

2P125

インフルエンザ・ヘマグルチニン・タンパク質に特異的に結合するRNA アプタマー

Penmetcha Kumar, 西川 諭, 〇川崎 一則 (産総研・生物機能工学)

標的物質に対して特異的に結合する人工核酸リガンドをアプタマーと呼ぶ。ウイルス表面のタンパク質に対して特異的なアプタマーが開発できれば、ウイルス研究やウイルス対策に有用と期待される。

我々は、ランダムな配列 (長さ 30 塩基) をコアに含む RNA (全長 74 塩基) のプールの中から、インフルエンザウイルスに結合する RNA アプタマーの選別を行った。標的はインフルエンザ A/Panama/2007/1999(H3N2) 株を用いた。この A/Panama 株には結合するが、対照とした A/Aichi/2/1968(H3N2) 株には結合しない RNA を回収し増幅させる、という交差選別を 10 サイクル繰り返し、得られた RNA プールから RNA をクローニングし塩基配列を決定した。特にウイルスへの結合性が高い 2 種類の RNA、P30-10-1 と P30-10-16 は、どちらも A/Panama 株から精製した膜タンパク質ヘマグルチニンには結合するが、A/Aichi 株のヘマグルチニンには結合しないことが示された。また、P30-10-1 と P30-10-16 は、ともに A 型インフルエンザウイルスの別の亜型 H1N1 や B 型インフルエンザウイルスには結合しなかった。

以上の結果より、2 種類の RNA、P30-10-1 と P30-10-16 はインフルエンザウイルス A/Panama/2007/1999(H3N2) 株のヘマグルチニンに特異的に結合する RNA アプタマーであることが明確にされた。抗インフルエンザ RNA アプタマーは、今後、ウイルスの種、型、亜型、株などを識別したりウイルスタンパク質を検出するプローブとして利用可能であろう。また、ウイルス膜タンパク質の生物活性への効果が明らかになれば、抗ウイルス薬やウイルス機能の研究試薬としての可能性も拓かれる。

K.Penmetcha, S. Nishikawa, K. Kawasaki : RNA aptamer specific for influenza hemagglutinin protein

2P127

べん毛モーターの回転機構

〇真下 拓史, 山口 滋, 相沢 慎一 (JST CREST)

バクテリアのべん毛モーターの回転を直接見る方法にテザードセル法がある。ガラス表面にべん毛の抗体を付着させ、そこに生菌のべん毛が結合すると菌体が回転しているのを観察することができる。バクテリアのべん毛は通常左巻きでありべん毛モーターは順転をしている。抗体を介せずに直接ガラスにべん毛を固定してもテザードセルを作ることができる。この場合菌体は通常とは逆の回転をする。逆転現象の原因を探るためにガラスの表面に加工をしてプラスの帯電、親水性、疎水性等の条件下でのテザードセルを観察した。またフックの長さが異なるミュータントを使用してガラスからの距離を変えて観察した。その結果べん毛やフックの抗原とガラスに付着させた抗体が一致した場合のみべん毛モーターの回転が正常でありそれ以外の条件では逆転することがわかった。この実験には *che* 遺伝子が無くべん毛モーターが一方にしか回転しないミュータント SJW3076 を使用した。またべん毛モーターのどのような部分に逆転させる作用が働いているかを調べるために *fliG*, *fliM*, *fliN*, *che* の変異体を使用して抗体法とガラス表面でのテザードセルの回転を比較した。この結果どのミュータントにおいても抗体を使った場合と使わない場合では回転が逆になることが確認された。この逆転現象の原因を探ることでべん毛モーターが回転しているのはどのような状態なのか、逆転するというのはどのような状態なのかについて新しい知見が得られるのではないだろうか。

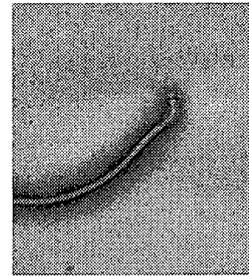
T.Mashimo S.Yamaguchi S.Aizawa : The flagellar motor of tethered cells.

2P126

Azospirillum brasilense のべん毛基部体の解析

〇齋藤 崇¹, 水崎 秀明², 相沢 慎一³ (¹長岡技科大, ²名古屋市大院, ³JST,CREST)

Azospirillum brasilense は土壌に住むグラム陰性細菌である。小麦や豆科の植物、芝などの根に根粒を作って窒素固定をしているので農作物の成長にとって重要な共生細菌である。この菌は細胞外にポリサッカライド (EPS) を放出し菌体を覆い、菌体同士が凝集することにより乾燥に強い性質がある。*A. brasilense* は培地の条件でべん毛の生え方が変わる。液体培地で育てるとその極に一本長いべん毛 (極単毛) を持つが、半固形培地で育てると、菌体の周りにたくさんのべん毛 (側毛) を持つようになる。また極単毛のべん毛については、糖鎖修飾している。我々は今回、液体培地で育て *A. brasilense* から、培地に放出されたべん毛を透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、極単毛のべん毛を基部体ごと放出するという現象が観察された。この基部体には 2 組の Ring 構造と Hook がついていた。また Hook の周りに膜状構造が付着している。現在、我々はなぜ菌体に何も手を加えていないのに、べん毛が基部体ごと放出されるのかを調べている。

T.Saito H.Mizusaki S.Aizawa : Purification and characterization of the flagellar basal body of *Azospirillum brasilense*.

2P128

サルモネラ菌べん毛モーターの固定子を形成する MotA/MotB 複合体の精製

〇小嶋 誠司¹, 南野 徹¹, 難波 啓一^{1,2} (¹JST・ICORP・超分子ナノマシン, ²阪大・院・生命機能)

細菌べん毛は、細胞外へ長く伸びたらせん状のべん毛繊維と、それを回転させる細胞膜上に埋められたモーター (基部体) から成る運動器官で、巨大なタンパク質分子複合体である。べん毛モーターは、細胞膜の内外に形成されるプロトンまたはナトリウムイオンの電気化学ポテンシャル差をエネルギー源とし、固定子の中をイオンが流れる際に回転力が発生する。このエネルギー変換機構はほとんど分かっていないが、固定子にプロトンが作用する際の固定子内構造変化によりトルクが発生するモデルが提唱され、それを支持する結果が報告されている。本研究は、固定子を形成する MotA/MotB 複合体の生化学的な性質を明らかにし、*in vitro* での活性測定系を確立することを目的として行われた。

サルモネラ菌 MotA/MotB 複合体は、べん毛モーター中でプロトンを流しそのエネルギーをトルクに変換しているが、複合体のみを介したイオン流の測定はまだ行われていない。そこで、まず MotA/MotB 複合体を精製し、膜小胞中に再構成することから始めた。複合体の精製は当研究室ですで行われていたが、これまでに報告されている大腸菌の MotA/MotB 複合体、および Na⁺ 駆動型の PomA/PomB 複合体の精製標品に比べて、かなりサイズの大きなものが単離されていた。また収量も少なかった。そこで、大量発現系を再検討して、発現量を上昇させるとともに、MotA の C 末端領域に His タグを導入し、精製を簡便化した。また細胞膜に似た構造を持つ界面活性剤 dodecylphosphocholine を可溶性に用いることで、サイズも PomA/B 複合体に近いものが単離されるようになった。年会ではこれら及び複合体再構成へ向けての実験結果を議論したい。

S. Kojima, T. Minamino and K. Namba : Purification of the MotA/MotB stator complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*