The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Mechanism of Torque-Generation Cycle of the Bacterial Proton Driven Flagellar Motor
Author(s)	蔡, 栄淑
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49303
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名　蔡（チェ）　栄淑（ヨンスク）

博士の専攻分野の名称　博　士（理　学）

学　位　記　番　号　第　２２１８３　号

学位授与年月日　平成 20 年３月 25 日

学位授与の要件　学位規則第４条第１項該当

生命機能研究科生命機能専攻

学　位　論　文　名　Mechanism of Torque-Generation Cycle of the Bacterial Proton Driven Flagellar Motor
（プロトン駆動型べん毛モーターのトルク発生機構の解析）

論　文　審　査　委　員　（主査）
教　授　難波　啓一

（副査）
教　授　柳田　敏雄　　教　授　平岡　　泰

論　文　内　容　の　要　旨

〔　要　旨　〕

サルモネラ菌は、運動器官であるべん毛モーターを回転させることにより水の中を自由に泳ぎ回る。べん毛モーターの回転エネルギー源は細胞膜を横切るプロトンの流れであり、そのプロトンは固定子として働く MotA/MotB（MotA/B）複合体を透過すると考えられている。

MotA も MotB も細胞膜内在性の蛋白質である。MotA は４つの膜貫通ドメインと大きな細胞質ドメインを持ち、MotB は一回膜貫通ドメインとペプチドグリカン結合様モチーフを含む大きな C 末ペリプラズミックドメインを持つ。サルモネラ菌 MotB の 33 番目のアスパラギン酸残基（Asp-33）は、MotA/B 複合体の膜貫通ドメインの中で唯一マイナス電荷を帯びた側鎖を持つアミノ酸であり、種間で高い保存性がある。Asp-33 を同じ負電荷アミノ酸である Glu に置換するとモーターの機能は著しく阻害されるが、Glu 以外に置換した場合はモーターの機能が完全に失われる。このことから、Asp-33 はプロトン結合部位として、モーターがトルクを発生するのに重要な残基であると考えられている。しかしながら、プロトンの Asp-33 への結合解離サイクルがどのように MotA/B の構造変化を起こしてトルクを発生させるのかについては明らかではない。そこで本研究では、プロトンの結合解離に伴うモーターのトルク発生機構を解明することを目的とした。

これまでに、運動機能が著しく低下した変異株として *motB*(D33E) 変異株が単離され、この運動機能の低下は、D33E の変異によって MotA/B 複合体のプロトン透過活性が顕著に低下したためであると考えられている。しかしながら、Asp-33 が MotB の膜貫通ドメインの細胞質側近傍に存在することや、Asp-33 が MotA の３番目の膜貫通ドメインにある Pro-173 と相互作用することから、MotB の細胞膜への局在化や MotA との複合体形成が、D33E の変異によって影響を及ぼされた結果として、運動能の低下が引き起こされた可能性も否定できない。そこでまず、これらの可能性を生化学的に検証した。その結果、MotB(D33E) が野生型 MotB と同様に正しく細胞膜に局在していること、さらに MotA と相互作用していることが明らかとなった。

D33E 変異による MotA/B 複合体のプロトン透過活性の低下の原因を明らかにするため、*motB*(D33E) 変異体から、部分的に運動機能が回復した 17 株の偽復帰変異株を単離した。それらのサプレッサー変異はすべて *motA* および

motB 遺伝子に存在することが明らかとなった。サプレッサー変異のみを持つものの運動能は野生株とほぼ同じであったため、単離されたサプレッサー変異は直接 Glu-33 と相互作用するものではなく、間接的に影響を及ぼすことで、変異型モーターの機能が部分的に回復したと推察される。

直径 0.8，1.5，2.0 μm の大きさの異なるビーズでべん毛繊維を標識し、光学計測装置を用いてビーズの回転計測を行うことで、野生株、*motB*(D33E) 変異株、そしてその偽復帰変異株のモータートルク特性を詳細に解析した。野生型モーターの場合、本研究で測定した負荷条件の範囲内ではトルクはほぼ一定であった。*motB*(D33E) 変異株のモーターが高負荷条件下で発生するトルクは野生型モーターの半分程度で、しかも、負荷の低減による回転速度の増加に伴ってトルクは著しく低下した。一方、偽復帰変異株では、高負荷条件下で発生するトルクは野生株レベル近くまで回復したが、回転速度の増加に伴うトルクの低下は *motB*(D33E) 変異株と同様か、より強い傾向を示すものもあった。

べん毛モーターのトルク発生サイクルは MotA/B 複合体のプロトン透過と共役しており、野生型では低負荷条件下でトルク発生は、MotA/B 複合体のプロトン透過速度に依存するが、高負荷条件下ではトルク発生はプロトン透過速度に依存しない。一方、*motB* (D33E)変異株では高負荷条件でのトルク発生はプロトン透過速度に依存して減少し、さらに低速度トルクが野生型モーターの半分程度であった。その原因として、プロトン透過速度の低下に加え、トルク発生のためのプロトンの結合解離に伴う MotA/B 複合体のコンフォメーション変化の異常が考えられる。一方、偽復帰変異株の低速度トルクが野生型に近いレベルまで回復したことは、Glu-33 のプロトン結合解離に伴う MotA/B 複合体のコンフォメーション変化の異常が、サプレッサー変異によって回復したことを示唆する。しかしながら、低負荷条件下では、偽復帰変異株のトルク発生は *motB* (D33E)変異株と同様に抑制されたままであった。このことは、偽復帰変異株の MotA/B 複合体のプロトン透過速度は *motB* (D33E)変異株と同様に、野生型に比べて著しく低下したままであることを示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

べん毛モーターは、直径 40 nm ほどの回転子と、その周りに結合してプロトンチャネルとして働く十数個の固定子複合体 MotA/B から構成され、チャネルを介した細胞外から細胞内へのプロトンの移動と回転子-個定子間の相互作用をカップルさせることによりトルクを発生すると考えられています。蔡栄淑は、MotA/B のプロトン結合部位である MotB の D33E 変異によりプロトン流が抑制された変異株から運動性を回復した偽復帰株を複数単離し、その親変異株および偽復帰変異株のべん毛モーターの回転特性を計測し、そのトルク-スピード特性に野生型モーターには見られない際だった特徴を見いだしました。負荷が大きい条件では、偽復帰変異株のモーターのトルクは野生型に近いレベルまで回復しているにもかかわらず、負荷が小さい時は *motB*(D33E) 変異株と同様に、トルクが著しく減少していました。この結果は、D33E 変異はプロトン透過活性のみならず、トルク発生のためのダイナミックな構造変化にも影響していることを示し、べん毛モーターのトルク発生機構に新たな手がかりを与えました。よって、本研究は博士（理学）の学位に値するものと認めます。