

バクテリアのべん毛フックの長さ制御に関する研究

県立広島大学大学院

総合学術研究科

生命システム科学専攻

博士論文

平成 26 年 3 月

(2014 年)

内田 薫

# 目 次

第1章 緒言	1
第2章 フック変異体におけるべん毛フックの長さ制御	7
2.1 研究の背景	8
2.2 材料と方法	
2.2.1 使用菌株	12
2.2.2 プラスミド	12
2.2.3 プライマー	12
2.2.4 実験方法	12
2.3 結果考察	
2.3.1 <i>flgE</i> 変異株 SJW2219 の温度感受性について	20
2.3.2 培養温度の違いによる分泌タンパク質の比較	24
2.3.3 FliC と FliK の分泌と発現	26
2.3.4 <i>flgE</i> 変異株 SJW2219 株のフックの長さ	28
2.3.5 HAP1 領域の長さについて	31
2.3.6 短い <i>fliK</i> , 長い <i>fliK</i> 挿入株のフック長制御	34
第3章 フック変異体におけるフック完成前後のタンパク質分泌	37
3.1 研究の背景	38
3.2 材料と方法	
3.2.1 使用菌株	40
3.2.2 プラスミド	40
3.2.3 実験方法	40
3.3 結果考察	
3.3.1 FlgM の分泌	41
3.3.2 <i>flgE</i> 変異株 SJW2219 の <i>flgM</i> 欠損株 (TH18945 株) の解析	43

3.3.3	<i>flgE</i> 変異株 SJW2219 における FliC の過剰発現	47
3.3.4	ポリフックのフィラメント構築	49
第 4 章	摘要	51
第 5 章	結論	52
	参考文献	54
	謝辞	57

# 第1章 緒言

バクテリアの多くはべん毛と呼ばれる運動器官を持っており、それを回転させて泳ぐ。真核生物に見られる鞭毛は、ATP をエネルギー源とし、鞭打ち運動をする。一方、細菌のべん毛は膜の内外間のイオン濃度差をエネルギー源とするプロトン駆動力によって回転運動する (Berg H.C., 1995)。同じべん毛と呼ばれる器官であっても真核生物とバクテリアのべん毛は全く異なっているため、「べん毛」と表記し、真核生物の鞭毛と区別されている。

べん毛研究は主にネズミチフス菌 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium が用いられ、遺伝学・生化学・生物物理学などの多種多様な観点から研究されてきた。以下サルモネラ菌を使って得られた成果をまとめる。

べん毛の構築には 40 以上の遺伝子が関与し、それは約 30 種類の異なったタンパク質から構成される超分子構造である。その構造は、細胞膜を貫通する基部体、細胞外に伸びるフック、そしてべん毛フィラメントの大きく分けて 3 つの部位から成る (Macnab, 1996, 図 1)。

べん毛構造の大部分を占めている部位は菌体の外に長く伸びた緩やかならせん型のべん毛フィラメントである。べん毛フィラメントは、1 種類のフラジェリン (FliC) というタンパク質が重合してできる。バクテリアの菌体表面に見られる繊毛などの繊維は、根元で繊維の重合が起きるのに対し、べん毛フィラメントは先端で重合して伸長する。その長さは菌体長の約 10-15 倍にも達する (Kubori *et al.*, 1992)。化学的に同一のサブユニットで構築されるにも関わらず、直線ではくらせんを形成する能力は他の超分子構造には見られないべん毛繊維特有のものである。

基部体は細胞膜内に存在し、C リング、MS リング、P リング、L リング、及びロッドと呼ばれる軸構造から構成される。べん毛完成後はモーターとして機能し、プロトン駆動力をエネルギー源として回転に必要なトルクの発生や回転方向の切り替えを行う (Macnab, 1996; Aizawa, 2001; 2004)。

基部体は MS リング(FliF)、C リング(FliG / FliM / FliN)、輸送装置部分の C rod(FliO / FliP / FliQ / FliR / FlhA / FlhB)、細胞の外側を貫く構造のロッド (FlgB / FlgC / FlgF / FliE / FlgG)、P リング(FlgI)、L リング(FlgH)、の順に構築される (Kubori T *et al.*, 1992; Aizawa S.I., 1996)。MS リングは他の構成タンパク質と相互作用せずに内膜で自己集合する (Ueno T *et al.*, 1994)。L リングは外膜のリポポリサッカライド層に結合し、P リングはペプチドグリカン層に結合している。この LP リング複合体はべん毛構造を安定化する重要な役割を担っている。ロッドは細かく分けると MS リングと FliE を介して結合する Rod1 (FlgB /

FlgC / FlgF)、約 10 nm の長さに制御された Rod2 (FlgG)から構成されている。C rod は MS リングの中央に位置し、べん毛構成タンパク質を特異的に認識して細胞内から細胞外に分泌する輸送装置部分であると考えられている(Katayama E *et al.*, 1996)。べん毛構成タンパク質の多くはモノマーの状態で C rod を通って分泌され、常に構築過程の先端部分で自己集合してべん毛構造を構築している。このようなタンパク質輸送系はⅢ型輸送系として分類されている。C rod 部分には ATPase 活性をもつ FliI が存在し、ATP を使ってべん毛タンパク質を分泌する(Dreyfus G. *et al.*, 1993)。

C リングはべん毛モーターのトルク発生、構成タンパク質の分泌、べん毛の回転方向の転換など 3 つの機能を持つ大事な部分である。C リングは FliG / FliM / FliN の 3 種類のタンパク質から成っている。これらのタンパク質が順に MS リング複合体にカップ状に積み重なって構成されている。FliG / FliM / FliN のそれぞれに変異をいれた菌株ではべん毛が正常に構築されないため、C リングはべん毛の蛋白質の分泌に深く関与していると考えられている (Irikura V., 1993: Yamaguchi S. *et al.*, 1986)。

基部体とべん毛フィラメントをつなぐフックは、基部体から発生したトルクをスムーズにべん毛フィラメントに伝える役割を担っている(Shaikh, T.R. *et al.*, 2005)。フックは曲げには柔軟性を示すが、ねじりには強いという性質を持っている。興味深いことに、その平均の長さは約 55 nm に制御されている (Hirano, T., 1994)。その長さ制御には FlgE / FlgG / FlgK / FlgL / FliG / FliK / FliM / FliN / FlhB といった蛋白質が関わっている (Chevance F.F., 2007: Muramoto K., 1999: Takahashi N., 2009: Williams A.W., 1996)。その中でも *fliK* 遺伝子を欠損させた変異株では、べん毛フィラメントが形成されずフックが長く伸びたポリフックと呼ばれる構造体が見られたことから、FliK が直接的にフックの長さ制御に関与していると考えられている (Patterson-Delafield *et al.*, 1973; Suzuki and Iino, 1981)。しかし、そのメカニズムについては複数のモデルが提唱されているが現在でも統一見解がなく、詳細は未だ明らかになっていない。フックの長さ制御のモデルの 1 つとして、フックの長さが FliK によって「ものさし」のように厳密に計測していると予想した「ルーラーモデル」が提唱されている (Wates R.C. *et al.*, 2007, 図 2. A)。このモデルでは、先ず FliK の C 末端部分は細胞内に残った状態で、N 末端部分がチャンネル内を通りフックのキャップタンパク質である FlgD に結合する。FliK の N 末端部分の長さが最大になった瞬間、FliK の N 末端から FliK の C 末端にシグナルが送られる。その結果、FliK の C 末端部分と C rod の FlhB が相互作用して分泌ゲートが変化し、輸送される蛋白質の種類がフックからフラジェリンに切り替わる (Minamino T. *et al.*, 2006) とされている。また、もう一つのモデルとして、C リング構成タンパク質の変異株から 55 nm よりも短

いフックが発見されたことから、FliK は C リング内に存在し、FliK の C 末端が FlhB に結合して FliK の N 末端部分と C リングの大きさによりフック構成蛋白質である FlgE の量を「ます」のように計るとされた「カップモデル」が提唱された。このモデルが提唱された経緯として、*fliK* 遺伝子を欠損させるとフックの長さが制御されず正常よりも長いポリフックと呼ばれる構造が観察されたが、ポリフックの長さの分布を観察すると 55 nm のポリフックが一番多いことが明らかになったことがある。このことから、フックは 55 nm まではスムーズに伸びるがそれ以降は重合効率が落ちる可能性が示唆された (Koroyasu *et al.*, 1998)。従って、FliK だけでなく C リング構成タンパク質との相互作用によってフックの長さを制御する「カップモデル」が注目を集めた。しかし、C リングの大きさが小さくなった菌株に ATPase の FliI を過剰発現させると、蛋白質の輸送が促進されることにより長さが 10-100 nm のフックが観察され、平均が 65 nm となることが明らかになった (Konishi M. *et al.*, 2009)。これは C リングの大きさはフックの正確な長さに調節するためには必要であるが、フックの長さを決定するわけではない事を示しているため、カップモデルを否定する結果となった。そこで、カップモデルに替わる「ウェイティングルームモデル」が提唱された (Aizawa S.I., 2012, 図 2. D)。このモデルの詳細は以下のような仮説を示している。FliK の N 末端は FlgD と FlgE に結合するので (Minamino T. *et al.*, 1999)、C リングが FlgD や FlgE で満たされている時には FliK の N 末端は輸送ゲートに近づくことができない。FlgD / FlgE の量が減ってくると FliK の N 末端が輸送ゲートに入ることが可能となり FliK の C 末端が輸送ゲートの FlhB に結合する。FliK の N 末端がチャンネルを通過し、FliK の C 末端部分を引っ張ることにより FlhB から外れることにより輸送ゲートの構造が変化し、FlgE の分泌を止めて HAP1 (FlgK) / HAP3 (FlgL) / フラジェリン (FliC) / HAP2 (FliD) の分泌を始める。このモデルであれば FliK が 1 分子輸送ゲートを通過するだけで分泌タンパク質をスイッチできる。

本研究では FliK の役割を明らかにし、フックの長さ制御の仕組みを解明することを目的とした。

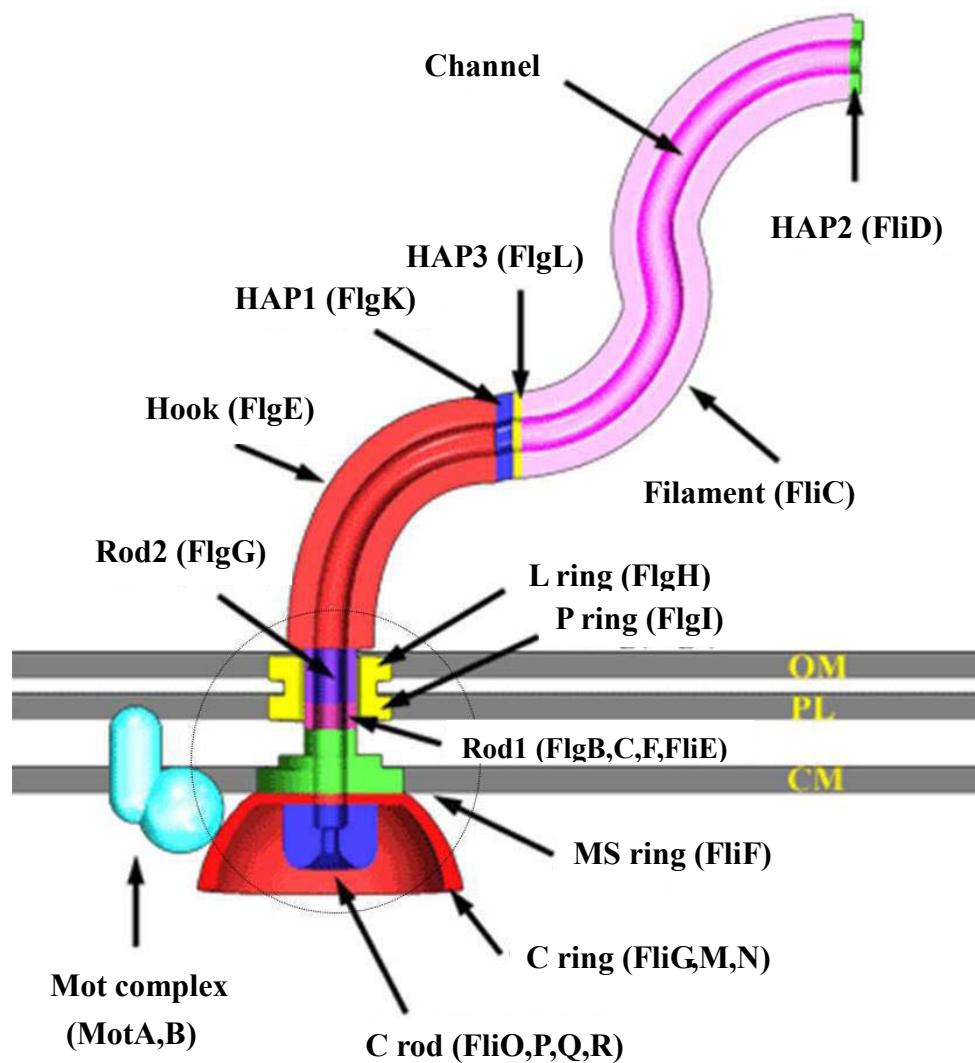


図 1. ベン毛構造の全体構造

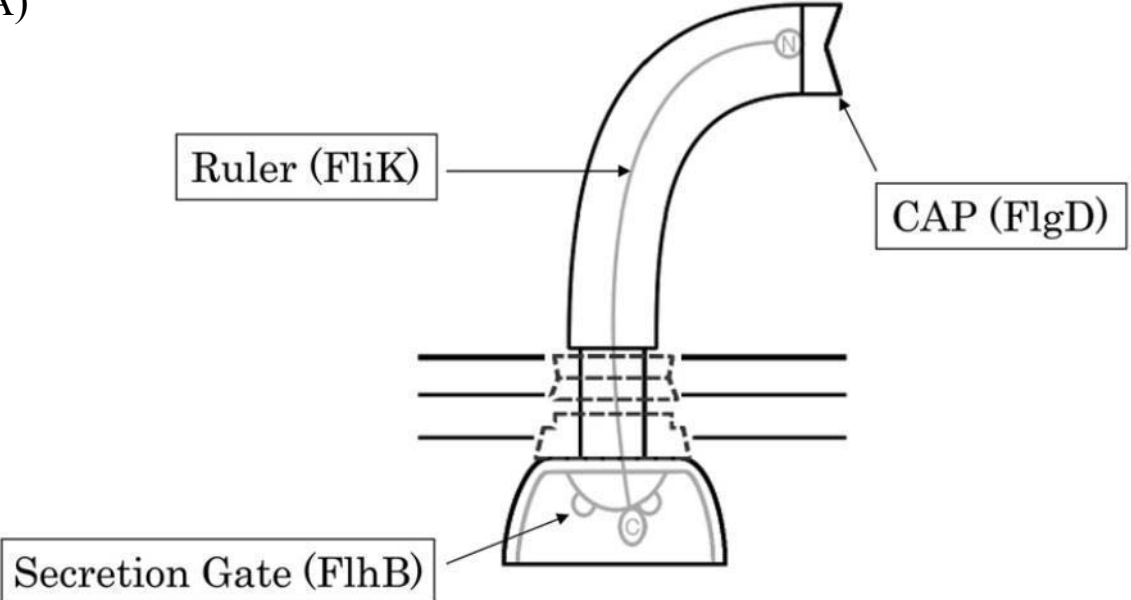
べん毛基部体；細胞内に存在する構造 (円で示した部分) の総称

フック(Hook)；べん毛基部体とべん毛フィラメントを繋ぐ

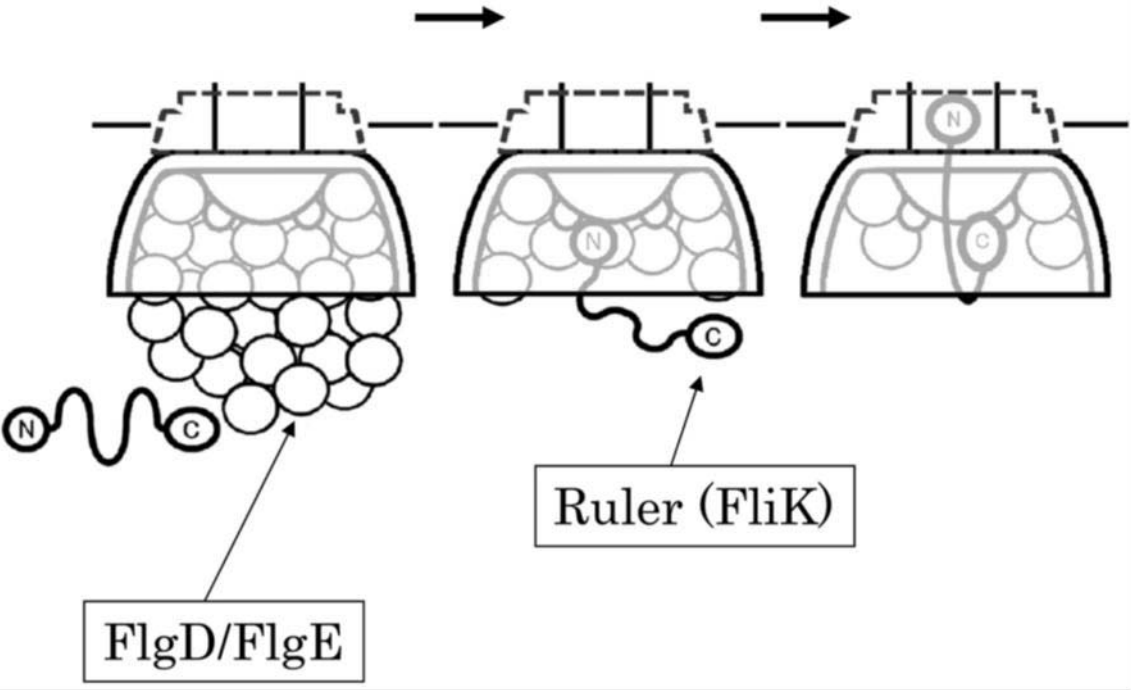
ユニバーサルジョイント部分

べん毛フィラメント(Filament)；べん毛構造の先端部分にあるらせん構造

(A)



(B)





## 図 2. FliK によるフックの長さ制御モデル

(A) FliK がフックの長さを「ものさし」のように計測すると予想される「ルーラーモデル」(Aizawa S.I, 2012)。FliK の C 末端が FlhB に結合した状態で細胞内残り、FliK の N 末端がチャネルを通過してフックの先端部分にあるフックのキャップ蛋白質の FlgD と結合する。FliK の N 末端はひも状構造であると予想されているため、N 末端が最大まで引っ張られ、FliK の N 末端から C 末端にシグナルが出ると予想される。その結果、FliK の C 末端と FlhB の結合が外れて FlhB のゲートの構造が変化する事により、分泌される蛋白質のフック蛋白質である FlgD / FlgE から HAP1 (FlgK) / HAP3 (FlgL) / べん毛フィラメント (FliC / FliD) 変化する。

(B) FliK と C リングによりフックの長さを計測すると予想される「ウェイティングルームモデル」(Aizawa S.I, 2012)。カップリングモデルのように、C リングの大きさを構成蛋白質の量を計測するため C リング内が FlgD / FlgE で満たされており、この時点では FliK の N 末端が輸送のチャネルに近づく事ができない。そのため、FliK の N 末端は FlgD / FlgE と結合して FlgD / FlgE の分泌を開始されるのを待つ。C リング内の蛋白質の量が減少すると FliK の N 末端が輸送ゲートに入り、FliK の C 末端が FlhB に結合する。FliK の N 末端がチャネルを通過して FliK の C 末端を引っ張ることにより、FliK の C 末端が FlhB から外れて菌体外に分泌される。その結果、FlhB のゲートの構造が変化して分泌される蛋白質が切り替わる。

## 第 2 章

### フック変異体における べん毛フックの長さ制御

## 2.1 研究背景

べん毛は根元から順に基部体、フック、フィラメントと呼ばれる 3 つの構造部位から構成されている。べん毛構造の中心は内径約 2 nm の空洞がある管状構造で、べん毛構成タンパク質はこの空洞を通過して菌体内から輸送されている (Macnab, 1996; Yonekura K. *et al.*, 2003)。

フックは、長さ 55 nm、直径 18 nm で、フックタンパク質 (別名 FlgE、分子量 41kDa、アミノ酸残基数 402) が約 120 個、らせん状に重合したチューブ状構造である。フックは、プロペラスクリューとして働くために比較的堅いべん毛繊維とは違って、曲げには柔らかいがねじれに対しては強い構造を持ち、べん毛繊維が向いている方向に関わらず回転トルクを忠実に伝えることができるため、細菌は自由自在に直線的な泳ぎや方向転換ができる。菌体から生えた数本のべん毛繊維が菌体の後ろで束を形成し、なめらかな推進力を発生するのに必須である。

フックタンパク質は 2 つのドメインから構成されている (図 3)。ねじれに強い構造は、フックの表面に並ぶ D2 ドメインが、右巻き 6 重らせん方向に強く結合していることによる (図 4)。曲げに柔らかいのは、フックのチューブ構造を構成する 11 本の素繊維 (軸方向のタンパク質分子配列による繊維構造) に沿ったタンパク質間相互作用が、比較的弱く作られていることが原因であると言われている。曲がったフックの原子モデルを見ると、素繊維の伸縮を実現する分子間相互作用が、フックタンパク質の D1 ドメインから外側に突き出て、下側のサブユニットの D2 ドメインと向き合う特殊なループ構造部分にあることがわかる (図 5b)。素繊維の伸縮に応じてこの結合部の構造が大きく変わることがモデルからは予想される。それに基づいて行われた素繊維伸縮のコンピュータシミュレーション実験から、このループを介した D1-D2 間の結合位置のずれとともに水素結合をする相手のアミノ酸残基が次々と代わり、分子間に滑りがおこり、分子間距離が変わっていくことが確認された。これが曲げに柔らかいフックの構造を産み出しており、ユニバーサルジョイントとして働くために必須の要素であると考えられる。

フックは、基部体で発生したトルクをスムーズにべん毛フィラメントに伝える役割を担う。*Salmonella enterica* serovar Typhimurium のフックは 1 種類のタンパク質 (FlgE) で構成される。基部体完成後、ロッド (FlgG) 先端にフックの形成を助けるフックキャップ (FlgD) が形成され、その真下に新たに送り出されてきたフックタンパク質が重合する。FlgE と FlgD が相互作用し、FlgE が自己集合することによりフックは構築される。フックの長さが約 55 nm に達す

ると、フックとべん毛フィラメントを連結するタンパク質(HAP1 : FlgK, HAP2 : FlgL)が送り出される。その結果、フックキャップがフックの先端から外れ、HAPが作られる。フックキャップが外れて HAP1 と置き換わったときフックの伸長が完全に止まる。

フックの平均の長さは約 55 nm に制御されている (Hirano T., 1994)。長さ制御には FliK と呼ばれるタンパク質が直接関与していると考えられている。FliK は 405 アミノ酸残基から成り、N 末端領域と C 末端領域の 2 つのドメイン構造から構成されることが示されている (Minamino *et al.*, 1999; Shibata *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 1996)。N 末端領域はフックの長さを制御する役割を担い、C 末端領域は C rod の FlhB と相互作用する事により、べん毛構成タンパク質の分泌の切り替えのトリガーとして重要な役割を担っている (Hirano T. *et al.*, 2005) 。FliK の結晶構造解析は困難で未だできていない。それに代わって NMR 解析により、C 末端配列 FliK (FliK<sub>204-405</sub>) にはコンパクトな構造があることが明らかになった (Mizuno S. *et al.*, 2011) 。しかし、N 末端の FliK (FliK<sub>1-203</sub>) には安定した構造はなく、ひものような不安定な構造をしていると予想されている。

55 nm よりも短いフックは、C リング構成タンパク質の変異株ばかりでなく、フックタンパク質の変異株 SJW2219 株で報告されている (Moriya, N. *et al.*, 2006) 。SJW2219 株は *flgE* の 149 番目のトレオニンをアスパラギンに置換された変異株であり温度感受性株の一つとして単離された。一般的に温度感受性変異株とは、普通の生育温度より温度が高い場合に生育できなくなる株を指すが、ここでは培養温度が高い時に、運動性に影響が現れる株を温度感受性変異株と定義する。Moriya らの論文では、FlgE の重合速度が低いためにフックの伸長に長時間かかるため、フックはわずかに短くなることが示されている。また、フックの伸長速度は FlgE の輸送速度に依存することから、フックの形成開始から輸送装置の基質特異性がスイッチするまでの時間を計って、スイッチ前にフックタンパク質の輸送速度を低下させるタイマー機構の存在が示唆されている。しかし、この報告では温度感受性という点が無視されていた。従って、本研究では詳しくこの菌株の性質を調べるとともに、SJW2219 株におけるフックの長さ制御について調べた。

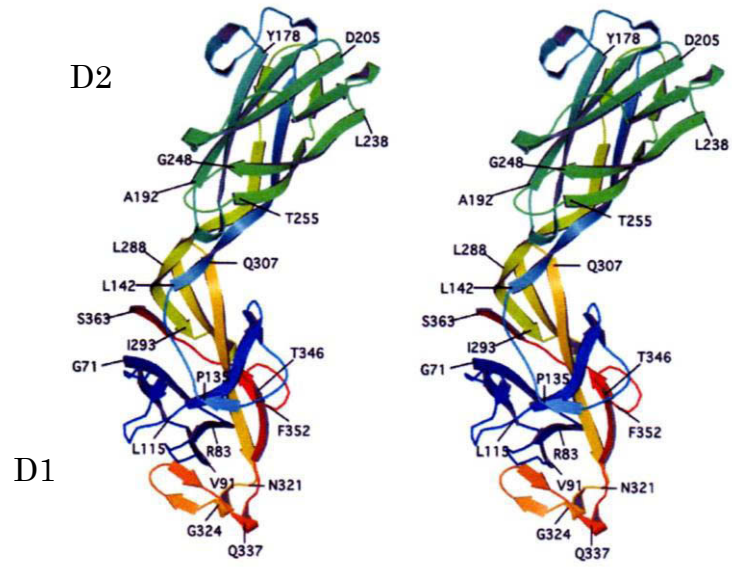


図 3 フックタンパク質フラグメントの結晶構造。立体視のためのステレオ図

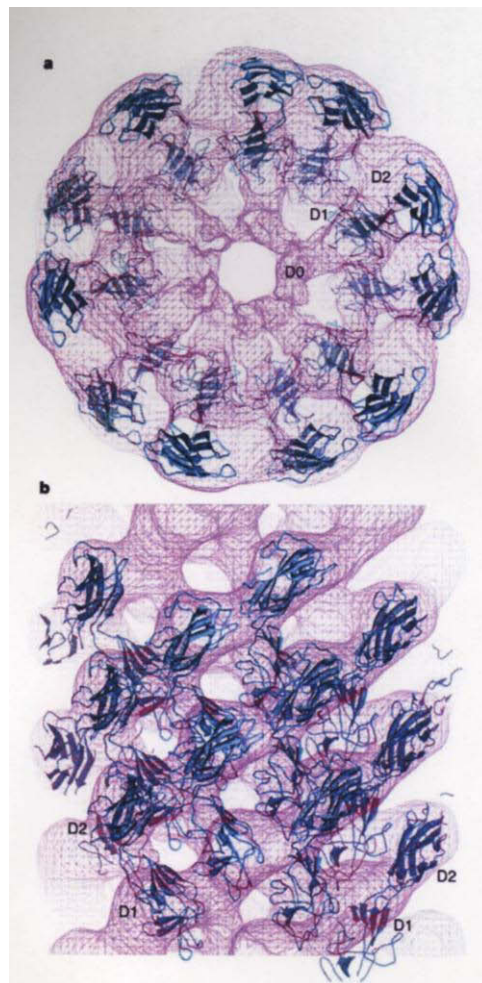


図 4 フックの密度マップと原子モデル

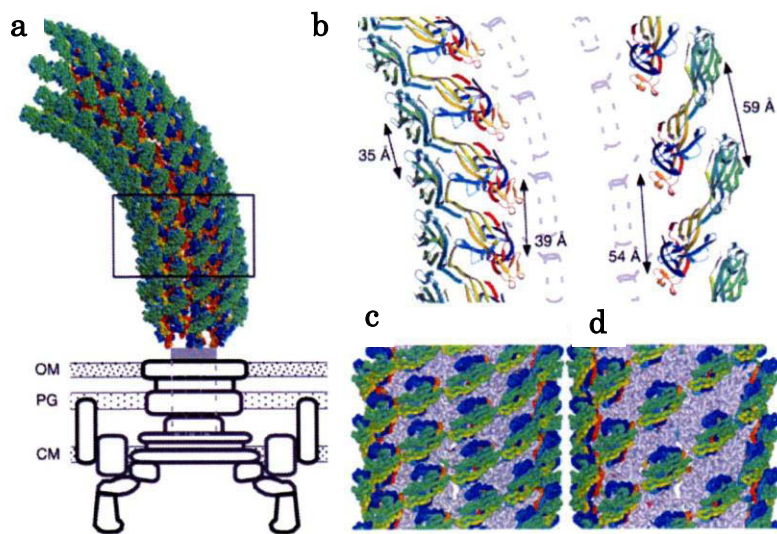


図 5 フックの原子モデル

- a, べん毛モーターの模式図にフックのモデルを組み合わせた図。
- b, a の四角部分の中央断面図。
- c, 曲がったフックの内側の表面。
- d, 外側の表面。c と d ではドメイン D1 はグレー。

(図 3～5 は Samatey *et al.* (2004) Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature*, 431, 1062-1068 より転載した。)

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 使用菌株

本研究で使用した菌株は表 1 に示した。

### 2.2.2 プラスミド

本研究で変異株を作成する際に使用したプラスミドを表 2 に示した。

### 2.2.3 プライマー

本研究で変異株を作成する際に使用したプライマーを表 3 に示した。

### 2.2.4 実験方法

#### 使用培地組成と抗生物質の濃度

本研究で使用した LB 培地の組成を表 4 に示した。表中に示した試薬は純水造装置 (Millipore EliX) で製造した脱イオン水に溶解し、121 °C で 20 分間オートクレーブ処理した。菌株を継代する場合には、1.5 % の寒天を添加した LB 寒天プレートを使用した。抗生物質が必要な菌株にはそれぞれ、アンピシリンナトリウム (50 µg / ml) 、テトラサイクリン (15 µg / ml) をその都度培地に添加した。また、使用菌株の粘性中での泳ぎを観察する場合には、LB に 0.4 % の寒天を添加した Swarm プレートを使用した。イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (0.1 M IPTG) が必要な場合はその都度培地に添加した。

#### 変異株の作成

変異 *fliK* 挿入株の作成には pKD46 (Para-λ-red) を用いた。*fliK* 遺伝子部分が *tetRA* に置換している菌株から DNeasy tissue kit (QIAGEN) を使用してゲノム DNA を抽出し、*fliK::tetRA* を PCR によって増幅した。これを、アンピシリンおよびアラビノース (0.2% (w/v)) を含む培地で培養した SJW2219 (pKD46) 株にエレクトロポレーション法によって導入し、L-テトラサイクリンを含む LB 固形培地上で 37 °C で選別した。これにより得られた株を、SJW2219 pKD46/*fliK::tetRA* とする。TH10335 株、TH8256 株から抽出したゲノム DNA から *fliK* を PCR で増幅し、得られた PCR 産物を SJW2219 pKD46/*fliK::tetRA* 株にエレクト

トロポレーション法によって導入し、形質転換株をテトラサイクリン感受性培地 (Maloy,1990) を用いて 37 °C 培養で選別することで、変異株を作出した。TH10335 株の *fliK* を導入した株を UA002 株、TH8256 株の *fliK* を導入した株を UA003 株とした。

*fliK* の増幅には KOD FX (TOYPBO) を用いて PCR を行った。PCR 装置は Gene Amp PCR sytem 9700 (Applied Biosystems) を使用した。最初の鋳型の変性を 94 °C, 3 分間行った後、熱変性 (94 °C, 1 分間)、アニーリング (60 °C, 1 分間)、伸長反応 (72 °C, 2 分間) を 30 サイクル行い、伸長反応の延長を 72 °C, 10 分間行った。

作成した変異株のコロニーPCR には Go Taq (Promega) を使用した。最初の鋳型の変性を 95 °C, 2 分間行った後、熱変性 (95 °C, 1 分間)、アニーリング (60 °C, 1 分間)、伸長反応 (72 °C, 3 分間) を 30 サイクル行い、伸長反応の延長を 72 °C で 5 分間行った。

#### 培養方法

前培養 ; 滅菌した爪楊枝で寒天培地からコロニーをとり、5 ml の LB 培地に植菌し、30 °C または 37 °C に設定した卓上振とう恒温器で 16 時間振とう培養した。抗生物質が必要な菌株には、それぞれその都度培地に添加した。

本培養 ; 前培養した培養液から 50 µl を LB 培地 5 ml に添加し、37 °C に設定した卓上振とう恒温器で OD<sub>600</sub> が 1.00 になるまで振とう培養した。前培養と同様に抗生物質 / イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (0.1 M IPTG) が必要な場合は、それぞれその都度培地に添加した。

#### Swarm 運動の観察

前培養した培養液を浸した爪楊枝で Swarm プレート(上記で示した固形培地の寒天を 0.4 % にした半固形培地) に植菌し、30 °C または 37 °C で静置培養した。

#### トリクロロ酢酸沈殿法による菌体外分泌蛋白質の回収

TY 培地で終夜培養した培養液を 2 ml エッペンドルフチューブに取って、遠心分離 (16,100 × g, 4 °C, 20 分) し、さらに菌体を除去した。上清 1.5 ml を新しい 2 ml エッペンドルフチューブに移し、(16,100 × g, 4 °C, 20 分) で遠心分離した。上清 1 ml を新しいエッペンドルフチューブに移し、25 % トリクロロ酢酸を 300 µl 加えボルテックスで攪拌した。氷上に 15 分間静置した後、遠心分離 (16,100 × g, 4 °C, 20 分) し、沈殿物を回収した。アセトン 1000 µl を加えボルテックスで攪拌した後、遠心分離 (16,100 × g, 4 °C, 10 分) し上清を捨てた。トリクロロ酢



酸を完全に除去するため、この操作を2度繰り返した。エッペンドルフチューブの蓋を開放してアセトンを除き、沈殿物を Sample buffer で懸濁後 SDS-PAGE でタンパク質を分画した。トリクロロ酢酸溶液等の組成は表6に示した。

#### 菌体内発現蛋白質の回収

試験管で終夜培養した培養液2 ml を2 ml エッペンチューブに移し、遠心分離 (16,100× g, 4 °C, 10 分) で集菌した。ペレットに Sample buffer 150 µl 加え、105 °Cで10分間加熱した。遠心分離 (16,100× g, 4 °C, 5 分) した後に上清100 µl を回収し、それを菌体内のタンパク質の発現量を調べるためのサンプルとして使用した。

#### 透過型電子顕微鏡 (TEM) による使用菌株の観察

本培養液 (OD<sub>600</sub> = 1.0) を500 µl エッペンドルフチューブに移し、遠心分離 (3,000× g, 4 °C, 3 分) した。上清を捨てペレットに滅菌水1 ml 添加し、タッピングによってペレットを再懸濁し、遠心分離 (3,000× g, 4 °C, 3 分) した。ペレットに滅菌水を50 µl 加えて懸濁したものを菌体サンプルとした。

コロジオン支持膜の上に炭素を蒸着した銅製のグリッド(JEOL 社製 200 メッシュ)上に菌体サンプル2 µl を乗せ、約60秒間静置した。その後、2% リンタングステン酸 (PTA) 溶液 (pH 7.0) をグリッド上に滴下しサンプルを添加した。グリッド上に残った余分な染色液は、濾紙で除去した。サンプル染色後のグリッドは JEM-1200EXII 型の透過型電子顕微鏡 (JEOL) を用いて観察した。

#### 浸透圧ショック (Osmotically shock) による半透明菌体

本培養液 (OD<sub>600</sub> = 0.5) を2 ml エッペンドルフチューブに移し遠心分離 (5,000× g, 4 °C, 10 分) した。ペレットを0.5 M スクロース溶液100 µl で懸濁後、氷上に30分間静置した。そこに5 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を1.8 ml 加え攪拌した。遠心分離 (5,000× g, 4 °C, 10 分) した上清を新しいチューブに移し、さらに遠心分離 (16,100× g, 4 °C, 10 分) することで菌体を回収し、10-20 µl の蒸留水で懸濁した。これを浸透圧ショック処理により作成した半透明菌体のサンプルとし、透過型電子顕微鏡で観察した。

#### 使用菌株のフック長の計測方法

フック基部体を氷上で冷却しながら2% PTA (pH 4.0) 染色液で染色し、フックを真直ぐにした後、透過型電子顕微鏡で観察・写真を撮影した。得られた画像上でフックの長さを ImageJ ソフトを用いて測定し統計処理を行った。

SDS-PAGE (使用した試薬は表 5 に示した。)

#### サンプル

精製したサンプルを適量の **Sample buffer** に懸濁し、電気泳動サンプルとした。分子量マーカーにはプレステインドエクセルラダー (APRO) を使用した。

#### 分離ゲル・濃縮ゲル作成

ゲル板にガスケットをセットしてクリップで留め、分離ゲルの組成を流し込んだ後、ゲル表面を空気から遮断するためイソプロピルアルコールを適量加え、ゲルが重合するまで静置した。重合後脱イオン水でイソプロピルアルコールを洗い流し、濃縮ゲルを流し込んでコームを挿し重合するまで静置した。ゲルが重合したらゲル板からガスケットを外して泳動層にセットし、**SDS Running Buffer** を適量注ぎ、**34 mA** で約 1 時間泳動した。クマシーブリリアントブルーまたは銀により染色した。

#### 銀染色法

プラスチックケースに入れた **Fixer** にゲルを浸し、**SDS sample buffer** の色が抜けるまで振盪した。次に蒸留水でゲルを 2 回洗い、**pre-treat solution** を入れ 1 分間振盪した。振盪後、蒸留水で 1 回ゲルを洗い、**AgNO<sub>3</sub>** 溶液で 15 分間振盪した。この間に **Developer** に 60 ml に 100 % **Formalin** を 30  $\mu$ l 加えて攪拌した。15 分後、**AgNO<sub>3</sub>** solution を捨て、**Developer** を加えてゲルを反応させた。バンドが現れたら **Stopper** を 5 ml 加え、泡が消えるまで振盪した。泡が消えた後 **Stopper** を捨て、脱イオン水でゲルを洗った。

#### ウェスタンブロットティング

**SDS-PAGE** 泳動後のゲルからタンパク質を **PVDF** メンブレンへ **CAPS buffer** **pH11** を満たしたウェット式ブロットティング装置を用い、**20 V** で 17 時間の条件下で転写した。その後メンブレンを、1 % **BSA** を含む **TBST** (0.05 % (w/v) **Tween20**, **20 mM Tris-HCl** (pH 8), **150 mM NaCl**) を用いてブロッキングし、目的とするタンパク質を認識する 1 次抗体をブロッキング液に 1/20000 量加え、1 時間反応させた。その後、**TBST** でメンブレンを 3 回洗浄し、2 次抗体を 1/20000 量加え、1 時間反応させた。再び **TBST** でメンブレンを 3 回洗浄し、**ECL Plus Western Blotting Detection system** (**GE** ヘルスケアバイオサイエンス社) を用いて目的のタンパク質の検出を行った。

表 1. 使用菌株

菌株	菌株情報 (遺伝子型等)	参考文献
SJW1103	Wild type	Yamaguchi S. <i>et al.</i> 1984
SJW2219	<i>flgE</i> (T149N)	Ohnishi K. <i>et al.</i> 1994
TH10335	<i>fliK6619</i> ( $\Delta$ aa238-269)	Shibata S. <i>et al.</i> 2007
TH8256	<i>fliK6125</i> ( <i>fliK95'</i> - <i>yscP</i> (217-381)-'96 <i>fliK</i> )	Shibata S. <i>et al.</i> 2007
TH18945	<i>flgM5794::FRT flgE2219</i> (T149N) <i>fljBenx</i> vh2	This study
UA001	SJW2219 に pAH25 を導入	This study
UA002	<i>flgE2219</i> (T149N)pTH10335	This study
UA003	<i>flgE2219</i> (T149N)pTH8256	This study
SJW2536	$\Delta$ <i>fliC</i>	Yamaguchi S. <i>et al.</i> 1984
SJW108	$\Delta$ <i>fliK</i>	Yamaguchi S. <i>et al.</i> 1984
TH16783	$\Delta$ araBAD7606:: <i>fliK</i> + $\Delta$ <i>fliK6140</i>	This study

表 2. プラスミド

プラスミド	菌株情報 (遺伝子型等)	参考文献
pKD46	Para- $\lambda$ -red	Datsenko and Wanner, 2000
pAH25	pTrc99AFF4- <i>fliC</i> SJW1103	Inaba S. <i>et al.</i> 2013
pTH10335	<i>fliK6619</i> ( $\Delta$ aa238-269)	Shibata S. <i>et al.</i> 2007
pTH8256	<i>fliK6125</i> ( <i>fliK95'</i> - <i>yscP</i> (217-381)-'96 <i>fliK</i> )	Shibata S. <i>et al.</i> 2007

表 3. プライマー

プライマー	配列	使用目的
<b>Cloning primer</b>		
TetR FliK	5'-gttaggcgcagacggcgcac agggcaaagacgcccgcattctt aagaccactttcacatt -3'	クローニング
TetA FliK	5'-tcgataacttgccgcctgccg cctgtaaateggccagcgteta agcacttgtctctctg -3'	クローニング
FliK (Forward)	5'-ggccgccgcgcgcgaa tggcgcagtggatatcttcgcctt aagaccactttcacatt -3'	クローニング
FliK (Reverse)	5'-ggccgccgcgcgcgaa tggcgcagtggatatcttcgcctt aagaccactttcacatt -3'	クローニング

表 4. 使用培地と抗生物質濃度

LB 培地	TY 培地
1 % Bact Tryptone	1 % Bact Tryptone
0.5 % Bact Yeast Extract	0.5 % Bact Yeast Extract
1 % Sodium choloride	
<b>抗生物質</b>	
アンピシリン; 50 µg/ml	
テトラサイクリン; 15 µg/ml	

## 表 5. 試薬組成

トリクロロ酢酸沈殿法

### 25% トリクロロ酢酸

トリクロロ酢酸 500 g に対し 227 ml の滅菌水を添加したものを 100 %とした。

SDS - ポリアクリルアミド電気泳動

### 分離ゲル

30 % Acrylamid solution

N, N'-Methylene-bis-HG (0.8 %)

Acrylamide (29.2 %)

Separation buffer

0.4 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)

1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)

10 % Ammonium Peroxodisulfate

### 濃縮ゲル

30 % Acrylamid solution

N, N'-Methylene-bis-HG (0.8 %)

Acrylamide (29.2 %)

Stacking buffer

0.4 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)

10 % Ammonium Peroxodisulfate

### Sample buffer

Tris-HCl (pH 6.8) (0.125 M)

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (4 %)

Glycerol (20 %)

2-Mercaptoethanol (10 %)

Bromophenol blue (0.1 %)

### SDS Running Buffer

---

Tris (0.3 %)  
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (0.1%)  
Glycine (1.4 %)

---

### **CBB 染色溶液**

---

Coomassie Brilliant Blue R-250 (0.25%)  
Methanol (50 %)  
Acetic Acid (10 %)

---

### **銀染色**

---

Fixer

Methanol (40 %)  
Formalin (5 %)

---

Pre-treat solution

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (0.02 %)

---

Silver solution

$\text{AgNO}_3$  (0.1 %)

---

Developer

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3 %)  
 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (0.0004 %)

---

Stopper

Citric acid (2.3 M)

---

### **乾燥溶液**

---

Glycerol (4 %)  
Ethanol (30 %)

---

## 2.3 結果・考察

### 2.3.1; *flgE* 変異株 SJW2219 の温度感受性について

SJW2219 株はもともと、温度感受性という性質を有する変異株として単離された。温度感受性の特徴を調べるため 30 °C と 37 °C で培養し、運動性の違いや菌体の観察を行った。

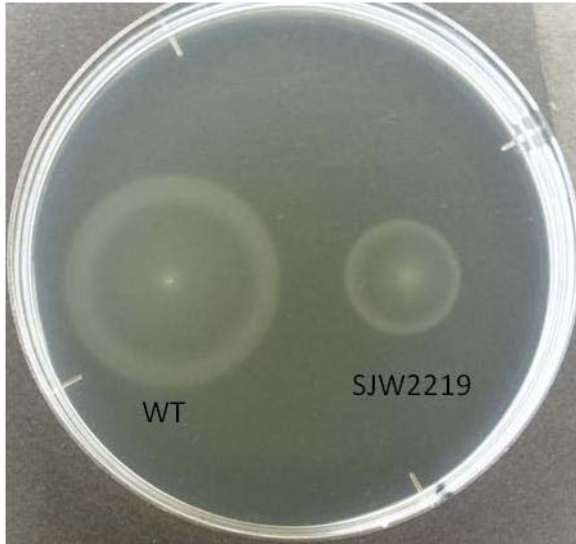
SJW2219 のコロニーは 30 °C 培養において、半固形培地上で運動性を示すスウォームリングを形成した。一方、37°C 培養ではスウォームリング（走化性によって形成されるリング）が形成されなかった（図 6, A,B）。

暗視野顕微鏡と電子顕微鏡観察の結果、30 °C 培養した SJW2219 株は活発に泳ぎ、野生株（SJW1103）と同様にべん毛を持っていた。一方、37 °C 培養ではほとんどの菌体がべん毛を持たず、泳ぎも見られなかった（図 7, A,B）。フックタンパク質に変異があるため、基部体構造は正常に構築されていると推測し、37°C 培養した菌体の基部体を単離精製し観察を行った。電子顕微鏡観察の結果、多くの基部体構造が観察され、そのほとんどがフックの付いていないものだった（図 8, A）。また、フックの付いた基部体構造のフックは、野生株よりも短いものが多く、べん毛フィラメントが付いた完全なべん毛構造は少数であった（図 8, B,C）。従って、推測通りフックタンパク質に変異があっても基部体構造の構築は正常に行われていた。

30 °C 培養と 37 °C 培養時に観察された構造物の割合をそれぞれ調べた結果、30 °C 培養では、フックの付いていない基部体が全体の 3 %、フック基部体構造が 26 %、フィラメント付き基部体構造は 71 % であった。一方、37 °C 培養ではフックの付いていない基部体構造が 70 %、フック基部体構造が 24 %、フィラメント付き基部体構造はわずか 6 % であった（表 1）。

このことから、30°C 培養では野生株と同様にべん毛は生えているが、フィラメントが付いていない基部体も多数存在することが明らかとなった。この結果は、*FlgE* の変異によってフック構築の効率が、培養温度が高くなることで低下することを示唆している。

(A)



(B)

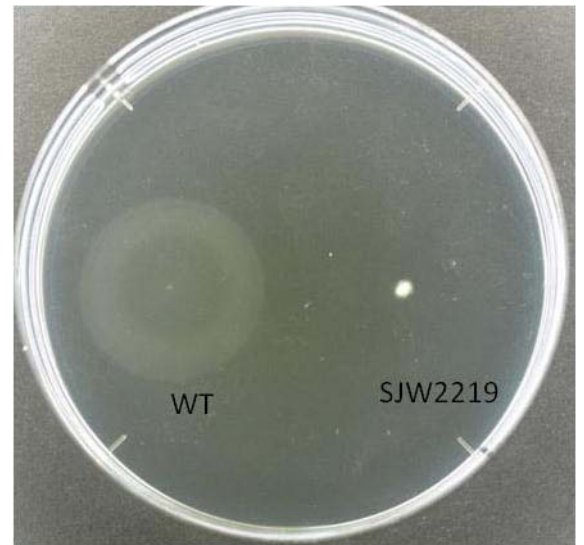


図 6. 野生株と SJW2219 株のスウォーム解析

野生株、SJW2219 株の培養温度の違いによるスウォーム運動の観察結果。観察にはスウォームプレート(0.4 % agar) を使用した。

(A) 30 °C で 11 時間静置培養した野生株と SJW2219 株の Swarm プレート。

(B) 37 °C で 7 時間静置培養した野生株と SJW2219 株の Swarm プレート。



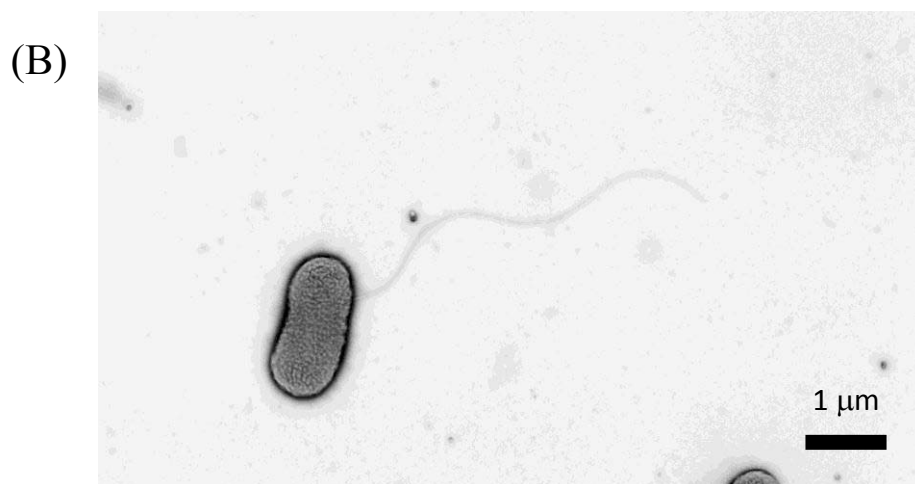
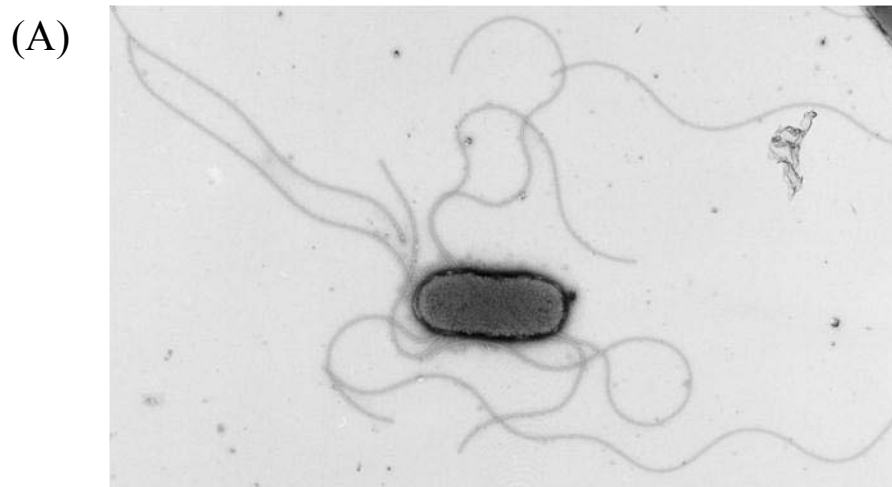


図 7. SJW2219 株の電子顕微鏡像

(A) 30 °C で 4 時間培養した菌体の電子顕微鏡像。

(B) 37 °C で 4 時間培養した菌体の電子顕微鏡像。

染色には 1% リンタングステン酸溶液 (pH 7) を使用した。

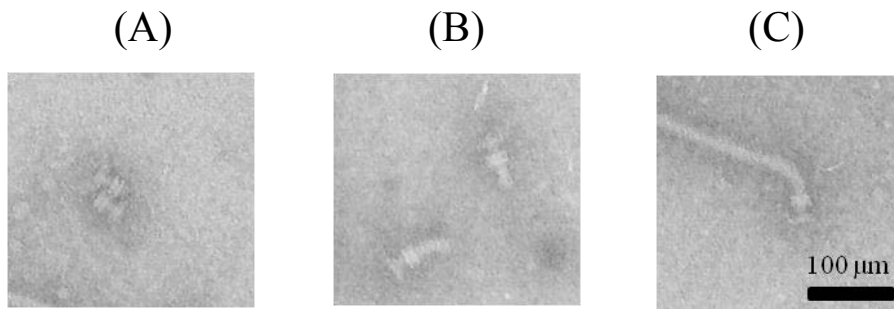


図 8. SJW2219 株の単離精製したべん毛の透過型電子顕微鏡観察

(A) 基部体、(B) フック基部体、(C) べん毛フック基部隊の電子顕微鏡写真。  
染色には、2% リンタングステン酸溶液 (pH7) を使用した。

表 6. SJW2219 株のべん毛構造とべん毛の割合

Flagellar structures	Number of particles	
	Grown at 30 °C	Grown at 37 °C
Basal body	0	106 (70 %)
Hook basal body	17 (23 %)	36 (24 %)
Intact flagella	58 (77 %)	10 (6 %)

### 2.3.2; 培養温度の違いによる分泌タンパク質の比較

37 °C培養した SJW2219 株に見られるフックのほとんどが野生株よりも短かった。そのため、37 °C培養した菌体の FlgE タンパク質の分泌量を調べた。

分泌タンパク質をトリクロロ酢酸沈殿法により回収し、SDS-PAGE によって解析した。野生株を LB 培地で培養すると、べん毛構築タンパク質と病原性タンパク質の両方が分泌される (Komoriya *et al.*, 1999)。しかし、LB 培地から塩化ナトリウムを除いた TY 培地で培養した場合、病原性タンパク質の分泌が抑えられることが分かっている (Mizusaki *et al.*, 2008)。分泌されるタンパク質は、SipA (89 kDa)、FlgK (HAP1; 60 kDa)、FliC (58 kDa)、FliD (56 kDa)、SipC/FlgE (42 kDa)、InvJ (40 kDa)、FlgL (HAP3; 35 kDa)である (図 9, Lane 1)。

30 °C培養した SJW2219 株の分泌タンパク質の SDS-PAGE パターンは、野生株の分泌タンパク質の SDS-PAGE パターンと似ていたが、FlgE (T149N; 41 kDa) や FlgF (32 kDa)、FlgG (30 kDa)といったロッド構成タンパク質や、フックキャップタンパク質である FlgD (28 kDa)が多く分泌されていた (図 6, Lane 2)。野生株では FlgE と SipC の分子量がほぼ等しいため、SDS-PAGE では2つのタンパク質は1本のバンドとして現れる。一方、SJW2219 株の FlgE の分子量は野生株と比較すると小さいため (41 kDa)、SipC と FlgE-T149N のバンドがそれぞれ分離されて観察された。

野生株の FlgE と SJW2219 株の FlgE 分泌量を比較すると、30 °C培養と 37 °C培養の両方で、SJW2219 株において多くの FlgE が重合せず培地中に漏れていた。野生株では FlgE はほとんど分泌されない (図 9, Lane 1)。変異がある FlgE はフックの重合が効率的に進まず、培地中に蓄積すると考えられる。また、前述したように 30 °C培養時のべん毛の単離精製の結果、観察された構造物のうち 26 % が短いフックを有する基部体構造であった。従って、30 °C培養時に培地中に見られた多くの FlgE-T149N は、重合に問題がある。そのため、短いフックが形成されたものと考えられる。SDS-PAGE の結果も、SJW2219 のフックの重合は野生株の様に効率的ではないことが示唆している。また、べん毛フィラメントの構築が遅れるのは、フックの重合効率が悪いためであると考えられる。

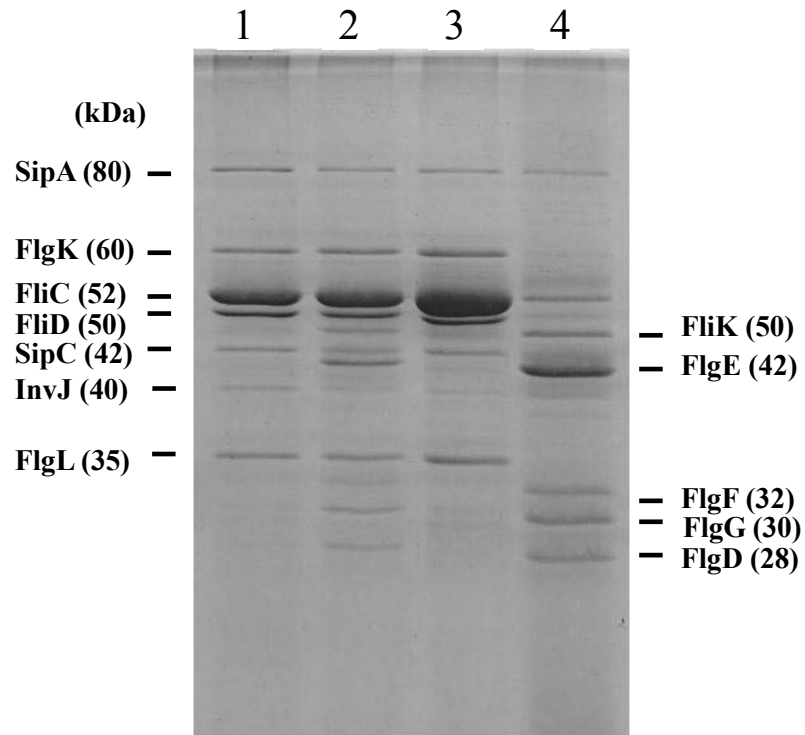


図 9. 野生株と SJW2219 株の分泌タンパク質の SDS-PAGE による解析

菌体外に分泌された野生株と SJW2219 株のタンパク質量の比較。(Lane 1: 30 °C 培養 WT, Lane 2: 30 °C 培養 SJW2219, Lane 3: 37 °C 培養 WT, Lane 4: 30 °C 培養 SJW2219)。

### 2.3.3; FliC と FliK の分泌と発現

SDS-PAGE の結果から、SJW2219 株を 37 °C で培養すると FliC がほとんど培地中に分泌されないことが明らかとなった。野生株と比較すると、FliC と同様に HAP タンパク質 (FlgK, FlgL) は検出されないレベルまで減っていた (図 9, Lane 4)。そこで細胞内で FliC が産生されているかどうか調べた。

野生株と SJW2219 株を 30 °C と 37 °C で培養し、分泌タンパク質をトリクロロ酢酸沈殿法により回収し、FliC 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った (図 10)。

30 °C 培養の SJW2219 株では、野生株と等量の FliC 分泌や発現量が見られた (図 10A, Lane 2)。37 °C 培養の SJW2219 株では、野生株や 30 °C 培養時よりも分泌量が極めて少なかった。SJW2219 株の細胞内の FliC を調べると、ほとんど検出されなかった (図 10, Lane 4)。従って、37 °C 培養の SJW2219 株では *fliC* 遺伝子が発現していないと考えられる。

野生株の FliK は SDS-PAGE ではほとんど検出されない (図 9, Lane 1)。一方 SJW2219 株では、FlgF や FlgD といったロッドタンパク質と同じように FliK も検出された (図 9, Lane 2, 4)。ウェスタンブロッティングの結果、野生株では両温度において分泌量・細胞内量ともにほぼ同じ量が検出された (図 10, Lane 1, 3)。SJW2219 株では、FliK は野生株よりも多く分泌・産生されており、その量は 37 °C での培養で若干の増加がみられた (図 10, Lane 2, 4)。SJW2219 株において細胞内の FliK が多く産生されるのは、未完成のフック基部体が多く観察されたことから、ロッド・フックタンパク質からフィラメントタンパク質への輸送の切り替えが起こっていないためだと考えられる。

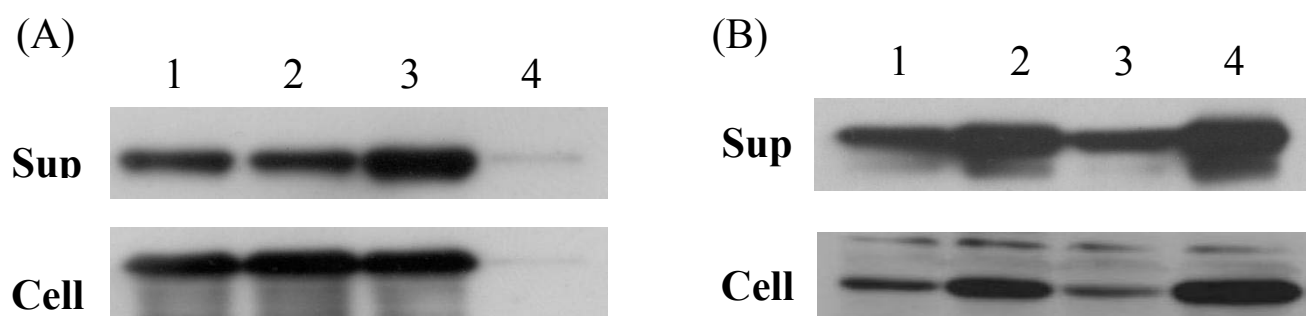


図 10. 野生株と SJW2219 株の菌体外・菌体内タンパク質の Western Blotting 解析

- (A) 菌体外・菌体内 FliC の検出。1 次抗体に anti-FliC 抗体を、2 次抗体には anti ラビット抗体を使用した。
- (B) 菌体外・菌体内 FliK の検出。1 次抗体に anti-FliK 抗体を、2 次抗体には anti ラビット抗体を使用した。

(Lane 1: 30 °C 培養 WT, Lane 2: 30 °C 培養 SJW2219, Lane 3: 37 °C 培養 WT, Lane 4: 30 °C 培養 SJW2219)。

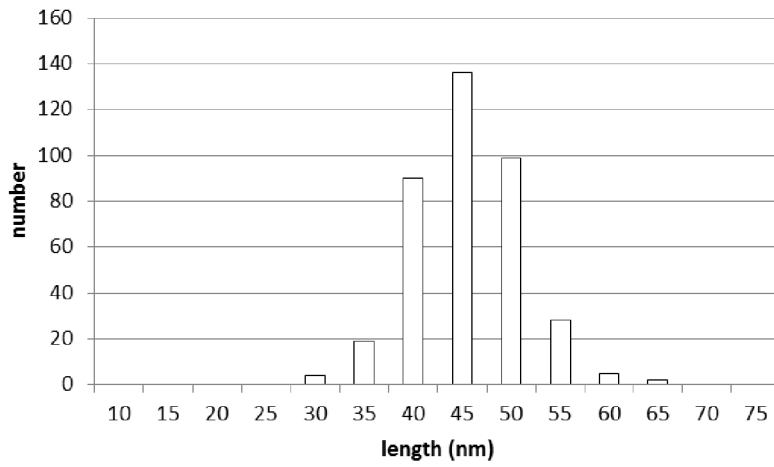
### 2.3.4; *flgE* 変異株 SJW2219 株のフックの長さ

SJW2219 株の分泌タンパク質の解析の結果、ロッド構成タンパク質 (FlgF, FlgG) や FliK の分泌量が多いことが明らかとなったが、電子顕微鏡観察からは野生株と 30 °C 培養した SJW2219 株のべん毛構造に明らかな違いは認められなかった。しかし、過去の研究で SJW2219 株のフックの長さが短く制御されているという報告があったため、フックの長さを計測した。

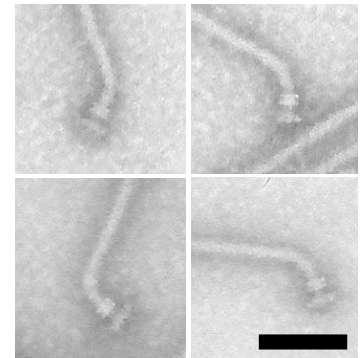
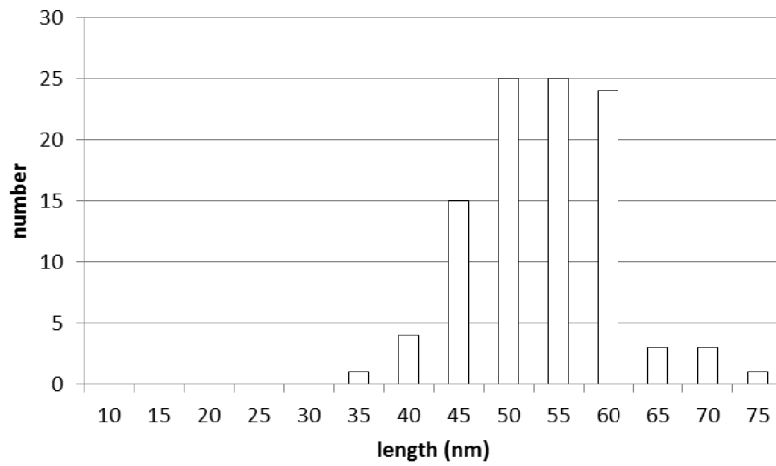
30 °C 培養した SJW2219 株のべん毛を単離精製し、酸処理によってべん毛フィラメントを脱重合させフック基部体構造を得た。フックの長さ計測には、低 pH・低温度で処理した真っ直ぐな状態のフックを用い、ImageJ ソフトを使用した。計測の結果、平均の長さは  $48 \pm 5$  nm であった (図 11, A)。一方、フィラメントが付いた状態で同様にフックの長さを計測すると、平均の長さが  $56 \pm 7$  nm と野生株とほぼ同じ長さであった (図 11, B)。この長さの違いは、フィラメント脱重合のために行った酸処理が原因であると推測した。酸処理によってフック自身も酸の影響を受けた可能性が考えられたため、精製したフック基部体の構成タンパク質を SDS-PAGE によって解析した。

野生株と SJW2219 株から単離精製したべん毛をグリシンバッファー(pH 2.5) で 1 時間処理した後、残った構造体を超遠心機で回収してサンプルとした。野生株のフック基部体では FliF(65 kDa)、FlgK(HAP1; 60 kDa)、FlgE(42 kDa) とロッドタンパク質のバンドが見られた (図 12, Lane 2)。SJW2219 株のフック基部体とバンドパターンを比較したところ FlgK(HAP1) のバンドが見られなかった (図 12, Lane 3)。この結果は酸処理によって HAP1 がフック基部体から外れたことを示唆している。従って、温度感受性株変異株ではフックと HAP1 の相互作用が野生株よりも弱いことが明らかとなった。さらに、酸処理を 2 時間行ってもフックに影響が見られなかったことから、温度感受性変異株においてもフックは一度形成されると形を保つことが示された。

(A)



(B)



100  $\mu\text{m}$

図 11. SJW2219 株のフックの長さ分布

(A) SJW2219 株のフック基部体のフックの長さ分布 (N = 383)。グラフの右側はフック基部体の電子顕微鏡写真。

(B) SJW2219 株のべん毛付フック基部体のフックの長さ分布 (N = 100)。グラフの右側はフック基部体の電子顕微鏡写真。染色には、2% リンタンダステン酸溶液 (pH7) を使用した。



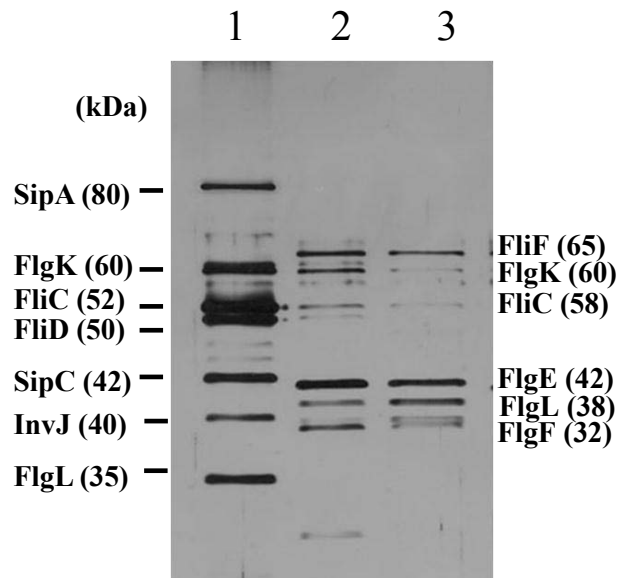


図 12. 野生株と SJW2219 株のフック基部体構成タンパク質の SDS- PAGE による解析

野生株と SJW2219 株から単離精製した HBB の構成タンパク質を SDS- PAGE によって解析した。Lane 1: WT の外分泌タンパク質, Lane 2: グリシンバッファ (pH 2.5) で 1 時間処理した後の野生株の HBB, Lane 3: グリシンバッファ (pH 2.5) で 1 時間処理した後の SJW2219 株の HBB。

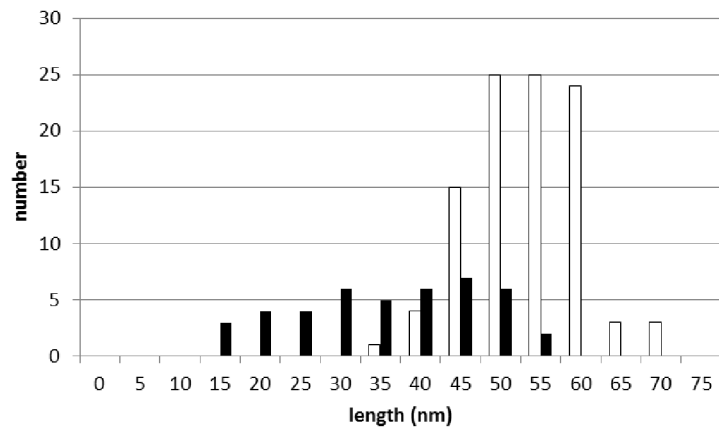
### 2.3.5; HAP1 領域の長さについて

SJW2219 株の短いフックが存在する理由を 2 つ挙げた。1 つ目はフックの重合効率が悪いこと、2 つ目は酸処理によってフックの先端から HAP1 が外れることである。フィラメントを脱重合させた後に計測したフックの長さ分布には、未完成のフックが混入していると考えられる。従って、30 °C 培養時に観察されたフィラメントが構築されていないフックの長さを計測した。その結果、平均の長さは  $38 \pm 7$  nm であった。フィラメントが付いた状態で計測したフックの長さ分布と共にグラフに表すと、フックの長さは 15 nm から 55 nm の間に分布していた (図 13, A)。

HAP1 は約 11 個のサブユニットから成っている (Jones CJ. *et al.*, 1990)。基本的なヘリックスのピッチは 1 回転が約 5.5 サブユニットである。さらに、そのサブユニットのピッチは 2.5 nm であるため、HAP1 領域の長さは約 5 nm と推測した。HAP3 (FlgL) に関してはサブユニット数が明らかとなっていないため (図 12, Lane 2) から推測して FlgL の量は FlgK とほぼ等しいと仮定した。従って、フックとフィラメントの間の HAP 領域の長さは約 10 nm であると考えられる。

未完成のフックの長さ分布や HAP 領域の長さが明らかとなったため、表 6 に示した 3 種類の構造物の割合を考慮して、(図 13, A) のグラフを元に新たなグラフを作成した (図 13, B)。その結果、長さ分布が酸処理後のフックの長さ分布とよく似たグラフとなった。従って、温度感受性 *flgE* 変異株 SJW2219 株ではフック形成能は低下しているが、フックの長さ制御能は維持されていることが示唆された。さらに、この菌株では HAP1 と HAP3 領域が酸に弱いことから、今まで信じられてきたフックの長さは実際よりも長く、HAP 領域を含む長さであることが本研究で初めて明らかとなった。つまり、野生株のフック長の 55 nm には HAP 領域が含まれており、SJW2219 株のフック基部体の解析結果から、実際のフックの長さは HAP 領域を除いた約 45 nm であることが明らかになった (図 14)。

(A)



(B)

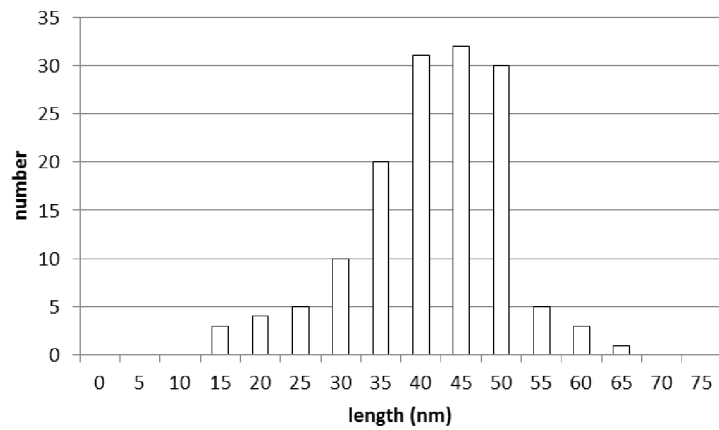


図 13. SJW2219 株のフィラメント付 HBB と未完成 HBB のフックの長さ分布

(A) 30 °C 培養の SJW2219 株から単離精製したフィラメント付 HBB (白) と未完成 HBB (黒) のフックの長さ分布。

(B) HAP1 の欠失と未完成 HBB の混入を想定したフックの長さ分布。

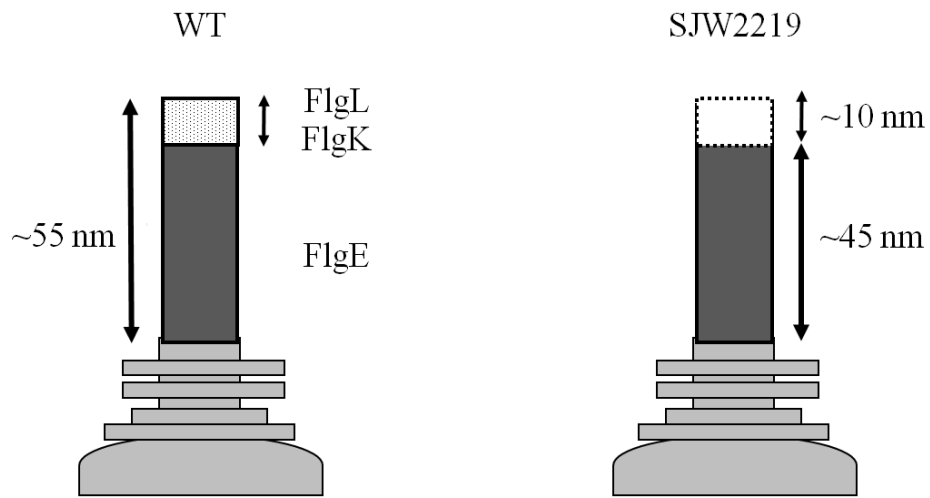


図 14. 野生株と SJW2219 株の HBB の略図

フック構造は FlgE と HAP 領域 (FlgK, FlgL) から構成されている。  
 (左) 野生株の HBB の略図。HAP 領域 (ドット) はフックの先端に残る。  
 (右) SJW2219 株の HBB の略図。HAP 領域は酸処理によって失われる。

### 2.3.6; 短い *fliK*, 長い *fliK* 挿入株のフック長制御

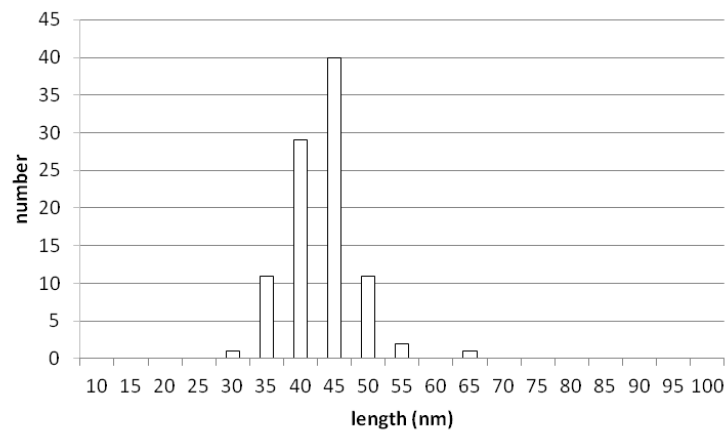
SJW2219 株は 30 °C で培養すると正常にべん毛を形成した。フィラメント付フック基部体の平均のフック長は野生株と同様に約 55 nm であったが、酸処理によるフィラメント脱重合後のフックの平均長は野生株のフックの平均長よりも短い約 45 nm であった。これは、*flgE* 変異株ではフックとフィラメントを連結するタンパク質である HAP1 と FlgE の相互作用が弱いため、酸処理によって HAP1 がフックから外れることが原因であることが明らかとなった。従って、SJW2219 株においても FliK が正常に働き、フックの長さを制御していると考えられる。

FliK が正常に働いているかどうかをさらに確かめるために、SJW2219 株に野生株よりも短い FliK (373 aa) を産生する *fliK* 遺伝子断片挿入株 (UA002 株) と長い FliK (570 aa) を産生する *fliK* 遺伝子断片を挿入し (UA003 株)、形成されたフックの長さを計測した。

UA002 株と UA003 株をそれぞれ 30 °C で培養し、べん毛を単離精製してフィラメント付フック基部体のフック長を計測した。その結果、短い *fliK* 遺伝子断片を挿入した UA002 株の平均長は  $45 \pm 5$  nm (図 15, A)、長い *fliK* 遺伝子断片を挿入した UA003 株の平均長は  $82 \pm 9$  nm となった (図 15, B)。つまり、挿入した *fliK* 遺伝子断片の長さを反映した長さのフックを形成した。また、酸処理によってフィラメントを脱重合させた後のフックの長さを計測したところ、短い *fliK* 遺伝子断片を挿入した UA002 株の平均長は  $41 \pm 6$  nm (図 16, A)、長い *fliK* 遺伝子断片を挿入した UA003 株の平均長は  $80 \pm 6$  nm となった (図 16, B)。

これらの結果から、SJW2219 株と同様に UA002 株や UA003 株においても酸処理によってフック長が短くなるものの、フックの長さは FliK の長さを反映しているため、*flgE* 変異株でも FliK がフックの長さを制御していることが示された。

(A)



(B)

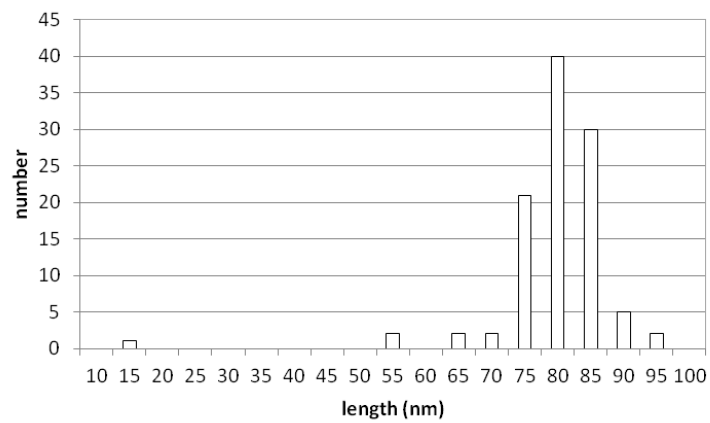
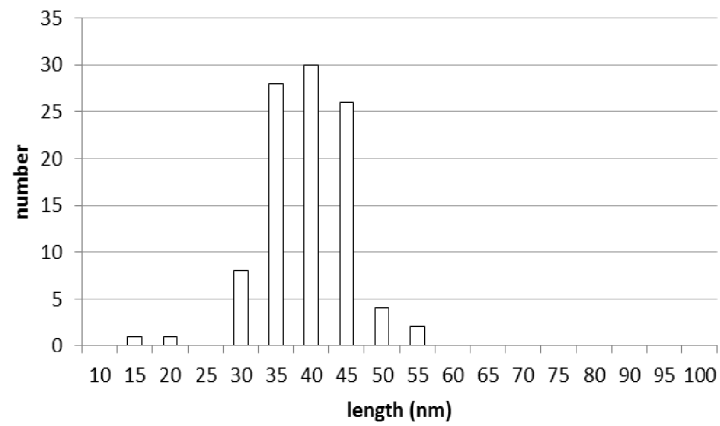


図 15. 短い *fliK* 挿入株 (UA002 株) と長い *fliK* 挿入株 (UA003 株) のフックの長さ分布

(A) 短い *fliK* 挿入株 (UA002 株) のべん毛付フック基部体のフックの長さ分布 (N = 95)。

(B) 長い *fliK* 挿入株 (UA003 株) のべん毛付フック基部体のフックの長さ分布 (N = 105)。

(A)



(B)

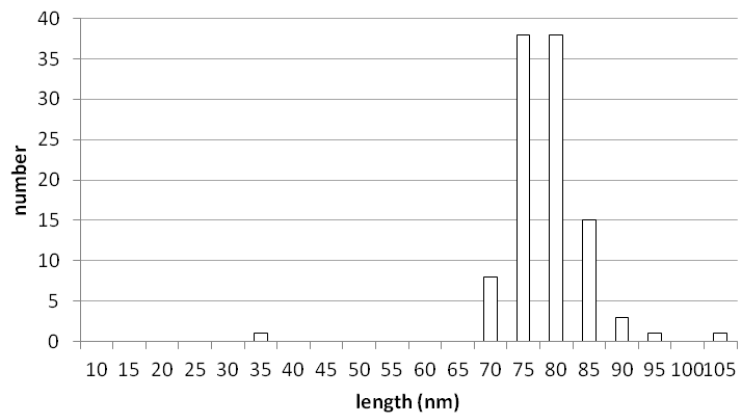


図 16. 短い *fliK* 挿入株 (UA002 株) と長い *fliK* 挿入株 (UA003 株) の酸処理後のフックの長さ分布

- (A) 短い *fliK* 挿入株 (UA002 株) のフック基部体のフックの長さ分布 (N = 100)。  
(B) 長い *fliK* 挿入株 (UA003 株) のフック基部体のフックの長さ分布 (N = 105)。

## 第3章

# フック変異体におけるフック完成前後の タンパク質分泌



## 3.1 研究背景

べん毛の形成が 40 種以上もの遺伝子から階層的に制御されるためには、タンパク質の輸送制御が重要な役割を果たしている。サルモネラ菌のべん毛遺伝子はクラス 1~3 の 3 つの階層構造をとって発現が制御されている。まず、クラス 1 では FlhDC ( $\sigma^{70}$  依存性) タンパク質複合体が転写活性化因子として働き、クラス 2 の発現を誘導する。クラス 1 遺伝子が機能しないと、クラス 2、クラス 3 の遺伝子が発現しないため、クラス 1 はマスターオペロンとも呼ばれている。クラス 2 には、べん毛基部体構成タンパク質、フック構成タンパク質、クラス 3 の転写因子であるべん毛特異的シグマ因子  $\sigma^{28}$  (FliA) とアンチシグマ因子 FlgM をコードする遺伝子が属している。クラス 3 にはべん毛フィラメント構成タンパク質であるフラジェリンと、フィラメント構築関連タンパク質、走化性レセプター Mcps、べん毛モーターの回転や回転方向を制御する Che タンパク質をコードする遺伝子が属している。クラス 2 からクラス 3 へ発現が移行するには輸送基質切り替えと、それに伴う FlgM の分泌が関与している。

クラス 2 の遺伝子群が発現すると基部体からフックまでが構築される。クラス 2 の発現からクラス 3 の発現への移行の遺伝的制御は FliA ( $\sigma^{28}$ ) と FlgM によって調節されている (Chilcott and Hughes, 1998)。フックが完成するまでは FliA の負の転写活性化因子である FlgM が細胞内に蓄積し、べん毛フィラメントの形成に必須な遺伝子群の発現を抑制する。フックの長さが 55 nm に到達すると FlgM は分泌装置によって菌体外に分泌され、FliA ( $\sigma^{28}$ ) の抑制が解除されるためクラス 3 の発現が誘導される (Minamino and Pugsley, 2005; Kutsukake, 1997)。クラス 3 の発現によってべん毛フィラメントタンパク質であるフラジェリンが大量に生産される。FlgM はクラス 2 とクラス 3 の両方で発現されることが (Aldridge *et al.*, 2006)、FlgM の菌体外への分泌が開始されることでクラス 3 の発現が可能となる。

第 2 章では温度感受性 *flgE* 変異株 SJW2219 のフックの重合が野生株よりも遅いことを示した。この変異株では、フックの長さ制御因子である FliK の過剰な分泌が観察されたが、30 °C 培養時の平均フック長は野生株と同じであり、フックの重合が遅くとも FliK は正常に働いていることを明らかにした。野生株ではフックの伸長が素早く進むため、構築途中のべん毛構造を観察することはできない。温度感受性 *flgE* 変異株はフックの重合が遅いため、タンパク質の輸送ゲートの切り替え過程を定量的に観察することが可能である。37 °C 培養では 30 °C 培養時よりも更にフックの重合効率が悪くなるが、37 °C 培養では 30 °C 培

養時と同様に FliK の分泌が観察された。FliK は分泌されているにも関わらずべん毛構築タンパク質への輸送切り替えが起こっていなかった。従って、*flgE* 変異株におけるアンチシグマ因子である FlgM の分泌と輸送基質切り替えとの関係や、フィラメント構築が可能になるフックの長さについて調べた。

## 3.2 材料と方法

### 3.2.1 使用菌株

本研究で使用した菌株は 2.2.1 表 1 に示した。

### 3.2.2 プラスミド

本研究で変異株を作成する際に使用したプラスミドを 2.2.2 表 2 に示した。

### 3.2.3 実験方法

以下の実験方法は第 2 章 実験方法に記載した。

使用培地組成と抗生物質の濃度

培養方法

トリクロロ酢酸沈殿法による菌体外分泌蛋白質の回収

菌体内発現蛋白質の回収

透過型電子顕微鏡 (TEM) による使用菌株の観察

SDS-PAGE

ウェスタンブロッティング

## 3.3 結果・考察

### 3.3.1; FlgM の分泌

37 °Cで培養した SJW2219 株では、ほとんどべん毛が構築されなかったことから、アンチシグマ因子が細胞外へ分泌されていない可能性が考えられた。このため、外分泌タンパク質の SDS-PAGE による解析を行った。

野生株、*fliC* 欠損株、*fliK* 欠損株をコントロールとして、FlgM の分泌を調べた。その結果、野生株と *fliC* 欠損株では FlgM のバンドが観察された (図 17, A Lane 1, 2)。*fliK* 欠損株では、FliK による輸送基質の切り替えが起こらないため、FlgM は細胞内に留まったままである。従って、分泌は観察されない (図 17, A Lane 3)。べん毛構築が起こる 30 °C 培養の SJW2219 株でも野生株と同様に FlgM は分泌された (図 17, B Lane 1, 2)。37 °C 培養の SJW2219 株では、*fliK* 欠損株とよく似たバンドパターンが得られ、FlgM の分泌はほとんど観察されなかった (図 17, B Lane 3)。

以上の結果から、SJW2219 株のべん毛タンパク質が 37 °C 培養で発現しないのは、FlgM によって発現が抑制されているためであることが明らかとなった。

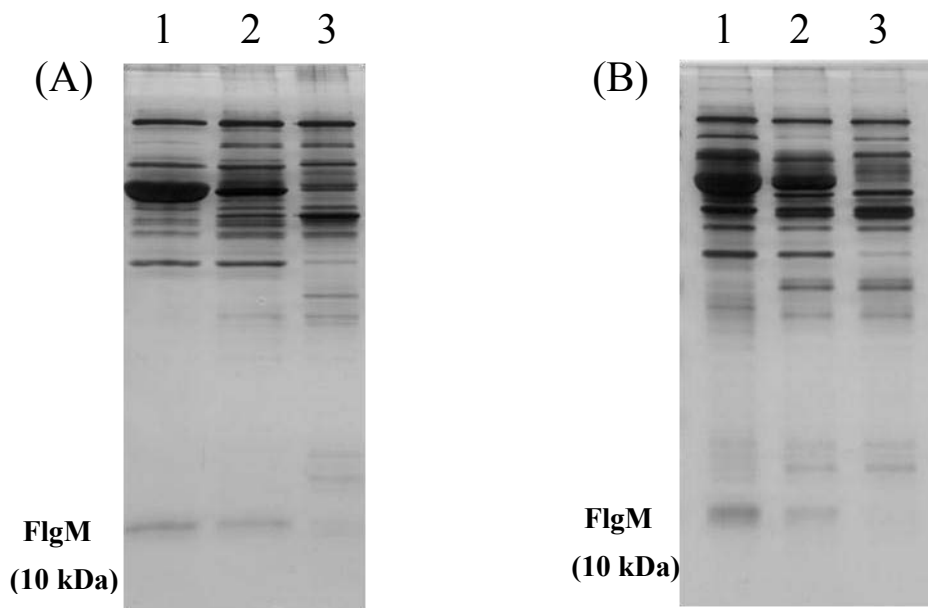


図 17. SDS-PAGE による FlgM の分泌観察

- (A) Lane 1: 野生株の外分泌タンパク質、Lane 2: *fliC* 欠損株 (SJW2536 株) の外分泌タンパク質、Lane 3: *fliK* 欠損株 (SJW108) の外分泌タンパク質。
- (B) Lane 1: 野生株の外分泌タンパク質、Lane 2: 30 °C培養の SJW2219 株の外分泌タンパク質、Lane 3: の外分泌タンパク質。37 °C培養の SJW2219 株の外分泌タンパク質。

### 3.3.2; *flgE* 変異株 SJW2219 の *flgM* 欠損株 (TH18945 株) の解析

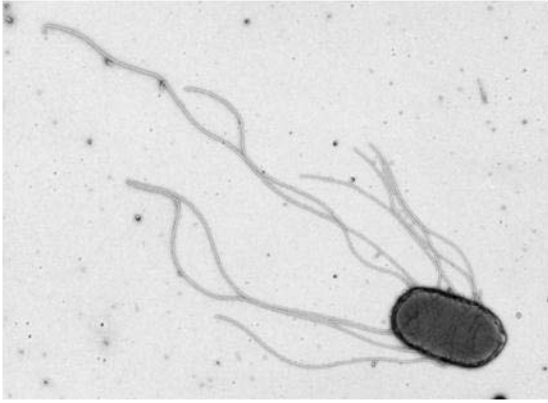
FlgMの分泌の観察の結果から、37 °C培養ではFlgMの分泌量が少ないために、FliCが発現しないことが明らかとなった。もしFlgMが存在しなければ、シグマ因子であるFliAは自由に働くため、多くのFliCが発現するはずである。37 °Cで培養したSJW2219株においても、*flgM*を欠損させることでFliCが発現すると考えられる。そこで、SJW2219から*flgM*遺伝子を欠損させた株(TH18945株)の菌体の観察を行った。同時に、細胞外タンパク質と細胞内タンパク質をSDS-PAGEとウェスタンブロッティングによって解析した。

30 °Cと37 °Cでそれぞれ培養した菌体の電子顕微鏡観察を行った。その結果、30 °C培養では、SJW2219株と同じ様にべん毛を生じていたが、長く構築されたべん毛も観察された(図18, A)。37 °C培養では、SJW2219株よりもべん毛は長くなったものの、構築されるべん毛の割合には変化がなかった(図18, B)。

SDS-PAGEによる解析の結果、30 °C培養したSJW2219株とTH18945株の菌の培地中に分泌されたFliC量はSJW2219株よりも多かった。このバンドは、FliCと、フィラメントキャップタンパク質であるFliDの混合バンドである(図19, A)。ウェスタンブロッティングによってFliCを検出した結果、*flgM*を欠損させた株の方でSJW2219株よりも2倍近い量のFliCが検出された(図19, B)。一方、37 °C培養ではTH18945株の菌体外と菌体内の両方でFliC量がわずかに多かった(図19, A)。ウェスタンブロッティングによる解析においても同様の結果が得られた(図19, B)。FliKやFlgEについては、*flgM*の有無や温度にかかわらず同じ様に分泌されていた(図19, C, D)。

これらの結果から、*flgM*を欠損させることで37 °C培養でFliCを発現量が増加することが明らかとなったが、構築べん毛数は増加しなかったことから、産生されたFliCはフックが短いため輸送装置を通ることができず菌体内で自己消化されることが示唆された。

(A)



(B)

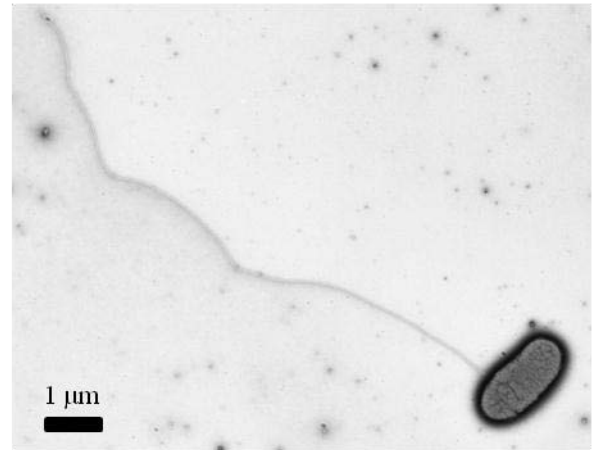


図 18. TH18945 株の透過型電子顕微鏡観察

(A) 30 °C で培養した TH18945 株の電子顕微鏡写真。

(B) 37 °C で培養した TH18945 株の電子顕微鏡写真。

染色には 1% リンタングステン酸溶液 (pH7) を使用した。

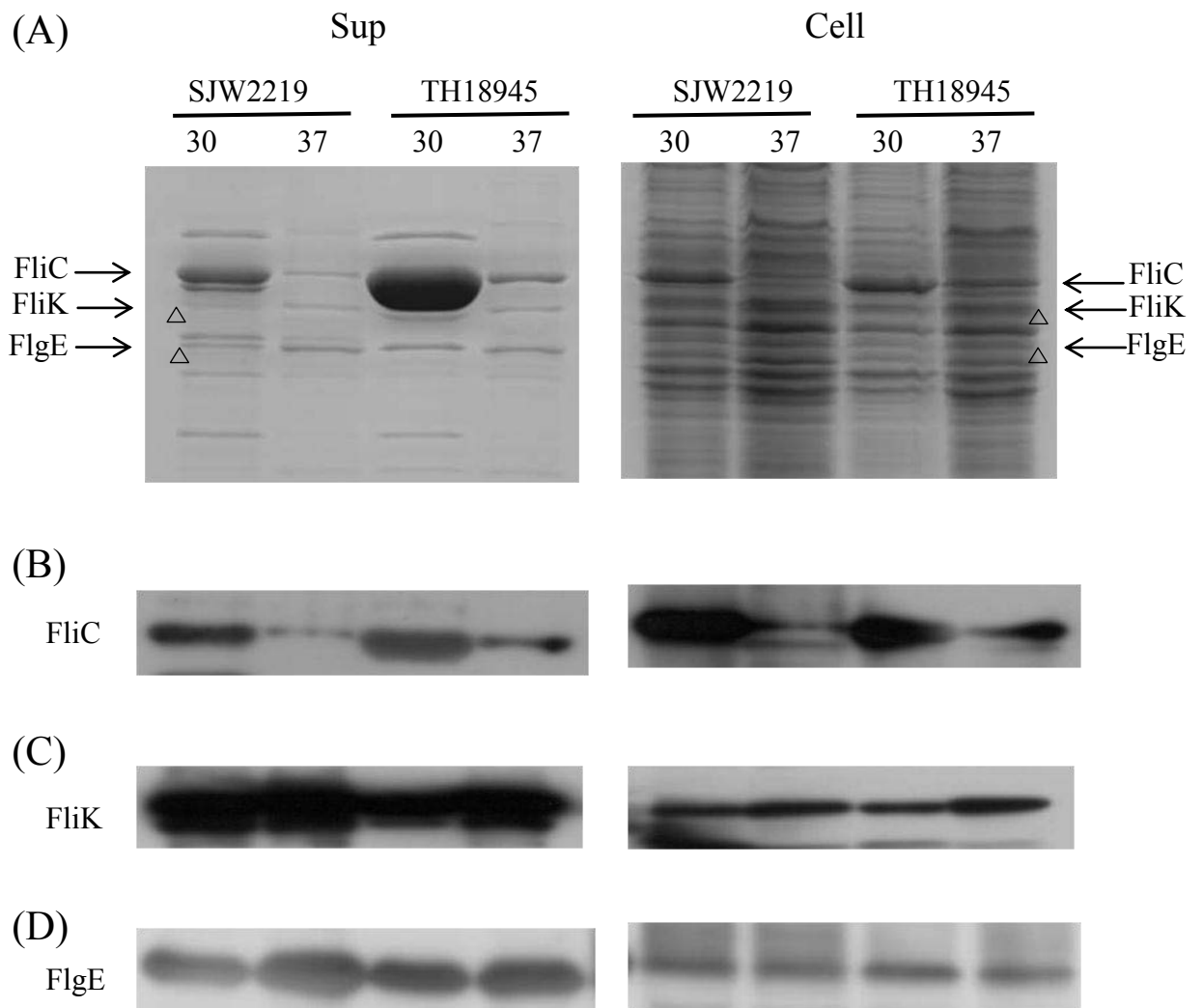


図 19. SJW2219 株と TH18945 株の菌体外・菌体内タンパク質の SDS-PAGE と Western Blotting による解析

SJW2219 株と TH18945 株を 30 °C と 37 °C で培養し発現・分泌するタンパク質を比較した。

- (A) 30 °C と 37 °C で培養した SJW2219 株と TH18945 株の菌体外・菌体内タンパク質の SDS-PAGE。
- (B) 30 °C と 37 °C で培養した SJW2219 株と TH18945 株の菌体外・菌体内 FliC の検出。1 次抗体に anti-FliC 抗体を、2 次抗体には anti ラビット抗体を使用した。
- (C) 30 °C と 37 °C で培養した SJW2219 株と TH18945 株の菌体外・菌体内 FliK の検出。1 次抗体に anti-FliK 抗体を、2 次抗体には anti ラビット抗体を使用した。



(D) 30 °Cと 37 °Cで培養した SJW2219 株と TH18945 株の菌体外・菌体内 FliK の検出。1 次抗体に anti-FlgE 抗体を、2 次抗体には anti ラビット抗体を使用した。

### 3.3.3; *flgE* 変異株 SJW2219 における FliC の過剰発現

アンチシグマ因子が存在しない TH18945 株においても FliC の分泌は SJW2219 株とほとんど差が見られなかった。SJW2219 株では FliC が発現していなかったことから、SJW2219 株で FliC を大量に発現させた場合の FliC の分泌を調べるため、SJW2219 株に FliC 過剰発現プラスミドを導入した (UA001 株)。

UA001 株を 30 °C と 37 °C で培養し、IPTG によって FliC を過剰発現させ、電子顕微鏡による観察を行った。その結果、30 °C 培養では SJW2219 株よりも長く伸びたべん毛が観察された (図 20, A)。また、37°C 培養では *flgM* 欠損株と同様に長くなったべん毛が観察された。また、稀に 1 菌体あたり 2 本のべん毛を持つ菌体も見られた。(図 20, B)。SJW2219 株や *flgM* 欠損株では構築されたべん毛は平均して菌体あたり 1 本であったが、UA001 株でもべん毛数の若干増加したものの大きな変化は見られなかった。

FliC 発現誘導前の UA001 株と誘導後の UA001 株の FliC の菌体外分泌量に注目すると、IPTG による発現誘導された UA001 株において 30 °C 培養ではわずかな増加しか見られなかった (図 21 A, Lane 2)。しかし、形成されたフィラメントが長くなっている事から、FliC がフィラメント重合に使用されているために分泌量が少ないと考えられる。37 °C 培養では FliC 発現誘導前の UA001 株よりも菌体外の FliC が増加した (図 21 A, Lane 4)。しかし、菌体内発現量は UA001 株の 30 °C 培養時の菌体内発現量と変わらなかった (図 21 B, Lane 4)。この時の FliC 分泌量は 30 °C 培養時の FliC 発現誘導前よりも少ないため (図 21 A, Lane 1, 4)、べん毛数が大きく増加しなかったと推測される。これはフックが短いため FliC が輸送装置を通ることができなかったことを示唆している。

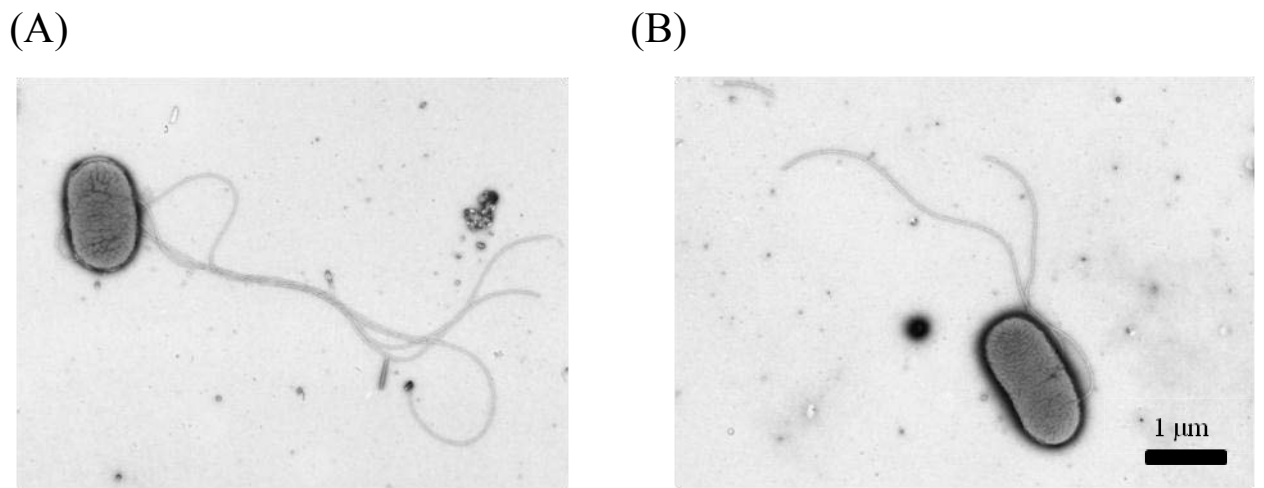


図 20. UA001 株の透過型電子顕微鏡観察

(A) 30 °C で培養した UA001 株の電子顕微鏡写真。  
 (B) 37 °C で培養した UA001 株の電子顕微鏡写真。  
 染色には 1% リンタングステン酸溶液 (pH 7) を使用した。

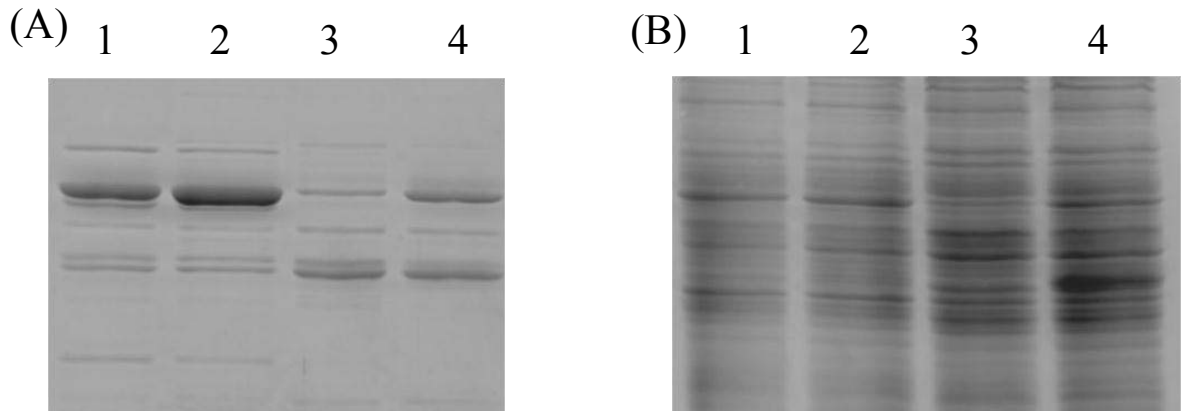


図 21. SJW2219 株と UA001 株の菌体外・菌体内タンパク質の SDS-PAGE 解析

SJW2219 株と UA001 株を 30 °C と 37 °C で培養し、発現・分泌するタンパク質を比較した。FliC タンパク質発現誘導には 0.1 mM IPTG を使用した。  
 (A) 30 °C と 37 °C で培養した UA001 株の菌体外タンパク質と (B) 菌体内タンパク質の SDS-PAGE。(Lane 1: 30 °C 培養の UA001 株 (-IPTG), Lane 2: 30 °C 培養の UA001 株 (+IPTG), Lane 3: 37 °C 培養の UA001 株 (-IPTG), Lane 4: 37 °C 培養の UA001 株 (+IPTG) )。

### 3.3.4; ポリフックのフィラメント構築

これまでの研究で、FliK の C 末端領域が正常であればフックの長さが制御されるかどうかに関わらず、FliK はタンパク質の輸送基質を切り替えることが分かっている (Hirano T. *et al.*, 2005; Shibata S. *et al.*, 2007)。温度感受性 *flgE* 変異株の FliK は正常なのにもかかわらず、タンパク質の輸送基質の切り替えの働きが見られなかった。これは SJW2219 株ではフックの長さが短いために、FliK が無駄に分泌されたことを示す。

フックの長さが十分でない場合はフィラメントが構築されない。フックが通常の何倍も長い場合に、FliK が輸送され FliC への輸送に切り替えるか否かを明らかにするため、アラビノースの添加によって *fliK* の発現が起こるプラスミドを持つ TH16783 株を使用して実験を行った。

TH16783 株は培地中にアラビノースを添加せずに終夜培養すると、ポリフックを形成し、アラビノースを添加して培養すると野生株と同様のべん毛を形成した。ポリフックからフィラメントが形成されるか否かを観察するために、アラビノースを無添加で培養した後にアラビノースを添加し、添加 5 分後、10 分後、30 分後の菌体を電子顕微鏡で観察した。アラビノースの添加前を 0 分とした (図 22, A)。その結果、アラビノースを添加した 5 分後の観察では、ポリフックの先端に短いフィラメントが見られた (図 22, B)。10 分経過後では、ポリフックの先端からフィラメントが 5 分後経過時よりも長く伸長していた (図 22, C)。30 分経過後ではさらに伸長したべん毛が観察された (図 22, D)。

これらの結果から、FliK は産生されると直ちにポリフックを通り、輸送基質を FliC へと切り替えることが明らかになった。従って、フックが長い場合はフックの長さに関係なく、輸送基質を切り替えることが示唆された。

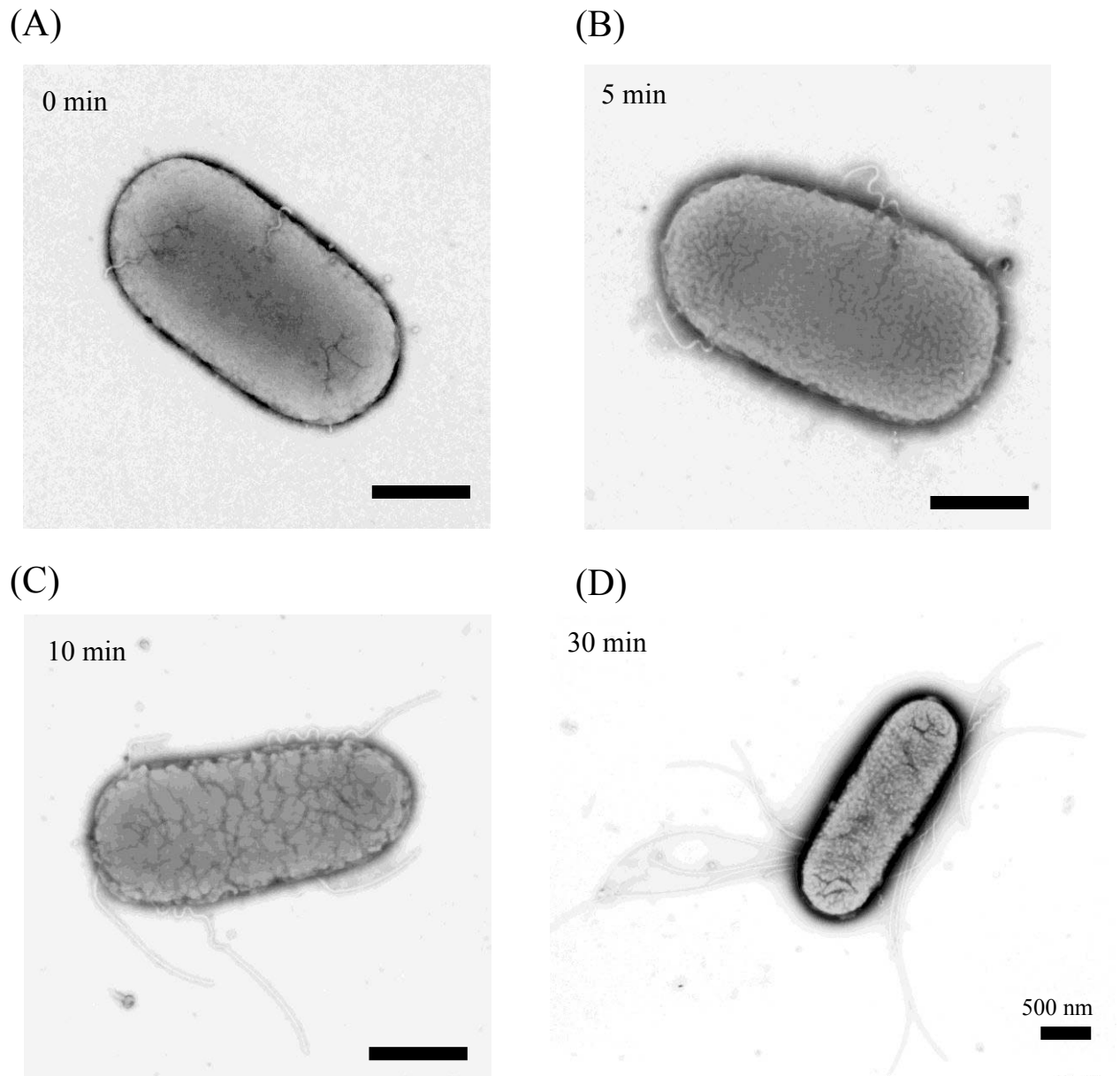


図 22. TH16783 株の透過型電子顕微鏡観察

*fliK* 遺伝子をアラビノースによって誘導し、べん毛構築の有無を観察した。(A) アラビノース添加前。(B) アラビノース添加から 5 分後。(C) アラビノース添加から 10 分後。(D) アラビノース添加から 30 分後に観察を行った。染色には 1% リンタングステン酸溶液 (pH 7) を使用した。

## 第4章 摘要

多くのバクテリア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。FliK はフックの長さ制御にも関与している。

本研究で使用した、*flgE* 変異株 SJW2219 は 37 °C での培養でべん毛が構築されない、温度感受性という特徴を持つ。この変異株はフックの重合が遅いため、野生株には見られない構築途中のフック基部体構造の観察が可能であることが明らかとなった。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。

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野生株と比較して調べた結果、野生株のフックの平均長は、フックとフィラメントの連結領域 (HAP 領域) も含んだ長さであることが明らかとなった。

さらに、SJW2219 株の *flgM* 欠損株や *fliC* 過剰発現株を使った、37 °C 培養時の分泌タンパク質や免疫ブロットの結果から、FliK は大量に分泌するにもかかわらず FliC は発現しないことが分かった。

これらの結果から、*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、フックの長さ制御の分子メカニズムの一端が明らかとなった。

## 第5章 結論

FliK によるフックの長さ制御機構を明らかにすることを目的として、温度感受性 *flgE* 変異株 (SJW2219 株) のべん毛構築について研究を行った。第2章の電子顕微鏡による観察の結果、SJW2219 株はフックの重合が効率的に行われなため、野生株よりも短いフックが多く観察された。

電子顕微鏡による観察では、フックと HAP とフィラメントの境目の区別が困難であった。べん毛フィラメントとは付いた状態でフック長を計測する場合、フィラメントとフックとの境界から L リングを目印としてフックの終わりまでを計測する。このように、これまで私たちは HAP 領域を含めた長さをフックとして計測していたことが明らかとなった。実際のフック領域の平均長は、約 45 nm であることが本研究により初めて示された。更なる観察の結果、30 °C で培養した菌体から単離したべん毛のフックの平均の長さは、野生株と同じ 55 nm であった。しかし、酸処理によってべん毛フィラメントを脱重合させたフックの平均の長さは 45 nm と短くなった。

フック基部体の構成タンパク質の SDS-PAGE による解析から、酸処理によってフックとフィラメントの連結部である HAP 領域が失われていることが明らかとなった。HAP 領域が失われたことによってフックの長さが短くなったと示唆された。この結果は変異のあるフックと HAP 部分の相互作用が野生株よりも弱いことを示唆している。また、これらの結果から SJW2219 株はフックの重合とフックと HAP の相互作用の安定性に欠陥があることが示された。

*fliC* の発現はシグマ 28 に依存しており、フック基部体が完成するまでアンチシグマ 28 である FlgM によって抑制されている。また、FliK が菌体外へ分泌されることでべん毛フィラメント構築タンパク質の分泌へと輸送が切り替わることが分かっている。しかし、SJW2219 株において、37 °C 培養では FliK は大量に分泌されているにもかかわらず *fliC* の発現がほとんど見られなかった。第3章の結果から、37 °C 培養では FlgM が菌体外へ分泌していないことが明らかとなり、それが原因で *fliC* が発現しないことが示唆された。また、SJW2219 株から *flgM* を欠損株させた株を 37 °C で培養した時の分泌タンパク質と菌体内タンパク質の解析では、菌体内の FliC 量は増加したものの分泌量にはほとんど変化が見られず、べん毛数は増加しなかった。FliC タンパク質過剰発現株の解析においても、37 °C 培養では同様の結果が得られた。従って、未完成の短いフックからは FliK は輸送されても FliC は輸送されないことが明らかとなった。さらに、*fliK* 発現誘導の実験から、ポリフックからは常にべん毛フィラメントが構築されることが観察された。この結果から、FliK は産生される

と直ちにポリフックを通り、FliC に輸送を切り替えることが明らかになった。

実験結果からべん毛構築に関するタンパク質輸送についてまとめる。ロッド-フックタンパク質が輸送されている間は、FliK も輸送されるが FlgM は輸送されない。また、フラジェリン-HAP タンパク質が輸送されるときは FlgM が輸送されるが、FliK は輸送されない。ロッド-フックタンパク質からフラジェリン-HAP タンパク質への輸送ゲートの切り替えは FliK のみによって行われる (図.23)。以上のことから、FliK はべん毛フィラメントの構築が可能になる最小のフックの長さを計測し、輸送タンパク質を切り替えると考えられる。SJW2219 株のフック長の計測結果から、30 nm のフックからべん毛フィラメントの構築が観察されたため、フィラメント構築が可能になるフックの長さは 30 nm 以上であることが示唆された。

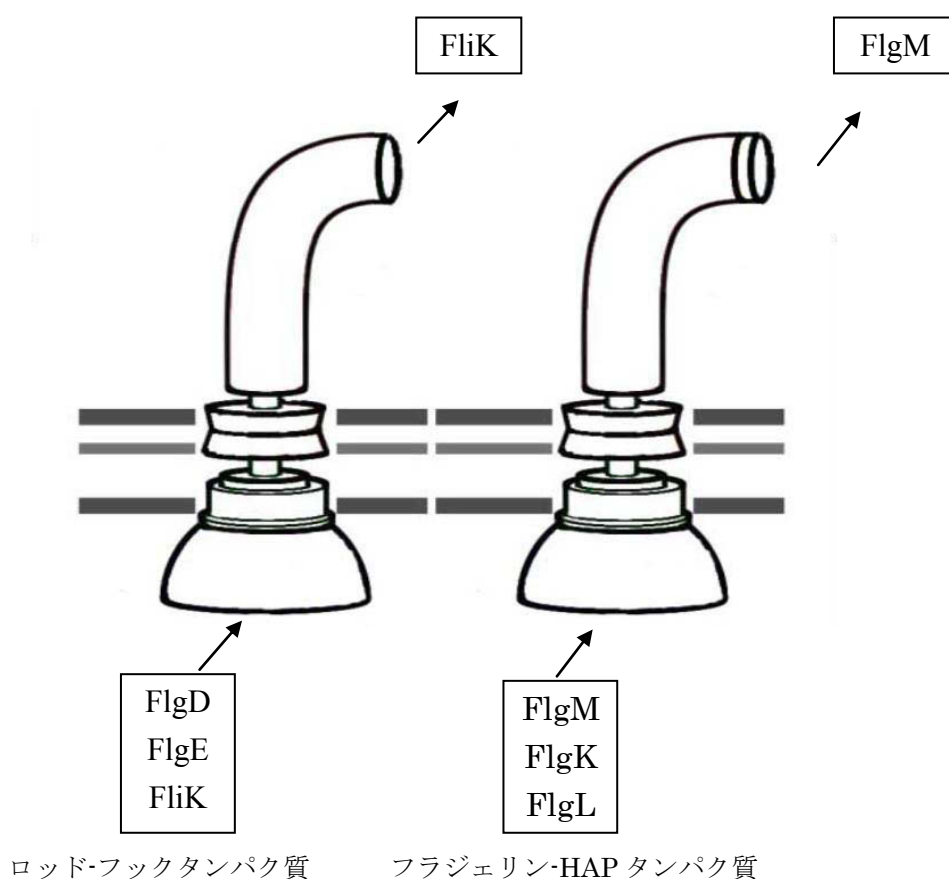


図 23. べん毛構築に関するタンパク質輸送のモデル

ロッド-フックタンパク質が輸送される間は FliK も輸送される。フックが 30 nm 以上構築すると、FliK によってロッド-フックタンパク質からフラジェリン-HAP タンパク質へ輸送が切り替えられる。



## 参考文献

- Aizawa, S.I, Dean, GE., Jones CJ., Macnab RM., Yamaguchi S. (1985) Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **161**, 836-849.
- Aizawa, S.I. (1996) Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* **19**, 1-5
- Aizawa, S.I. and Kubori, T. (1998) Bacterial flagellation and cell division. *Gene Cells.* **3**, 625-634.
- Aizawa S.I (2009) Flagella, P.393-403. *In* Encyclopedia of Microbiology. (Moselio Schaechter), Oxford: Elsevier
- Aizawa, S.I. (2012) Mystery of FliK in length control of the flagellar hook. *J. Bacteriol.* **194**, 4798-4800.
- Aldridge, P.D., Karlinsey, J.E., Aldridge, C., Birchall, C., Thompson, D., Yagasaki, J., Hughes, K.T. (2006) The flagellar-specific transcription factor, sigma28, is the Type III secretion chaperone for the flagellar-specific anti-sigma28 factor FlgM. *Genes Dev.* **20**, 2315-2316.
- Berg, H.C. (1995) Torque generation by the flagellar rotary motor. *Biophys J.* **68**, 163-167..
- Chilcott, G.S., Hughes, K.T. (1998) The type III secretion determinants of the flagellar anti-transcription factor, FlgM, extend from the amino terminus into the anti-sigma 28 domain. *Mol Microbiol.* **30**, 1029- 1040.
- Dreyfus, G., Williams, A.W., Kawagishi, I., Macnab, R.M. (1993) Genetic and biochemical analysis of FliI, a flagellar protein related to the catalytic subunit of the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant pathogens. *J. Bacteriol.* **175**, 3131-3138.
- Samatey, F.A., Matsunami, H., Imada, K., Nagashima, S., Shaikh, T.R., Thomas, D.R., Chen, J.Z., DeRosier, D.J., Kitao, A., Namba, K. (2004) Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature*, **431**, 1062-1068
- Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K., Aizawa, S.I. (1994) Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* **176**, 5439-5449.
- Hirano, T., Shibata, S., Ohnishi, K., Tani, T., Aizawa, S.I. (2005) N-terminal signal region of FliK is dispensable for length control of the flagellar hook. *Mol*

- Microbiol.* **56**, 346-360.
- Irikura, V.M., Kihara, M., Yamaguchi, S., Sockett, H., Macnab, R.M. (1993) *Salmonella typhimurium* *fliG* and *fliN* mutations causing defects in assembly rotation, and switching of the flagellar motor. *J Bacteriol.* **175**, 802-810.
- Jones, C.J., Macnab, R.M., Okino, H., Aizawa, S.I., (1990) Stoichiometric analysis of the flagellar hook- (basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **212**, 377-387.
- Katayama, E., Shiraishi, T., Oosawa, K., Baba, N., Aizawa, S.I. (1996) Geometry of the flagellar motor in the cytoplasmic membrane of *Salmonella typhimurium* as determined by stereo-photogrammetry of quick-freeze deep-etch replica images. *J Mol Biol.* **255**, 458-475.
- Komoriya K, Shibano N, Higano T, Azuma N, Yamaguchi S, Aizawa S-I (1999) Flagellar proteins and type III-exported virulence factors are the predominant proteins secreted into the culture media of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* **34**, 767-779.
- Konishi, M., Kanbe, M., McMurry, J.L., Aizawa, S.I. (2009) Flagellar formation in C-ring-defective mutants by overproduction of FliI, the ATPase specific for flagellar type III secretion. *J Bacteriol.* **191**, 6186-6191.
- Koroyasu, S., Yamazato, M., Hirano, T., Aizawa, S.I. (1998) Kinetic analysis of the growth rate of the flagellar hook in *Salmonella typhimurium* by the population balance method. *Biophys J.* **74(1)**, 436-443.
- Kubori, T., Shimamoto, N., Yamaguchi, S., Namba, K., Aizawa, S.I. (1992) Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol.* **226**, 433-446.
- Macnab, R.M. (1996) Flagella and motility. P.123-145. *In Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology.* Vol.1. Neidhardt, F.C, Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H.E. (eds) Washington, DC : American Society for Microbiology Press
- Minamino, T., Gonzalez-Pedrajo, B., Yamaguchi, K., Aizawa, S.I., Macnab, R.M. (1999) FliK, the protein responsible for flagellar hook length control in *Salmonella*, is exported during hook assembly. *Mol Microbiol.* **341**, 491-502.
- Minamino, T., Pugsley, A.P. (2005) Measure for measure in the control of type III secretion hook and needle length. *Mol Microbiol.* **56(2)**, 303-308.
- Minamino, T., Ferris H.U., Moriya, N., Kihara, M., Namba, K. (2006) Two parts of the T3S4 domain of the hook-length control protein FliK are essential for the

- substrate specificity switching of the flagellar type III export apparatus. *J Mol Biol.* **362 (5)**, 1148-1158.
- Mizuno, S., Amida, H., Kobayashi, N., Aizawa, S.I., Tate, S.I. (2011) The NMR structure of FliK, the trigger for the switch of substrate specificity in the flagellar type III secretion apparatus. *J Mol Biol.* **409**, 558-573.
- Mizusaki, H., Takaya, A., Yamamoto, T., Aizawa S.I. (2008) Signal pathway in the salt-activated expression of the SPI1/ type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* **190**, 4626-4631.
- Moriya, N., Minamino, T., Hughes, K.T., Macnab, R.M., Namba, K. (2006) The type III flagellar export specificity switch is dependent on FliK ruler and a molecular clock. *J Mol Biol.* **359**, 466-477.
- Muramoto, K., Makishima, S., Aizawa, S.I., Macnab, R.M. (1999) Effect of hook subunit concentration on assembly and control of length of the flagellar hook of *Salmonella*. *J Bacteriol.* **181**, 5805-5813.
- Shaikh, T.R., Thomas, D.R., Chen, J.Z., Samatey, F.A., Matsunami, H., Imada, K., Namba, K., and Derosier, D.J. (2005) A partial atomic structure for the flagellar hook of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**, 1023-1028.
- Shibata, S., Takahashi, N., Chevance, F.F., Karlinsey, J.E., Hughes, K.T., Aizawa, S.I. (2007) FliK regulates flagellar hook length as an internal ruler. *Mol Microbiol.* **64**, 1404-1415.
- Takahashi, N., Mizuno, S., Hirano, T., Chevance, F.F., Hughes, K.T., Aizawa, S.I. (2009) Autonomous and FliK-dependent length control of the flagellar rod in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **191**, 6469-6472.
- Ueno, T., Oosawa, K., Aizawa, S.I. (1994) Domain structures of the MS ring component protein (FliF) of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol.* **236(2)**, 546-55
- Yamaguchi, S., Fujita, H., Taira, T., Kutsukake, K., Homma, M., Iino, T. (1984) Genetic analysis of three additional fla genes in *Salmonella typhimurium*. *J Gen Microbiol.* **130 (12)**, 3339-3342.
- Yamaguchi, S., Aizawa, S.I., Kihara, M., Isomura, M., Jones, C.J., Macnab, R.M. (1986) Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **168**, 1172-1179.
- Williams, A.W., Yamaguchi, S., Togashi, F., Aizawa, S.I., Kawagishi, I., Macnab, R.M. (1996) Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **178**, 2960-2970.

## 謝辞

本研究を行うに当たり、終始御指導・御教示賜りました県立広島大学生命環境学部生命科学科の相沢慎一教授に厚く御礼申し上げます。菌株を提供して頂いたユタ大学の Kelly T. Hughes 教授に深く感謝致します。博士論文を執筆するに当たり、御指導・御教示賜りました県立広島大学環境学部の奥尚教授、小西博昭教授、森永力教授に厚く御礼申し上げます。

最後に県立広島大学生命環境学部生命科学科の相沢研究室の皆様にも深く感謝致します。