The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	べん毛タンパク質輸送装置サブユニットFlhAcの温度感受性変異体の機能喪失・復帰メカニズム
Author(s)	島田, 賢史
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49334
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

【99】

氏　　名	島（しま）　田（だ）　賢（まさ）　史（ふみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２３０９４　号
学位授与年月日	平成21年３月24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	**べん毛タンパク質輸送装置サブユニットFlhAcの温度感受性変異体の機能喪失・復帰メカニズム**
論文審査委員	（主査） 教　授　難波　啓一 （副査） 教　授　木下　修一　　教　授　谷澤　克行　　教　授　中川　敦史

論 文 内 容 の 要 旨

サルモネラ菌べん毛は約30種類のタンパク質からなる超分子複合体で、細胞膜内に埋まっているモーター部分と、菌体外へ長く伸びるチューブ状の軸構造体から構成される。細胞質内で合成された軸構造体構成タンパク質は、TypeⅢ輸送系に分類されるべん毛タンパク質輸送装置（以下、輸送装置）によって細胞膜を通過し、軸構造体のチューブの中を通って先端まで運ばれ、重合する（Namba and Vonderviszt, 1997; Minamino and Namba, 2004; Kubori *et al.*, 1996）。

輸送装置は6種類の膜タンパク質（FlhA、FlhB、FliO、FliP、FliQ、FliR）と3種類の細胞質タンパク質（FliH、FliI、FliJ）から構成され、べん毛基部体の細胞質側中央に形成されると考えられている（Minamino and Macnab, 1999, 2000）。この輸送装置は病原性細菌の外毒素分泌装置と高い相同性を持つためTypeⅢ輸送系に分類され、タンパク質間相互作用、ATP加水分解、プロトン駆動力によってタンパク質輸送を行う。

6種類の膜タンパク質のうち最も大きな分子量を持つFlhA（75 kDa）は、N末端側の疎水性膜貫通ドメイン（$FlhA_{TM}$）とC末端側の親水性細胞質ドメイン（$FlhA_C$）から成る。また$FlhA_C$はリンカー領域と$FlhA_C$38Kと呼ばれる部位に分かれており、$FlhA_C$38KはFlhAの機能で重要な役割を担っていると考えられている。FlhAの立体構造はX線結晶構造解析法により、2.8Å 分解能で解析され、4つのドメイン（D1、D2、D3、D4）から構成されることがわかった（Saijo-Hamano, unpublished）。

輸送装置構成タンパク質の様々な変異株の中から、42℃で輸送機能が失われる温度感受性変異株が6株報告され、さらにその中の一つ、*flhA*(G368C)から二次変異によって機能回復を果たした偽復帰変異株が単離された（Minamino, unpublished）。これまでの研究では、*flhA*(G368C)の温度上昇に伴う機能喪失はG368Cによる$FlhA_C$構造の不安定化が原因であると考えられ、*flhA*(G368C)偽復帰変異株では二次変異によって熱安定性が高まり、機能が回復すると考えられてきたが、詳細な解析は行われておらず、この機能喪失・回復のメカニズムは不明であった。そこで、野生株と変異株について、様々な温度での輸送機能測定と$FlhA_C$の酵素限定分解や熱変性解析を行った。

遊泳速度測定や輸送基質分泌量測定によって、野生株、*flhA*(G368C)、*flhA*(G368C)偽復帰変異株の温度上昇に伴う輸送機能の変化を詳細に調べ、*flhA*(G368C)と*flhA*(G368C)偽復帰変異株の機能の差が36－39℃で見られることがわかった。大量精製した野生型$FlhA_C$、$FlhA_C$(G368C)、$FlhA_C$(G368C)偽復帰変異体に対して酵素限定分解実験を行ったところ、変異型$FlhA_C$はG368Cの存在するD1－D2が42℃では切断されやすいことがわかり、この領域に何らかの構造変化を起こしていることがわかった。熱変性解析では、G368Cを持つ変異型$FlhA_C$は野生型$FlhA_C$よりもD1-D2が低温で熱変性すること、そして30℃から42℃の間ではD2が熱変性を起こすことがわかった。これらの結果から、D2で起こる熱変性が*flhA*(G368C)と*flhA*(G368C)偽復帰変異株の機能喪失・回復に関与することがわかった。

論文審査の結果の要旨

サルモネラ菌べん毛特異的タンパク質輸送装置（以下、輸送装置）のサブユニットFlhAの変異によって、42℃で輸送機能を喪失する温度感受性変異株*flhA*(G368C)がある。申請者はこのflhA(G368C)株と、二次変異によって輸送機能が回復した複数の偽復帰変異株について、温度感受性に関する詳細な輸送機能解析と、変異箇所を含むFlhAの細胞質ドメイン$FlhA_C$についての物理化学的および生化学的実験手法による熱安定性の解析を行うことにより、FlhA(G368C)変異による温度感受性機能喪失と偽復帰変異による機能回復のメカニズムを探り、$FlhA_C$のD2ドメインの熱安定性が機能変化に関わることを示した。この研究成果の学術的価値を高く評価し、学位の授与に値するものと認める。