

別紙 4

報 告 番 号	※ 甲 第 号
---------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 Na⁺駆動型細菌べん毛モーターにおける固定子機能の解析
氏 名 竹川 宜宏

論 文 内 容 の 要 旨

細菌の多くは、自身の生存に好ましい環境に向かって運動する。この運動は主に『べん毛』と呼ばれる運動器官により行われる。べん毛は細菌の表面から生えたらせん状の繊維で、細菌はこれをスクリューのように回転させることで自在に移動する。べん毛の根元には膜に埋め込まれた回転モーターが存在し、これは『固定子』と『回転子』から構成される。固定子は2つの膜タンパク質 MotA と MotB（あるいは PomA と PomB）からなり、回転子のまわりへと少なくとも 11 個の固定子が集合する。固定子が回転子の周囲への集合するためには、固定子-回転子間の相互作用が重要である。固定子はイオンチャネルとして働き、固定子を介したイオンの流入と共役して固定子タンパク質 MotA (PomA) の細胞質領域が回転子構成タンパク質 FliG と相互作用し、回転力が生み出されると考えられている。このエネルギー源となるイオン (H⁺、Na⁺など) の種類は細菌の種類によって様々である。これまで、べん毛モーターの研究は、遺伝学的・生化学的・物理学的・構造学的研究など様々な角度から行われ、これまでに回転特性や回転方向制御機構、べん毛形成機構など、多くのことが判明した。しかし、最も重要なモーターの回転力発生機構そのものに関してはほとんど分かっていない。どうやって固定子は回転子のまわりに正しく集合するのか。どうやって固定子内をイオンが流入するのか。回転力を生み出すための固定子-回転子間相互作用界面はどうなっているのか。固定子はイオン流入と共役してどのように構造を変化させるのか。いまだ明らかになってないことは多い。本学位論文では、べん毛モーターの固定子機能に関して以下の3つの内容について研究し、明らかにした。

海洋性ビブリオ菌 (*Vibrio alginolyticus*) の Na⁺駆動型の極べん毛モーターにおいて、固定子が回転子の周囲へと集合するための固定子-回転子間 (PomA-FliG 間) 相互作用の寄与を明らかにするために、固定子の主に細胞質領域に変異を導入し、固定子の集合能への影響を調べた。解析したすべての変異体において、べん毛運動能

が低下し、固定子集合能の低下が観察された。共溶出実験によりいくつかの変異により PomA-PomB 間相互作用の低下が観察された。固定子のイオン透過活性を詳細に解析するために、プラグ欠失固定子大量発現による生育阻害・細胞内 Na^+ 濃度上昇測定を行った。プラグ欠失固定子 PomA/PomB Δ L を大腸菌 (*Escherichia coli*) 内で大量発現すると、培養液中の Na^+ 濃度依存的な生育阻害が観察された。原子吸光法および Na^+ 蛍光指示薬 (Sodium Green) を用いて細胞内 Na^+ 濃度を測定したところ、プラグ欠失固定子の大量発現により、細胞内 Na^+ 濃度が顕著に上昇していることが分かり、これを測定することで固定子のイオンチャネル活性を定量化できることを見いだした。変異固定子のイオン透過活性を測定したところ、いくつかの変異体において生育阻害の抑圧が観察されたことから、それらの変異によって固定子のイオン透過活性が低下することが明らかとなった。これらの結果から固定子内の変異による、べん毛モーター機能と固定子集合能および固定子複合体形成能、固定子イオン透過活性、固定子-回転子間相互作用への影響と相関関係が明らかとなった。

べん毛モーターが回転するためには、MotA と FliG が持つ荷電残基間の静電的な相互作用が、固定子-回転子間相互作用界面において重要であると考えられている。しかし、それらの荷電残基の実際の働きについてはいまだ明らかにされていない。そこで、海洋性ビブリオ菌の極べん毛モーターにおいて、PomA および FliG の荷電アミノ酸残基を無電荷残基あるいは逆電荷残基に置換した変異を導入し、べん毛モーター機能への影響を調べた。その結果、PomA 内の 7 つの荷電残基ならびに FliG 内の 6 つの荷電残基が、協調的にモーター機能へと寄与していることが分かり、これまで明らかにされていなかった新規相互作用が明らかになった。 Na^+ 駆動型モーターにおいては、既知の H^+ 駆動型モーターと比べ、多数の荷電残基が非常に複雑に相互作用し、これがビブリオ菌 Na^+ 駆動型モーター機能のロバスト性に寄与することが明らかとなった。

Aquifex aeolicus は最高 95°C でも生育可能な超好熱性の細菌であり、既知のべん毛遺伝子のほぼ全てを保有している。*A. aeolicus* は細胞の極に 1 本のべん毛を持ち、至適生育温度である 85°C において $90\ \mu\text{m/s}$ という速い運動能を示した。この *A. aeolicus* 由来の固定子遺伝子 (*motA/motB*) を大腸菌の *motA/motB* 欠損株で発現させたところ、*A. aeolicus* の MotA、およびペリプラズム領域を大腸菌由来のものに置き換えたキメラ MotB を共発現させることで、大腸菌のべん毛モーターが機能することが分かった。さらに MotA の細胞質側に点変異を導入することで、*A. aeolicus* キメラ固定子による大腸菌モーター機能の向上が見られた。この大腸菌内キメラ解析系を用いることで、*A. aeolicus* のべん毛モーターは Na^+ によって駆動されることが明らかとなった。固定子遺伝子の分子系統学的解析から、 Na^+ 駆動型の固定子が祖先型であることや、 H^+ 駆動型固定子を持つ細菌への Na^+ 駆動型の固定子の水平伝播が一部で生じたことなどが示唆された。