, 1990)。極毛の Na^+ 駆動型モーターの阻害剤であるフェナミル (アミロライドの誘導体) を用いて、極毛回転の低

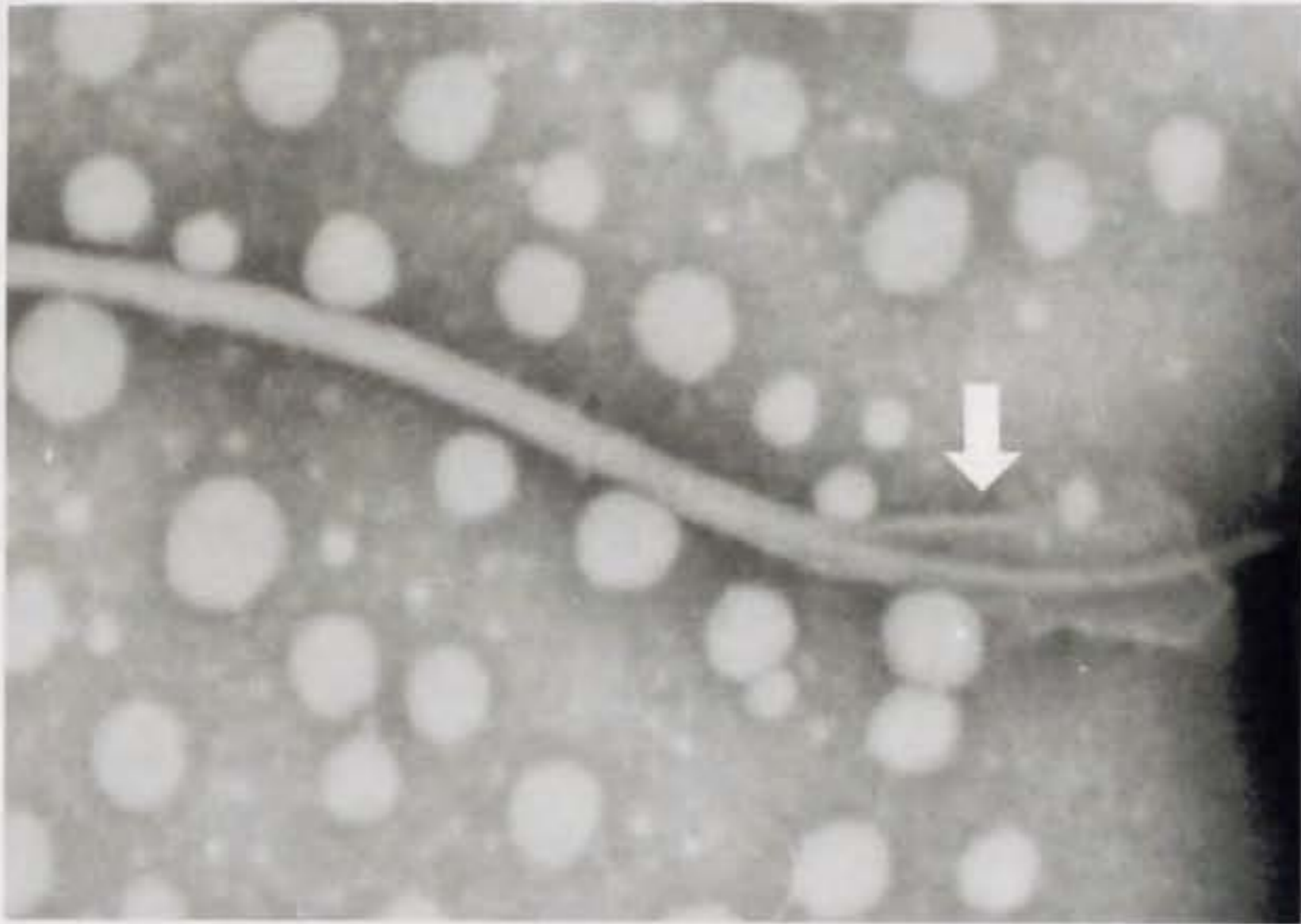


図 1-6 極毛の電子顕微鏡像
矢印で示した部分は鞘膜が破れており
コアであるべん毛繊維が露出している。

下と側毛遺伝子の発現の間に相関関係があることが示された (Kawagishi *et al.*, 1996)。このことから極毛は力学的センサーとして働き、側毛の発現を制御すると考えられている。

極毛の回転についてはレーザー暗視野顕微鏡を用いて調べられている。レーザー暗視野顕微鏡はべん毛のらせんに対して斜めにレーザー光をあて散乱光強度の変化を解析し回転速度を計測するシステムである。この方法により、極毛は最高毎分10万回転という驚異的なスピードで回転していることがわかった (Magariyama *et al.*, 1994; Muramoto *et al.*, 1995)。なぜこのような高速回転ができるのかはわかっていない。また、極毛の基部体構造について電子顕微鏡による観察が行われている (Arai, unpublished observation)。全体の外形はサルモネラ菌のべん毛基部体とほぼ同様であったが、LPリングの直径が約1.5倍あった。このような構造の違いが極毛の機能や鞘膜という形態的な特徴と関係があるのか興味深い。

多くのビブリオ属において、極毛はすくなくとも2種類のフラジェリンから構成されていることが知られている (Shinoda & Okamoto, 1977)。また、*V. parahaemolyticus* では、極毛のフラジェリンをコードする遺伝子 *flaA*, *flaB*, *flaC*, *flaD* がクローニングされている (McCarter, 1995)。これらの遺伝子は、染色体上で *flaAB* および *flaCD* の二つの部位に分かれている。*flaA*, *flaB* および *flaD* は、 σ^{28} 型のプロモーター配列を持ち大腸菌で σ^{28} をコードする *fliA* 遺伝子に依存して発現することが確認されている。これに対して、*flaC* は、*fliA* には依存しない。*flaC* は σ^{54} 型のプロモーターを持つが、 σ^{54} を欠損した大腸菌の菌体中에서도発現することが確認されている (Stewart & McCarter, 1996)。*flaAB* 部位の下流には、*flaG*, *flaH*, *flaI*, *flaJ*, *flaK* が存在する (Stewart & McCarter, 1996)。*FlaJ* は前述した大腸菌の *FliS* (フラジェリン遺伝子の発現調節に関係する) とホモロジーを持つ。また、*FlaK* は σ^{54} を含む RNA polymerase のアクチベーターとして働く *NtrC*, *NifA* 等のホモログをコードする。*flaC* の発現には、*flaI* と *flaK* の両方が必要であるのに対して、他のフラジェリン遺伝子の発現は、*flaI* は必要だが *flaK* は必要でない。*flaH* は HAP2 (cap)、*flaI* は rod タンパク質のホモログをそれぞれコードしているが、*flaG* は 15 kDa の未知のタンパク質をコードする。

また最近、*V. alginolyticus* の σ^{54} RNA サブユニットをコードする *rpoN* 遺伝子がクローニングされ、極毛遺伝子の発現に関わっていることが示されている。

(Kawagishi *et al.*, 1997)。

当研究室において、*V. alginolyticus* のべん毛に関する様々な変異株が採られている。極毛の形態に関する変異株、すなわち野生型の約2倍の長さの極毛を持つ長極毛株、約1/2の長さの極毛を持つ短極毛株、多数の極毛を持つ多極毛株、またべん毛を持たないべん毛欠損株なども単離されている。とくに、べん毛の長さがこれほどはっきりと変化した例は珍しく、これらの変異体は、鞘をもつべん毛の形態形成機構を探る上で有用であると考えられる。

<第2章 材料と方法>

2.1 使用した菌株と培養条件

本研究に用いた海洋性ビブリオ菌 *V. alginolyticus* および大腸菌 *E. coli* 株を表2-1に示した。ビブリオ菌の培養にはVC培地またはVG培地を用い、30℃で振盪した。必要に応じて、抗生物質クロラムフェニコール、カナマイシン、リファンピシン、テトラサイクリンを各々2.5 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、1.25 $\mu\text{g/ml}$ になるように加えた。大腸菌の培養には、LB培地を用いた。抗生物質はクロラムフェニコール、カナマイシン、テトラサイクリンを各々25 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、12.5 $\mu\text{g/ml}$ になるように加えた。

2.2 培地とバッファー

VC培地は0.5% (w/v) polypeptone、0.5% yeast extract、0.4 (w/v) K_2HPO_4 、0.2% glucose、500mM NaCl から成る。VG培地は1% (w/v) polypeptone、0.4% (w/v) K_2HPO_4 、0.5% glycerol、3% NaCl から成る。

TNM バッファーは50 mM Tris/HCl (pH7.5)、300 mM NaCl、5mM MgCl_2 から成る。Tris-motility バッファーはTNM バッファーに5 mM glucose を加えた。NaCl 濃度を変化させる場合はKCl を加え、塩濃度を一定に保つようにした。V-buffer は25 mM Tris/HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、10mM MgCl_2 から成る。

2.3 高輝度暗視野顕微鏡

極毛の観察は100Wの水銀ランプ(Ushio USH-102)を組み合わせた暗視野顕微鏡(オリンパス model BHT)を用いて行った。

2.4 べん毛の長さの測定

対数増殖期後期の菌体を高輝度暗視野顕微鏡下でビデオテープに記録した。モニター上で再生した菌体像のべん毛の長さ(らせん軸の長さ)を計測した。この時べん毛像を見やすくするために高強度の光を当てるため、菌体像が実際より増幅さ

れべん毛像の上に重なる。そこで弱い光で計測した実際の菌体の大きさを元にべん毛の長さの補正を行った。

2.5 遊泳速度の測定

対数増殖期後期の菌を遠心により集め、Tris-motility バッファー (50 mM NaCl, 250 mM KCl) に懸濁し、高輝度暗視野顕微鏡下で菌の運動をビデオテープに記録した。画像処理装置 (Image Σ -II; Avionics) により積算した画像上で運動の軌跡の長さを計測した。

2.6 電子顕微鏡観察

試料を 2% potassium phosphotungstate (pH7.0) によりネガティブ染色し、電子顕微鏡 (JEM-1200 ESII; 日本電子) により観察した。

2.7 べん毛らせんの形状の計測

VC 寒天培地上で生育させたコロニーを 2% potassium phosphotungstate に懸濁し電子顕微鏡で菌体像を記録した。30 サンプルの写真像よりべん毛らせんの波長と振幅を計測した。波長は三次元のべん毛らせんのピッチと同じ値であるとした。

2.8 極毛の精製

各株を VC 培地で一晚培養し、1.5% の寒天培地上に $2\mu\text{l}/\text{cm}^2$ になるように広げた。約 20 時間後に寒天培地上の菌をかき集め、V-buffer に懸濁した。菌体懸濁液を 10 分間ボルテックスミキサーにかけ、 $10,000 \times g$ で 10 分間の遠心によりべん毛を分離した。沈殿した菌体を再度 V-buffer に懸濁し再度べん毛を分離した。集めた上清を $80,000 \times g$ で 60 分間で超遠心した。沈殿を V-buffer に懸濁し、これを極毛分画とした。

2.9 SDS-PAGE と免疫プロット

表 2-1 本研究で用いたビブリオ菌株および大腸菌株

Strain	Phenotype or genotype	Parent strain
<i>V. alginolyticus</i>		
NMB90	Long-Pof Laf ⁻	YM4
NMB103	Pof ⁻ Laf ⁻	YM4
NMB126	Pof ⁻ Laf ⁻	VIO5
NMB175	Pof ⁻ Laf ⁻	VIO5
VIO5	Pof ⁺ Laf ⁻	VIK4
VIO578	Long-Pof Laf ⁻ Rif ^r	VIO5
VIO560	Pof ⁻ Laf ⁻	VIO5
VIO587	Pof ⁻ Laf ⁻	VIO5
YM4	Pof ⁺ Laf ⁻	138-2
YM43	Short-Pof Laf ⁻	YM4
YM44	Pof ⁻ Laf ⁻ (σ^{54} gene defective)	YM4
<i>E. coli</i>		
SM10 λ pir	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km</i>	
SY327 λ pir	Δ (<i>lac pro</i>) <i>argE</i> (Am) <i>rif nalA recA56</i>	

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、次のようにして行った。サンプルに、6×SDS-loading buffer (0.4 mM Tris-HCl pH6.8, 50% glycerol, 6% SDS, 0.2% bromophenol blue) 1/5 容と、 β -メルカプトエタノール 1/10 容を加え、100℃で5分間加熱した後、6%～14%のアクリルアミドゲルで20 mAの定電流で80～120分間通電しタンパク質成分を分離した。ゲルを0.1%クマシーブルー染色液で30分間染色した後、7%酢酸溶液に浸し一晩脱色した。脱色後のゲルは水洗した後、ゲルドライヤーにより乾燥した。

免疫プロットを行う場合は、泳動後のゲルを blotting buffer に浸し、15分間振とうしてゲルを平衡化した後、セミドライプロット装置(バイオクラフト)により定電流100 mAで30分間で、タンパク質成分をPVDF膜に移した。膜をプラスチックケースに移し、15 mlの3%スキムミルクに浸し10分間振とうした。液を捨て1%スキムミルクを10 ml入れ、一次抗体を5 μ l (2,000倍希釈)加え、一晩振とうして一次反応させた。1%スキムミルクでリンスした後、1%スキムミルクを10 ml入れ10分間振とうした。この作業を再度行った後、1%スキムミルクを10 ml入れ、アルカリフォスファターゼ標識した抗ウサギIgG抗体を10 μ l (1000倍希釈)加え二次反応させた。2時間反応後、一次反応の時と同様に膜を洗った。蒸留水により膜を洗った後、アルカリフォスファターゼ発色液を加え振とうした。発色後、蒸留水で十分洗い、風乾した。

2.10 N末端配列の決定

極毛分画をSDS-PAGEで分離し平野ら(1988)の方法に従ってPVDF膜にプロットした。各バンドを切り出して気相シーケンサー(名古屋大学遺伝子実験施設)で分析した。

2.11 PF60の精製とN末端配列の決定

極毛分画に等量の2.0% TritonX-100溶液を加え混合後、80,000 x gで60分間超遠心した。超遠心上清に等量の電気泳動用試料bufferを加え熱処理後、7.5%アクリルアミドゲルで電気泳動した。染色後PF60のバンドを切り出し、リジルエンドペプチダーゼを含む500 mM Tris-HCl buffer (pH9.0)を加え37℃で24時間処理した。その後、溶液の全量を逆相HPLCにかけ、断片ペプチドを分離した。3種類のペプ

チドについて、気相シーケンサーでN末端アミノ酸配列を決定した。

2.12 抗体の作製

PF60 抗体の作製は次のようにして行った。長極毛株 NMB90 べん毛分画を TritonX-100 処理後、超遠心により分離し上清分画を SDS-PAGE により分離した。クマシーブルー染色後、PF60 のバンドを切り出し本間らの方法に従ってウサギに免疫し、抗血清を得た (Homma *et al.*, 1992)。PF45 抗体の作製は、野生株 YM4 のべん毛分画を SDS-PAGE で分離し、染色後 PF45 のバンドを切り出し、PF60 抗体と同様の方法で作製した (Nishioka, *et al.*, 1998)。また、PF60 ペプチド抗体は以下のように行った。*pfsA* 遺伝子から予測される PF60 のアミノ酸配列の 96 番目から 115 番目および 301 番目から 319 番目の残基に Cys 残基を加えた配列を持つペプチドを合成した。これらの合成ペプチドをウサギに免疫し、抗血清を得た。96 ~ 115 番および 301 ~ 319 番目のペプチドに対する抗体をそれぞれ PF60-96 抗体および PF60-301 抗体と命名した。

2.13 遺伝子操作および塩基配列決定

基本的な遺伝子操作は Sambrook らの方法に従って行った (Sambrook, 1989)。塩基配列決定は、Universal primer または 合成 primer を用いて ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit で反応させ、ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (PERKIN ELMER) で解析した。*pMFS2* の塩基配列決定を行う際には、制限酵素地図 (図 6-5) に基づき各種欠失プラスミドを作製し、各プラスミドの挿入断片の配列を決定し DNASIS-MAC V3.2 (HITACHI SOFTWARE ENGINEERING) を用いて解析した。

<第3章 長さの異なる極毛をもつ変異株のべん毛の長さと運動>

この章では、野生型極毛株 YM4、短極毛株 YM43、長極毛株 NMB90 の3種類の極毛の長さの異なる株について、べん毛の長さと運動能との関係を調べた。さらにその過程から、長極毛株と野生型株における極毛の形状の違いを見いだしたので報告する。

3.1 べん毛の長さ変異株の特徴

海洋性ビブリオ菌 *V. alginolyticus* の野生型極毛株 YM4、短極毛株 YM43 および長極毛株 NMB90 の電子顕微鏡像を図 3-1 に示した。野生型極毛株 YM4 は側毛欠損株で、野生型の極毛を持つ。YM43 および NMB90 は YM4 を親株としてとられた極毛の長さに関する変異株で、それぞれ野生型極毛の約 1/2、2 倍の長さの極毛を持つ。この電子顕微鏡像における極毛の長さは、それぞれ $4.5 \mu\text{m}$ 、 $2.2 \mu\text{m}$ 、 $9.1 \mu\text{m}$ である。海洋性ビブリオ菌の極毛は通常は単毛性だが、希に複数の極毛が観察されることがある (図 3-1)。この時、複数の極毛間での長さは揃っていた。

図 3-2 に、各株の軟寒天培地上でのスワームを示した。野生型極毛株 YM4 は軟寒天培地上で極毛により運動し大きなスワームを形成する。これに対して長極毛株 NMB90 および短極毛株 YM43 は、親株 YM4 と比較して小さいスワームしか形成できない。また野生型株と短極毛株のスワームは外縁がはっきり観察できるが、長極毛株ではぼんやりしており逆にスワームの中央付近に菌が多い。短極毛株と長極毛株では、極毛による運動能が低下していると考えられる。

3.2 べん毛の長さと遊泳速度

これらの株の極毛の長さを高輝度暗視野顕微鏡下で計測した (図 3-3)。野生型株 YM4、短極毛株 YM43、長極毛株 NMB90 の極毛の長さはそれぞれ、 $5.5 \mu\text{m} \pm 0.9 \mu\text{m}$ 、 $2.5 \mu\text{m} \pm 0.6 \mu\text{m}$ 、 $11.2 \mu\text{m} \pm 3.6 \mu\text{m}$ であった。野生型極毛株および短極毛株では、べん毛の長さは非常によく揃っていた。これに対して長極毛株のべん毛の長さは $4 \mu\text{m}$ から $20 \mu\text{m}$ まで大変ばらつきが多かった。

短極毛株および長極毛株におけるスワーム能の低下は極毛による運動能の低下に因るものであることが予想される。そこで各株の液体培地中での遊泳速度を計測

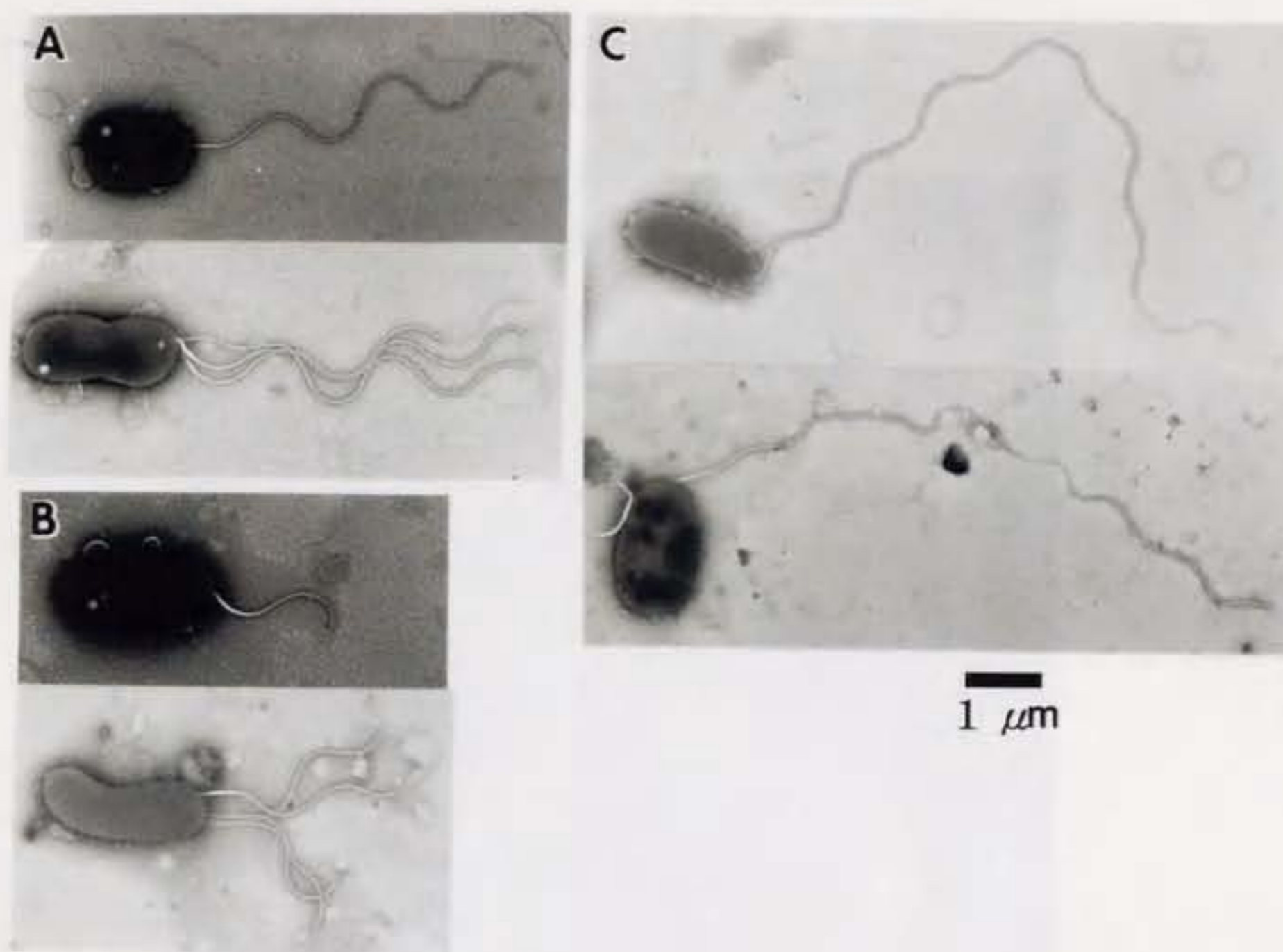


図 3-1 海洋性ビブリオ菌のべん毛長変異株の電子顕微鏡像
Vibrio alginolyticus YM4 株 (A)、YM43 株 (B)、NMB90 株
 (C) の菌体を potassium phosphotungstate でネガティブ染色
 し、電子顕微鏡で観察した。バーの長さは $1\mu\text{m}$ 。

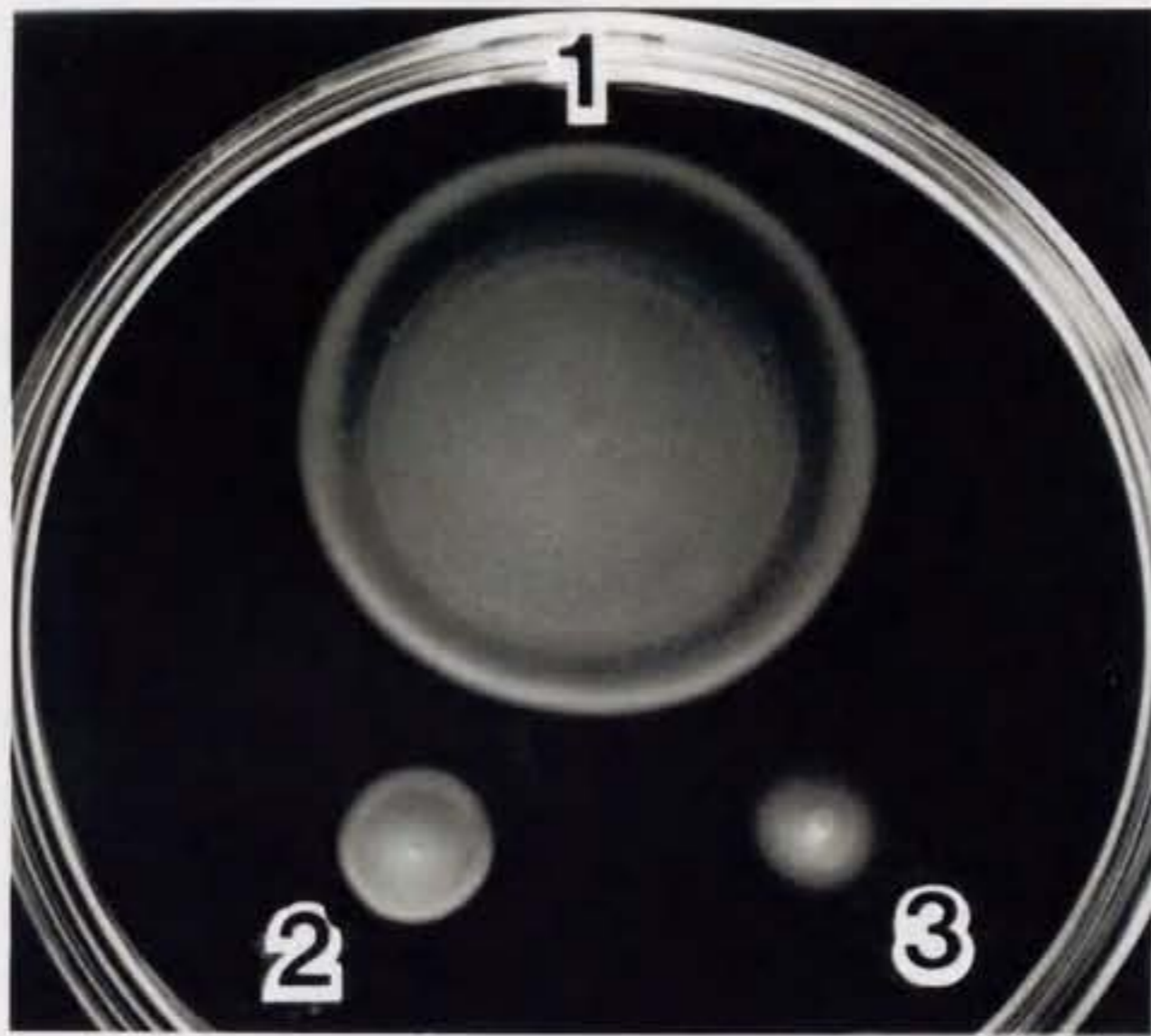


図 3-2 極毛長変異株のスワーム

野生型極毛株 YM4 (1)、短極毛株 YM43 (2)、長極毛株 NMB90 (3) のスワームを示した。コロニーを 0.3% 寒天培地上に接種し 30 °C で 6 時間培養した。

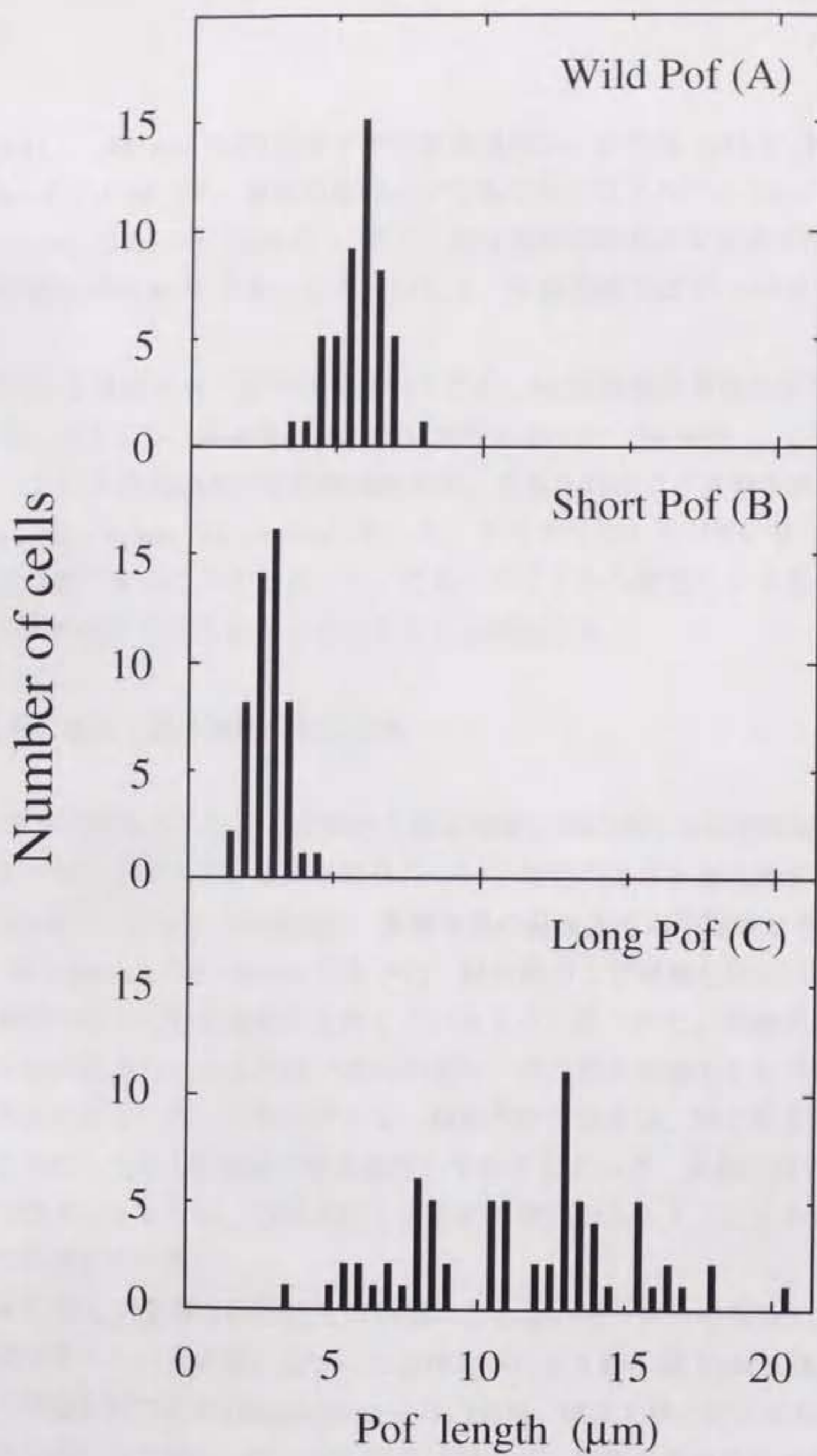


図 3-3 極毛長変異株におけるべん毛長さの分布
 各株の対数増殖期の液体培養液を暗視野顕微鏡下で観察し、
 ビデオテープに記録した。各菌体のべん毛の長さをモニター
 上で計測した。

した(図3-4)。300 mM NaCl 存在下での遊泳速度は、野生株 YM4 が $68 \pm 13 \mu\text{m/sec}$ であったのに対して、長極毛株および短極毛株ではそれぞれ $53 \pm 17 \mu\text{m/sec}$ 、 $32 \pm 15 \mu\text{m/sec}$ であった(図3-4)。また、野生型極毛株および短極毛株では、泳いでいる菌の割合が約 80% であったのに対して、長極毛株では 20~30% と非常に低かった。

極毛による運動の Na^+ 依存性を調べるため、NaCl 濃度を変化させた時の遊泳速度を計測したところ、各株共 Na^+ 濃度依存性を示した(図 3-5)。この時、300 mM NaCl における遊泳速度の平均値は野生株、短極毛株および長極毛株それぞれ、 $76 \mu\text{m/sec}$ 、 $53 \mu\text{m/sec}$ 、 $30 \mu\text{m/sec}$ であった。すなわちべん毛が短い場合も長い場合も遊泳速度は低下することがわかった。これらのことから極毛による遊泳速度の低下がスワームの低下を引き起こしていることが確認された。

3.3 べん毛の長さとの遊泳速度の相関関係

これまでの結果からべん毛の長さとの遊泳速度の間に何らかの相関関係がある可能性が考えられた。そこで、次に各菌体について極毛の長さとの遊泳速度を同時に測定した(図3-6)。野生株、短極毛株、長極毛株の遊泳速度の平均値はそれぞれ、 $68 \mu\text{m/sec}$ 、 $45 \mu\text{m/sec}$ 、 $29 \mu\text{m/sec}$ であった。野生株および短極毛株では、極べん毛の長さの増加に応じて遊泳速度も上昇しているように見られた。短極毛株において、約 $5 \mu\text{m}$ の長さのべん毛を持つ菌体の場合、同じ長さの極毛をもつ野生株とほぼ同じ遊泳速度を示した。これに対して、長極毛株の場合は、同じ長さの極毛を持つ野生株と比較して約 1/3 程度の遊泳速度しか示さなかった。長極毛株の場合もべん毛の長さの増加にともない、遊泳速度も上昇する傾向があるようにもみえたが、非常にばらつきが多かった。

図 3-6 に示した実線は回転速度の増加にともないモーターの発生するトルクが直線的に減少するという仮定に基づいた流体力学により野生株 YM4 の値に合うように計算した理論曲線である(Magariyama *et al.*, 1995)。短極毛株と野生型株のプロットはこの理論曲線に比較的近い値を示したのに対して、長極毛株の遊泳速度は理論曲線から推定される値よりかなり低かった。長極毛株の遊泳速度の低下はべん毛の長さ以外の原因が関わっていることが予想された。

3.4 極毛の形状計測

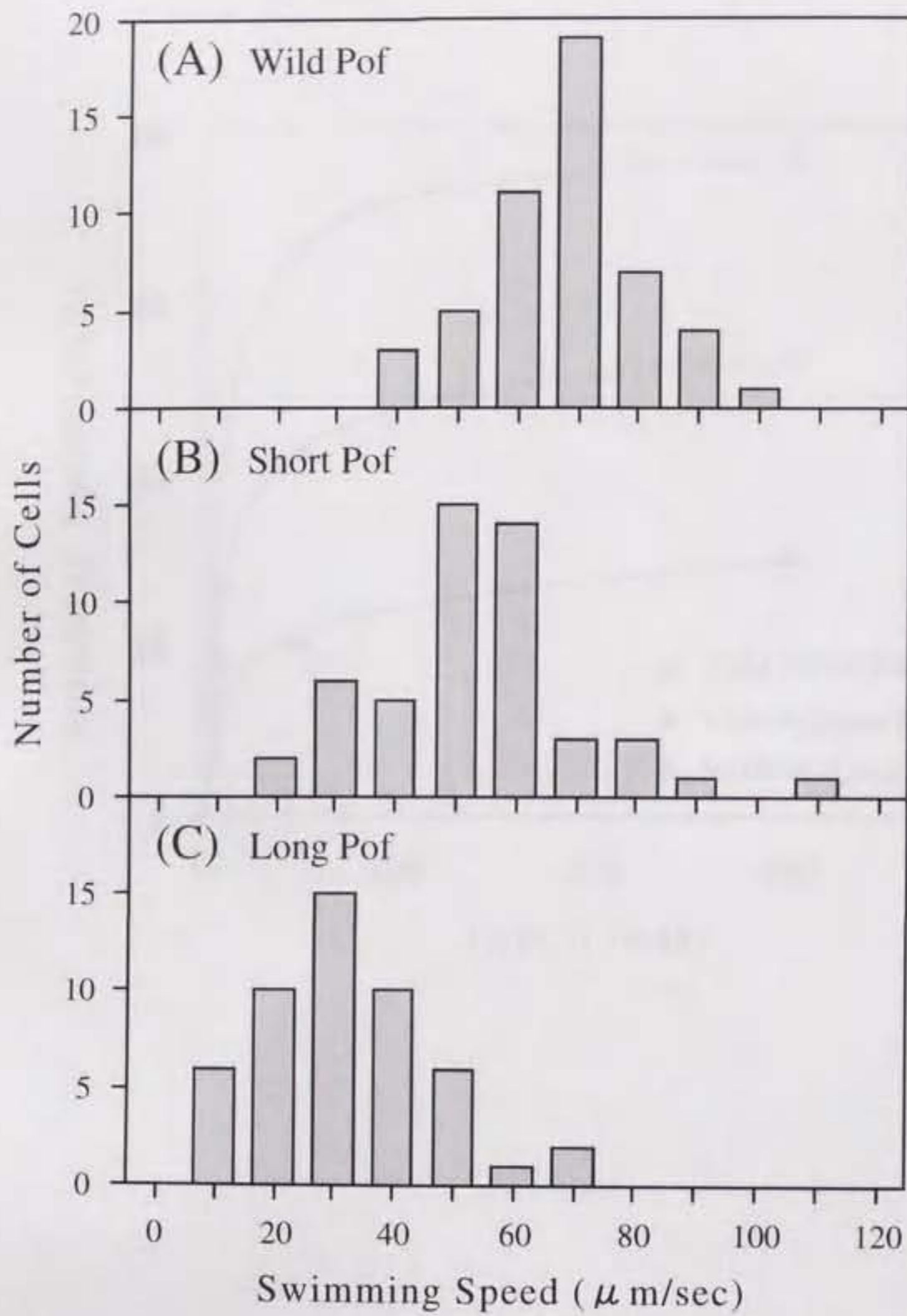


図 3-4 極毛長変異株の遊泳速度

対数増殖期後期の菌体を集菌し、Tris-motility buffer 中での遊泳速度を計測した。

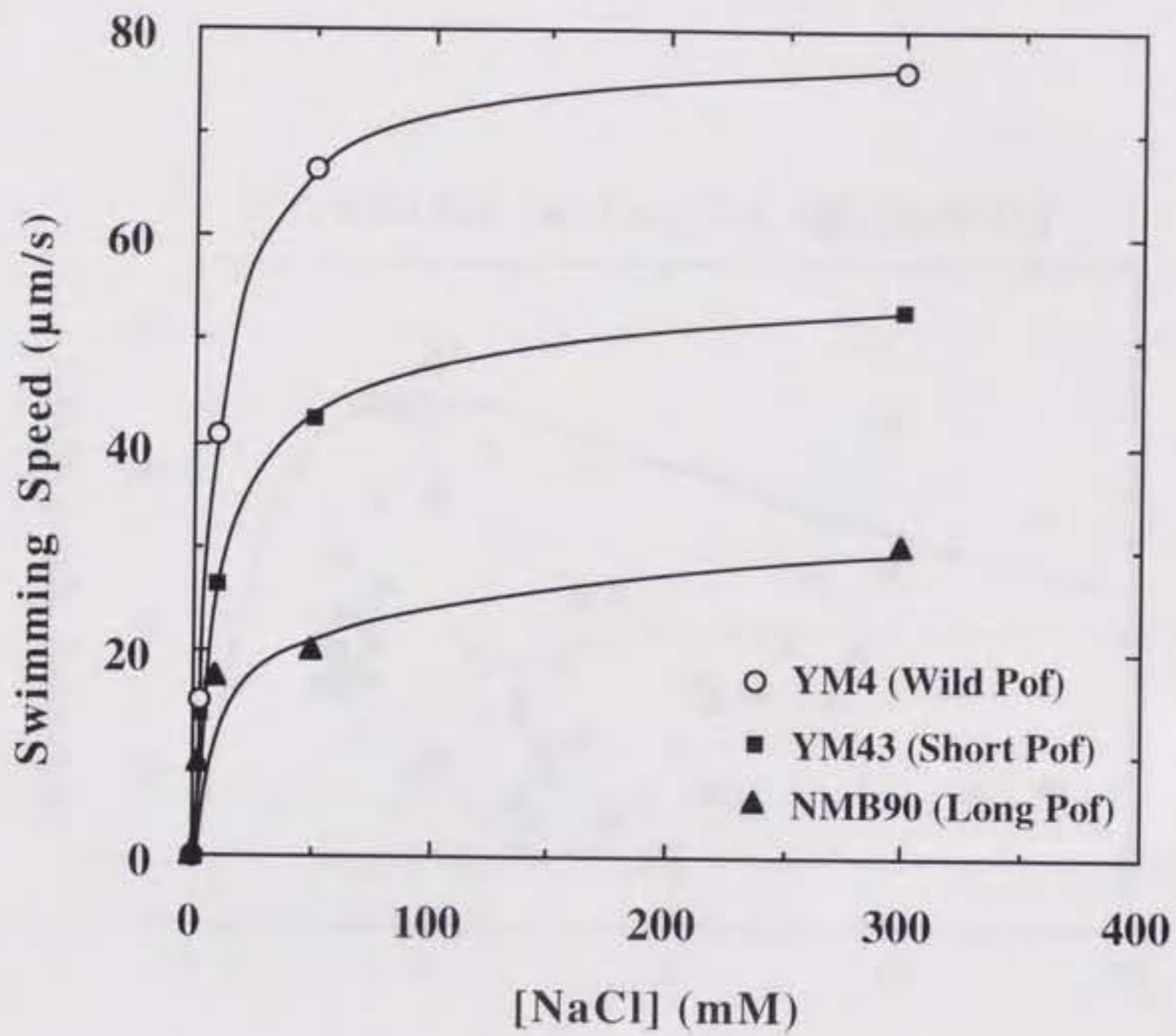


図 3-5 極毛長変異株のNaCl 濃度による遊泳速度の変化

各濃度の NaCl を含む Tris motility buffer 中での遊泳速度を測定した。

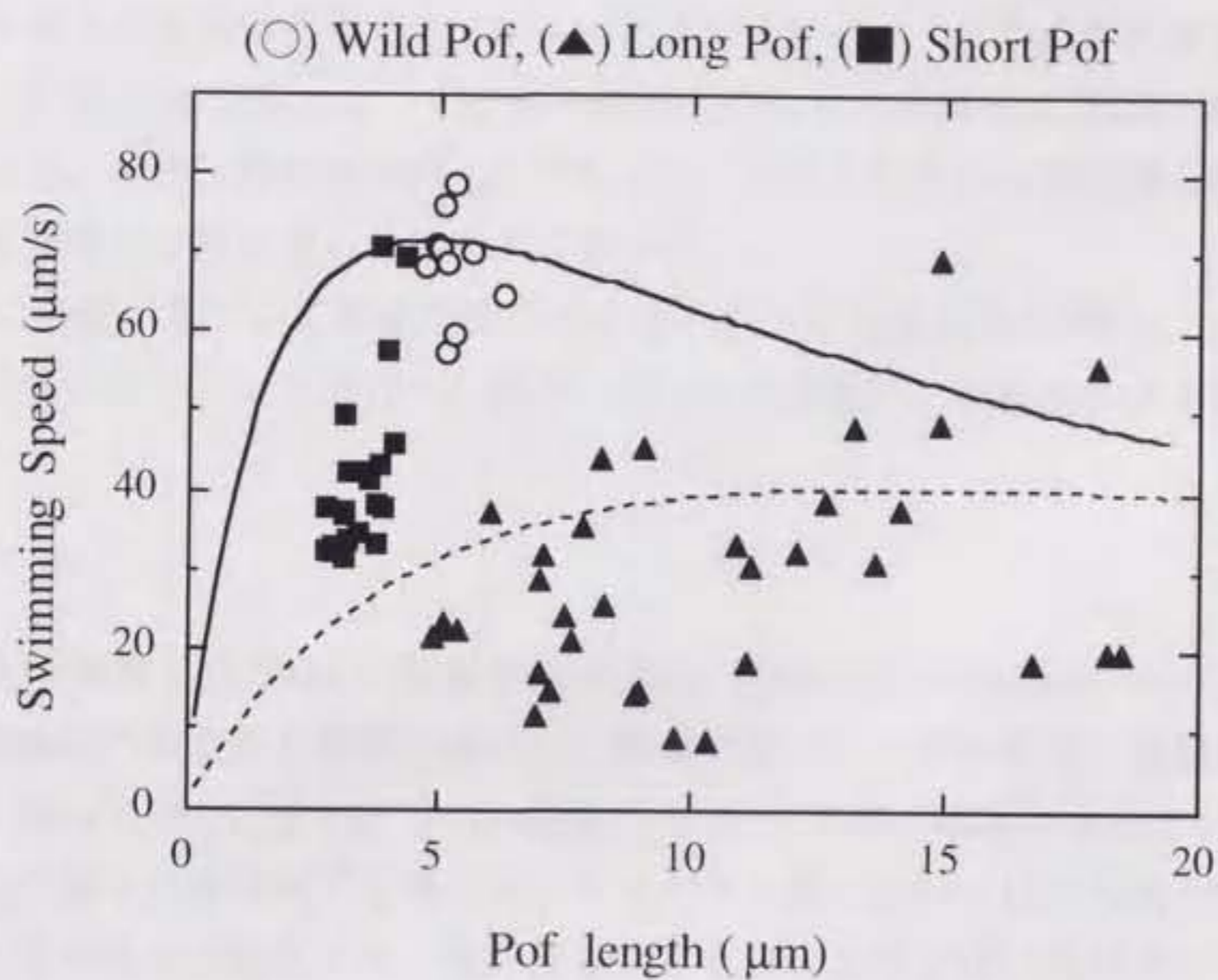


図 3-6 べん毛の長さとう泳速度の関係

対数増殖期後期の菌体を 300 mM NaCl を含む Tris-motility buffer に懸濁して暗視野顕微鏡下で録画し、モニター上で個々の菌体のべん毛の長さと遊泳速度を同時に測定した。野生型株 (実線) または長極毛株 (破線) のらせん形状のデータを用いて計算したべん毛の長さと遊泳速度の関係についての理論曲線を示した。

暗視野顕微鏡による各株の極毛の観察の過程で、長極毛株のべん毛の形状が野生型株と異なることを見つけた。すなわち長極毛株のべん毛らせんの振幅はあきらかに野生型極毛と比較して小さいように見られた。そこで各株の電子顕微像を元にべん毛のらせんの波長と振幅の値を計測した(図3-7)。野生株および長極毛株の極毛のらせんの波長はそれぞれ $1.4 \mu\text{m}$ および $1.5 \mu\text{m}$ 、らせんの半径は $0.062 \mu\text{m}$ および $0.16 \mu\text{m}$ であった。すなわち長極毛のらせんは波長はほぼ野生型と同じであったが、半径は野生型の約 $1/3$ であった。らせんの形状は野生株と同様に基部体近くと先端部分で特に違いは見られなかった。

この値に基づいて長極毛株のべん毛の長さと言泳速度の関係についての流体力学的シミュレーションを行った結果(図3-6の点線)、実験値により近い値となった。

考察

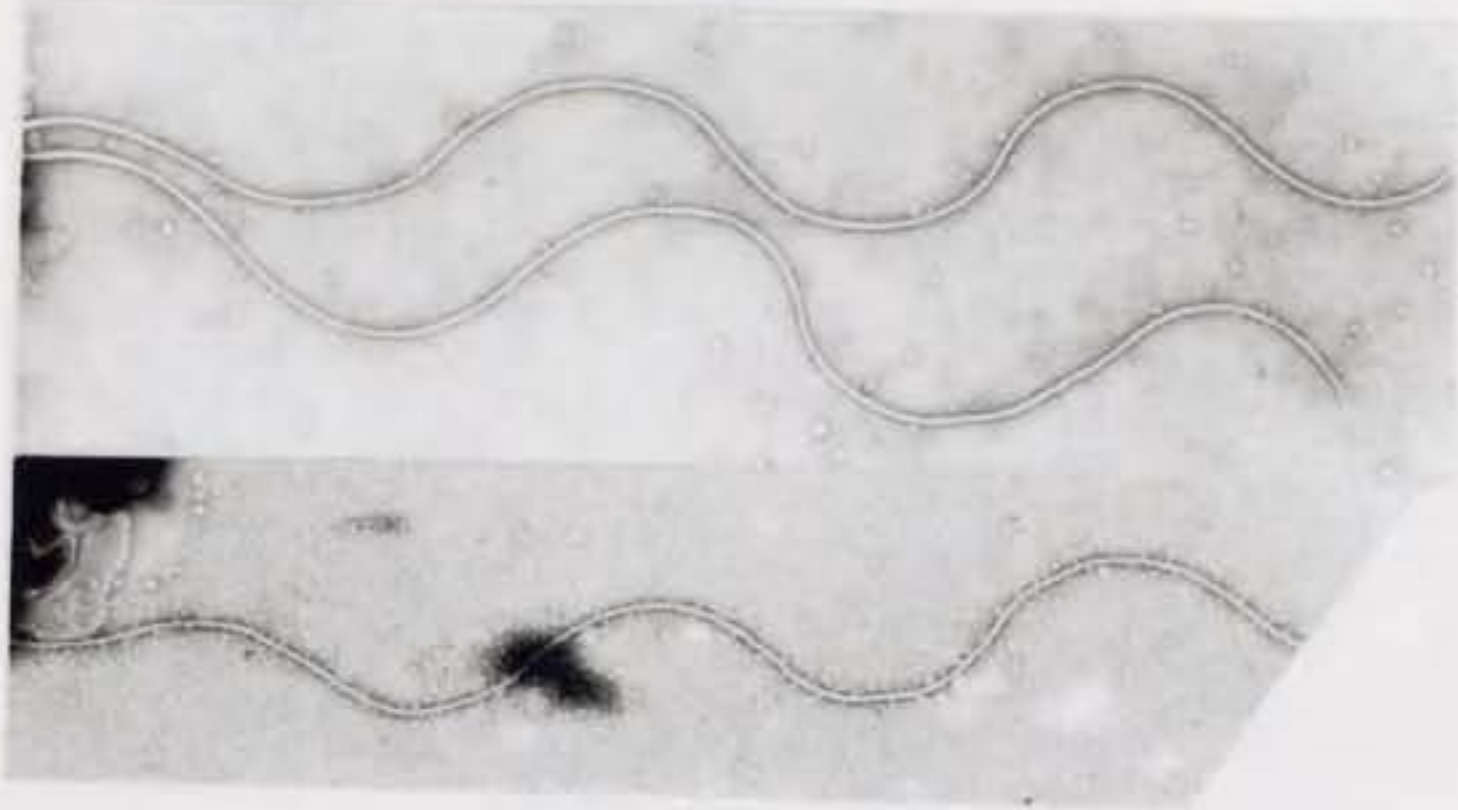
野生型極毛株 YM4、短極毛株 YM43、長極毛株 NMB90 について、べん毛の長さと運動能の観点から特徴を調べた。極毛の長さは、野生型株、短極毛株では非常によく揃っていた。また、1つの菌体から2~3本のべん毛が生えている場合でも、べん毛の長さはほぼ同じであった。サルモネラ菌においてはべん毛の供給量に応じてべん毛の長さが変化する。海洋性ビブリオ菌の極毛では、単にフラジェリンの発現量に依存して長さが変化するのではなく、べん毛の長さを制御する機構が存在する可能性が考えられる。しかしながら、長極毛株のべん毛の長さは非常にばらつきが多く、べん毛の長さ制御はほとんど働いていないように見えた。

短極毛株および長極毛株では、野生型株に比べて遊泳速度が低かった。べん毛の長さと遊泳速度の関係を計測したところ、野生型株と短極毛株ではべん毛の長さの増加に応じて遊泳速度も上昇していた。曲山らの理論に基づき計算した理論曲線によれば、ビブリオ菌体の遊泳速度はべん毛の長さが約 $5 \mu\text{m}$ になるまでは大きく上昇し、それ以上の長さになると徐々に減少する。しかし長極毛株においては、同じべん毛の長さを持つ野生株の菌体と比べて遊泳速度が約 $1/3$ 程度しかないことがわかった。この遊泳速度の低下は、野生型極毛と長極毛のらせん形状の違いに因るところが大きいと考えられる。実際、長極毛のらせん形状の値に基づいて計算した理論曲線は長極毛株の遊泳速度の実測値により一致した。しかしながら、長極毛株において同じべん毛の長さをもつ菌体でも遊泳速度に大きなばらつきがあることは、

(A) Long Pof



(B) Wild Pof



500 nm

図 3-7 極毛の形状

長極毛株 NMB90 (A) と短極毛株 YM43 (B) のコロニー中の菌体を 2% potassium phosphotungstate によりネガティブ染色した。極毛の形状を見やすくするため菌体の像は除いてある。

このシミュレーションでも説明できない。実際、長極毛株における泳いでいる菌体の割合は20~30%と低いことから、べん毛の回転能そのものが野生株に比較して低い可能性もある。

<第4章 長さの異なるべん毛におけるタンパク質の解析>

一般に細菌のべん毛繊維はフラジェリンタンパク質により形成されている。海洋性ビブリオ菌の極毛はべん毛繊維とそれを被う鞘膜とからなっている。第1章で述べたように長極毛はその形状が野生型極毛および短極毛と異なっていた。この章では長極毛のべん毛らせんの形状変異の原因を調べるために、野生型株、短極毛株、長極毛株の極べん毛を精製し、その構成タンパク質を調べた。さらにべん毛繊維と鞘膜とを分離し、それぞれの部分に含まれる構成タンパク質を明らかにした。

4.1 極毛構成タンパク質の分離精製

海洋性ビブリオ菌野生型極毛株 YM4、短極毛株 YM43、長極毛株 NMB90 について寒天培地上で培養した菌体より、極毛分画を調製した。極毛分画は、集めた菌体をバッファーに懸濁し、ボルテックスミキサーによりべん毛を切断後遠心により菌体を沈殿させ、上清に残ったべん毛を超遠心により集めた。それぞれの分画について暗視野顕微鏡により観察し鞘を持つべん毛を確認した。SDS-PAGE により極毛分画のタンパク質を分離し、クマシーブルー染色したところ、複数のバンドが検出された(図4-1A)。主要なタンパク質、5種類について分子量に従い、PF60、PF47、PF45、PF44、PF18 と命名した。その他の少量しか検出されない成分についても極毛の構成成分である可能性も考えられる。PF47 と PF45 は非常に分子量が近かったため、別の分離条件を検討し泳動した(図4-1B)。各株の極毛構成タンパク質の相対的な量を表4-1に示した。野生株と短極毛株では各タンパク質の相対量比はおおよそ同じであった。これに対して、長極毛株の極毛では、PF60、PF47、PF18 タンパク質が野生株と比較して多く検出された(表4-1)。

これら5種類の極毛構成タンパク質についてナイロン膜にプロットし、気相シーケンサーによるN末端アミノ酸配列の決定を試みた。

PF47、PF45、PF44 のN末端配列を図4-2に示した。PF47 および PF45 のN末端配列は、近縁種である *V. parahaemolyticus* の極毛を構成するフラジェリンの共通配列を持っていた。PF47 は FlaC と、PF45 は FlaB および FlaD と完全に一致した。このことから PF47 と PF45 は *V. alginolyticus* の極毛繊維を構成するフラジェリンであると結論された。また、PF44 は大腸菌の外膜ポーチンを形成する OmpC および

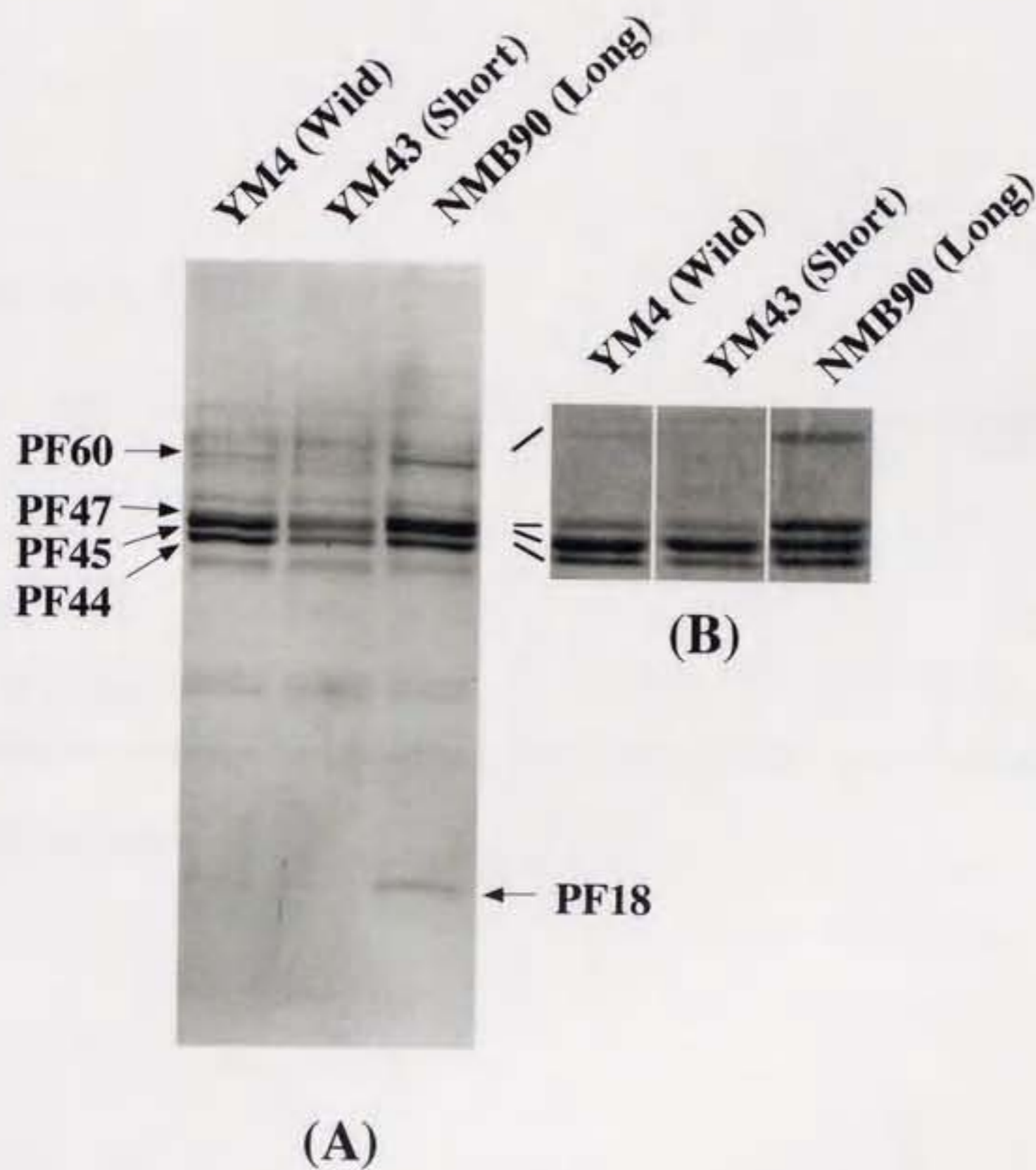


図 4-1 極毛構成タンパク質のSDS-PAGE による分離
 野生株 YM4、短極毛株 YM43、長極毛株 NMB90 の極毛分画を
 10% (A) または 6% (B) のポリアクリルアミドゲルにより分離
 し、クマシーブルー染色によりタンパク質を検出した。主要なタ
 ンパク質 PF60、PF47、PF45、PF44、PF18 について示した。

表 4-1 極毛タンパク質の量比

株	PF60	PF47	PF45	PF44	PF18
野性株 YM4	0.1	1	3.8	1.4	ND
短極毛株 YM43	ND	1	5.4	1.7	ND
長極毛株 NMB90	0.4	1	1.1	0.7	0.2

ND、Not determined.

(A)			*+*+*+*+*+*+*+*+*+*+*+*
	<i>V. alginolyticus</i>	PF47	AVTVSTNVSAMTAQRYLNKA
		PF45	AVNVNTNVSAMTAQRYLNNA
	<i>V. parahaemolyticus</i>	FlaA	AINVNTNVSAMTAQRYLNHA
		FlaB	AVNVNTNVSAMTAQRYLNNA
		FlaC	AVTVSTNVSAMTAQRYLNKA
		FlaD	AVNVNTNVSAMTAQRYLNNA

(B)			**+ +* **
	<i>V. alginolyticus</i>	PF44	AEVFKQEEGSVDFYGLRPT
	<i>E. coli</i>	OmpC	AEVYNKDGKLDLYGKVDGD
		OmpF	AEIYNKDGKVDLYGKAVGL

図 4-2 極毛構成タンパク質のアミノ酸配列とホモロジー

(A) PF47、PF45のN末端アミノ酸配列と *V. parahaemolyticus* のフラジェリン遺伝子から推定されるN末端アミノ酸配列を示した。*は全てのタンパク質で共通の残基を、+はいずれかのアミノ酸と共通の残基を示す。

(B) PF44と大腸菌の外膜タンパク質 OmpC および OmpF のN末端アミノ酸配列を示した。

OmpF の N 末端配列と低いながらホモロジーを示した。PF44 が外膜から連続した鞘膜に存在するタンパク質である可能性が示唆された。

PF60 および PF18 タンパク質については N 末端がブロックされているためか N 末端アミノ酸配列を決定することができなかった。

4.2 極毛繊維および鞘膜の分離

各株の極毛分画をセシウム密度勾配遠心により分離したところ、二層に分かれた。暗視野顕微鏡および電子顕微鏡により観察したところ、上層には長いべん毛繊維が、下層には比較的短いべん毛繊維と考えられる構造と共に、膜小包様の構造が多く観察された (図 4-3)。これらの分画を SDS-PAGE により分離し、クマシーブルー染色により検出したところ、密度勾配遠心による分離前の構成タンパク質比に比べて上層では 2 種類のフラジェリン PF47 および PF45 が多く検出された (図 4-4)。これに対して、下層には PF60、PF44 および PF18 が多く検出された。これらのことから、PF47 および PF45 が極毛繊維を構成するのに対し、PF60、PF44 および PF18 は極毛の鞘膜に含まれると考えられる。

4.3 極毛の性質

極毛構造の性質を調べるため、極毛分画を熱または界面活性剤により処理した後、超遠心による分離を行った (図 4-5)。処理を行う前の極毛分画は超遠心により沈殿し、全ての極毛構成タンパク質が定量的に回収される。これに対して、熱を加えてから超遠心を行った場合、2 種類のフラジェリン (PF47 と PF45) が上清に検出され、PF60、PF44、PF18 は主に沈殿に検出された。

界面活性剤 Triton X-100 を 0.2% になるように加えた場合、PF60 および PF18 の一部が上清に検出された。1.0% になるように加えた場合、PF60 の大部分および PF18 の約半量が上清に検出された。これらのタンパク質は、界面活性剤で可溶化できることから、膜に付随したタンパク質である可能性が支持された。

考察

海洋性ビブリオ菌の極毛のべん毛繊維は鞘膜に被われている。今回鞘膜を含む

(A)



(B)



図 4-3 密度勾配遠心分画の電子顕微鏡像

長極毛株のべん毛を塩化セシウム密度勾配遠心により分離した。上層 (A) と下層 (B) の分画 について 2% potassium phosphotungstate によりネガティブ染色し、電子顕微鏡で観察した。バーの長さは 200 nm。

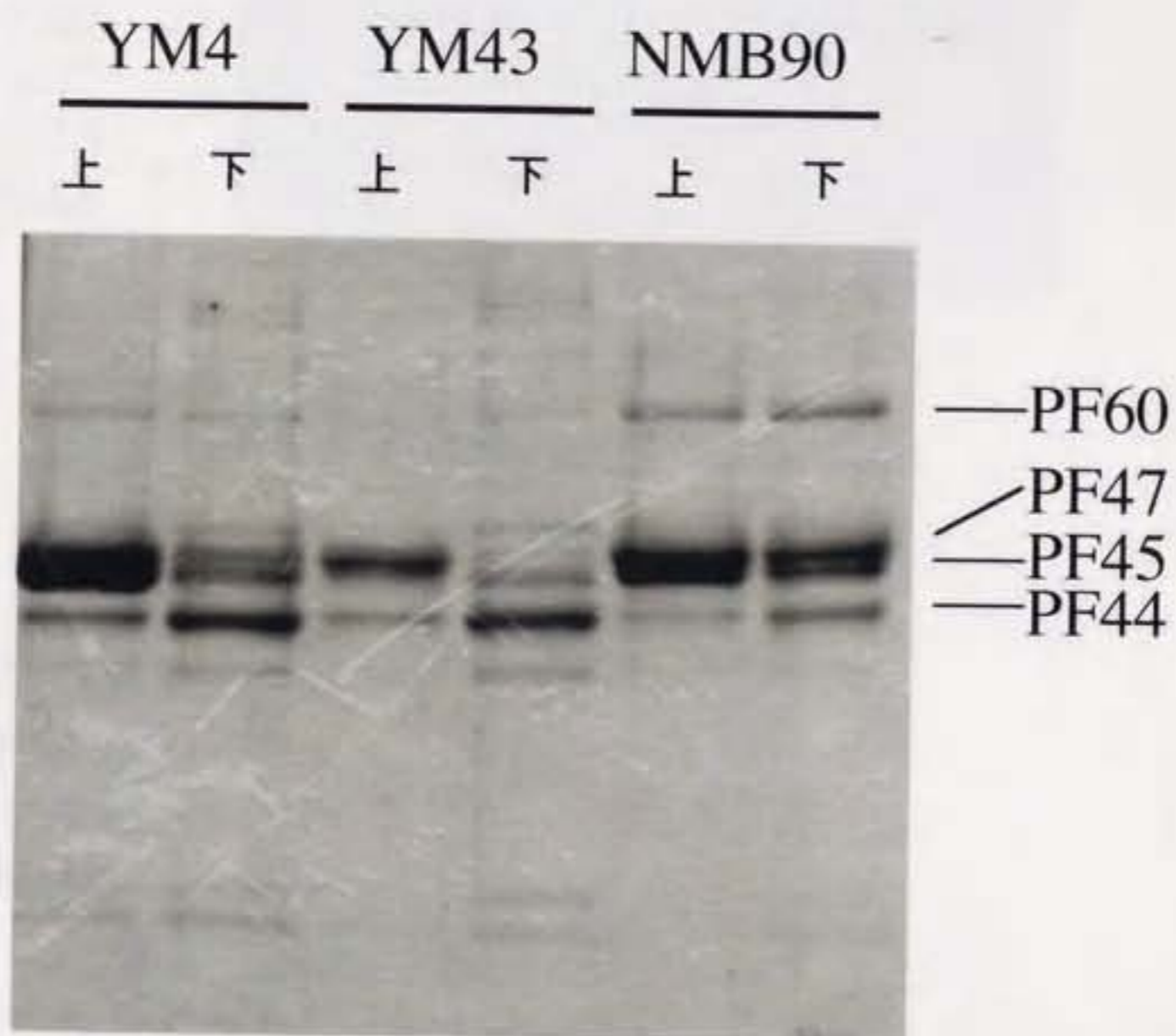


図 4-4 密度勾配遠心によるべん毛の分離

極毛分画に塩化セシウムを 1.3 g/ml (31.2 % (W/V)) になるように加え、80,000×gで 5 時間超遠心し、バンドを透析チューブに回収し V-buffer で一晩透析した。各分画を 8 % のポリアクリルアミドゲルにより分離し、クマシーブルー染色した。PF60、PF47、PF45、PF44 について図示した。

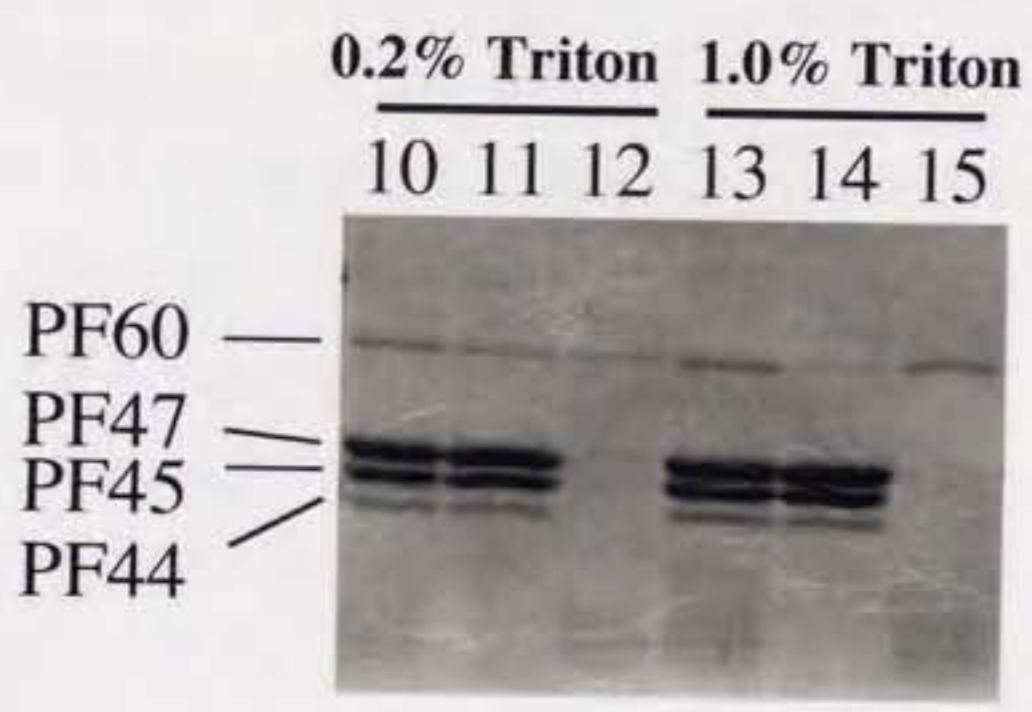
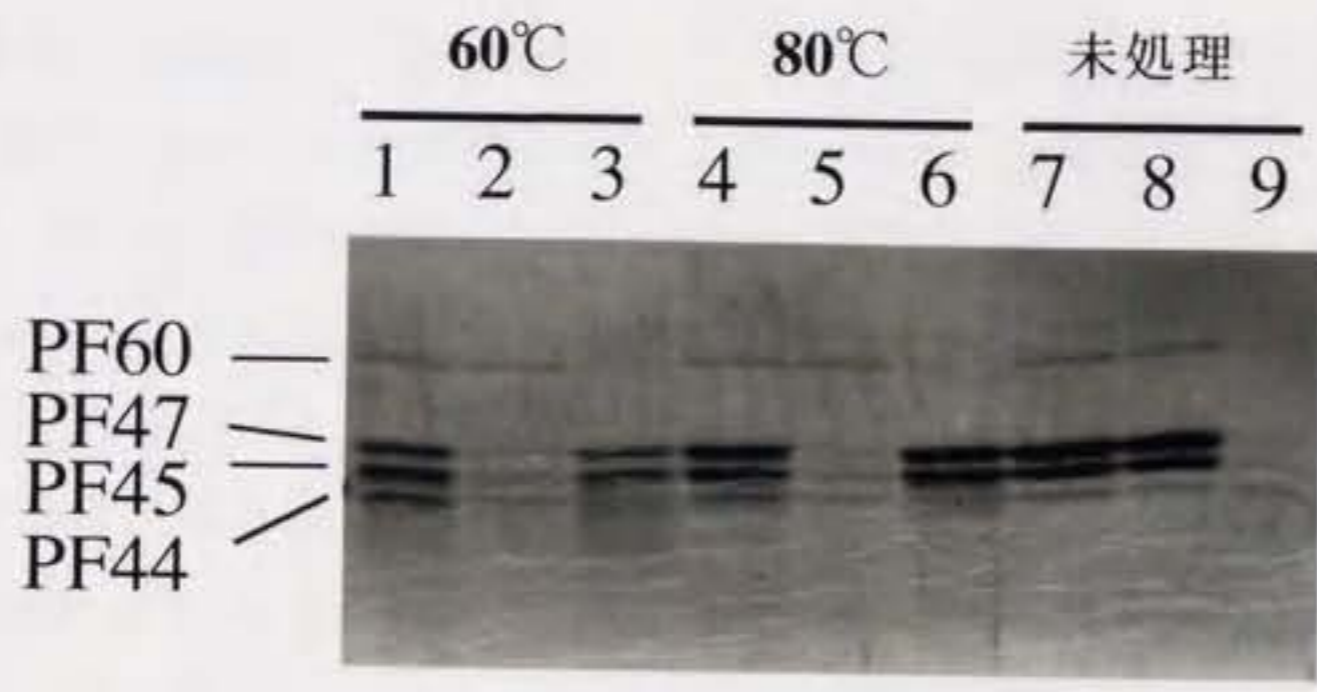


図 4-5 ベン毛の性質

極毛分画（レーン7）を 60°C または 80°C の熱、0.2% または 1.0% の Triton X-100 により処理し超遠心により分離した。各処理直後の分画（レーン1、4、7、10、13）、超遠心後の沈殿（レーン2、5、8、11、14）および上清（3、6、9、12、15）について 6% のアクリルアミドゲルで分離しクマシーブルー染色した。

極べん毛の構成タンパク質を調べた。その結果、5種類のタンパク質を検出した。密度勾配遠心による分画およびN末端アミノ酸配列より、極毛のべん毛繊維は少なくとも2種類のフラジェリン PF47 および PF45 より構成されていることがわかった。野生型極毛と短極毛では2種類のフラジェリンの量比はほぼ同じであった。

短極毛株ではなぜべん毛が短くなるのだろうか。序論で述べたようにサルモネラ菌における *fls* 変異株では野生株より短いべん毛を形成する (Iino et al., 1974)。*fls* 変異株で短いべん毛が形成されるのは、フラジェリンの供給量が減少していることによると考えられる。サルモネラ菌においてはべん毛繊維の長さは供給されるフラジェリンの合計量により決まると考えられている。海洋性ビブリオ菌では、野生株および短極毛株におけるべん毛の長さは非常によく揃っていた。またべん毛の本数が増えても長さは一定であった。このことから、ビブリオ菌の短極毛変異の原因はフラジェリンの発現量の減少からは説明しにくい。フラジェリンの重合能もまた、べん毛の長さに影響する。フラジェリン遺伝子の変異が、短いべん毛をもつ変異株を生じる例がサルモネラ菌において報告されている (Ikeda et al., 1983; Ikeda et al., 1984)。この変異株では、フラジェリンが大量に液体培地中に分泌される。しかしながら、海洋性ビブリオ菌の短極毛株では培地中へのフラジェリンの放出は検出されなかった (data not shown)。サルモネラ菌の *hap* 遺伝子の変異株では、フック構造は見られるがべん毛繊維は形成されない。この変異株では未重合のフラジェリンが培地中に放出される。海洋性ビブリオ菌においても、フック構造をもつべん毛繊維欠損株が報告されている。この株は未重合のフラジェリンが鞘に包まれて大量に放出されるが、希に短いべん毛構造が観察される。これは、べん毛の形態の違い、すなわち鞘膜が未重合のフラジェリンの放出を妨げるためだと考えられる。*V. alginolyticus* の短極毛株の場合も重合できないフラジェリンが鞘膜の存在により分泌を妨げられているのかもしれない。

長極毛では、2種類のフラジェリンの量比が野生株と比べて逆転していた。このフラジェリンの量比の違いが、べん毛のらせん形状の違いを引き起こしていると考えられる。2種類のフラジェリンは、べん毛繊維のなかでどのように局在しているのだろうか。もしべん毛繊維の菌体に近い部分と先端部分で2種類のフラジェリンの構成が異なっていたら、べん毛のらせん形状の違いが生じると考えられる。野生株においても、また長極毛株においても極毛のらせん形状は単一であったことから、海洋性ビブリオ菌の極毛は、*Campylobacter* と同様に基部体近くと先端部分で

のフラジェリン構成は同一であると思われる。

長極毛株のべん毛の長さは、野生株や短極毛株に比べて非常に幅広く分布していた。長極毛株においては野性株ほど厳密にべん毛の長さの制御が行われていないようである。最近、*Vibrio anguillarum* において *flaG* ホモログの変異株が長い極毛を生じることが報告されている (McGee et al., 1996)。この遺伝子、あるいはその下流の遺伝子がべん毛の長さ制御に関わっているかもしれない。この遺伝子は序論で述べた *V. parahaemolyticus* の機能がわかっていない *flaG* 遺伝子とホモロジーを持つ。*flaG* の下流には、*flaJ* (*fliS* ホモログ)、*flaK* (*ntrC* ホモログ) があり、フラジェリンの発現に関わっていることが示されている (Stewart and McCarter, 1996)。

フラジェリン以外に鞘膜部分に付随していると考えられる3種類のタンパク質を検出した。PF44 についてはN末端アミノ酸配列が大腸菌の外膜ポーリンタンパク質とホモロジーを持っていたことから、外膜タンパク質である可能性がある。鞘膜と外膜は連続した構造を持つことから、共通のタンパク質成分をもつ可能性が考えられる。PF60 および PF18 タンパク質は、界面活性剤 Triton X-100 による処理で可溶化されることから、膜タンパク質であると考えられる。PF60 と PF18 タンパク質は、長極毛株において大量に存在していた。長極毛株における3種類の鞘膜タンパク質の総量は、フラジェリン PF47 と PF45 の合計量と比較して、1/10 ~ 1/3 程度もある。これらのタンパク質は鞘膜の構造や機能に影響を与えているかもしれない。

<第5章 長極毛株の変異を抑圧する遺伝子のクローニング>

第3章および第4章において、長極毛株の極毛構成成分の違いがべん毛形状の変異を引き起こしていることを示した。また、長極毛株では遊泳速度の低下により軟寒天培地上でのスワーム能も大きく低下していた。この章では長極毛株からスワーム能を回復した自然復帰株を単離し、これらの株の性質を調べることによりスワーム能とべん毛の長さの相関関係についての知見を得た。これに基づき、海洋性ビブリオ菌の形質転換法を用いて、長極毛株の変異を抑圧する遺伝子のクローニングを試みた。その結果、軟寒天培地上での長極毛株のスワーム能を回復するDNA断片をクローニングし、その断片による遊泳速度、べん毛の長さや形状、べん毛構成成分に対する影響を調べた。

5.1 長極毛株由来のスワーム能に関する自然復帰株の単離

長極毛株 NMB90より、軟寒天培地上でのスワーム能を回復した復帰株を採取し、その性質を調べた。長極毛株のコロニーを軟寒天培地上に接種し、30℃で培養し2~3日後にスワームの外縁から広がった菌を単離した。この方法により NMB165、NMB178、NMB179、NMB180、NMB181、NMB182 の6種類のスワーム能復帰株を採取した(図5-1)。これらの復帰株は全て長極毛株より大きいスワームを示したが、スワームの形状から2種類の型が見られた。すなわち、NMB165、NMB179、NMB180の3株は野生型 YM4 と同様に外縁のはっきりしたスワームを示し、また大きさも比較的大きかった(表5-1)。これに対し、NMB178、NMB181、NMB182の3株はスワームの外縁がはっきりせず、またスワームも比較的小さかった。

次に、スワーム能変異の回復したこれらの株において、極毛の長さの変異にも変化が見られるのかどうか調べた。各株を液体培地で培養し暗視野顕微鏡下で極毛の長さを計測し分布を調べた(図5-2、表5-1)。NMB165、NMB179、NMB180株の3株では長さの平均値と分布が野生型株 YM4 とほぼ同じであった。これに対して NMB178、NMB181ではNMB182の3株では、べん毛の長さの平均値と分布が長極毛株と野生株の中間の値を示した。そこで、前者の3株を野生型復帰株、後者を中間型復帰株と呼ぶことにした。

次に極毛構成タンパク質の変化を調べた。各復帰株を寒天培地上で培養しべん毛分画を精製し、SDS-PAGEによりべん毛を分離し2種類のフラジェリン PF47 およ

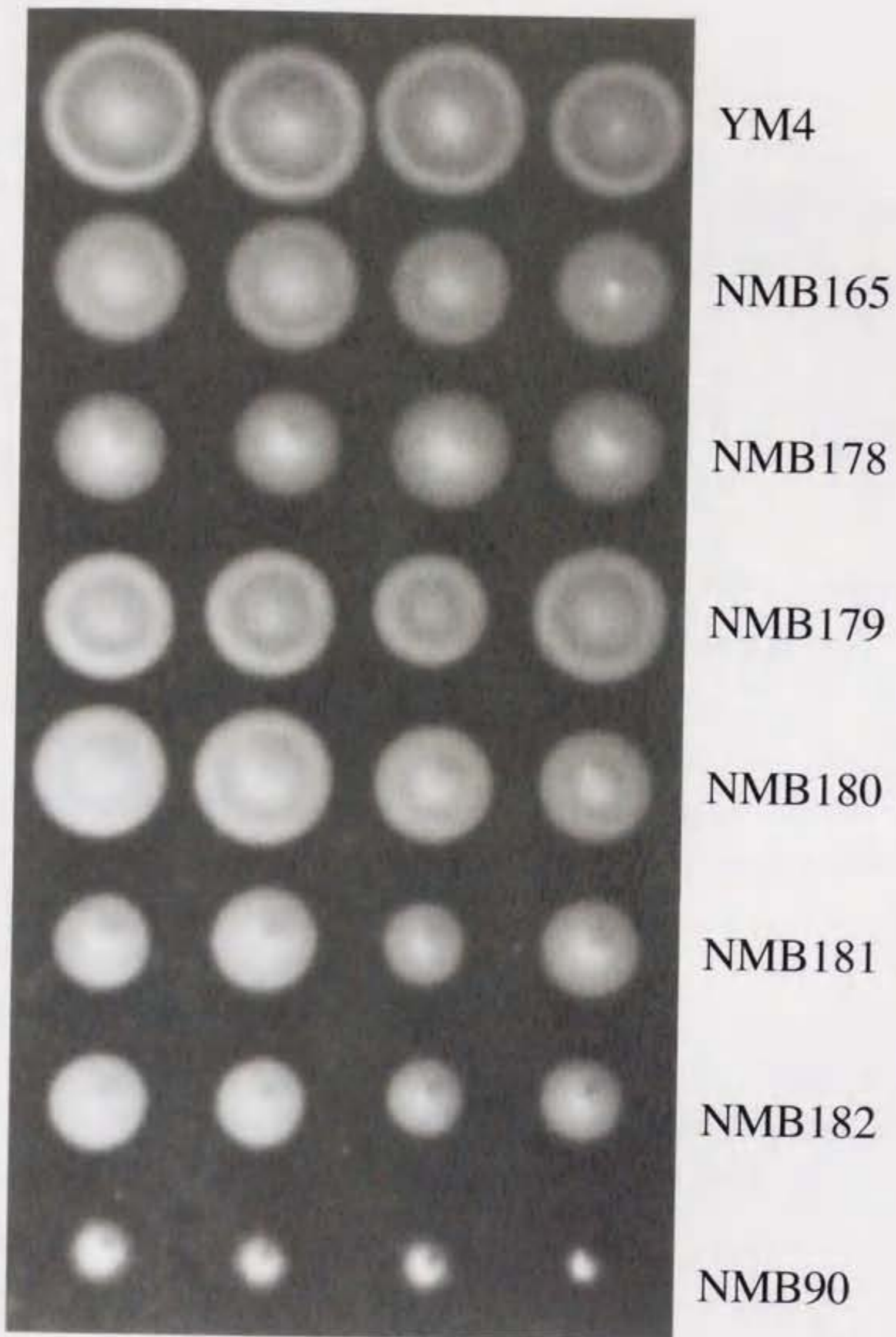


図 5-1 長極毛からの復帰株のスワーム

各株のコロニーを 0.3% 寒天をふくむ VC 培地上に接種し 30 °C で 6 時間培養した。

	極毛の長さ (μm)	フラジェリン量比 PF45 / PF47	スワームの外径 の相対比
野生型株 YM4	4.4 \pm 0.8	3.0	1.0
NMB179	4.5 \pm 0.7	3.4	0.82
NMB180	4.5 \pm 0.8	2.6	0.82
NMB165	4.5 \pm 0.8	2.7	0.81
NMB178	5.3 \pm 1.8	1.9	0.71
NMB181	6.3 \pm 1.8	1.3	0.64
NMB182	4.8 \pm 1.6	2.1	0.60
長極毛株 NMB90	7.6 \pm 2.2	0.5	0.35

表 5-1 長極毛株からの復帰株の特徴

長極毛株からの復帰株の極毛の長さ、フラジェリン量比、スワームの外径の相対比を示した。スワームの外径は YM4 の 15.8 mm を 1.0 とした相対値で表した。また、フラジェリン量比については、図 6-3 に示した SDS-PAGE の画像からコンピューター上で画像解析ソフト(NIH Image)を用いて定量した値を用いた。

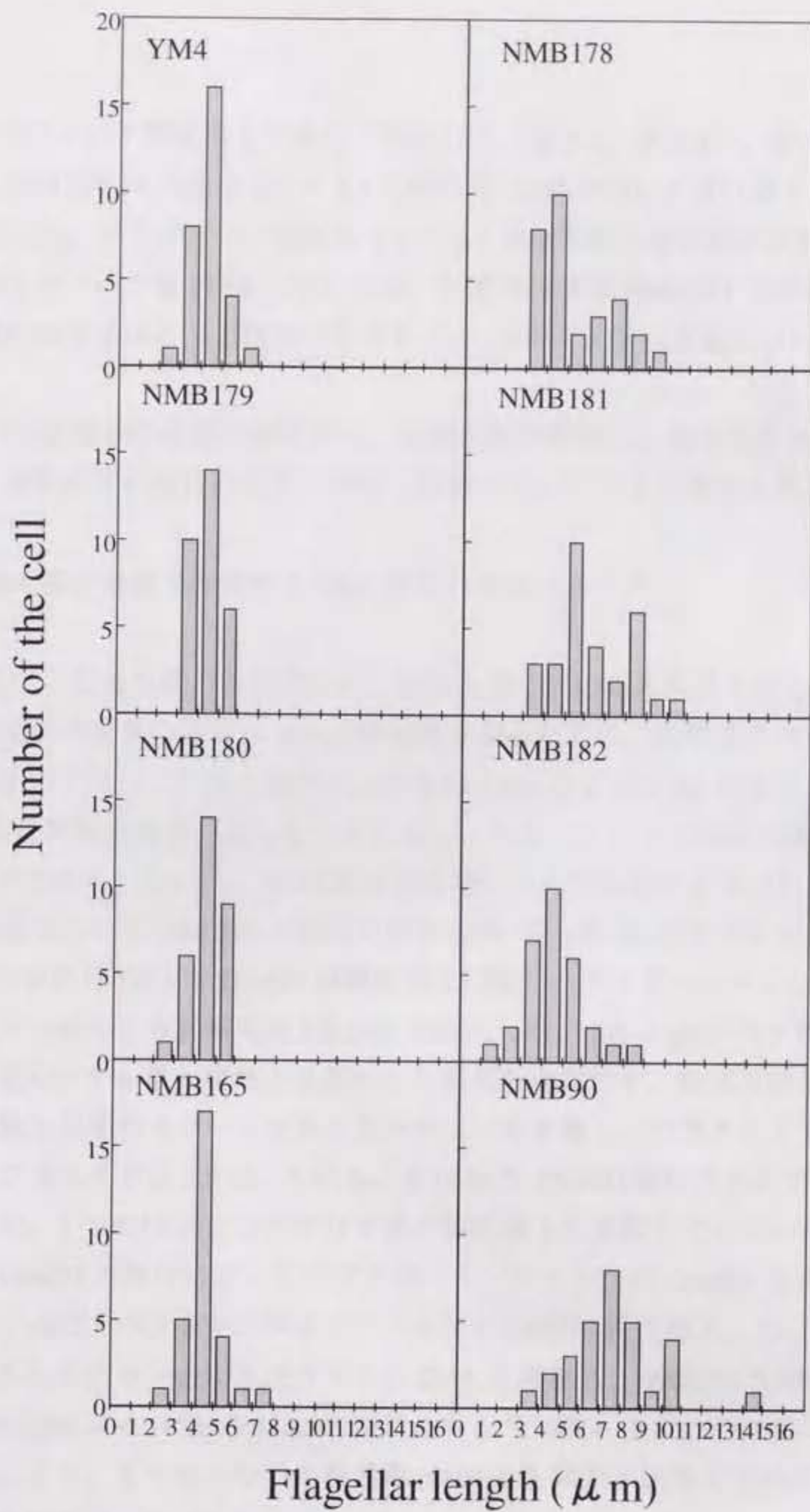


図 5-2 長極毛変異復帰株の極毛の長さ分布

対数増殖期の菌体を暗視野顕微鏡下で観察し、ビデオテープに録画して、モニター画面上でべん毛の長さを計測した。

び PF45 のタンパク質量比をゲル上で計測した (図 5-3、表 5-1)。野生型復帰株 3 株では、PF45/PF47 の値は 2.6 ~ 3.4 で野生型 YM4 の 3.0 と近い値を示した。中間型復帰株では、フラジェリン量比も 1.3 ~ 2.1 長極毛株と野生株の中間の値を示した。鞘結合タンパク質 PF60 については、中間型復帰株 NMB181 で少量存在していたが、他の株ではほとんど検出できなかった。PF18 タンパク質については確認していない。

これら復帰株の性質の解析から、長極毛株の変異は、極毛の長さ、フラジェリン量比、運動能等の複数の性質に同時に影響を与えていると考えられた。

5.2 長極毛株の運動を回復する DNA 断片のクローニング

前節で、長極毛株の各性質が同じ制御を受けている可能性を示した。そこで次に、長極毛株の変異の性質についての知見を得るために、長極毛のスワームを回復する遺伝子のクローニングを試みた。野生株 YM4 および YM4 由来の長極毛株 NMB90 は形質転換効率が高くないことから、クローニングには野生株 VIO5 由来の長極毛株 VIO578 を用いた。VIO578 は運動能、べん毛の長さおよび形、べん毛タンパク質構成について NMB90 と同様の性質を持つ。pSU21 プラスミドベクターおよび VIO5 の染色体 DNA を *Hind*III 制限酵素で切断し、ライゲーションし、エレクトロポレーション法により長極毛株 VIO578 に導入した。2.5 μ g/ml のクロラムフェニコールを含む 1.5% 寒天培地上で選別した形質転換細胞を、軟寒天培地上に接種した。野生株と同等のスワームを示したコロニーを単離し、プラスミド DNA を抽出した。このプラスミドは 2.5 kb、0.84 kb、0.14 kb の *Hind*III 断片を含んでおり、pMF2 と命名した。3 つの *Hind*III はビブリオ菌の染色体上で連続していない可能性も考えられる。*Hind*III の断片についてサブクローニングするために pMF2 を再度、*Hind*III で切断し、pSU21 ベクターにライゲーションし VIO578 株に導入した。軟寒天培地上でスワームしたクローンよりプラスミド DNA を抽出し、pMF209 と命名した (図 5-4)。pMF209 は 0.14 kb の *Hind*III 断片を含んでいた。またこのプラスミドを導入することにより、もうひとつの長極毛株 NMB90 も軟寒天培地上でのスワーム能を回復することを確認した (data not shown)。

5.3 pMF209 による長極毛株の変異抑圧

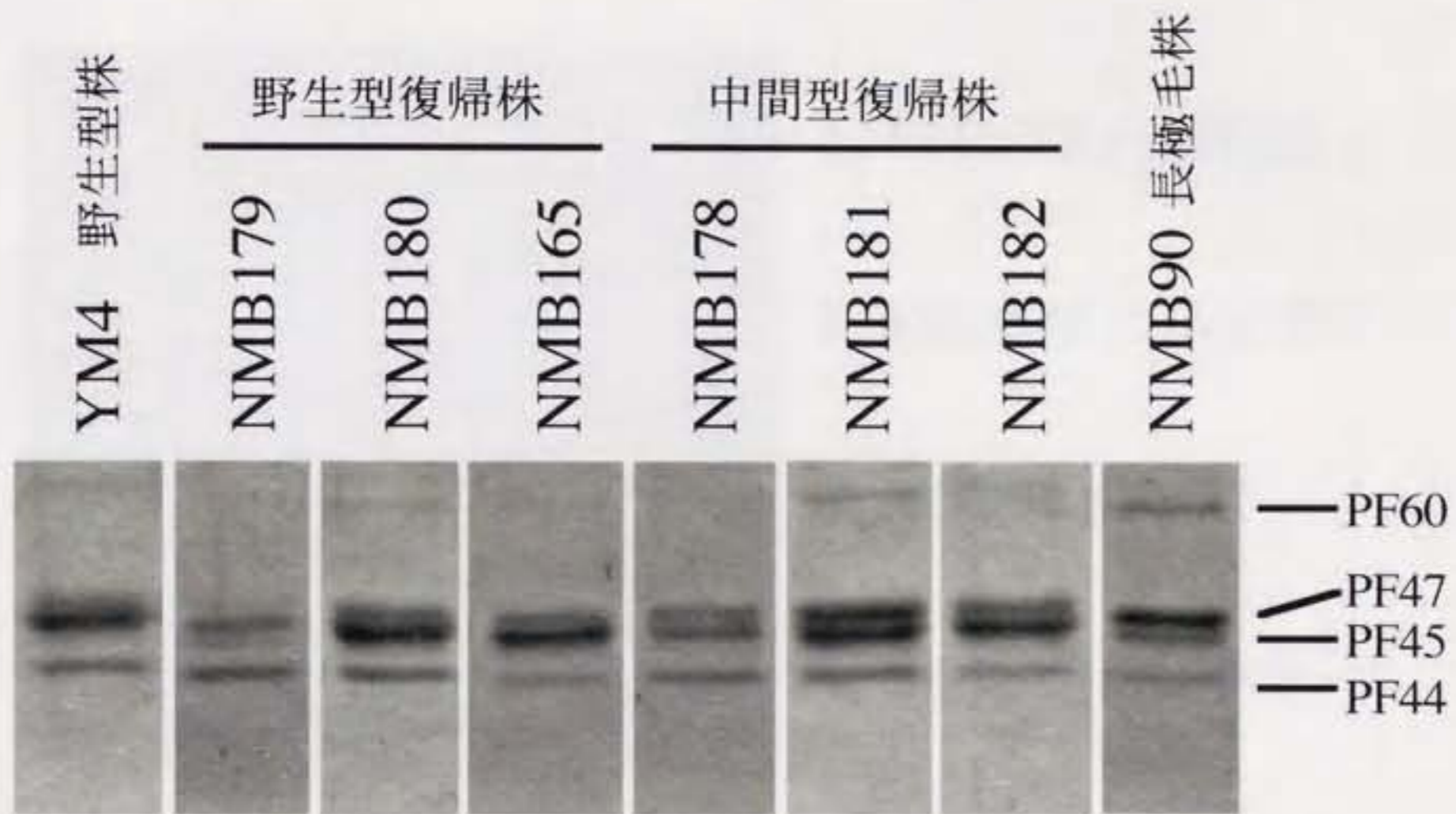
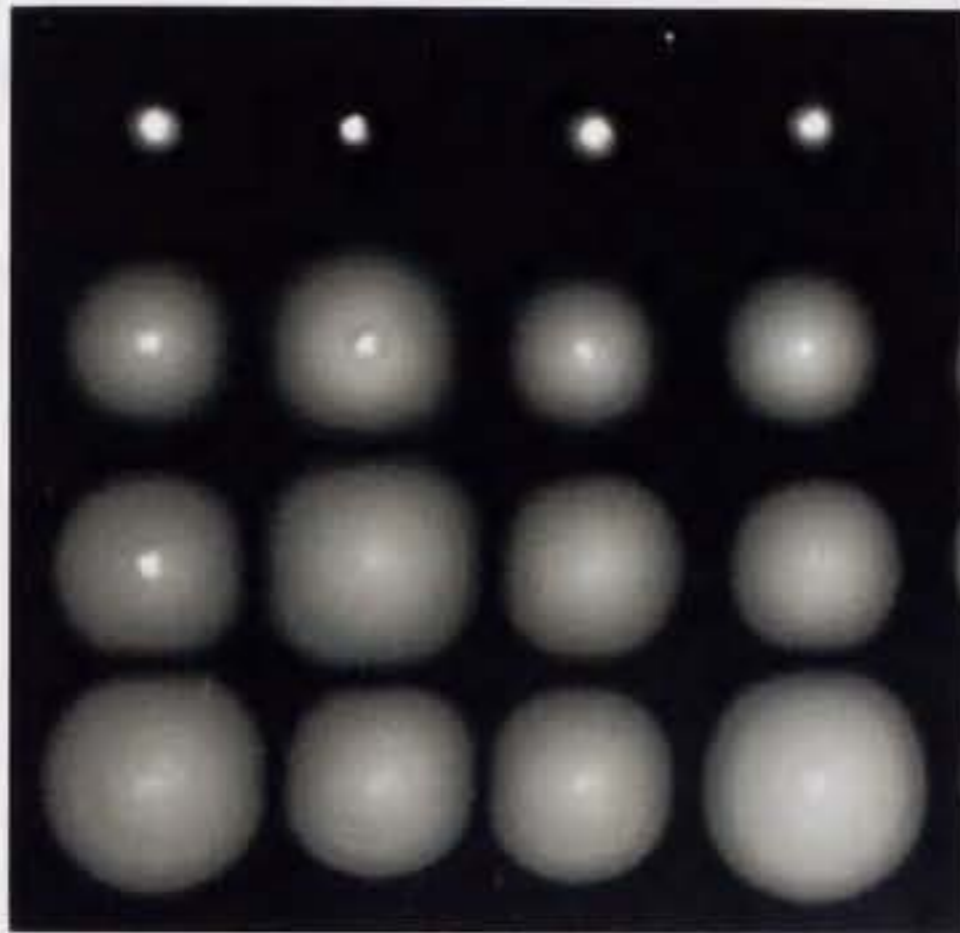


図 5-3 長極毛変異復帰株の極毛タンパク質構成

各株の極毛分画を調製し、8% のアクリルアミドゲルで分離後クマシー染色した。



1. VIO578 / pSU21

2. VIO578 / pMF209

3. VIO5 / pSU21

4. VIO5 / pMF209

図 5-4 長極毛株のスワーム能の回復

長極毛株 VIO578 および野生型株 VIO5 をプラスミド pSU21 (vector) または pMF209 で形質転換した。各形質転換体のコロニーをクロラムフェニコールを含む0.3% 寒天 VC 培地上に接種し、30℃ で4時間培養した。

長極毛株 VIO578 および親株 VIO5 に pMF209 を導入し、対数増殖期の菌体について暗視野顕微鏡下で極毛の長さおよび遊泳速度の同時測定を行った (図 5-5)。表 5-2 に示したように、pSU21 ベクターを導入した場合、長極毛株 VIO578/pSU21 は VIO5/pSU21 に対して、極毛の長さは約 2 倍、遊泳速度は約 1/2 であった。これに対して pMF209 を導入することにより、長極毛株の長さおよび遊泳速度はほぼ野生株と同じ値に回復した。長極毛株において遊泳速度の低下とべん毛の長さが同じ制御を受けている可能性が示された。

長極毛株と野生型株ではべん毛の形状が異なることを第一章で示した。VIO578/pMF209 株について電子顕微鏡により極毛を観察したところ、極毛のらせんについても野生株と同様の形状を示した (data not shown)。

VIO578/pMF209 株の極べん毛構成タンパク質を、免疫プロットにより検出した (図 5-6)。2 種類のフラグゼリン PF47:PF45 の相対比は、野生株 VIO5/pSU21 では約 1:4 だったのに対して長極毛株 VIO578/pSU21 では約 2:1 であった。また、長極毛株では、鞘結合タンパク質 PF60 が大量に発現していたが、pMF209 プラスミドの導入により減少していた。

5.4 pMF209 の挿入断片の DNA 配列

pMF209 の *Hind*III 断片 143 bp について塩基配列を決定した (図 5-7 A)。データベース検索の結果、この領域は近縁種である *V. parahaemolyticus* の *motX* 遺伝子上流領域と 79.8% の similarity を持つことがわかった。*V. parahaemolyticus* ではこの領域は σ^{28} プロモーター結合領域 (TAAA-N15-GCCGATAA) の存在が提唱されているが、今回クローニングした *Hind*III 断片には σ^{28} プロモーター配列の -10 領域が含まれていない (図 5-7)。また、 σ^{54} プロモーター配列 TAAA-N5-TTGC と非常によく似た TATGGCAC-N4-TTGC という配列が見いだされた。この断片が σ^{28} あるいは σ^{54} と結合して極べん毛形成に関する遺伝子群の転写に影響を与えている可能性がある。

この断片のどの領域が長極毛株の変異の抑圧に必要であるのかを調べるために、pMF209 由来の *Nde*I deletion を作製し、pMF211 と命名した (図 5-7 B)。*Nde*I および *Hind*III の間、わずか 57 bp の領域でも長極毛株のスワームを回復した。さらに pMF209 の σ^{54} プロモーター様領域を含む上流部分を含む領域を増幅し、pSU21 ベクターにクローニングし、pMF212 と命名した (図 5-7 B)。このプラスミドでも

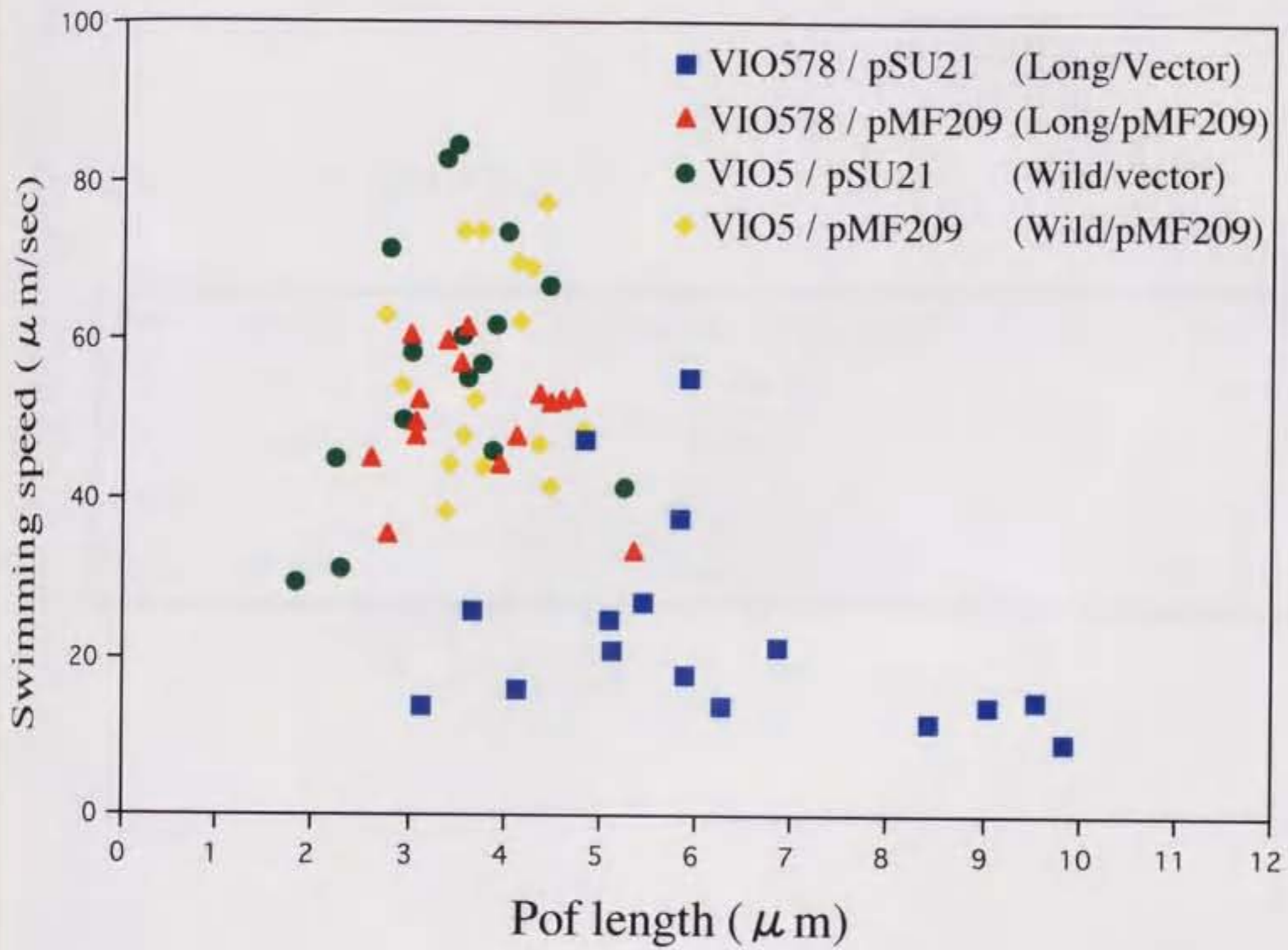


図 5-5 pMF209 形質転換株における遊泳速度と極毛の長さの相関関係
 各株のコロニーを VG 液体培地に懸濁し、30℃ で 4 時間振盪培養し
 た。集菌後、300 mM NaCl を含む Tris-motility buffer に懸濁し、
 暗視野顕微鏡下でビデオテープに録画した。再生モニター上で各菌体
 が 1 秒間に動く距離とべん毛の長さを計測した。

表 5-2. 遊泳速度と極毛の長さ

Strain/plasmid	Swimming speed (μms^{-1})	Pof length (μm)
VIO578/pSU21	23.2 ± 12.7	6.2 ± 2.0
VIO578/pMF209	50.3 ± 7.8	3.7 ± 0.8
VIO5/pSU21	57.2 ± 15.4	3.4 ± 0.8
VIO5/pMF209	56.6 ± 12.6	3.8 ± 0.6

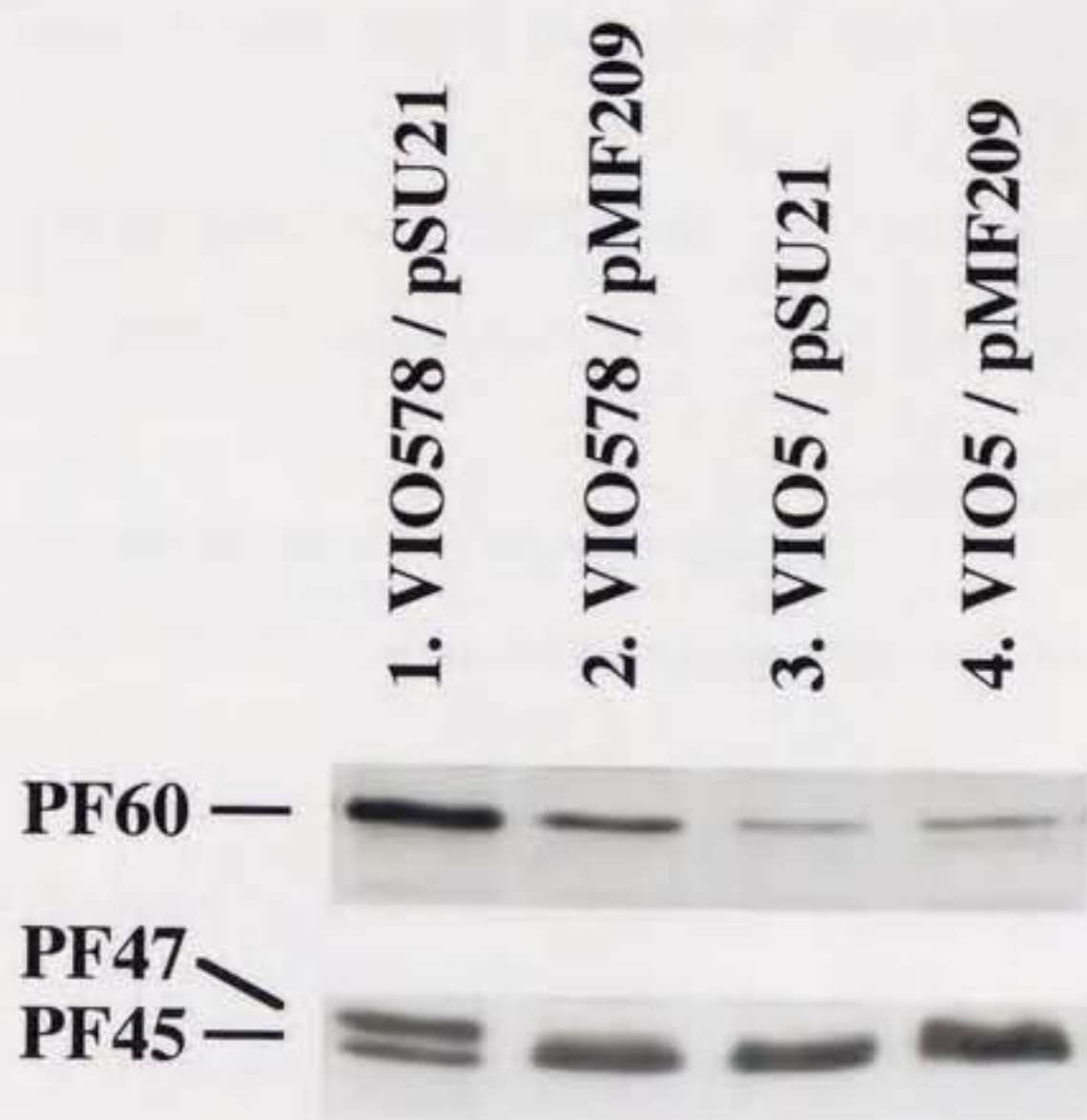
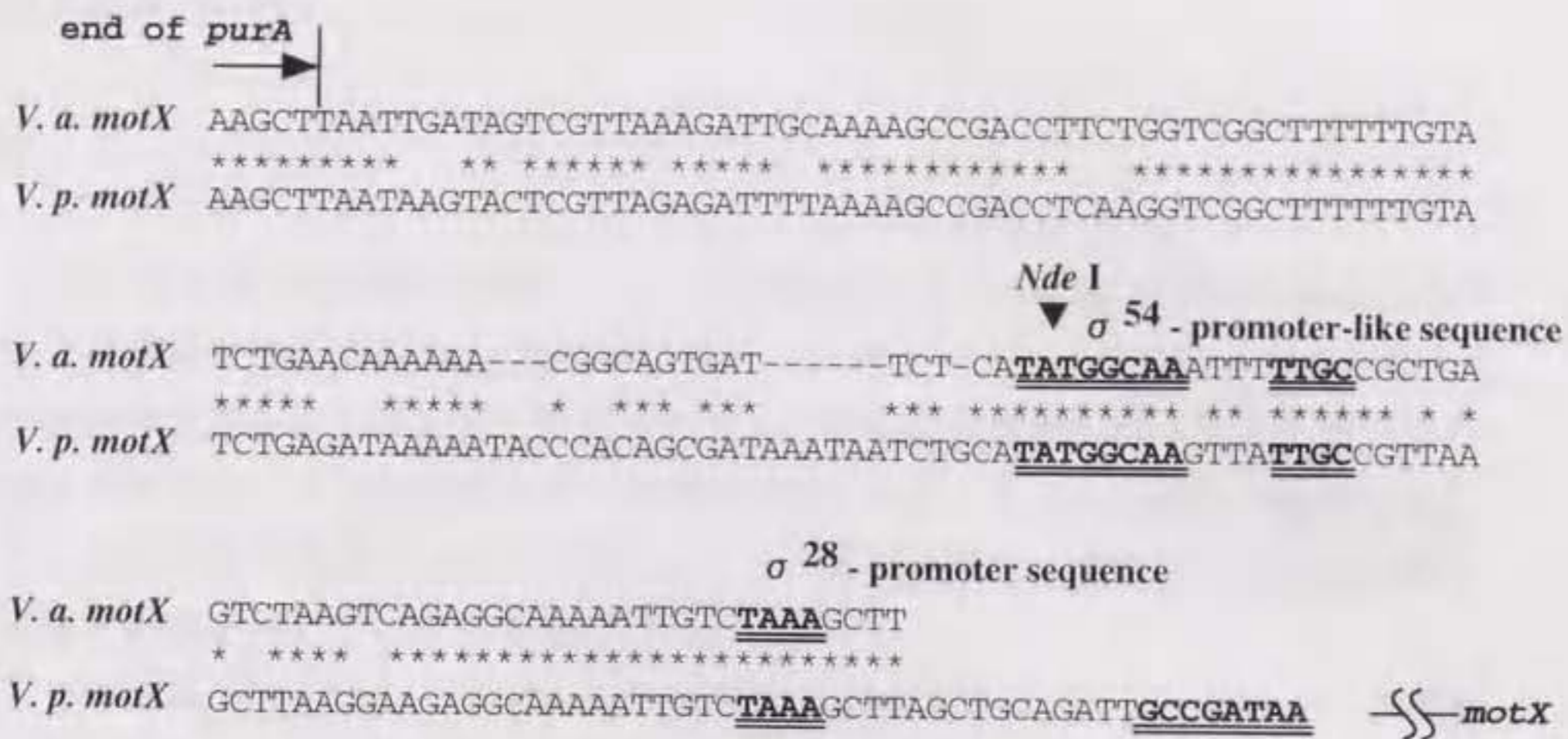


図 5-6 極毛構成タンパク質の変異抑圧

各株について、対数増殖期後期の培養液を採取し SDS-PAGE で分離後、PF45 抗体 または PF60 抗体で免疫プロットした。

A



σ 28 promoter consensus sequence	TAAA-N15-GCCGATAA
<i>V. a. motX</i> sequence	TAAA-
σ 54 promoter consensus sequence	TGGCAC-N5-TTGC
<i>V. a. motX</i> sequence	TGGCAA-N4-TTGC

B

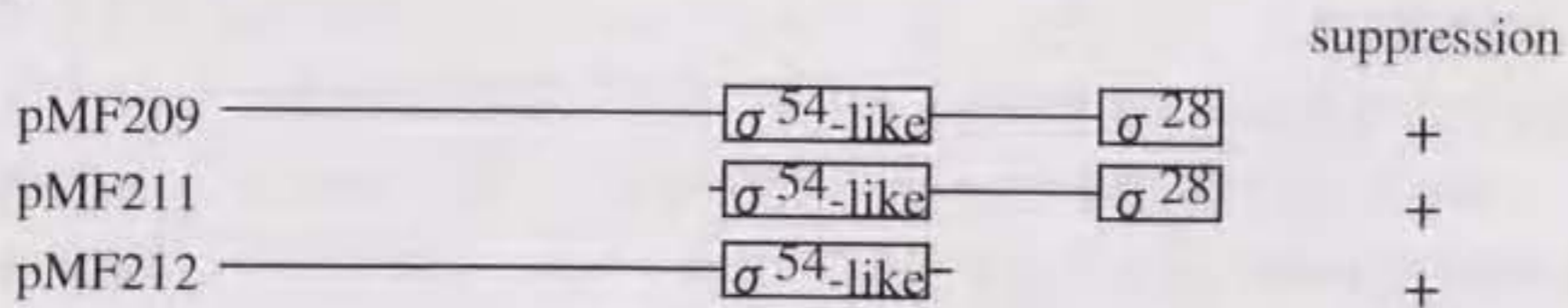


図 5-7 塩基配列と欠失地図

(A) pMF209 の挿入断片の塩基配列に対応する *V. parahaemolyticus* の *purA* および *motX* の間の領域の配列を示し、共通の塩基を *で示した。また、下段に各プロモーター配列とコンセンサス配列を示した。

(B) pMF209 由来の欠失変異プラスミドについて図示した。その右に、各プラスミドを長極毛株 VIO578 に移入したときのスワーム回復能（長極毛変異抑圧能）について示した。

長極毛株のスワーム能は回復された。これらの結果より、この σ^{54} プロモーター様領域が長極毛の変異の抑圧に重要であることが示された。

考察

この章では長極毛株の変異についての知見を得るために、まず自然復帰株の解析および変異を抑圧する DNA 断片のクローニングを行った。スワーム能を回復した自然復帰株は野生株とほぼ同じ性質を回復した野生型復帰株と野生株と長極毛株の中間的な性質を示す中間型復帰株の2種類が得られた。これら復帰株の性質の解析から、長極毛株の変異は、極毛の長さ、フラジェリン量比、運動能等の複数の性質に同時に影響を与えていると考えられた。

次に長極毛株のスワーム能を回復する遺伝子のクローニングを行った。形質転換の効率が良いことからクローニングには長極毛株 VIO578 を用いたが、この株は運動能、べん毛の長さおよび形、べん毛タンパク質構成について NMB90 と同様の性質を持つ。2種類の独立した変異株でこのような多表現型が見られることは、この性質の変化が double mutation に因るものではないことを示している。得られた断片の導入より長極毛株は、スワーム能、遊泳速度、極べん毛タンパク質構成、べん毛の形状などの全ての変異において、ほぼ野生株と同じ性質を示した。この断片は、*V. alginolyticus* の近縁種 *V. parahaemolyticus* の *motX* 遺伝子上流領域と高いホモロジーを持っていた。この領域は、non-coding 配列であることから長極毛株の変異を直接的に相補するのではなく、おそらく間接的に抑圧しているのであろう。では、この抑圧はどのような仕組みで行われているのであろうか。欠失プラスミドの解析から、 σ^{54} プロモーター配列様の領域が重要であることが示された。海洋性ビブリオ菌 *V. alginolyticus* では *motX* の他に、極毛モータータンパク質をコードする *motY*、*pomA*、*pomB* 遺伝子が当研究室においてクローニングされている。*pomA* と *pomB* 遺伝子は σ^{28} プロモーター配列を持ち、連続して転写されると考えられている。これに対し *motY* は σ^{54} 保存配列をもつ。また、*V. parahaemolyticus* では、4つのモーター遺伝子の他に、いくつかの極毛に関する遺伝子がクローニングされており、 σ^{28} または σ^{54} プロモーター配列を持つことが示されている。さらに、最近 *V. alginolyticus* の σ^{54} をコードする構造遺伝子が、当研究室でクローニングされ、極毛の形成に関わっていることが示された。おそらく pMF209 は σ^{54} サブユニットに結合し長極毛株における極毛遺伝子群の発現を抑えているのではないだろうか。

<第6章 極毛鞘膜結合タンパク質 PF60 の構造遺伝子 *pfsA* のクローニング>

ビブリオ属の細菌の極毛は一般に鞘膜に被われている。電子顕微鏡による観察から鞘膜は外膜から連続した構造を持つと言われている。しかしながら序章でも述べたように鞘膜の詳細な構造や機能については明らかになっていない。第4章において、海洋性ビブリオ菌の極毛の鞘膜に結合する3種類のタンパク質の存在を明らかにした。本章では長極毛株で大量に発現していた PF60 タンパク質を精製し、その構造遺伝子の遺伝子のクローニングを行った。

6.1 極毛鞘膜に結合する PF60 タンパク質の大量精製とポリクローナル抗体の作製

第二章で示したように PF60 は界面活性剤 Triton X-100 に可溶化される。そこで PF60 を多く発現している長極毛株を寒天培地上で大量培養し極毛分画を精製し、1.0% Triton X-100 で処理後、超遠心上清として可溶化分画を得、これを PF60 精製分画とした (図 6-1A)。

PF60 精製分画を SDS-PAGE で分離後、PF60 のバンドを切り出し、ウサギに免疫しポリクローナル抗血清を得た。この抗 PF60 ポリクローナル抗体を用いて精製した PF60 分画に対する免疫プロットを行った (図 6-1B)。抗 PF60 ポリクローナル抗体は PF60 のバンドにも結合したが、SDS-PAGE では検出されない 55 kDa のバンドにも反応した。このバンドは、PF60 の切り出しの際に、コンタミしたものかもしれない。PF55 は PF60 精製分画においてクマシーブルー染色ではほとんど検出されないことから、PF60 よりも抗原性が高いのかもしれない。この抗体によるビブリオ菌体に対する凝集反応を暗視野顕微鏡下で観察したところ、野生型極毛株 YM4 および VIO5、長極毛株 NMB90 および VIO578 の全ての株において凝集反応が見られた。凝集はおもに極毛部分で起こっており、極毛部分で絡み合った菌体が観察された。

6.2 PF60 のリジルエンドペプチダーゼによる分解と各ペプチドの N 末端配列の決定

第2章で述べたように、PF60 は N 末端がブロックされているためか、アミノ酸配列を決定することができなかった。そこで、精製した PF60 分画を SDS-PAGE で分離し染色後、PF60 のバンドを切り出しリジルエンドペプチダーゼにより処理、逆相 HPLC に供して PF60 由来のペプチドを分離した。3種類の分画について N 末端

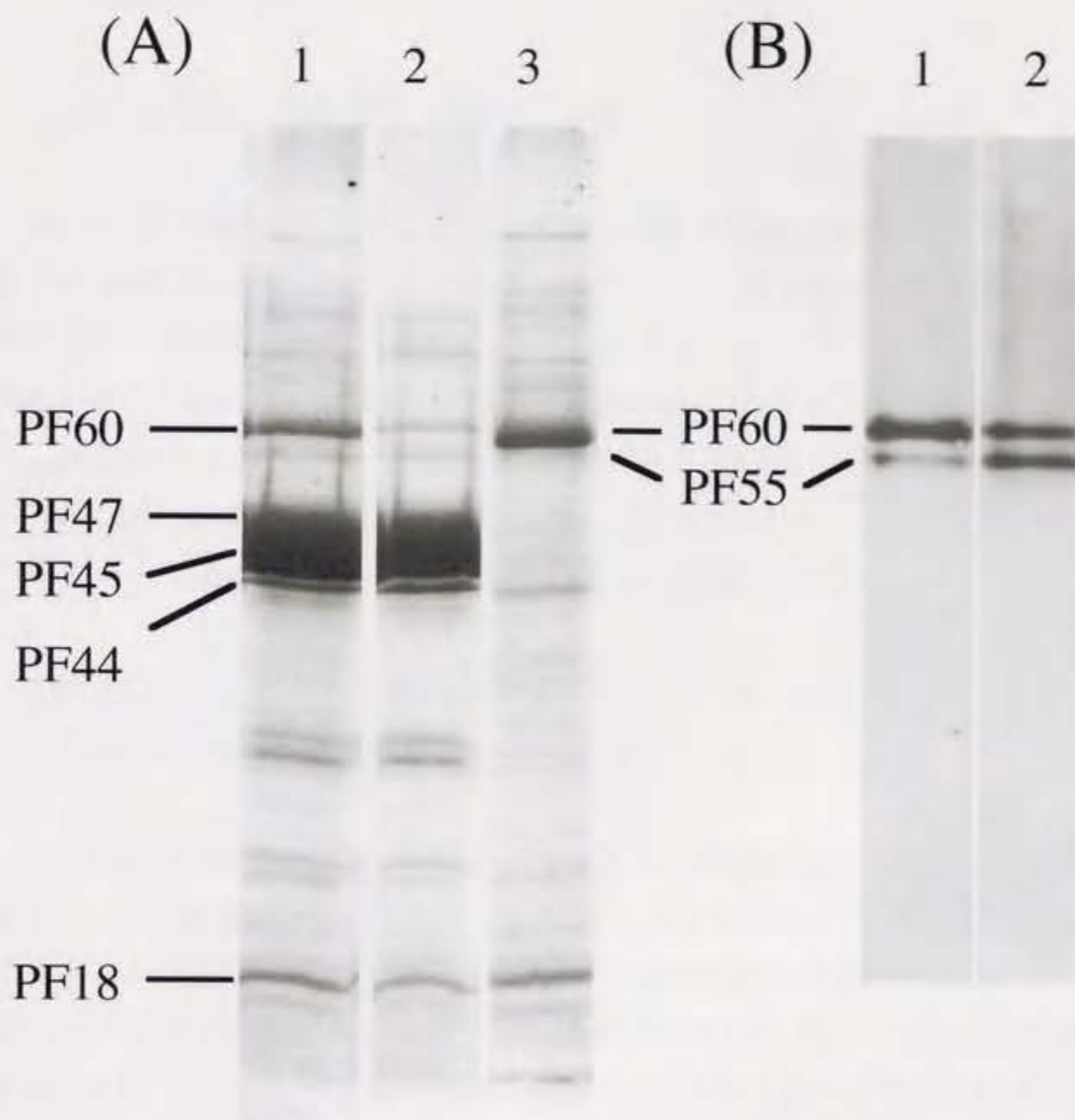


図 6-1 PF60 の精製と抗体の反応

A) 長極毛株 NMB90 のべん毛分画 (レーン 1) を 1.0% TritonX-100 で処理後、超遠心により沈殿 (レーン 2) と上清 (レーン 3) に分離し、SDS-PAGE により泳動、クマシーブルー染色により検出した。

B) 長極毛株 NMB90 (レーン 1) および野生型株 YM4 (レーン 2) の極毛分画を SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜に移し、PF60 抗体で免疫プロットした。

のアミノ酸配列を決定した (図 6-2)。

6.3 PCRによるPF60構造遺伝子断片の増幅

決定したPF60由来ペプチドのN末端配列より推定されるコドン塩基配列を元にPCR用のmix primerを合成した (図 6-2)。これらのプライマーを用いて長極毛株および野生株の染色体DNAを鋳型としてPCR反応を行ったところ、約230 bpの断片が増幅された (図 6-3)。長極毛株より増幅された断片をTAベクターにクローニングし、pMFS1と命名した。pMFS1の塩基配列を決定しアミノ酸配列を推定したところ、PF60由来ペプチドのアミノ酸配列と一致したことから、この断片はPF60タンパク質をコードする遺伝子の一部分であることが確認された。

6.4 PF60構造遺伝子による染色体サザンプロットとコロニーハイブリダイゼーション法によるPF60遺伝子全長のクローニング

この遺伝子断片をプローブとして、様々な制限酵素で切断した長極毛株NMB90の染色体DNAに対するサザンプロットを行ったところ、各々1本のバンドが検出された (図 6-4)。このことからPF60構造遺伝子は染色体上に1コピーのみ存在すると考えられる。PF60構造遺伝子を含む4.4 kbのHindIII断片をクローニングするために、HindIIIで切断したNMB90の染色体をpHSG398ベクターにつなぎ、大腸菌に導入した。放射線標識したpMFS1をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行ったところポジティブに反応するクローンを得た。このコロニーよりプラスミドDNAを抽出したところ、4.4 kbのHindIII断片を含んでいたため、これをpMFS2と命名した。

6.5 PF60およびその周辺領域の遺伝子

pMFS2より各種欠失変異をもつプラスミドを作製し、塩基配列を決定したところ、PF60構造遺伝子を含む4つのopen reading frameが同定された (図 6-5)。PF60遺伝子は491アミノ酸残基からなる推定分子量54 kDaのタンパク質をコードしていた。この遺伝子を、*pfsA* (polar flagellar sheath protein A)と命名した。*pfsA*の456 bp上流にはPF60遺伝子と逆方向にorfAが、270 bp下流には同方向にorfBが、そのさら

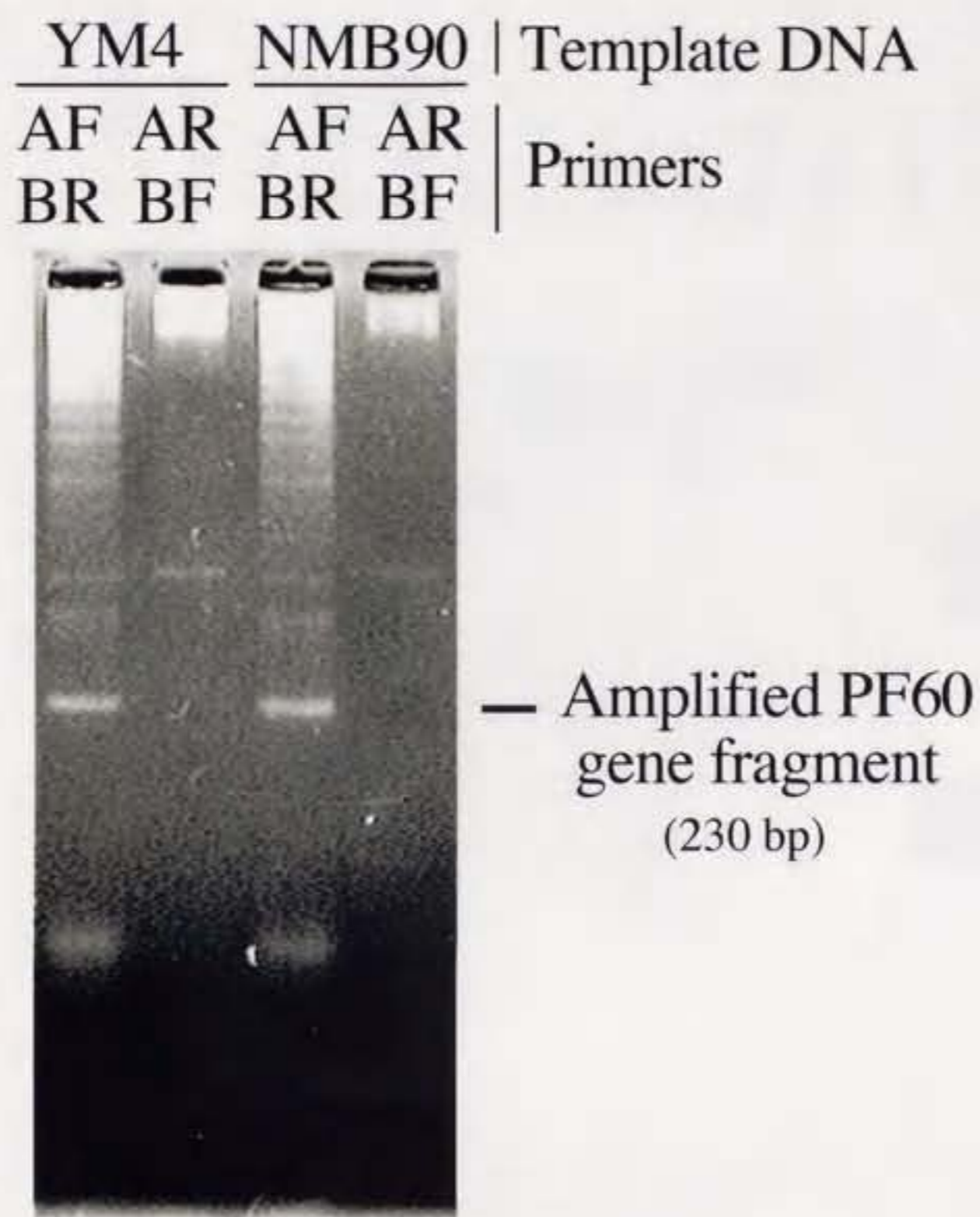


図 6-3 PCRによる PF60 遺伝子断片の増幅

野生株 YM4 または長極毛株 NMB90 の染色体 DNA を鋳型として図 6-2 に示した AF と BR または AR と BF のプライマーの組み合わせで PCR 反応を行い、アガロースゲル電気泳動により分離した。

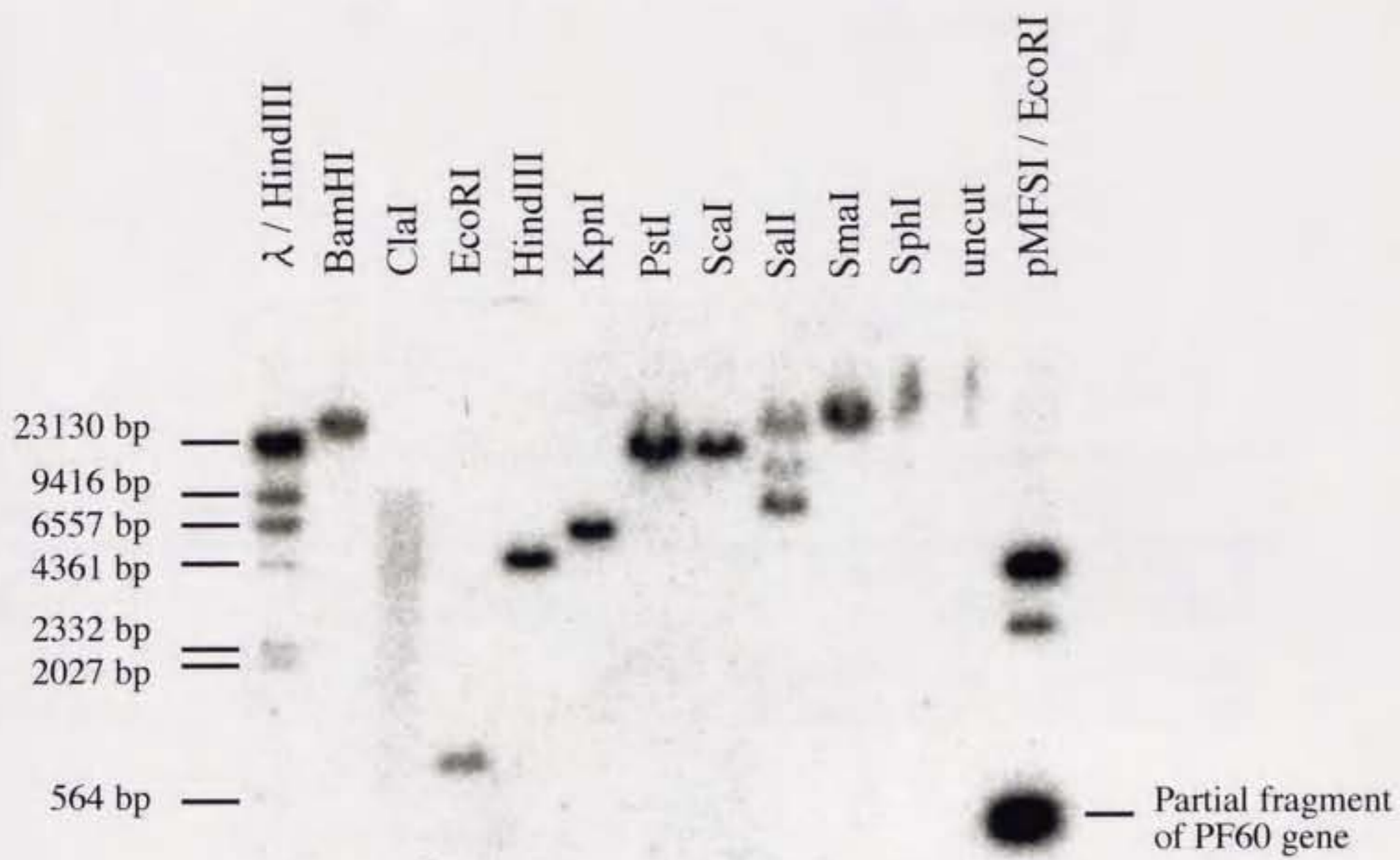


図 6-4 pMFS1 をプローブとしたビブリオ菌染色体 DNA に対するサザンブロット
 長極毛株の染色体 DNA を制限酵素で切断してナイロン膜にブロットし、放射性標
 識した pMFS1 の EcoRI 断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを
 行った。

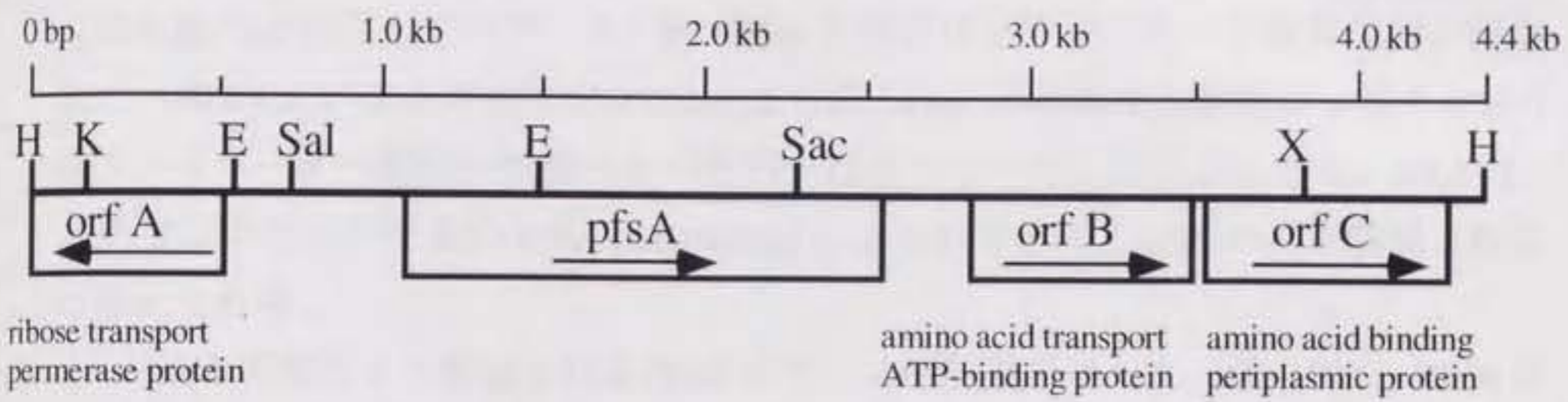


図 6-5 *pfsA*とその周辺地図

pfsA と周辺の open reading frame を四角で示した。下段に各々の遺伝子産物のホモログを示した。矢印は各遺伝子の転写方向を示す。

に下流には orfC が存在していた。ただし、orfA は、N 末端領域側の 206 アミノ酸のみを含む。また orfB の C 末端側と orfC の N 末端側の配列については、塩基配列決定を行っていない。データベース検索の結果、orfA、orfB、orfC 共に糖またはアミノ酸の輸送系に関わるタンパク質とホモロジーが見られた (図 6-5)。

6.6 *pfsA* の遺伝子構造および *pfsA* のアミノ酸配列とタンパク質構造

pfsA の開始コドン ATG 配列の 6 bp 上流には大腸菌のリボソーム結合部位によく似た配列が存在していた。また約 60 bp 上流には σ^{54} プロモータ保存配列が存在した (図 6-6A)。また終止コドン TAA より約 50 bp 下流には大腸菌の ρ 因子非依存的ターミネーター配列の特徴をもつ配列が存在していた。このことから、*pfsA* は σ^{54} サブユニットをもつ RNA polymerase により転写され、*pfsA* のみが翻訳されると考えられる。

pfsA の配列より推定される PF60 のアミノ酸配列を示した (図 6-7)。PF60 は N 末端部分に 2 個の正電荷アミノ酸と 17 の疎水性アミノ酸からなるシグナルペプチドと考えられる配列を持っていた。20 残基目付近にはシグナルペプチダーゼにより切断される可能性のある部位が存在していた。また、シグナルペプチド配列の後には、8 つのグリシン残基の繰返し配列がみられた。PF60 のアミノ酸配列について、BLAST プログラムを用いてデータベースとのホモロジー検索を行った。その結果、*Pseudomonas fluorescens* の XylIF と PF60 の N 末端のシグナルペプチドおよびグリシン繰返し配列部分を含む 1 ~ 35 残基の部分の間で 37% のホモロジーを示した。N 末端領域以外の部分では PF60 と XylIF の間の有意なホモロジーはなかった。進行中の *V. cholerae* のゲノムプロジェクトのデータベースについてもホモロジー検索を行ったが、PF60 とホモロジーのある配列は見つからなかった。

PF60 タンパク質のヒドロパシープロットを示した (図 6-8)。大腸菌の外膜タンパク質 OmpF と同様に N 末端のシグナルペプチド部分を除いて高い疎水性領域は見られなかった。アミノ酸配列からタンパク質の局在部位 (細胞質、細胞膜、外膜、分泌) を予測する PSORT プログラムにより PF60 のアミノ酸配列を解析したところ、菌体の外膜に局在する可能性が高い (約 94%) ことが示された。

6.7 *pfsA* 遺伝子のビブリオ菌体における発現

(A)

-480 GCGTTTTGTAACTGCGTCTGACATAGATTCCTCATATATTTAAAAGTTATGAATTCTTC
-420 ATTCAATTTGTGTTAATCCGCATCCTGCGGCACGCTTATGCTAGCTATTATTAGATTGTT
-360 ACACGTCGACATTGTGCCTAAGCATAGCTAATAACTTATTGTGTTGAGGCACAAAAAAT
-300 CCTCATCTTTTGGCAGGAGTCTAGCAAGATAGCCATTTAGGGTGATTGATTAGATCACT
-240 TTAAGAATGGTTGTGAAATAAACTACAGAAAAGTTTCTGGCATGCGAATGAGATGGTGAA
-180 ATCTTGTGTAATTTCAATTACACAAGTTGCATAAAATTAGAATTTGTTGCTCTTATCGTTC
-120 TGGGATGCAGGGTAAATATCAATATTCATGATGATTATATAAAGCTGGCTTTATTCTTC
-60 TTTCTACAGGGCAAAGACGATTTTTTGGCTAATCATTGCCGCTCAGTTTAGGAAAAAGAC SD
+1 ATGAAACAGCTTAAAGTACTGCCACTAGTGGCAATCATCTCAGGGTTAATGGTCGGTTGT
M K Q L K V L P L V A I I S G L M V G C

(B)

+1441 ACTTCAAACCTCATTGGTAGTCAGTCGTTTTAATTAATTCATTACGACCCATAAATAAGTTC
T S N S L V V S R F N *
+1501 CAATTAACACTTTTGTAAATTTATTAAGCCCTTCTAAAGGGCTTTTTTATATTTAATA
+1561 TTCAGCTTTTGAAGAATAAGTTGCTATATATTGCATATTAATTTGGCTATCGTATCTTTC

図 6-6 PF60 遺伝子のプロモーター領域と転写終結因子

(A) σ^{54} の保存配列を二重線で、大腸菌の ribosome binding site (RBS) である Shine-Dalgarno (SD) 配列に類似した部位を下線で示した。また、開始コドン⁺を四角で囲んだ。

(B) ρ 非依存性転写終結因子と考えられる配列を矢印で示した。


```

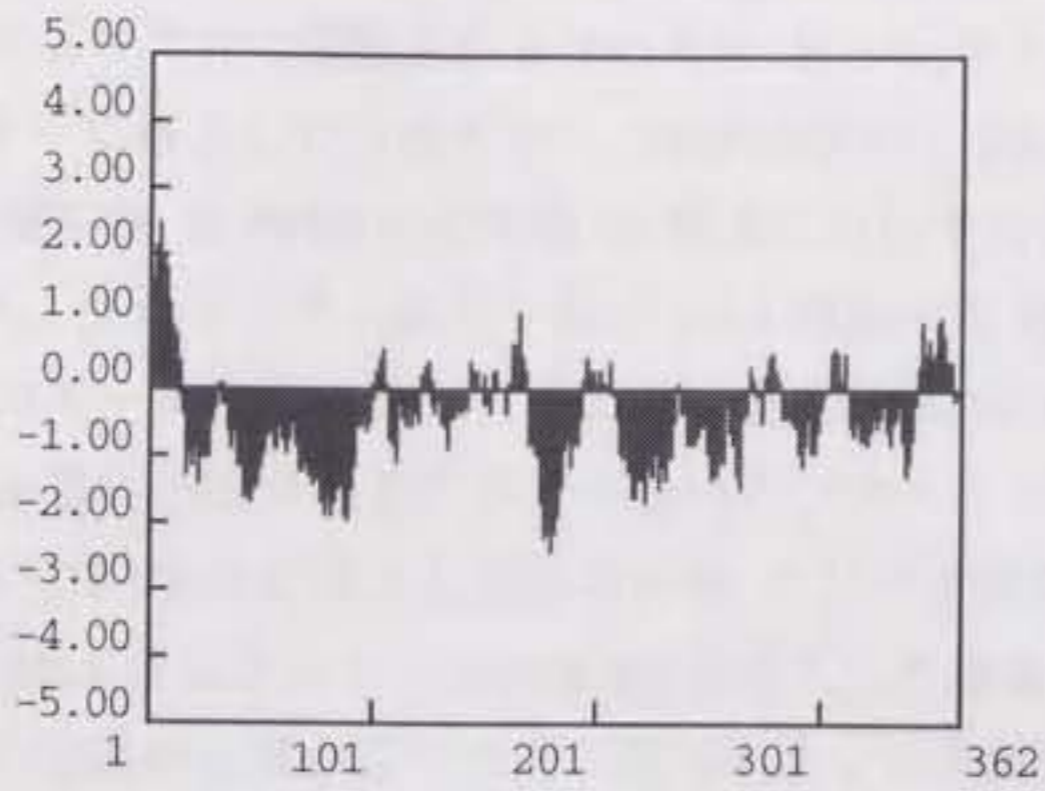
      10      20      30      40      50      60
MKQLKVLPLV AIISGLMVGC GGGGGGGGGA APKTAFTDF AIPATMTESE ATAKGCTVYD
      70      80      90     100     110     120
HKTELNGDKT VLTYSAASK QVTNYVIGYY SDADQKRAGD I IKPTIDNFK FYLEDIPDGG
      130     140     150     160     170     180
FVTFQAIEFN GREARVNTFS KEFLQDKKLR NATFALNRDS LNKCFTGGNL ASNKFTNLDY
      190     200     210     220     230     240
RNAESGGGDY NFVSQTDIFT SPNPDMLPTD ELMGLKGEPT ALFQYESGSS DKALYQYGIG
      250     260     270     280     290     300
SWGTEGIALV RADNTSNIYS SSDYTYDILH IGFITNGFAY DALKLDKTAV EYNRPSATNK
      310     320     330     340     350     360
ETWVYMAFSE NQVNGWDSI L NETVSDGWDI DVDPSSYLN I DNLPNIKPSV STQGSADSVI
      370     380     390     400     410     420
DLDMGLTSST EGFTRVAYFA ASGDYKVTHR IFTKSDSDSV VVPELHYYNF PTSAVNGLKY
      430     440     450     460     470     480
SASDDFNRTA LVLSDDSNID SKVFMSFFSN GEASEPELDE DLDGIITSEK EGLENEVTLR
      490     500     510     520     530     540
TSNSLVVSRF N.....

```

図 6-7 PF60 の推定アミノ酸配列

pfsA から予測される PF60 のアミノ酸配列を示した。シグナルペプチドと考えられる配列を四角で囲んだ。矢印は大腸菌のシグナルペプチダーゼによる切断部位に似た配列を示す。グリシンの繰返し配列を二重下線で示した。リジルエンドペプチダーゼ分解によって得られた3種類のペプチドのN末端配列と一致した領域を下線で示した。また、ペプチド抗体の作成に用いた配列を点線で囲んだ。

PF60



OmpF

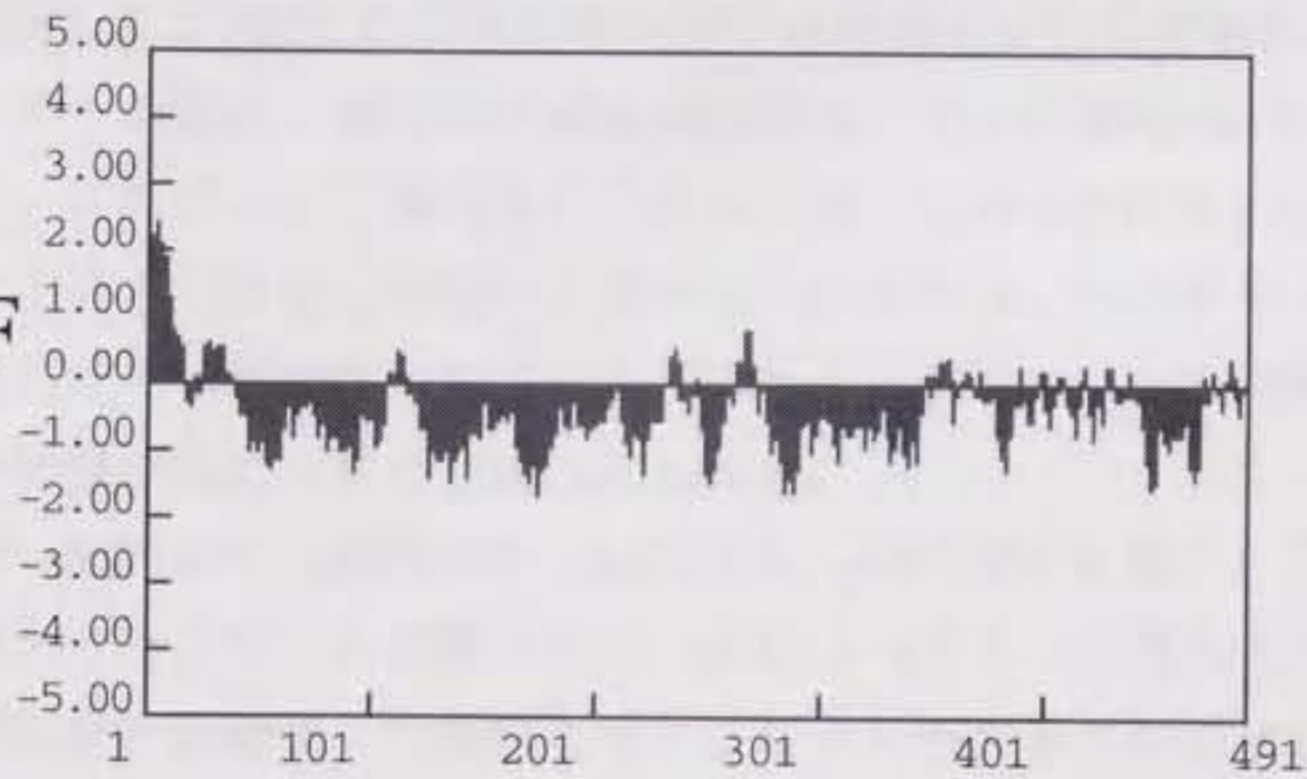


図 6-8 PF60 および OmpF のハイドロパシープロット

PF60 および 大腸菌の外膜ポーリンタンパク質 OmpFのハイドロパシープロットを示した。Kyte & Doolittle 法による。

ペプチド抗体を用いて、ビブリオ菌体中での *pfsA* 遺伝子の発現を調べた。pMFS2 プラスミドの持つ ColE1 ori (pHSG398 由来) はビブリオ株では複製されない。そこでビブリオ菌体中での *pfsA* 遺伝子の発現を調べるために、pMFS2 上の *pfsA* 遺伝子をビブリオ株で複製される P15A ori およびカナマイシン耐性遺伝子を持つ pSU 系ベクターに移入した (図 6-9)。pMFS304 は、*pfsA*、*orfB*、および *oriC* の一部をもつ。pMFS306 は PF60 の C 末側 86 残基に対応する部分を欠失させた。また、pMFS301 は、プロモーター部分を除く *pfsA* 遺伝子を PCR により増幅し、pSU41 の lac プロモーターの直後につないだ。また、pMFS302 は、pMFS301 の *pfsA* 遺伝子部分を逆向きにつないだプラスミドである。これらのプラスミドを野生型極毛株 VIO5 に導入し菌体の PF60 タンパク質の発現を PF60-96 抗体により検出した。*pfsA* 遺伝子をもつ pMFS304 を導入した場合、ベクターのみの場合に比べて約 40 倍の発現の上昇が見られた (図 6-10)。3' 末端側を欠失した *pfsA* 遺伝子をもつ pMFS306 では PF60 の発現は野生株とほぼ同じレベルであった。またラクトースプロモーターの直後に順方向に *pfsA* 遺伝子をつないだ場合もほぼ同様の発現上昇が見られた。これに対して逆向きにつないだ場合は約 8 倍程度しか発現上昇が見られなかった。逆向きの場合に発現の上昇が見られるのは、ベクター上の何らかのプロモーター配列から転写が行われているためかもしれない。PF60-301 抗体を用いた場合も同様の発現が検出された (data not shown)。

プラスミド pMFS301、pMFS302、pMFS304、pMFS306 を導入した野生株について軟寒天培地上でのスワームを調べたが、pSU21 ベクターを導入した株と違いが無かった。また暗視野顕微鏡下で観察したところべん毛の長さや形状にも違いは見られなかった (data not shown)。

6.8 極毛欠損株における PF60 及びフラジェリンタンパク質の発現

当研究室で単離されている極毛欠損株の whole cell extract を、PF60 抗体を用いて免疫ブロットしてみると、PF60 の発現が上昇または減少している株があることがわかった。図 6-11 にそれらの株の免疫ブロットの代表例を示した。NMB126 および NMB175 は野生型の約 5 倍量の PF60 の発現が見られた。これらの株では PF47 は野生型の約 2 倍程度発現していたが、PF45 はほとんど検出されなかった。VIO560 および VIO587 では、野生株の半分程度しか PF60 が発現していなかった。これらの株では、PF47 は全く検出されなかったが、PF45 は少量ながら発現していた。さらに

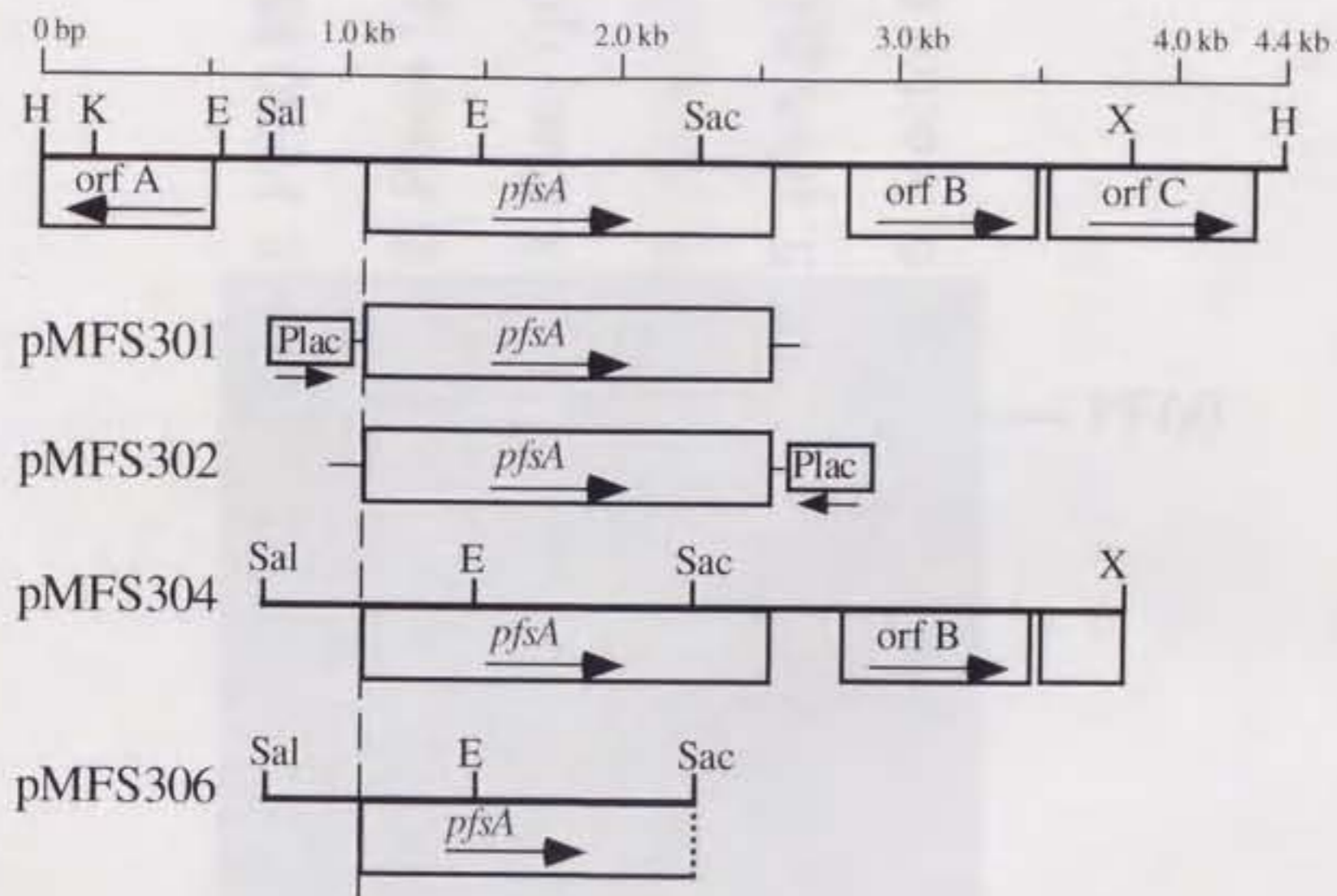


図 6-9 *pfsA* 遺伝子プラスミドマップ

pMFS301、pMFS302 は *lac* プロモーターの直後に *pfsA* 遺伝子をそれぞれ順方向、逆方向につないだ。pMFS304 は *pfsA*、*orfB* および *orfC* の一部を含む。pMFS306 は *pfsA* の C 末端側 86 残基をコードする部分が欠失している。

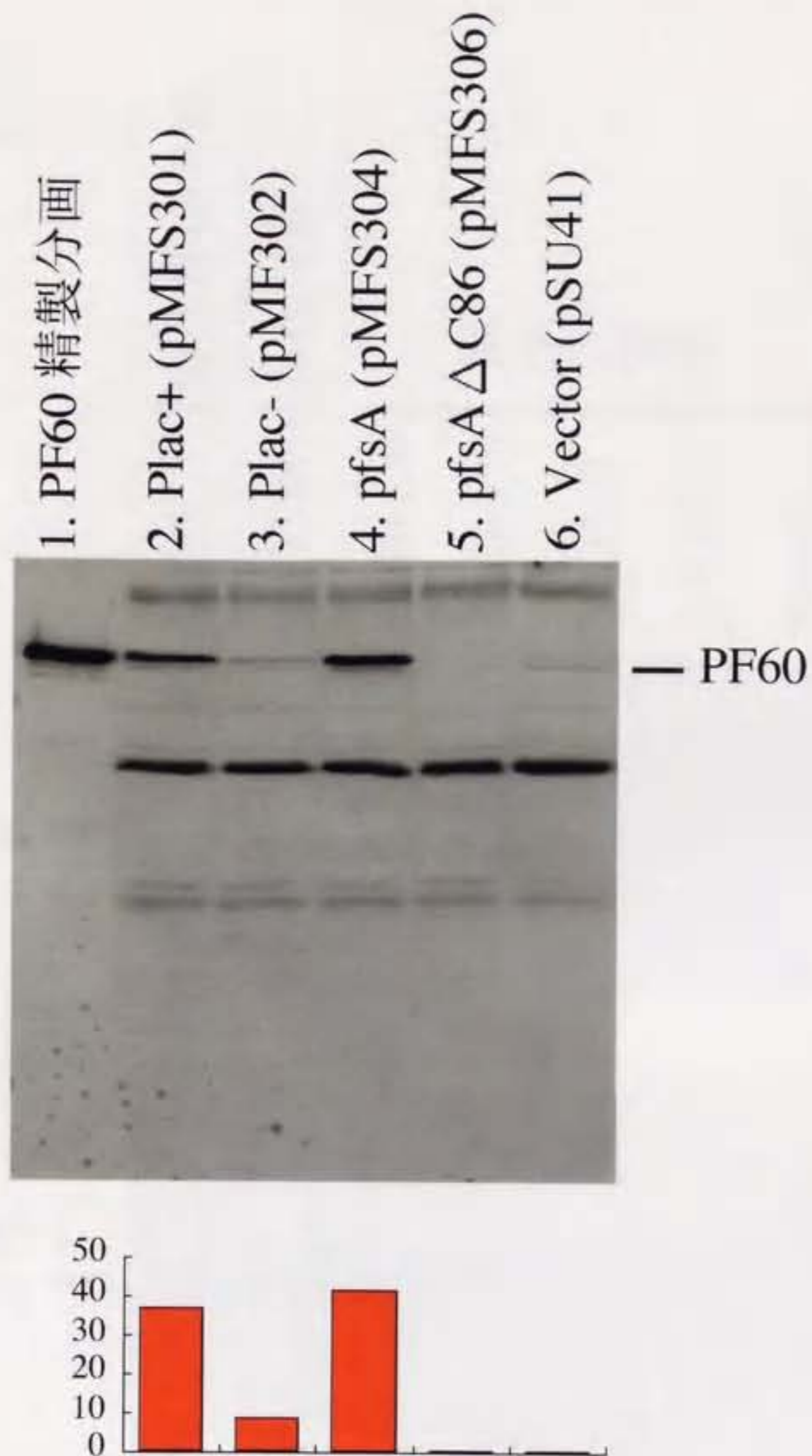


図 6-10 *pfsA* 遺伝子の発現

pfsA 遺伝子を含む各プラスミド (図 6-9) を野生型極毛株 VIO5 に移入した。各形質転換体の対数増殖期後期の培養液を SDS-PAGE により分離し、PF60 ペプチド抗体により免疫プロットした。PF60 のバンドの強度を計測し、レーン 6 (VIO5/pSU41) のものを 1 としたときの相対量比を下図にグラフで示した。

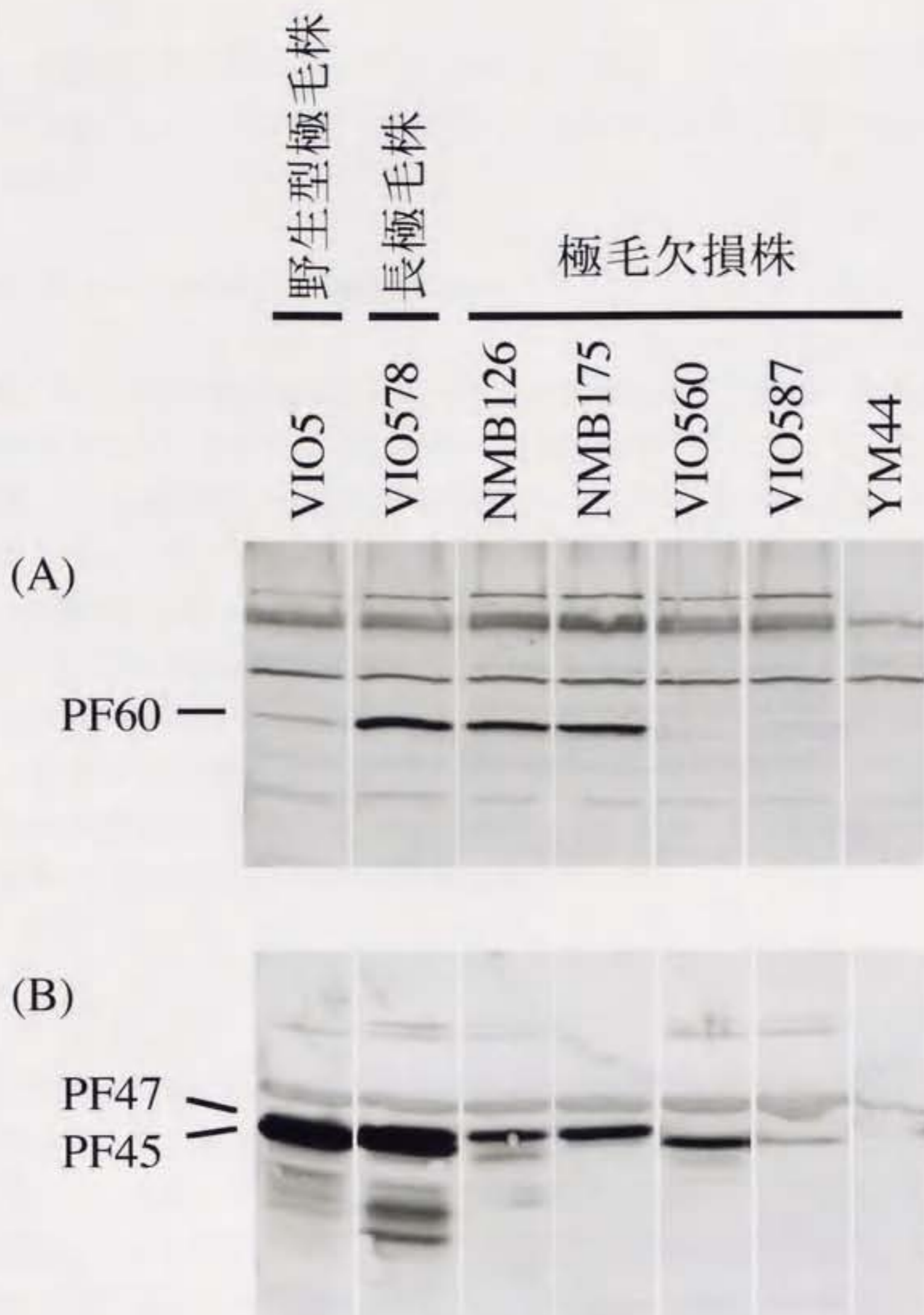


図 6-11 極毛欠損株のPF60 およびフラジェリンの発現量
 各株の対数増殖期後期の培養液を SDS-PAGE により分離し、PF60 抗体 (A)
 または PF45抗体 (B) により免疫プロットした。

σ^{54} 遺伝子変異株である YM44 では、PF60 およびフラジェリンの両方共に全く検出されなかった。これらのことから、PF47 と PF60 は同じ発現調節を受けているように思われる。

6.9 染色体上の *pfsA* 遺伝子の破壊の試み

pfsA 遺伝子の機能を知るためにビブリオ菌染色体上の遺伝子破壊を試みた。*pfsA* 遺伝子をもつプラスミド pMF304 (Km^r) に pBR322 のテトラサイクリン耐性遺伝子を順方向 (pMFS308) または逆方向 (pMFS309) に導入した。 λ pir を持つ大腸菌中では複製されるが、ビブリオ菌では複製されない pKY704 suicide vector (Cm^r) に、*pfsA* (Tet^r) 遺伝子を導入した。これらのプラスミド pMFS312、pMFS313 (Tet^r 、 Cm^r) を海洋性ビブリオ菌の野生株 VIO5 および VIO578 株に接合により導入したところ、 Tet^r 、 Cm^r の株を単離することができた。これらの株は、染色体上に Tet^r 導入型 *pfsA* 遺伝子と正常な *pfsA* 遺伝子の両方を持っていると考えられる。これらの株をテトラサイクリンを含む VC 液体培地で約 30 回植え継いだ後、VC 寒天培地上で Tet^r Cm^r の株の選択を試みたが、目的の株は得られなかった。

考察

この章では PF60 タンパク質を精製、抗体の作製および構造遺伝子のクローニングを行った。第二章で示したように、鞘膜に存在すると考えられる、PF60 に対するポリクローナル抗体による凝集反応が見られたことからこのタンパク質は鞘膜の外側に露出している可能性が示された。ただしこの抗体は PF60 の他にも 55 kDa のバンドにも反応することからこの凝集反応が PF60 によらない可能性もある。序章でも述べたが *Vibrio cholerae* において、65 kDa、60 kDa、56.5 kDa の 3 種類のタンパク成分が鞘膜に含まれることが報告されている (Hranitzky, 1980)。これらのタンパクに対する抗体は鞘膜および菌体外膜の両方に反応することが免疫電顕法を用いた観察から示されている。*V. alginolyticus* の PF60 タンパク質も鞘膜のみならず菌体外膜にも存在するかもしれない。

PF60 をコードする遺伝子のクローニングに成功した。*pfsA* 遺伝子は 491 残基からなる推定分子量約 54 kDa のタンパク質をコードしていた。PF60 の N 末端には 19 残基からなるシグナルペプチド配列が存在していた。19 残基のグリシンと 20 残

基目のシステインの間でシグナルペプチダーゼによる切断される可能性があるが実際に切断されるかどうかはわからない。また PF60 の N 末端のシグナルペプチド配列の直後にはグリシンが 9 個連続して存在していた。グリシンは 1 個の水素原子を側鎖に持ち様々なコンフォメーションに適応することから、このグリシンの繰返し配列の部分は自由度の高い構造を形成していると考えられる。(Branden & Tooze, 1991)。PF60 のシグナルペプチドとグリシン繰返し配列を含む N 末端領域と *Pseudomonas fluorescens* の XylIF の N 末端の領域でホモロジーが見られた。XylIF は植物ヘミセルロースの主要成分である β -1,4-D-キシランを分解する分子量約 65 kDa の酵素である (Millward *et al.*, 1995)。XylIF のグリシン繰返し配列はシグナルペプチドと機能ドメインの間のリンカー配列と考えられている。XylIF の N 末端領域を除く機能部位では PF60 と間で有意なホモロジーは見られなかったことから、機能的には PF60 とは相関関係は低いと考えられる。

鞘膜に存在するタンパク質はどのような役割を担っているのでしょうか。 *pfsA* の上流および下流に存在した 3 つの *orf* の遺伝子産物は分子輸送に関わるタンパク質とホモロジーが見られた。PF60 は鞘膜あるいは外膜において何らかの分子の輸送に関わっているのかもしれない。PF60 の機能についての知見を得るために、野生型株に *pfsA* 遺伝子を導入し発現させたが、極毛による運動や形状には違いを見いだせなかった。またビブリオ菌染色体上での *pfsA* 遺伝子の破壊を試みたが、成功しなかった。

鞘膜タンパク質はどのように鞘膜まで運ばれるのでしょうか。フックやフラジェリンなどのべん毛構成タンパク質の多くはシグナルペプチドを持たずべん毛特異的な輸送装置によりべん毛中心部の中空部分をとおって先端で重合する。PF60 はシグナルペプチドを持ち、Sec 膜透過系により内膜を透過すると考えられる。

極毛欠損株の発現解析から PF60 がフラジェリンと同じ σ^{54} べん毛遺伝子群の発現調節下にある可能性が示された。このように *pfsA* 遺伝子が極毛遺伝子群と同じ発現制御を受けるという推定は、以下の知見ともよく一致する：(1) *pfsA* が σ^{54} 型プロモーター配列をもつこと、(2) σ^{54} 変異株が極毛欠損を示すこと (Kawagishi *et al.*, 1997)、(3) いくつかの極毛関連遺伝子が σ^{54} 型プロモーター配列をもつこと (Asai, *et al.*, 1997; Okunishi, *et al.*, 1996)。さらに、近縁種 *Vibrio parahaemolyticus* では 4 つのフラジェリン遺伝子のうち *flaA*、*flaB*、*flaD* は σ^{28} 型のプロモーター配列をもつが、*flaC* は σ^{54} 型のプロモーター配列をもつ (McCarter, 1995)。PF47 の N 末端の配列は

V. parahaemolyticus の FlaC (σ^{54} プロモーターを持つ) の配列と完全に一致していた (図 4-2)。フラジェリンの N 末端の配列は 20 残基中 16 残基が一致していたので、直ちに PF47 = FlaC とは結論できないが、PF47 と PF60 は共に σ^{54} 因子による直接的な制御を受けているのかもしれない。

<第7章 結論と展望>

本研究では鞘を持つ海洋性ビブリオ菌 *V. alginolyticus* の研究を行った。第3章では、極毛の長さの異なる3種類の株、野生型株、短極毛株、長極毛株の運動能を調べた。短極毛株、長極毛株共に、運動能の低下が見られた。短極毛株の運動能低下がべん毛の長さの減少によるものが示された。これに対して長極毛株ではらせん形状の違いが野生株との運動能の違いの大きな原因であると推定された。第4章では、各株のべん毛構成タンパク質を調べ、べん毛を構成する2種類のフラジェリンと鞘膜に存在する3種類のタンパク質 PF60、PF44、PF18 を見いだした。短極毛株のタンパク質構成は野生株とほとんど変わらなかったが、長極毛株では、PF60、PF47、PF18 タンパク質が野生株より増加していた。長極毛株のべん毛の形状の違いはべん毛タンパク質構成の違いによることが示唆された。第5章では、長極毛株の変異の原因を探った。長極毛株の変異はべん毛遺伝子群の発現制御に作用し、複数の性質に影響を与えることが示唆された。第6章では、長極毛株において顕著に増加していた PF60 タンパク質について研究を進め、*pfsA* をクローニングした。*pfsA* は N 末端にシグナルペプチドを持つ 491 アミノ酸からなる推定分子量約 54 kDa のタンパク質をコードしていた。

本研究によって、*V. alginolyticus* の極毛繊維の構成タンパク質が明らかになった。べん毛繊維を構成する2種類のフラジェリンの量比はべん毛の形を決める重要な要素であることが示された。べん毛のらせん形状は長極毛と野生型極毛とで異なっていたが、それぞれの極毛のらせんは根本から先端までほぼ同じ形状であった。このことは海洋性ビブリオ菌のべん毛繊維において2種類のフラジェリンが均等に局在していることを示唆する。サルモネラ菌のべん毛繊維は1種類のフラジェリンから構成されるが、べん毛のらせんの形はダイナミックに変化する。この多型変換の機構は、べん毛繊維の中でフラジェリンが L 型と R 型と呼ばれる2つのコンフォメーションをとることにより説明される。この2種類のコンフォメーションのサブユニット間相互作用がべん毛のらせん形状を変化させると考えられている。ビブリオ菌の極毛の場合、2種類のフラジェリンがこの2つのコンフォメーションに対応するのかもしれない。ビブリオ菌の極毛の場合、サルモネラ菌のべん毛のようなダイナミックなコンフォメーション変化は起こらない。すなわちべん毛が逆回転する際にもべん毛らせんの向きは左巻きのままで、菌体は前進と後退という動きをする。これは、ビブリオ菌のべん毛らせんを形成するフラジェリンのサブユニット間

相互作用がサルモネラ菌のように柔軟に変化しないためかもしれない。極毛の詳細な構造解析をすすめれば、2種類のフラジェリンから構成されるべん毛のらせん形成のしくみが明らかになるかもしれない。

べん毛の長さはどのように決まっているのだろうか。序章で述べたようにサルモネラ菌では、べん毛の長さはフラジェリンの供給量で決まると考えられている。したがってべん毛の本数が増えると一本あたりのべん毛の長さは減少する傾向にある。海洋性ビブリオ菌の極べん毛では、図3-1で見られるようにべん毛の本数が増えてもべん毛の長さは揃っていた。ビブリオ菌の極毛においては、サルモネラ菌と異なるべん毛制御を受けていると考えられる。2種類のフラジェリンの量比がべん毛の長さに影響している可能性も考えられる。先に述べたようにサルモネラ菌のべん毛繊維はフラジェリンの2種類のコンフォメーションの割合が自由に変わることによってべん毛の形が様々に変化できる。ビブリオ菌極毛において2種類のフラジェリンが重合し得る量比が、ある程度決まっているかもしれない。つまり野生型における PF47:PF45=1:4 という比率が安定した量比で、どちらかのフラジェリンの供給量が増加しても自由に重合比が変化できないのかもしれない。長極毛株のように PF47 が過剰に発現されると、別のらせん形状をとると考えられる。2種類のフラジェリンのバランスがとれた供給によりべん毛の重合が促進されるため、1種類のフラジェリンからなるべん毛繊維に比べて、べん毛の長さもより厳しく制御されるのかもしれない。

極毛の鞘は、フラジェリンタンパク質のみからできたべん毛繊維を包む膜構造である。べん毛モーターの回転は最終的には鞘膜の運動という形で外界に伝えられる。この際、鞘膜がべん毛繊維と共に回転しているとすれば、鞘と外膜との境界で回転が起こることになる。あるいは鞘膜の内側でべん毛繊維が回転しているならば、繊維と鞘膜の間で回転が起こる。どちらの場合も毎秒千回転以上の速度で回る為にベアリング構造のようなこれまで知られていない仕組みが存在しているかもしれない。また、鞘がどのように外膜から突出してできるのか、膜の形態形成という観点からも非常に興味深い研究対象である。本研究では、海洋性ビブリオ菌の鞘膜に含まれる3種類のタンパク質を見つけた。また、長極毛株において PF60 および PF18 タンパク質が増加していることを見いだした。鞘膜結合タンパク質 PF60 を精製し、構造遺伝子 *pfsA* のクローニングに成功したことは、鞘膜の構造および機能の解明への手がかりとなる有意義な成果である。

鞘膜タンパク質 PF60 の極毛欠損株における発現解析から PF60 が PF47 フラ

ジェリンと同じべん毛遺伝子群の発現調節下にある可能性が示された。V. *alginoliticus* および近縁種 V. *parahaemolyticus* の極べん毛遺伝子群の多くは、 σ^{54} または σ^{28} の発現制御を受けている (Asai, et al., 1997; McCarter, 1994; McCarter, 1994; McCarter, 1995; Okunishi, et al., 1996)。また、第5章での長極毛株の変異を抑圧する遺伝子断片の解析から長極毛株における変異が σ^{54} による極べん毛遺伝子群の発現に影響を与えている可能性が考えられる。長極毛株において、PF60 および PF47 が過剰発現していることは σ^{54} の発現制御を受けていることを支持する。

PF60 はどのような機能を持っているのだろうか。pfsA 遺伝子の周辺領域の orf の推定アミノ酸配列は ABC transporter 関連タンパク質とホモロジーがあった。これらのタンパク質は、アミノ酸やリボースの膜透過に関係し、菌体のペリプラズムまたは内膜に存在する。PF60 が鞘膜または外膜に存在し、分子輸送に関わっている可能性が考えられる。今回、pfsA 遺伝子破壊株の作製をこころみたが成功しなかった。今後 PF60 の機能を特定するために pfsA 遺伝子の解析を進める必要がある。

鞘膜はどのようにして作られるのだろうか。今回 pfsA の推定アミノ酸配列から PF60 が、N 末端にシグナルペプチドと考えられる配列をもつことが明らかになった。シグナルペプチドをもつタンパク質は Sec 系膜透過装置を介して内膜を透過する。PF60 も Sec 系膜透過装置により内膜を透過し、外膜に運ばれると考えられる。鞘膜タンパク質の局在機構の解析が鞘膜の形成機構をさぐる手がかりとなるかもしれない。

<引用文献>

- Asai, Y., Kojima, S., Kato, H., Nishioka, N., Kawagishi, I. & Homma, M. (1997). Putative channel components for the fast-rotating sodium-driven flagellar motor of a marine bacterium. *J. Bacteriol.* **179**, 5104-5110.
- Atsumi, T., Maekawa, Y., Yamada, T., Kawagishi, I., Imae, Y. & Homma, M. (1996). Effect of viscosity on swimming by the lateral and polar flagella of *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* **178**, 5024-5026.
- Atsumi, T., McCarter, L. & Imae, Y. (1992). Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive forces. *Nature* **355**, 182-184.
- Belas, M. R. & Colwell, R. R. (1982). Adsorption kinetics of laterally and polarly flagellated *Vibrio*. *J. Bacteriol.* **151**, 1568-1580.
- Belas, M. R. & Colwell, R. R. (1982). Scanning electron microscope observation of the swarming phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **150**, 956-959.
- Branden, C. & Tooze, J. (1991). Introduction to protein structures. *New York: Garland Publishing, Inc.*, 85-110.
- Dreyfus, G., Williams, A. W., Kawagishi, I. & Macnab, R. M. (1993). Genetic and biochemical analysis of *Salmonella typhimurium* FliI, a flagellar protein related to the catalytic subunit of the F_0F_1 ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant pathogens. *J. Bacteriol.* **175**, 3131-8.
- Driks, A., Bryan, R., Shapiro, L. & DeRosier, D. J. (1989). The organization of the *Caulobacter crescentus* flagellar filament. *J. Mol. Biol.* **206**, 627-636.
- Driks, A. & DeRosier, D. J. (1990). Additional structures associated with bacterial flagellar basal body. *J. Mol. Biol.* **211**, 669-672.
- Fuerst, J. A. (1980). Bacterial sheathed flagella and the rotary motor model for the mechanism of bacterial motility. *J. Theor. Biol.* **84**, 761-774.
- Guerry, P., Alm, R. A., Power, M. E., Logan, S. M. & Trust, T. J. (1991). Role of two flagellin genes in *Campylobacter* motility. *J. Bacteriol.* **173**, 4757-4764.
- Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K. & Aizawa, S. (1994). Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**, 5439-5449.
- Homma, M., Kanbe, T., Chibana, H. & Tanaka, K. (1992). Detection of intracellular forms of secretory aspartic proteinase in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.*,

- Homma, M., Kutsukake, K., Hasebe, M., Iino, T. & Macnab, R. M. (1990).** FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* [published erratum appears in *J. Mol. Biol.* 1990 Sep 20;215 (2):331]. *J. Mol. Biol.* **211**, 465-477.
- Hranitzky, K. W., Mulholland, A., Larson, A. D., Eubanks, E. R. & Hart, L. T. (1980).** Characterization of a flagellar sheath protein of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **27**, 597-603.
- Iino, T. (1985).** Structure and assembly of flagella. In *Molecular Cytology of Escherichia coli*, 9-37. Edited by N. Nanninga. London: Academic Press.
- Iino, T., Oguchi, T. & Kuroiwa, T. (1974).** Polymorphism in a flagellar-shape mutant of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **81**, 37-45.
- Ikeda, T., Kamiya, R. & Yamaguchi, S. (1983).** Excretion of flagellin by a short-flagella mutant of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **153**, 506-510.
- Ikeda, T., Kamiya, R. & Yamaguchi, S. (1984).** *In vitro* polymerization of flagellin excreted by a short-flagellum *Salmonella typhimurium* mutant. *J. Bacteriol.* **159**, 787-789.
- Ikeda, T., Yamaguchi, S. & Hotani, H. (1993).** Flagellar growth in a filament-less *Salmonella* fliD mutant supplemented with purified hook-associated protein 2. *J. Biochem. (Tokyo)* **114**, 39-44.
- Jones, C. J. & Aizawa, S. (1991).** The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function. *Adv. Microb. Physiol.* **32**, 109-172.
- Kaneko, T. & Colwell, R. R. (1973).** Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J. Bacteriol.* **113**, 24-32.
- Katsura, I. & Hendrix, R. W. (1984).** Length determination in bacteriophage lambda tails. *Cell* **39**, 691-698.
- Kawagishi, I., Imagawa, M., Imae, Y., McCarter, L. & Homma, M. (1996).** The sodium-driven polar flagellar motor of marine *Vibrio* as the mechanosensor that regulates lateral flagellar expression. *Mol. Microbiol.* **20**, 693-699.
- Kawagishi, I., Maekawa, Y., Atsumi, T., Homma, M. & Imae, Y. (1995).** Isolation of the polar and lateral flagellum-defective mutants in *Vibrio alginolyticus* and identification of their flagellar driving energy sources. *J. Bacteriol.* **177**, 5158-5160.
- Kawagishi, I., Nakada, M., Nishioka, N. & Homma, M. (1997).** Cloning of a

Vibrio alginolyticus rpoN Gene that is required for polar flagellar formation. *J. Bacteriol.* **179**, 6851-6854.

Kostrzynska, M., Betts, J. D., Austin, J. W. & Trust, T. J. (1991). Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. *J. Bacteriol.* **173**, 937-946.

Koyasu, S., Asada, M., Fukuda, A. & Okada, Y. (1981). Sequential polymerization of flagellin A and flagellin B into *Caulobacter* flagella. *J. Mol. Biol.* **153**, 471-475.

Kreig, N. R. & Holt, J. G. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology* Vol. 1. Baltimore: Williams and Wilkins.

Krupski, G., Gotz, R., Ober, K., Pleier, E. & Schmitt, R. (1985). Structure of complex flagellar filaments in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **162**, 361-366.

Kubori, T., Shimamoto, N., Yamaguchi, S., Namba, K. & Aizawa, S. (1992). Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **226**, 433-446.

Kutsukake, K., Ohya, Y. & Iino, T. (1990). Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **172**, 741-747.

Kutsukake, K., Minamino, T. & Yokoseki, T. (1994). Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**, 7625-7629.

Kutsukake, K. (1997). Hook-length control of the export-switching machinery involves a double-locked gate in *Salmonella typhimurium* flagellar morphogenesis. *J. Bacteriol.* **179**, 1268-1273.

Liu, X. & Matsumura, P. (1994). The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J. Bacteriol.* **176**, 7345-7351.

Macnab, R. M. (1992). Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu. Rev. Genet.* **26**, 131-158.

Magariyama, Y., Sugiyama, S., Muramoto, K., Maekawa, Y., Kawagishi, I., Imae, Y. & Kudo, S. (1994). Very fast flagellar rotation. *Nature* **371**, 752.

Magariyama, Y., Sugiyama, S., Muramoto, K., Kawagishi, I., Imae, Y. & Kudo, S. (1995). Simultaneous measurement of bacterial flagellar rotation rate and swimming speed. *Biophys. J.* **69**, 2154-2162.

- Maruyama, M., Lodderstaedt, G. & Schmitt, R. (1978).** Purification and biochemical properties of complex flagella isolated from *Rhizobium lupini* H13-3. *Biochim. Biophys. Acta.* **535**, 110-124.
- McCarter, L., Hilmen, M. & Silverman, M. (1988).** Flagellar dynamometer controls swarmer cell differentiation of *V. parahaemolyticus*. *Cell* **54**, 345-351.
- McCarter, L. & Silverman, M. (1990).** Surface-induced swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol. Microbiol.* **4**, 1057-1062.
- McCarter, L. L. (1994).** MotX, the channel component of the sodium-type flagellar motor. *J. Bacteriol.* **176**, 5988-5998.
- McCarter, L. L. (1994).** MotY, a component of the sodium-type flagellar motor. *J. Bacteriol.* **176**, 4219-4225.
- McCarter, L. L. (1995).** Genetic and molecular characterization of the polar flagellum of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **177**, 1595-1609.
- McCarter, L. L. & Wright, M. E. (1993).** Identification of genes encoding components of the swarmer cell flagellar motor and propeller and a sigma factor controlling differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **175**, 3361-3371.
- McGee, K., Horstedt, P. & Milton, D. L. (1996).** Identification and characterization of additional flagellin genes from *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **178**, 5188-5198.
- Millward, S. S., Davidson, K., Hazlewood, G. P., Black, G. W., Gilbert, H. J. & Clarke, J. H. (1995).** Novel cellulose-binding domains, NodB homologues and conserved modular architecture in xylanases from the aerobic soil bacteria *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa* and *Cellvibrio mixtus*. *Biochem. J.* **312**, 39-48.
- Mimori, K. Y., Vonderviszt, F., Yamashita, I., Fujiyoshi, Y. & Namba, K. (1996).** Direct interaction of flagellin termini essential for polymorphic ability of flagellar filament. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15108-15113.
- Mimori, Y., Yamashita, I., Murata, K., Fujiyoshi, Y., Yonekura, K., Toyoshima, C. & Namba, K. (1995).** The structure of the R-type straight flagellar filament of *Salmonella* at 9 Å resolution by electron cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.* **249**, 69-87.
- Morgan, D. G., Owen, C., Melanson, L. A. & DeRosier, D. J. (1995).** Structure of bacterial flagellar filaments at 11 Å resolution: packing of the alpha-helices. *J. Mol. Biol.* **249**, 88-110.
- Muramoto, K., Kawagishi, I., Kudo, S., Magariyama, Y., Imae, Y. &**

- Homma, M. (1995).** High-speed rotation and speed stability of the sodium-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*. *J. Mol. Biol.* **251**, 50-58.
- Muramoto, K., Makishima, S., Aizawa, S. I. & Macnab, R. M. (1998).** Effect of cellular level of FliK on flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **277**, 871-882.
- Nishioka, N., Furuno, M., Kawagishi, I. & Homma, M. (1998).** Flagellin-containing membrane vesicles excreted from *Vibrio alginolyticus* mutants lacking a polar-flagellar filament. *J. Biochem. (Tokyo)* **123**, 1169-1173.
- Ohnishi, K., Ohto, Y., Aizawa, S., Macnab, R. M. & Iino, T. (1994).** FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**, 2272-2281.
- Okunishi, I., Kawagishi, I. & Homma, M. (1996).** Cloning and characterization of *motY*, a gene coding for a component of the sodium-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* **178**, 2409-2415.
- Sambrook, J. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. .
- Shewan, C. M. & Bennett, C. W. (1974).** Effects of verbal labeling on visual recall by adult aphasic patients. *Percept. Mot. Skills.* **38**, 255-262.
- Shinoda, S. & Okamoto, K. (1977).** Formation and function of *Vibrio parahaemolyticus* lateral flagella. *J. Bacteriol.* **129**, 1266-1271.
- Stewart, B. J. & McCarter, L. L. (1996).** *Vibrio parahaemolyticus* FlaJ, a homologue of FliS, is required for production of a flagellin. *Mol. Microbiol.* **20**, 137-149.
- Thomashow, L. S. & Rittenberg, S. C. (1985).** Waveform analysis and structure of flagella and basal complexes from *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *J. Bacteriol.* **163**, 1038-1046.
- Trachtenberg, S., DeRosier, D. J., Aizawa, S. & Macnab, R. M. (1986).** Pairwise perturbation of flagellin subunits. The structural basis for the differences between plain and complex bacterial flagellar filaments. *J. Mol. Biol.* **190**, 569-576.
- Ueno, T., Oosawa, K. & Aizawa, S. (1992).** M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. *J. Mol. Biol.* **227**, 672-677.
- Ueno, T., Oosawa, K. & Aizawa, S. (1994).** Domain structures of the MS ring component protein (FliF) of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.*

236, 546-555.

Vogler, A. P., Homma, M., Irikura, V. M. & Macnab, R. M. (1991). *Salmonella typhimurium* mutants defective in flagellar filament regrowth and sequence similarity of Flil to F₀F₁, vacuolar, and archaebacterial ATPase subunits. *J. Bacteriol.* **173**, 3564-3572.

Yamashita, I., Vonderviszt, F., Mimori, Y., Suzuki, H., Oosawa, K. & Namba, K. (1995). Radial mass analysis of the flagellar filament of *Salmonella*: implications for the subunit folding. *J. Mol. Biol.* **253**, 547-558.

<付記>

本論文の第3章、第4章の内容の一部は下記の論文として発表済みである。

Furuno, M., Atsumi, T., Yamada, T., Kojima, S., Nishioka, N., Kawagishi, I. & Homma, M. (1997). Characterization of polar-flagellar-length mutants in *Vibrio alginolyticus*. *Microbiology* 143, 1615-1621.

<謝辞>

大学院に入学してからこれまで辛抱強く指導して下さった本間道夫教授に感謝いたします。有意義な指導、議論をして下さった川岸郁朗助教授に感謝いたします。いろいろな面で支えて下さった第四講座および関係者の皆さんに感謝いたします。実験上の指導、助言を下された渥美龍男博士に感謝いたします。

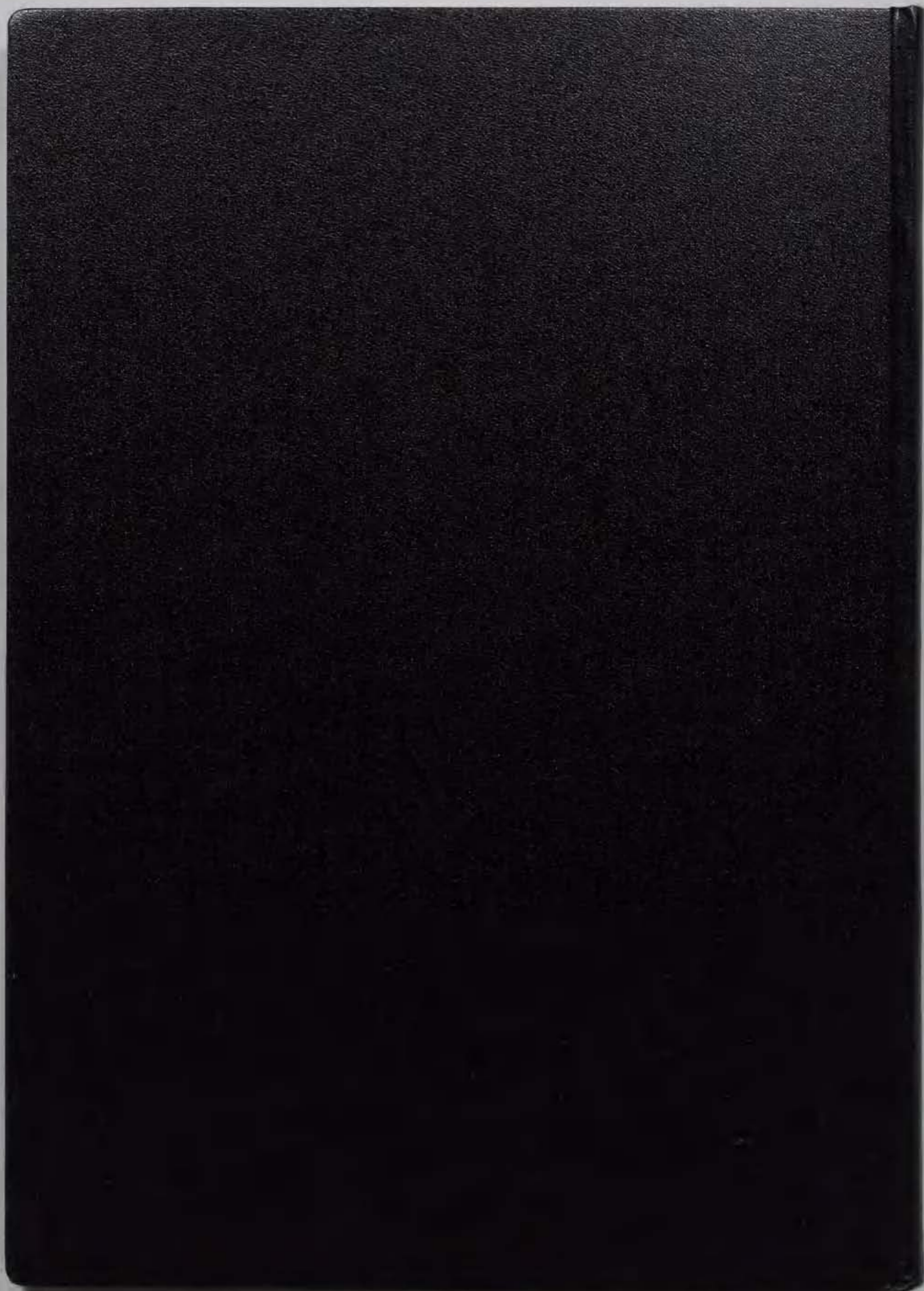
<副論文>

Furuno, M., Atsumi, T., Yamada, T., Kojima, S., Nishioka, N., Kawagishi, I. & Homma, M. (1997). Characterization of polar-flagellar-length mutants in *Vibrio alginolyticus*. *Microbiology* 143, 1615-1621.

<参考論文>

Nishioka, N., Furuno, M., Kawagishi, I. & Homma, M. (1998). Flagellin-containing membrane vesicles excreted from *Vibrio alginolyticus* mutants lacking a polar-flagellar filament. *J. Biochem. (Tokyo)* 123, 1169-73.

Tsuzuki, S., Masuta, T., Furuno, M., Sakurai, S. & Iwami, M. (1997). Structure and expression of bombyxin E1 gene: a novel family gene that encodes bombyxin-IV, an insect insulin-related neurosecretory peptide. *Comp. Biochem. Physiol.* 117, 409-16.





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black
1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16	17	18

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

- A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

