

氏名・本籍	内田 薫 (広島県)
学位の種類	博士 (生命システム科学)
学位記番号	博甲 第20号
学位授与の日付	平成26年3月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	細菌のべん毛フックの長さ制御に関する研究
学位論文審査委員	主査 教授 相沢 慎一 副査 教授 森永 力 教授 小西 博昭 教授 奥 尚

学位論文の要旨

多くの細菌はべん毛という運動器官を持っている。べん毛は、モーター駆動部である基部体、プロペラ部分であるフィラメント、基部体からフィラメントに効率良く回転を伝達させるユニバーサルジョイントとして働くフックの3つの構造部位から構成される。50個もあるべん毛遺伝子はクラス1から3までの階層構造をとって発現が制御され、順序よくべん毛は組み立てられる。クラス1から2の発現によって基部体とフックが構築されるとともに、FliKと呼ばれるタンパク質が分泌され、輸送基質がフックタイプからフィラメントタイプに切り替わる。この切り替えによって、それまで細胞内に留まっていたアンチシグマ因子FlgMが分泌され細胞内濃度が低下すると、クラス3の発現に必要なシグマ因子FliAが活性化され、フィラメント形成に関わる遺伝子群の発現が開始されべん毛は完成する。

サルモネラ菌 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium のフックは、FlgE と呼ばれる1種類のタンパク質から構成されており、平均長が約55 nm に制御されている。フックの長さ制御には、FlgE, FlgG, FlgK, FlgL, FliG, FliK, FliM, FliN, FlhB など多くのタンパク質が関わっている。その中でも、*fliK* を欠損させるとポリフックと呼ばれる長いフックを構築することから、フックの長さ制御にはFliK が最も直接的に関与していると考えられている。長さ制御に関するモデルがいくつか提唱されているが、その機構は未だ解明されていない。過去に、149番目のトレオニンをアスパラギンに置換した *flgE* 変異株

SJW2219 において、*fliK* は正常であるにもかかわらず、フックの長さが短く制御され

るといふ報告があつた。このSJW2219株は温度感受性という特徴を持っているが、培養温度との関係については言及されていなかった。本研究ではこの温度感受性に着目し、*flgE*変異株におけるフックの長さ制御を解明することを目的とした。

第1章では諸言として背景を記載する。第2章では*flgE*変異株の温度感受性について詳しく調べるため、*flgE*変異株を30℃と37℃で培養し軟寒天培地上でのスウォーム運動（走化性によるリング形成）の比較や、電子顕微鏡による菌体の観察や菌体内外のタンパク質量を調べた。その結果、30℃培養では野生株と同様に軟寒天培地上でスウォームリングを形成し、べん毛も観察された。しかし、37℃ではスウォームリングは形成されず、べん毛を持たない菌体が全体の約9割であつた。37℃で培養した場合のべん毛がどの段階まで構築されているか観察した結果、ロッドまでしか構築されていないものが多く、フックが短い基部体構造も多数認められた。分泌タンパク質の観察結果から*flgE*変異株において、フックタンパク質の重合が効率的に行われていないことが明らかとなつた。そこで、SJW2219株のフックの長さを計測し、重合効率の低さがフックの長さに与える影響を調べた。まず30℃培養した菌体のべん毛を単離精製したのち、べん毛フィラメントを酸処理により脱重合させた状態でフックの長さを計測した。その結果、フックの平均長は野生株よりも短い約48 nmであつた。しかし、べん毛フィラメントがフックに連結したままの状態は、フックの平均長は野生株とほぼ同じ約56 nmであつた。野生株では酸処理によるこのような違いは見られない。そこで、フィラメント脱重合後の基部体構成タンパク質を野生株と比較したところ、*flgE*変異株においてフックとフィラメントを連結するタンパク質であるFlgKタンパク質（HAP1）の減少が見られた。この結果から、酸処理によりHAP領域が失われるためにフックの長さが短くなることが示された。

第3章では、37℃培養の*flgE*変異株においてべん毛が構築されない理由を明らかにする。第2章の分泌タンパク質や免疫プロットの結果では、37℃培養の*flgE*変異株ではFlhKは大量に分泌しているにもかかわらず、FlhCの発現は観察されなかつた。そこで、37℃培養の*flgE*変異株でFlgMの分泌の有無を観察したところ、FlgMの分泌は見られなかつた。さらに、*flgE*変異株の*flgM*を欠損させた変異株や*fliC*過剰発現株を使って37℃培養でもべん毛が構築されるか否かを観察した。その結果、菌体内外のFlhC量に若干の増加が見られたが、FlgMの有無にかかわらずべん毛が生ずる菌体の割合には変化がなかつた。つまり、フックがある一定の長さ以上に達しない限り、FlhKが分泌してもタンパク質の輸送切り替えが起きず、FlgMやFlhCは細胞外に分泌されないことが明らかになつた。第4章では本研究の総括を述べる。

本研究により、野生株のフックの平均長である55 nmには、フック部分だけではなくフックとフィラメントの連結領域であるHAP領域も含まれていることが明らかとなり、*flgE*変異株においてもフックの長さはFlhKにより正常に制御されていることが証明された。また、FlhKによる輸送基質の切り替えが可能になる最小のフック長を示した。

審査の結果の要旨

本論文はバクテリアのべん毛フックの構築に関するものである。べん毛の根元にあるフックは細胞膜内にある基部体で発生したトルクをらせん形の長いフィラメントに伝えるために不可欠な部品である。フックの平均長は約 55nm に制御されているが、本研究によりその分子メカニズムの一端が明らかになった。

第 1 章では諸言として使用したサルモネラ菌 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) のべん毛研究の歴史や背景を記載する。

第 2 章ではフック構成タンパク質 (FlgE) の温度感受性変異株 SJW2219 について詳しく調べた。30 °C と 37 °C で培養した変異株の、軟寒天培地上でのスウォーム運動や、電子顕微鏡による観察、SDS-アクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE) により菌体内外のタンパク質量を解析した。その結果、flgE 変異株において、FlgE の重合が効率的に行われなため、短いフックの未完成の基部体を多数形成することが明らかとなった。そこで、重合効率の低さがフック長に与える影響を調べるため、30 °C 培養した菌体の精製したべん毛を、酸処理により脱重合させてフック長を計測した。その結果、フックの平均長は野生株よりも短い約 48 nm であったが、べん毛フィラメントがフックに連結した状態の平均長は野生株とほぼ同じ約 56 nm であった。すなわち、野生株のフックの平均長である 55 nm には、フックとフィラメントの連結領域 (HAP 領域) も含まれていることが明らかとなった。

第 3 章では、37 °C 培養の flgE 変異株においてべん毛が構築されない理由を明らかにする。第 2 章の分泌タンパク質や免疫ブロットの結果では、37 °C 培養の flgE 変異株では FliK は大量に分泌するにもかかわらず、FliC の発現は観察されなかった。flgE 変異株の flgM 欠損株や fliC 過剰発現株を使って 37 °C 培養時のべん毛構築の有無を観察した。その結果、菌体内外の FliC 量に若干の増加が見られたが、FlgM の有無にかかわらずべん毛が生ずる菌体の割合には変化がなかった。つまり、フックがある一定の長さ以上に達しない限り、FliK が分泌しても FlgM や FliC は分泌されないことが明らかになった。flgE 変異株においてもフックの長さは FliK により正常に制御されていることが証明された。また、FliK による輸送基質の切り替えが可能になる最小のフック長を示した。第 4 章は本研究の総括である。

本研究はべん毛フックの長さ制御において、FliK の役割を分子レベルで明らかにした画期的なものである。よって審査員一同が協議の結果、博士の学位に値する論文の内容と学力を有すると判定した。