

KRZYSZTOF SKOWRONEK

Zakład Biochemii Mięśni

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: kskowro@nencki.gov.pl

MOTORY ROTACYJNE BAKTERII

Dla małych jednokomórkowych organizmów żyjących w zmiennym i zróżnicowanym przestrzennie środowisku, takim jak gleba, naturalne zbiorniki wodne lub przewód pokarmowy zwierząt, zdolność do przystosowania się, a co za tym idzie również umiejętność przetrwania zależy w dużej mierze od wyboru optymalnego środowiska, a więc od zdolności do jego odnajdywania i przemieszczania się. W królestwie Prokaryota istnieje kilka sposobów przemieszczania się. Sinice poruszają się ruchem ślizgowym wyłącznie po podłożu stałym. Ruchliwe są tylko niektóre formy komórek - hormogonia (krótkie odcinki łańcucha komórek powstałe w wyniku rozerwania) i beocyty (grupy małych komórek reprodukcyjnych otoczonych wspólną ścianą komórkową). Ruch sinic wywo-

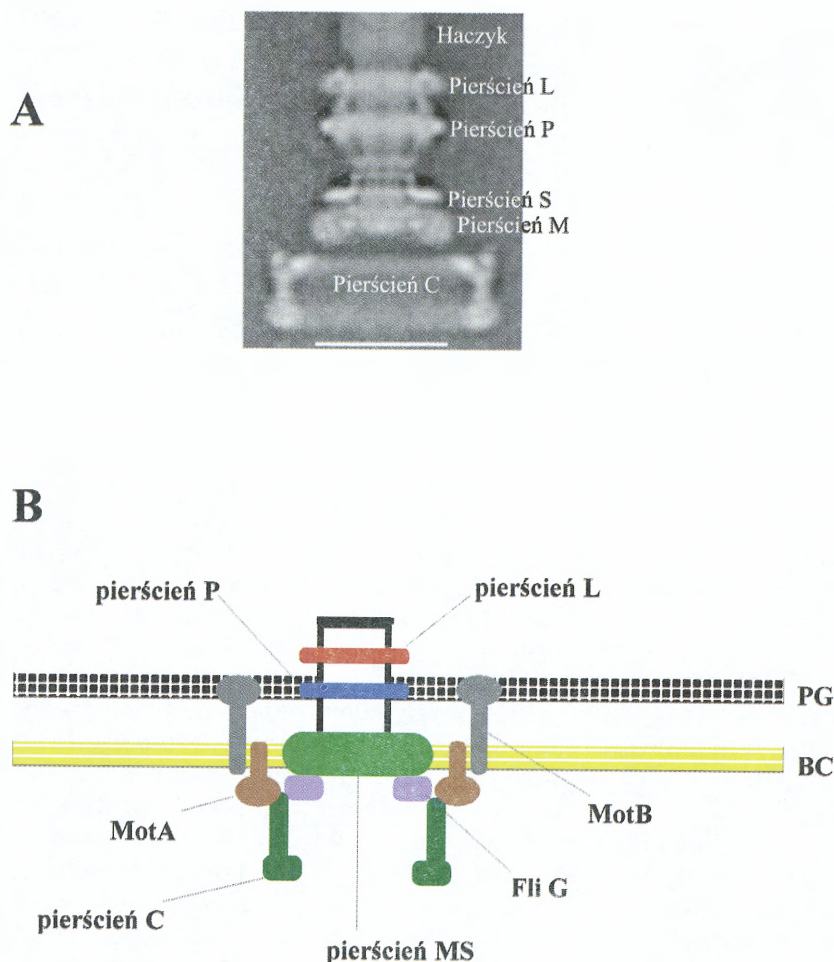
łany jest rotacją wokół podłużnej osi. Mechanizm tego ruchu nie jest znany. Sugeruje się, że wywołany jest on przez skręcanie helikalnych fibryl położonych w ścianie komórkowej sinic.

Bakterie śluzowe przemieszczają się ruchem ślizgowym dzięki ukierunkowanemu wydzielaniu śluzu. Większość bakterii porusza się jednak dzięki rotacji rzęsek, długich fibrylarnych struktur zewnątrzkomórkowych, których dystrybucja na powierzchni komórki stanowi jedną z cech różnicujących poszczególne grupy bakterii. Rzęski bakteryjne są tworami całkowicie odmiennymi od znacznie większych i bardziej złożonych rzęsek eukariontów. Zasadniczo różny jest również mechanizm działania obu tych struktur.

BUDOWA I RUCH RZĘSKI

Rzęski *Escherichia coli* to helikalnie skręcone struktury o długości 5–10 μm i średnicy ok. 20 nm (NAMBA i współaut. 1989). Jednostka helikalna rzęski ma ok. 2 μm długości. Całkowita masa pojedynczej rzęski wynosi ok. 1×10^9 daltonów. Zasadniczą, zewnętrzną część rzęski tworzy cylinder zbudowany z helikalnie ułożonych cząsteczek białka zwanego flageliną (FliC) o masie cząsteczkowej 51,2 kDa (497 aa). Pojedynczą rzęskę tworzy ok. 20 000 podjednostek FliC. Rzęska jest strukturą dość sztywną, co powoduje, że niełatwo ulega odkształceniu w płaszczyźnie poprzecznej. W powłokach komórki bakteryjnej zakotwicza ją ciało podstawowe, złożona struktura, której zasadniczą budowę poznano dzięki obserwacjom w mikroskopie elektronowym (Ryc. 1). Włókno rzęski połączone jest z ciałkiem podstawowym za pomocą haczy-

ka, elastycznego odcinka o charakterystycznym kształcie, długości ok. 55 nm. Zbudowany jest on z około 130 podjednostek białka FlgE. Za połączenie włókna z haczykiem odpowiadają dwa białka łączące, FlgK i FlgL (HOMMA i IINO 1985, HOMMA i współaut. 1985). Ciało podstawowe składa się z centralnej cylindrycznej części stanowiącej jak gdyby przedłużenie włókna rzęski (ta część, podobnie jak włókno rzęski, wykazuje strukturę helikalną) i z pierścieni otaczających ten cylinder. U bakterii gramujemnych są to kolejno: pierścień L położony w błonie zewnętrznej, pierścień P w warstwie peptydoglikanu, pierścień S w przestrzeni peryplazmatycznej, pierścień M w błonie cytoplazmatycznej oraz pierścień C położony po wewnątrzkomórkowej stronie błony cytoplazmatycznej i bezpośrednio kontaktujący się z pierścieniem



Ryc. 1. Budowa ciała podstawowego rzęski bakteryjnej.

A. Obraz z mikroskopu elektronowego. Biała linia na dole odpowiada długości 25 nm (DEROSIER 1998; za zgodą Elsevier Science). B. Schemat budowy ciała podstawowego. PG — peptydoglikan; BC — błona cytoplazmatyczna.

M. Białka tworzące poszczególne elementy ciała podstawowego i ich stechiometrię przedstawia Tabela 1. Bakterie gramododatnie nie mają dwu zewnętrznych pierścieni (L i P), co sugeruje, że nie są one potrzebne do funkcjonowania rzęski, a służą jedynie do właściwego mocowania w błonie zewnętrznej. Uważa się, że pierście-

Tabela 1. Białka ciała podstawowego rzęski (wg. MACNABA 1996)

Struktura	Białka	Masa cząsteczkowa (kDa)	Liczba cząstek w jednym ciałku podstawowym
oś zewnętrzna	FlgG	28	26
pierścień L	FlgH	22	26
pierścień P	FlgI	36	26
oś wewnętrzna	FlgB	16	6
	FlgC	28	6
	FlgF	26	6
pierścień MS	FliF	61	26
pierścień C	FliM	38	34
	FliN	15	34
	FliG	37	26
sator	MotA	32	8–11 (?)
	MotB	34	8–11 (?)

nie M i S służą jako miejsce połączenia rzęski z motorem rotacyjnym i są trwale połączone z osią tworzoną przez wewnętrzny cylinder ciała podstawowego, haczyk i rzęskę, a co za tym idzie uczestniczą w ruchu obrotowym całej rzęski. Natomiast pierścienie L i P pozostają nieruchome i są połączone ze ścianą komórkową. Tworzą one rodzaj łożyska izolującego obracającą się oś od ściany komórkowej (MACNAB 1996).

Rzęska bakteryjna wykonuje do 100000 obrotów na minutę umożliwiając komórce przemieszczanie się z szybkością do kilkuset mikrometrów na sekundę. U najlepiej poznanych pod tym względem bakterii *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*, stanowiących organizmy modelowe w badaniach nad motorami rotacyjnymi bakterii, rzęski wykonują do 18 000 obrotów na minutę nadając komórkom bakterii prędkości do 30 $\mu\text{m/s}$. Urzęsione bakterie pokonują w ciągu minuty odległość 300–3000 razy większą od długości własnej komórki.

Aby spełniać swą biologiczną rolę, ruch komórki bakteryjnej nie może odbywać się w przypadkowym kierunku, ale w kierunku optymalnego środowiska. Zjawisko to nazywamy taksją.

Mechanizmem sprzęgającym informacje o stanie środowiska z kierunkiem ruchu jest kontrola częstotliwości zmian kierunku ruchu obrotowego rzęski. Przez większość czasu rzęski obracają się w kierunku przeciwnym do ruchu wskazówek zegara. Ponieważ rzęska ma kształt lewoskrętnej helisy, ten kierunek obrotu powoduje przemieszczanie się ruchu obrotowego w kierunku od ciała komórki do końca rzęski. Taki kierunek obrotu sprawia również, że rzęski bakterii orzęsionych na całej powierzchni (orzęsienie peritrichalne), tak jak *E. coli*, skręcają się w pojedynczą wiązkę skierowaną wzdłuż długiej osi komórki i wspólnie generują powstanie siły odpychającej. Efektem jest ruch komórki bakteryjnej zbliżony do prostoliniowego.

Jednak, co jakiś czas następuje zmiana kierunku obrotu rząsek (na zgodny z ruchem wskazówek zegara). Zmiana kierunku ruchu wywołuje zmianę strukturalną w filamencie rzęski. Poczynając od podstawy, rzęska przechodzi w konformację prawoskrętną (zmiana na poziomie obserwacji mikroskopowej, a nie na poziomie struktury molekularnej), co wywołane jest dwukrotnie większym skreśleniem helisy (stąd nazwa tej konformacji, curly czyli skręcony). Powoduje to postępujący rozpad wiązki powstałej przy obrotach przeciwnych do wskazówek zegara. Jednocześnie rzęski przejściowo składają się z dwu odcinków o różnych konformacjach i różnym kierunku skręcenia, co wywołuje „koziółkowanie” (ang. tumbling) komórki, tj. gwałtowną, przypadkową zmianę kierunku ruchu. Molekularny mechanizm tych przemian stanowią zmiany w oddziaływaniach pomiędzy sąsiadującymi podjednostkami flageliny w protofilamencie rzęski (SAMATEY i współaut. 2001).

Choć dla obu konformacji dystans pomiędzy kolejnymi cząsteczkami flageliny jest bardzo zbliżony (różnica wynosi zaledwie 0,8 Å), to konformacja oddziałujących ze sobą domen zmienia się gwałtownie.

Częstotliwość koziółkowania maleje wraz ze zbliżaniem się do korzystnego środowiska. Innymi słowy, oddalanie się od korzystnego środowiska zwiększa częstotliwość zmiany kierunku ruchu, jeśli zaś ruch przybliży do środowiska o korzystnym charakterze, częstość zmian kierunku ruchu maleje. Należy przy tym zaznaczyć, że chociaż zmiana kierunku obrotu poszczególnych rząsek nie jest skoordynowana, to częstość przechodzenia do obrotów w kierunku zgodnym ze wskazówkami zegara (czyli częstość koziółkowania) jest dla wszystkich rząsek komórki w danym momencie taka sama (ISHIHARA i współaut. 1983, MACNAB i HAN 1983).

Końcowym przekaźnikiem regulującym częstość przechodzenia rzęski w rotację o kierunku zgodnym ze wskazówkami zegara jest białko CheY, które jest aktywowane przez fosforylację reszty D57 (SANDERS i współaut. 1989). W formie aktywnej białko CheY zwiększa częstość „koziółkowania” poprzez oddziaływanie ze składnikami bakteryjnego motoru rotacyjnego, tzw. kompleksem przełącznikowym (ang. switch complex), tj. białkami FliG i FliM. Mechanizm koordynacji różnorodnych sygnałów natury fizycznej i chemicznej informujących o parametrach środowiska jest dość dobrze poznany na poziomie molekularnym (EISENBACH 1996, GOUDREAU i STOCK 1998, SILVERSMITH i BOURRET 1999), jednak jego omawianie przekracza ramy niniejszego artykułu.

SKŁADNIKI MOTORU ROTACYJNEGO

Fenotypy mutacji inaktywujących ruchliwość komórek *Salmonella typhimurium*, a co za tym idzie również geny (i ich produkty białkowe) odpowiedzialne za ruch rzęski, podzielono na trzy zasadnicze klasy: Fla⁻ — brak rząsek o prawidłowej morfologii (geny leżą w trzech regionach chromosomu nazwanych odpowiednio flg, flh i fli); Mot⁻ — rzęski zachowują normalną morfologię, ale nie poruszają się; Che⁻ — rzęski obracają się, ale występują zaburzenia kontroli częstotliwości zmiany kierunku obrotu (a co za tym idzie, taksji). Obecnie znamy około 40 genów klasy pierwszej, dwa klasy drugiej (*motA* i *motB*) oraz 6 genów *che*.

Niektóre mutacje trzech genów położonych w regionie fli (*fliG*, *fliM* i *fliN*), choć nie wykazują wpływu na morfologię rzęski, wykazują jednak

fenotypy Mot⁻ (*fliG* i *fliN*) i Che⁻ (we wszystkich trzech genach). Produktami tych genów są białka cytoplazmatyczne o masach cząsteczkowych odpowiednio 36,8 kDa (331 aa), 37,8 kDa (334 aa) i 14,9 kDa (137 aa). Białko FliG lokalizuje się w ciałku podstawowym po cytoplazmatycznej stronie pierścienia M tworząc wyraźnie widoczną wypustkę na obwodzie tego pierścienia skierowaną do wewnątrz komórki (Ryc. 1). Jest ono połączone z białkiem FliF, wchodzącym w skład pierścienia M i S i tworzącym tuleję wokół części osiowej na poziomie błony cytoplazmatycznej oraz po jej zewnętrznej stronie w przestrzeni peryplazmatycznej. Białka FliM i FliN tworzą cytoplazmatyczny pierścień C, zakończenie ciałka podstawowego. Białko FliM wiąże się z białkiem FliN za pośrednictwem swej do-

meny C-końcowej, natomiast w wiązaniu FliG uczestniczą liczne segmenty FliM położone zarówno w części N-końcowej, jak i w C-końcowej (MATHEWS i współaut. 1998). Z aktywną formą CheY oddziałuje 16 aa z N-końca FliM (BREN i EISENBACH 1998).

Należy zaznaczyć, że rola każdego z białek: FliG, FliM i FliN, w generacji ruchu rzęski może nie być równie ważna. Sugerują to różne efekty ich mutacji. Mutacje o fenotypie Mot⁻ i Che⁻ w białku FliN lokalizują się w 87 resztach w pobliżu końca karboksylowego. Spośród znanych mutacji białka FliM większość to mutacje Che⁻. W przypadku obu tych białek fenotyp Mot⁻ mutantów jest częściowo znoszony przez nadprodukcję zmutowanych białek (LLOYD i współaut. 1996). Inaczej niż w przypadku FliM i FliN, fenotyp Mot⁻ mutantów *fliG* utrzymuje się nawet przy nadprodukcji zmutowanej wersji białka. Sugeruje to, że o ile białka FliM i FliN pełnią w motorze rzęskowym funkcje strukturalne, to

białko FliG wydaje się bezpośrednio uczestniczyć w generacji ruchu.

Dwa inne białka tworzące motor rotacyjny bakterii to MotA (32,0 kDa, 295 aa) i MotB (34,2 kDa; 308 aa). Są one nieobecne w preparatach izolowanych rzęsek, natomiast są widoczne w preparatach ściany komórkowej uzyskanych metodą zamrażania-rytowania, jako 11 wypustek otaczających pierścienie M i S ciała podstawowego (KHAN i współaut. 1988). Uważa się, że ogólny plan budowy motoru rotacyjnego bakterii przypomina nieco turbinę, tj. składa się z części ruchomej — rotora, połączonej trwale z rzęską, która jest osadzona w środku nieruchomej tulei — stojana (statora), łączącej się z warstwą peptydoglikanu w ścianie komórkowej. Kompleks białek MotA i MotB tworzy stator. Rolę rotora pełnią kontaktujące się ze statorem elementy ciała podstawowego, białka FliM, FliG i FliN.

FliG

W zależności od położenia, mutacje genu *fliG* wykazują fenotyp Mot⁻ (C-terminalna połowa białka) lub Che⁻ (środkowy odcinek sekwencji aminokwasowej) (IRIKURA i współaut. 1993). Jedynie około 56 reszt aminokwasowych, położonych na końcu aminowym FliG, wydaje się nie mieć istotnego znaczenia dla funkcji białka. Większość znanych mutacji *fliG* o fenotypie Mot⁻ polega na zmianie aminokwasów niepolarnych na polarne lub prolinę. Przypuszczalnie efekt tych mutacji polega na zaburzeniu ogólnej struktury białka, a nie na selektywnej inaktywacji funkcji motorycznej (IRIKURA i współaut. 1993, LLOYD i BLAIR 1997). Analiza efektów delecji poszczególnych fragmentów FliG wskazuje, że część N-końcowa odpowiada za wiązanie się z białkiem FliF, tworzącym zrąb pierścienia M (KIHARA i współaut. 2000). Pojedyncze podstawienia naładowanych reszt R279, D286 i D287, silnie konserwowanych w białkach FliG różnych organizmów i położonych w C-terminalnej helisie α , resztami niepolarnymi, choć zmniejsza znacznie szybkość rotacji rzęski, to nie znosi jej całkowicie. Stąd przyjmuje się, że żadna z tych reszt nie jest bezpośrednio zaangażowana

w przenoszenie protonów, chociaż prawdopodobnie są one kluczowe dla funkcjonowania motoru (LLOYD i BLAIR 1997, ZHOU i BLAIR 1997, ZHOU i współaut. 1998a). Sugeruje to również struktura krystalograficzna C-terminalnej domeny FliG (LLOYD i współaut. 1999). Wymienione powyżej trzy kluczowe aminokwasy są eksponowane na krawędzi cząsteczki FliG i w motorze rzęskowym są przypuszczalnie skierowane w stronę białka MotA. Ponieważ nie wydaje się, by wszystkie 3 istotne, naładowane aminokwasy FliG mogły kontaktować się z dwoma istotnymi aminokwasami MotA podczas obrotu pierścieni C i M, zaproponowano model, według którego zmiana kierunku obrotu rzęski wywołana jest zmianą kąta ustawienia FliG wobec MotA. Ta zmiana konformacyjna zmienia układ oddziaływań pomiędzy FliG–MotA. Podsumowując, wyniki badań różnych mutacji genu *fliG* wskazują na bezpośredni udział produktu tego genu w generacji ruchu obrotowego i w zmianie kierunku obrotu (MARYKWAŚ i BERG 1996, TOGASHI i współaut. 1997). W tym drugim przypadku FliG współdziała z FliM i CheY.

BIAŁKA MotA I MotB

Wszystkie znane mutacje genów *motA* i *motB* wykazują wyłącznie fenotyp Mot⁻. Innymi słowy, żadna z nich nie wpływa na morfologię rzęsek lub zdolność do taksji, a wyłącznie na zdolność bakterii do ruchu. Przywrócenie ru-

chu rzęsek w komórkach pozbawionych białka MotA lub MotB, za pomocą kontrolowanej ekspresji brakującego białka, odbywa się w kilku wyraźnych krokach (BLOCK i BERG 1984, BLAIR i BERG 1988). Ponieważ liczba tych etapów może

sięgać 8, uważa się, że białka MotA i MotB tworzą do ośmiu niezależnych elementów generujących ruch obrotowy.

Białko MotA zawiera cztery odcinki transmembranowe, które jak się wydaje, tworzą kanał przepuszczający protony i dwie domeny cytoplazmatyczne o wielkości 120 aa i 63 aa (DEAN i współaut. 1984). Jest to kanał błonowy dla protonów i najprawdopodobniej odpowiada za sprzężanie ich przepływu z wytwarzaniem momentu obrotowego przez motor. Pętle peryplazmatyczne łączące domeny transmembranowe są krótkie. O ile efekty mutacji w domenach transmembranowych są znaczące (znaczące upośledzenie lub eliminacja zdolności do ruchu, zaburzenie przepływu protonów), to mutacje w domenach cytoplazmatycznych wykazują pełne spektrum nasilenia efektów fenotypowych, od spowolnienia ruchu do jego całkowitej eliminacji, przy czym transport protonów wydaje się nie zaburzony (ZHOU i BLAIR 1997). Najistotniejsze dla funkcji motorycznej MotA wydają się reszty R90 i E98 w domenie cytoplazmatycznej oraz P173 i P222 położone w miejscu przejścia domeny cytoplazmatycznej w transmembranową. Rzęski mutantów o spowolnionym ruchu komórek charakteryzują się normalnym momentem obrotowym przy niskiej szybkości obrotów. Przy większej częstotliwości obrotów moment obrotowy jest niższy niż w

rzęskach komórek typu dzikiego. Różnice w efektach fenotypowych mutacji tych dwu regionów białka MotA wskazują, że pełnią one odrębne funkcje: domeny transmembranowe tworzą kanał dla protonów, natomiast domeny cytoplazmatyczne uczestniczą w etapie wykorzystania przepływu protonów do generacji ruchu.

MotB składa się z krótkiego N-terminalnego odcinka cytoplazmatycznego (27 aa), pojedynczego odcinka transmembranowego (21 aa) i dużej domeny peryplazmatycznej odpowiedzialnej za wiązanie się z peptydoglikanem w ścianie komórkowej (260 aa) (STADER i współaut. 1986, CHUN i PARKINSON 1988). Wydaje się, że główną funkcją białka MotB jest zakotwiczenie statora tworzonego przez białka MotA i MotB w peptydoglikanie. Kompleks MotA/MotB powstaje dzięki oddziaływaniom domen transmembranowych obu białek. Mutacje genu *motB* są zlokalizowane w sekwencji kodującej domenę transmembranową oraz peryplazmatyczną i zazwyczaj związane są z całkowitą inaktywacją motoru. To, że niektóre z mutacji *motB* są supresjonowane przez dodatkowe mutacje w genach *motA*, *fliG* lub *fliM* (GARZA i współaut. 1996) może wskazywać, iż oprócz wiązania statora ze ścianą komórkową białko MotB odpowiada również za właściwe wzajemne ułożenie składników motoru i wraz z białkiem MotA tworzy kanał dla protonów.

ŹRÓDŁO ENERGII — GRADIENT POTENCJAŁU ELEKTROCHEMICZNEGO

Źródłem energii wykorzystywanej do napędzania motoru rotacyjnego rzęski jest gradient potencjału elektrochemicznego na zewnątrz i wewnątrz błony cytoplazmatycznej. U *Bacillus subtilis*, *Spreptococcus*, *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium* wykazano, że motor rotacyjny napędzany jest gradientem protonów po obu stronach błony cytoplazmatycznej (LARSEN i współaut. 1974, MANSON i współaut. 1977, MATSURA i współaut. 1977, GLAGOLEV i SKULACHEV 1978, CHUN i PARKINSON 1988). Efekty mutacji genów *motA* i *motB* wskazują, że kanał dla przepływu protonów napędzającego motor rzęski tworzą transmembranowe domeny produktów białkowych tych genów (BLAIR i BERG 1990, STOLZ i BERG 1991, GARZA i współaut. 1995, SHARP i współaut. 1995a,b). Istotnych informacji dotyczących funkcji białek MotA i MotB dostarczyły badania przy użyciu systematycznej mutagenyzy prowadzącej do substytucji poszczególnych aminokwasów tryptofanem, a więc wprowadzające duży hydrofobowy aminokwas (SHARP i współaut. 1995a,b). Ich wyniki wskazują, że mutacje zmieniające stru-

kturę przestrzenną i charakter hydrofilowy potencjalnie transmembranowych helis α białka MotA, zaburzając funkcje kanału protonowego, inaktywują ruch rzęski. Również mutacje wprowadzone w białku MotB w odcinku transmembranowym (w pobliżu końca peryplazmatycznego) zaburzają funkcjonowanie kanału. Wbrew wcześniej proponowanym modelom (ELSTON i OSTER 1997), nie wydaje się, żeby protony poruszały się przez kanał w sposób „skwantowany”, poprzez przeskakiwanie pomiędzy kolejnymi wiązającymi je aminokwasami domen transmembranowych MotA i MotB. Przeczy temu fakt, że jak wskazują wyniki mutagenyzy białek tworzących motor, tylko jeden aminokwas o odpowiednim charakterze chemicznym i wysokim stopniu konserwacji u różnych mikroorganizmów, D32 białka MotB, jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania motoru (ZHOU i współaut. 1998a). Na razie nie są znane żadne szczegóły dotyczące mechanizmu sprzęgającego przepływ protonów z ruchem rotacyjnym. Przypuszcza się, że przepływ ten wywołuje zmiany konformacyjne białka MotA, które są odpowie-

działne z kolei za zmianę oddziaływań z innymi komponentami motoru (przede wszystkim FliG) wywołującymi ruch (LLOYD i współaut. 1996, 1999; LLOYD i BLAIR 1997; ZHOU i BLAIR 1997; ZHOU i współaut. 1998b).

Liczna grupa bakterii posiada motory rzęskowe napędzane gradientem nie protonów, a jonów Na^+ . Najlepiej poznane są motory rzęskowe niektórych przedstawicieli rodzaju *Vibrio* (DIBROV i współaut. 1986, HIROTA i IMAE 1983). Rzęski napędzane przepływem jonów sodowych wykazują znacznie większą szybkość. Dochodzi ona do 1700 obrotów na sekundę. W skład statora w motorach napędzanych gradientem Na^+ wchodzi cztery białka: MotX, MotY, PomA i PomB. Białka PomA i PomB wykazują wysoką homologię zarówno na poziomie sekwencji, jak i struktury domenowej z białkami, odpowiednio, MotA i MotB wchodzącymi w skład motorów napędzanych gradientem protonów. Białka MotX i MotY to białka błonowe zawierające pojedynczy segment transmembranowy (OKUNISHI i współaut. 1996). Białko MotY na końcu karboksylowym zawiera motyw wiążący się z peptydoglikanem (podobnie jak MotB). Ponieważ nadprodukcja MotX w *E. coli* hamuje wzrost bakterii w podłożu o wysokiej zawartości Na^+ i efekt ten znosi amilorid, inhibitor kanałów sodowych, białko to niewątpliwie współuczestniczy w funkcjonowaniu kanału sodowego (McCARTER 1994). Jednocześnie MotX odpowiada za błonową lokalizację MotY. W peryplazmatycznych pętlach białka PomA (szczególnie w pętli₃₋₄ w pozycjach 169–175) lokują się mutacje inaktywujące motor (ASAI i współaut. 2000a). Ponieważ jednocześnie reaktywność reszty 170 w mutancie D170C zmienia się w zależności od stężenia Na^+ , wydaje się, że reszta D170 (w PomA typu dzikiego) jest skierowana w stronę kanału i kontaktuje się z Na^+ . Niska reaktywność reszt cysteinowych wprowadzonych w miejsce aminokwasów pętli₁₋₂ wskazuje, że region ten może być „przykryty” innym białkiem, np. PomB, MotX lub MotY, lub, że jest położony wewnątrz kanału sodowego. W pozycji 31 PomA (pętla₁₋₂) jedyna tolerowana substytu-

cja to D31E, co wskazuje, że ujemny ładunek w tej pozycji ma zasadnicze znaczenie dla przepływu jonów Na^+ (KOJIMA i współaut. 2000). Przymuszczenie pojedynczy element statora w motorach zależnych od jonów sodowych tworzy dimer PomB i dwa dimery PomA (SATO i HOMMA 2000a).

Bardzo interesujące wyniki przyniosły badania nad selektywnością kanału jonowego motorów rzęskowych (ASAI i współaut. 1999, 2000b). Okazało się, że białko MotA może zastąpić białko PomA, przywracając mutantom *pomA* zdolność do ruchu zależnego od gradientu Na^+ , natomiast PomB nie może zostać zastąpione przez MotB. Chimeryczne białko MomB (domeiny cytoplazmatyczna i transmembranowa białka MotB połączone z peryplazmatyczną domeną PomB) tworzy funkcjonalny motor zależny od Na^+ zarówno z PomA, jak i MotA. Ta daleko posunięta wymiennność elementów tworzących kanały sodowy i protonowy sugerowałaby, że specyficzność kanału sodowego jest determinowana przez czynniki zlokalizowane poza samym kanałem, np. białka MotX i MotY. Świadczy o tym również fakt, że reszta D32, jedyna reszta konserwowana we wszystkich znanych homologach białka MotB, jest również obecna w odpowiadającej pozycji w białku PomB (D24) i wszystkie substytucje w tej pozycji z wyjątkiem konserwatywnej D32E całkowicie inaktywują motor. Poza tym rekonstruowany kanał sodowego motoru rzęskowego *Vibrio alginolyticus*, choć składa się wyłącznie z białek PomA i PomB, wykazuje selektywność dla jonów Na^+ (SATO i HOMMA 2000b).

Niedawno poznano sekwencję aminokwasową pozostałych składników motoru rzęskowego, FliG, FliM i FliN *Vibrio parahaemolyticus* i *V. cholerae*, a więc mikroorganizmów, których rzęski napędzane są gradientem jonów Na^+ (BOLES i McCARTER 2000, YORIMITSU i HOMMA 2001). Okazało się, że wszystkie 3 obdarzone ładunkiem reszty aminokwasowe, które pełnią kluczową rolę w aktywności FliG *E. coli*, są zachowane również w przypadku FliG w motorach zależnych od jonów sodowych.

MECHANICZNE PARAMETRY MOTORU RZĘSKOWEGO

Większość informacji dotyczących parametrów mechanicznych motoru rzęskowego uzyskano na podstawie pomiarów wpływu siły hamującej obrót rzęski na tempo obrotów dokonanych na komórkach *E. coli* i *S. Typhimurium*, obracanych przez pojedynczą rzęskę przytwierdzoną do podłoża lub zmieniając siłę utrzymującą pułapkę optyczną, w której umieszczono

polistyrenową kulkę związaną z rzęską (BERG i TURNER 1993, RYU i współaut. 2000). Ustalono, że pojedynczy motor wytwarza moment obrotowy o wartości 300–600 pN. Przy założeniu, że jest on wytwarzany przez 10 elementów statora, uzyskano wartość 30–60 pN na pojedynczy generator obrotów. Ze względu na znacznie większą szybkość, motory napędzane gradientem jonów

Na^+ wytwarzają mniejszy moment obrotowy, ok. 100 pN.

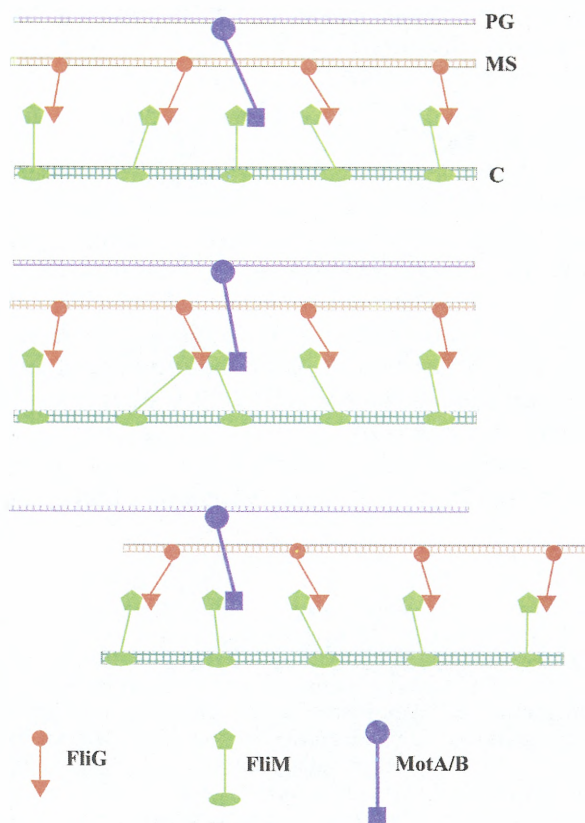
Stwierdzono również, że motor rzęskowy wykazuje „duty ratio” bliski jedności, tj. prawie w każdym momencie każdy generator momentu obrotowego pozostaje w kontakcie z rotorem przez większą część cyklu pracy (RYU i współaut. 2000). Wyznaczono także parametry pracy pojedynczego generatora obrotów — prędkość liniowego przemieszczenia (30 $\mu\text{m/s}$), częstotliwość kroczenia (12 kHz) i wytwarzaną moc (1,5

$\times 10^5$ pN nM s^{-1}). Na podstawie pomiarów kinetycznych pracy motoru rzęskowego *E. coli* szacuje się, że każdemu pełnemu obrotowi rzęski towarzyszy przepływ 1200 protonów. Zgodnie z obliczeniami termodynamicznymi uwzględniającymi powyższe parametry, rzęskowy motor rotacyjny wydaje się przekształcać energię potencjalną, związaną z gradientem jonów po obu stronach błony cytoplazmatycznej, w energię mechaniczną obracającej się rzęski z wydajnością bliską 100 %.

MODEL DZIAŁANIA MOTORU ROTACYJNEGO

Ultrastruktura motoru rotacyjnego nadal nie jest znana, jednakże dokładne badania dotyczące efektów mutacji pięciu białek wchodzących w jego skład oraz określenie ich struktury domenowej i dokładnej stechiometrii poszczególnych składników kompleksu oraz określenie symetrii rotacyjnej pierścieni M i C sugerują model jego struktury (THOMAS i współaut. 1999). Wydaje się, że pierścień M tworzy 26 symetrycznie ułożonych kompleksów FliF-FliG (JONES i współaut. 1990). Z kolei pierścień C, utworzony przez kompleksy białek FliM-FliN, wykazuje symetrię 34-krotną. Innymi słowy pierścień C wydaje się mieć o 8 podjednostek więcej niż pozostający z nim w kontakcie pierścień M, a więc dokładnie tyle, ile etapów wykryto przy restytucji obrotów rzęski za pomocą kontrolowanej ekspresji białek MotA lub MotB (BLAIR i BERG 1988, BLOCK i BERG 1984). Na podstawie tych danych liczbowych oraz informacji na temat kontaktów pomiędzy poszczególnymi komponentami motoru i przynależności białkowych składników do statora i rotora zaproponowano model funkcjonalny motoru rotacyjnego (Ryc. 2). Stator tworzyłby pierścień heterodimerów MotA/MotB, zakotwiczonych w peptydoglikanie i mających postać bolców (ang. studs) skierowanych w stronę pierścieni M i C. Pierścienie M i C utrzymywałyby ścisły kontakt przez oddziaływania między białkiem FliG pierścienia M i białkiem FliM pierścienia C. W oddziaływaniach tych uczestniczyłyby wszystkie 26 cząsteczek FliG wchodzących w skład pojedynczego pierścienia M i identyczna liczba cząsteczek FliM w pierścieniu C. Pozostałe 8 podjednostek pierścienia C wiązałyby się z dystalną częścią bolców, a więc z białkiem MotA. Taki model wyjaśniałby istnienie 8 generatorów momentu obrotowego w każdym motorze (patrz sekcja MotA i MotB). Ta liczba wynikałaby z różnicy pomiędzy podjednostkami pierścienia M i pierścienia C i odpowiadającej jej liczby kompleksów MotA/MotB.

Mechanizm ruchu polegałby na obrocie obu pierścieni wywołanym przez kolejne oddziaływanie MotA z tymi cząsteczkami FliM w pierścieniu C, które nie byłyby związane przez FliG z pierścieniem M. Postuluje się, że kompleks MotA-FliM miałby zdolność do kierunkowego przemieszczania się i oddziaływania z sąsiadującym kompleksem FliG-FliM i wymiany związanych cząsteczek FliM pomiędzy białkami MotA i FliG. Taka wymiana stanowiłaby molekularny mechanizm ruchu obrotowego obu pierścieni: C i M. Ze względu na różną liczbę podjednostek pierścienie C i M poruszałyby się



Ryc. 2. Model działania motoru rotacyjnego (wg THOMASA i współaut. 1999).

z inną prędkością. Każdy cykl powodowałby przemieszczenie się pierścienia M o 1/26 obrotu, podczas kiedy pierścień C przemieściłby się o 1/34 obrotu. Ponieważ pierścień M jest integralną częścią ciała podstawowego (a więc i całej rzęski), a pierścień C pozostaje w łączności z ciałkiem podstawowym tylko dzięki kontaktom z pierścieniem M, według proponowanego modelu pierścień C wykazywałby rotację w stosunku do rzęski.

Istnieją dwa nieco odmienne modele wyjaśniające sprzężenie pomiędzy przepływem protonów, a ruchem obrotowym rotora względem

statora. Pierwszy z nich postuluje, że proton jest przyłączany przez resztę D32 MotB, co wywołuje zmiany konformacyjne w białku tworzącym stator/kanal protonowy, MotA (BRAUN i współaut. 1999). Zmiany te, prowadząc do przemieszczenia się naładowanych reszt MotA, oddziałujących z naładowanymi resztami rotora, wywołują ruch obrotowy. Drugi model sugeruje, że ruch jest wynikiem zmiany oddziaływań pomiędzy skośnie ułożonymi resztami obdarzonymi ładunkiem a liniowo ułożonymi miejscami wiążącymi protony w kanale transmembranowym (WALZ i CAPLAN 2000).

PERSPEKTYWY

Rzęskowe motory rotacyjne od lat stanowią obiekt intensywnych badań łączących metody biofizyki, biochemii i biologii molekularnej. Nadal jednak, pomimo że nasza wiedza na temat budowy tej niezwyklej klasy maszyn molekularnych oraz funkcji poszczególnych elementów jest coraz większa, nie mamy ugruntowanego poglądu na żadną z podstawowych kwestii dotyczących molekularnego mechanizmu odpowiadającego za przekształcenie przepływu jonów w poprzek błony cytoplazmatycznej w ruch rotacyjny rzęski. Jest to szczególnie widoczne przy porównaniu naszej wiedzy na temat rotora rzęskowego z innym motorem rotacyjnym, syntazą ATP (ENGELBRECHT i JUNGE 1997, KINOSITA i współaut. 1998, NAKAMOTO i współaut. 1999, CROSS 2000).

Wydaje się, że jedną z głównych trudności jest prawie całkowity brak informacji na temat struktury molekularnej poszczególnych białek tworzących motor rzęskowy (jedynym wyjątkiem jest C-terminalna domena FliG). Oprócz tego, do stworzenia modelu motoru rzęskowego niezbędne też będzie ostateczne potwierdzenie stechiometrii poszczególnych białek tworzących rotor i stator.

Pewne nadzieje można też wiązać z rozwojem badań nad motorami napędzanymi prze-

plywem jonów Na^+ . Dzięki temu, że dużo łatwiej można manipulować stężeniem tych jonów w środowisku, możliwe są różnorodne badania motorów sodowych w układzie *in vivo*, których nie dałoby się przeprowadzić w przypadku motorów napędzanych przepływem protonów (ponieważ zmiany pH środowiska życiowego bakterii podlegają znacznie poważniejszym ograniczeniom).

Najistotniejsze pytania dotyczące mechanizmu działania motoru rotacyjnego nadal wymagają odpowiedzi:

- 1) Jaka jest liczba kroków wykonywanych przez rotor podczas jednego obrotu?
- 2) Jaki jest mechanizm oddziaływania przepływających jonów z białkami tworzącymi kanał i/lub generującymi ruch obrotowy?
- 3) Jaki jest strukturalny mechanizm sprzężenia przepływu jonów z ruchem obrotowym?
- 4) Jak na poziomie molekularnym odbywa się zmiana kierunku rotacji motoru?
- 5) Jakie aminokwasy białek statora i rotora oddziałują ze sobą i jak oddziaływanie to zmienia się podczas obrotu?
- 6) Jaki jest molekularny mechanizm generacji siły obracającej rotor?

BACTERIAL ROTARY MOTORS

Summary

For many prokaryotes the ability of directed movement of the cell is of basic importance to survival in changing environment. The most common form of cell motility among bacteria is flagellum induced swimming. Bacterial flagellum is a long helical cell appendage built from a single kind of protein, flagellin, moving in the rotary fashion in both directions. The clockwise rotation results in tumbling (i.e. abrupt random change of swimming direction) while the counter clockwise rotation results in close to linear swimming. Flagella are anchored in cell membranes through an elaborate structure called basal body made of central rod

and several rings. Two proximal rings — MS ring spanning the cell membrane and C ring on the cytoplasmic side of cell membrane participate in torque generation. Bacterial rotary motor consists of a rotor built by three proteins FliG (MS ring), FliN and FliM (both in C ring) — and a stator made of MotA/MotB complexes. The motor is powered by electrochemical potential across the cell membrane. Stator proteins, visible in electron microscope as 8–10 studs surrounding the basal body, function as ion channels specific either to protons (i.e. in *E. coli*) or Na^+ (*Vibrio alginolyticus*). Most probably ions leaving the channel on the cytoplasmic

side of cell membrane change the interactions between stator and rotor components which results in rotor rotation. Although, due to very limited structural information, we do not know how the ion flux is converted into the mechanical

energy, several models of the rotary motor action have been proposed based on the genetical, biophysical and biochemical data.

LITERATURA

- ASAI Y., KAWAGISHI I., SOCKETT R. E., HOMMA M., 1999. Hybrid motor with H^+ - and Na^+ -driven components can rotate *Vibrio polar flagella* by using sodium ions. *J. Bacteriol.* 181, 6332-6338.
- ASAI Y., SHOJI T., KAWAGISHI I., HOMMA M., 2000a. Cysteine-scanning mutagenesis of the periplasmic loop regions of PomA, a putative channel component of the sodium-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* 182, 1001-1007.
- ASAI Y., KAWAGISHI I., SOCKETT R. E., HOMMA M., 2000b. Coupling ion specificity of chimeras between H^+ - and Na^+ -driven motor proteins, MotB and PomB, in *Vibrio polar flagella*. *EMBO J.* 19, 3639-3648.
- BERG H. C., TURNER L., 1993. Torque generated by the flagellar motor of *Escherichia coli*. *Biophys. J.* 65, 2201-2216.
- BLAIR D. F., BERG H. C., 1988. Restoration of torque in defective flagellar motors. *Science* 242, 1678-1681.
- BLAIR D. F., BERG H. C., 1990. The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell* 60, 439-449.
- BLOCK S. M., BERG H. C., 1984. Successive incorporation of force-generating units in the bacterial rotary motor. *Nature* 309, 470-472.
- BOLES B. R., McCARTER L. L., 2000. Insertional inactivation of genes encoding components of the sodium-type flagellar motor and switch of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 182, 1035-1045.
- BRAUN T. F., POULSON S., GULLY J. B., EMPEY J. C., VAN WAY S., PUTNAM A., BLAIR D. F., 1999. Function of proline residues of MotA in torque generation by the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 3542-3551.
- BREN A., EISENBACH M., 1998. The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY. *J. Mol. Biol.* 278, 507-514.
- CHUN S. Y., PARKINSON J. S., 1988. Bacterial motility: membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. *Science* 239, 276-278.
- CROSS R. L., 2000. The rotary binding change mechanism of ATP synthases. *Biochim. Biophys. Acta* 1458, 270-275.
- DEAN G. E., MACNAB R. M., STADER J., MATSUMURA P., BURKS C., 1984. Gene sequence and predicted amino acid sequence of the motA protein, a membrane-associated protein required for flagellar rotation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 159, 991-999.
- DEROSIER D. J., 1998. The turn of the screw: the bacterial flagellar motor. *Cell* 93, 17-20.
- DIBROV P. A., KOSTRYKO V. A., LAZAROVA R. L., SKULACHEV V. P., SMIRNOVA I. A., 1986. The sodium cycle. I. Na^+ -dependent motility and modes of membrane energization in the marine alkalotolerant vibrio *Alginolyticus*. *Biochim. Biophys. Acta* 850, 449-457.
- EISENBACH M., 1996. Control of bacterial chemotaxis. *Mol. Microbiol.* 20, 903-910.
- ELSTON T. C., OSTER G., 1997. Protein turbines. I: the bacterial flagellar motor. *Biophys. J.* 73, 703-721.
- ENGELBRECHT S., JUNGE W., 1997. ATP synthase: a tentative structural model. *FEBS Lett.* 414, 485-491.
- GARZA A. G., HARRIS-HALLER L. W., STOEUBNER R. A., MANSON M. D., 1995. Motility protein interactions in the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92, 1970-1974.
- GARZA A. G., BIRAN R., WOHLSCHEGEL J. A., MANSON M. D., 1996. Mutations in motB suppressible by changes in stator or rotor components of the bacterial flagellar motor. *J. Mol. Biol.* 258, 270-285.
- GLAGOLEV A. N., SKULACHEV V. P., 1978. The proton pump is a molecular engine of motile bacteria. *Nature* 272, 280-282.
- GOUDREAU P. N., STOCK A. M., 1998. Signal transduction in bacteria: molecular mechanisms of stimulus-response coupling. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 160-169.
- HIROTA N., IMAE Y., 1983. Na^+ -driven flagellar motors of an alkalophilic *Bacillus* strain YN-1. *J. Biol. Chem.* 258, 10577-10581.
- HOMMA M., IINO T., 1985. Locations of hook-associated proteins in flagellar structures of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 162, 183-189.
- HOMMA M., KUTSUKAKE K., IINO T., 1985. Structural genes for flagellar hook-associated proteins in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 163, 464-471.
- IRIKURA V. M., KIHARA M., YAMAGUCHI S., SOCKETT H., MACNAB R. M., 1993. *Salmonella typhimurium* fliG and fljN mutations causing defects in assembly, rotation, and switching of the flagellar motor. *J. Bacteriol.* 175, 802-810.
- ISHIHARA A., SEGALL J. E., BLOCK S. M., BERG H. C., 1983. Coordination of flagella on filamentous cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 155, 228-237.
- JONES C. J., MACNAB R. M., OKINO H., AIZAWA S., 1990. Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal body) complex of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* 212, 377-387.
- KHAN S., DAPICE M., REESE T. S., 1988. Effects of mot gene expression on the structure of the flagellar motor. *J. Mol. Biol.* 202, 575-584.
- KIHARA M., MILLER G. U., MACNAB R. M., 2000. Deletion analysis of the flagellar switch protein FliG of *Salmonella*. *J. Bacteriol.* 182, 3022-3028.
- KINOSHITA K. J., YASUDA R., NOJI H., ISHIWATA S., YOSHIDA M., 1998. F1-ATPase: a rotary motor made of a single molecule. *Cell* 93, 21-24.
- KOJIMA S., SHOJI T., ASAI Y., KAWAGISHI I., HOMMA M., 2000. A slow-motility phenotype caused by substitutions at residue Asp31 in the PomA channel component of a sodium-driven flagellar motor. *J. Bacteriol.* 182, 3314-3318.
- LARSEN S. H., ADLER J., GARGUS J. J., HOGG R. W., 1974. Chemomechanical coupling without ATP: the source of energy for motility and chemotaxis in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 71, 1239-1243.
- LLOYD S. A., BLAIR D. F., 1997. Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 266, 733-744.
- LLOYD S. A., TANG H., WANG X., BILLINGS S., BLAIR D. F., 1996. Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence of a direct role for FliG but not for FliM or FliN. *J. Bacteriol.* 178, 223-231.
- LLOYD S. A., WHITBY F. G., BLAIR D. F., HILL C. P., 1999. Structure of the C-terminal domain of FliG, a component of the rotor in the bacterial flagellar motor. *Nature* 400, 472-475.
- MACNAB R. M., HAN D. P., 1983. Asynchronous switching of flagellar motors on a single bacterial cell. *Cell* 32, 109-117.

- MACNAB R. M., 1996. *Flagella and motility*. [W:] *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. NEIDHARDT F. (red.), ASM Press, Washington, DC, 123–145.
- MANSON M. D., TEDESCO P., BERG H. C., HAROLD F. M., VAN DER DRIFT C., 1977. A protonmotive force drives bacterial flagella. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3060–3064.
- MARYKWA D. L., BERG H. C., 1996. A mutational analysis of the interaction between *FliG* and *FliM*, two components of the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178, 1289–1294.
- MATHEWS M. A., TANG H. L., BLAIR D. F., 1998. Domain analysis of the *FliM* protein of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 5580–5590.
- MATSURA S., SHIOI J., IMAE Y., 1977. Motility in *Bacillus subtilis* driven by an artificial protonmotive force. *FEBS Lett.* 82, 187–190.
- MCCARTER L. L., 1994. *MotX*, the channel component of the sodium-type flagellar motor. *J. Bacteriol.* 176, 5988–5998.
- NAKAMOTO R. K., KETCHUM C. J., AL-SHAWI M. K., 1999. Rotational coupling in the *FOF1* ATP synthase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28, 205–234.
- NAMBA K., YAMASHITA I., VONDERVISZT F., 1989. Structure of the core and central channel of bacterial flagella. *Nature* 342, 648–654.
- OKUNISHI I., KAWAGISHI I., HOMMA M., 1996. Cloning and characterization of *motY*, a gene coding for a component of the sodium-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* 178, 2409–2415.
- RYU W. S., BERRY R. M., BERG H. C., 2000. Torque-generating units of the flagellar motor of *Escherichia coli* have a high duty ratio. *Nature* 403, 444–447.
- SAMATEY F. A., IMADAK K., NAGASHIMA S., VONDERVISZT F., KUMASAKA T., YAMAMOTO M., NAMBA K., 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature* 410, 331–337.
- SANDERS D. A., GILLECE-CASTRO B. L., STOCK A. M., BURLINGAME A. L., KOSHLAND D. E. Jr., 1989. Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, *CheY*. *J. Biol. Chem.* 264, 21770–21778.
- SATO K., HOMMA M., 2000a. Multimeric structure of *PomA*, a component of the Na^+ -driven polar flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* 275, 20223–20228.
- SATO K., HOMMA M., 2000b. Functional reconstitution of the Na^+ -driven polar flagellar motor component of *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* 275, 5718–5722.
- SHARP L. L., ZHOU J., BLAIR D. F., 1995a. Features of *MotA* proton channel structure revealed by tryptophan-scanning mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7946–7950.
- SHARP L. L., ZHOU J., BLAIR D. F., 1995b. Tryptophan-scanning mutagenesis of *MotB*, an integral membrane protein essential for flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 34, 9166–9171.
- SILVERSMITH R. E., BOURRET R. B., 1999. Throwing the switch in bacterial chemotaxis. *Trends Microbiol.* 7, 16–22.
- STADER J., MATSUMURA P., VACANTE D., DEAN G. E., MACNAB R. M., 1986. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli motB* gene and site-limited incorporation of its product into the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* 166, 244–252.
- STOLZ B., BERG H. C., 1991. Evidence for interactions between *MotA* and *MotB*, torque-generating elements of the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173, 7033–7037.
- THOMAS D. R., MORGAN D. G., DEROSIER D. J., 1999. Rotational symmetry of the C ring and a mechanism for the flagellar rotary motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10134–10139.
- TOGASHI F., YAMAGUCHI S., KIHARA M., AIZAWA S. I., MACNAB R. M., 1997. An extreme clockwise switch bias mutation in *fliG* of *Salmonella typhimurium* and its suppression by slow-motile mutations in *motA* and *motB*. *J. Bacteriol.* 179, 2994–3003.
- WALZ D., CAPLAN S. R., 2000. An electrostatic mechanism closely reproducing observed behavior in the bacterial flagellar motor. *Biophys. J.* 78, 626–651.
- YORIMITSU T., HOMMA M., 2001. Na^+ -driven flagellar motor of *Vibrio*. *Biochim. Biophys. Acta* 1505, 82–93.
- ZHOU J., BLAIR D. F., 1997. Residues of the cytoplasmic domain of *MotA* essential for torque generation in the bacterial flagellar motor. *J. Mol. Biol.* 273, 428–439.
- ZHOU J., SHARP L. L., TANG H. L., LLOYD S. A., BILLINGS S., BRAUN T. F., BLAIR D. F., 1998a. Function of protonatable residues in the flagellar motor of *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of *MotB*. *J. Bacteriol.* 180, 2729–2735.
- ZHOU J., LLOYD S. A., BLAIR D. F., 1998b. Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6436–6441.