

*Посвящается памяти
члена-корреспондента РАН
Б. Ф. ПОГЛАЗОВА*

ЖГУТИКИ ПРОКАРИОТ КАК СИСТЕМА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПОДВИЖНОСТИ

© 2001 г.

А. Л. МЕТЛИНА

*Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова,
Москва*

I. Введение. II. Ультраструктура БЖ. III. Система генов жгутиковой подвижности. IV. Самосборка НБЖ. V. Строение НБЖ и ее полиморфные переходы. VI. Структурные белки мотора БЖ и его функционирование. VII. Археобактериальные жгутики. VIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Формы проявления биологической подвижности чрезвычайно разнообразны, однако, в основе их лежит всего несколько молекулярных механизмов. Так, молекулярный механизм подвижности всех эукариотических клеток основан на взаимодействии двух белков, сопровождаемом гидролизом АТФ, химическая энергия которого трансформируется при этом в механическую энергию движения. Наиболее распространена актомиозиновая система подвижности, основанная на взаимодействии миозина и актина. Именно это взаимодействие лежит в основе молекулярного механизма сокращения мышц и многих процессов клеточной подвижности. Другая форма подвижности, характерная для эукариотических клеток, связана с микротрубочками и имеет определенное сходство с актомиозиновой системой. Наиболее ярко такая подвижность проявляется в жгутиках и ресничках простейших, где она основана на взаимодействии динеина с микротрубочками, состоящими из тубулина. Существует

Принятые сокращения: БЖ — бактериальные жгутики; НБЖ — нити бактериальных жгутиков; НВВ — комплекс крюк—базальное тело; ЕВВ — вытянутое базальное тело; НАР — крюк-ассоциированные белки; БК — белок крюка; НЖА — нити жгутиков архей; ДПС — дискообразная пластинчатая структура.
Адрес для корреспонденции: metlina@genebee.msu.ru

большое количество дополнительных белков, участвующих в этих процессах, но основной молекулярный механизм функционирования этих систем одинаков и основан на взаимодействии минимально двух белков и нуклеозидтрифосфата в качестве источника энергии.

Совершенно иной молекулярный механизм лежит в основе движения бактериальной клетки. Исключим из обсуждения подвижность ползающих бактерий, так как до настоящего времени это явление оставляет массу вопросов. Способность бактерий к быстрому и направленному перемещению обусловлена наличием у этих организмов специального органа движения — *бактериального жгутика* (БЖ), структуру и функционирование которого кодирует около 50 генов. БЖ, пронизывая клеточную стенку, уходит под цитоплазматическую мембрану. Он имеет дискретную структуру, состоящую из базального тела, длинной наружной нити и соединяющего эти две части «крюка». Базальное тело, расположенное в толще клеточной стенки, вращаясь, приводит в движение наружную полужесткую спиральную белковую нить, обеспечивающую генерацию гидродинамической силы, направленно толкающую клетку. Длительное время в составе БЖ искали АТФазу, но не обнаружили ее. Относительно недавно (конец 70-х годов) выяснилось, что базальное тело жгутика представляет собой миниатюрный электромотор, благодаря которому бактериальная клетка способна развивать очень большую скорость — 100 мкм/сек, то есть более 50 длин тела клетки в сек. Энергетика этого процесса оказалась уникальной для систем подвижности — трансмембранный потенциал ионов водорода (или натрия) на мембране.

Аппарат мотора жгутика содержит около 25 различных белков, включая специфические белки, переключающие направление вращения мотора. В последнее время получен ряд доказательств, что именно эти белки образуют две основные части мотора — ротор и статор. Особого внимания заслуживает белок наружной нити жгутика — флагеллин. Свойства субъединиц флагеллина в составе нити таковы, что позволяют белковой надспирали НБЖ принимать разные формы (жгутик имеет форму полужесткой спирали типа винта), тем самым обеспечивая передвижение клетки в среде.

Жгутик как аппарат подвижности прокариот длительное время изучался только на представителях эубактерий. Все вышеперечисленные свойства БЖ изучены, в основном, на *Salmonella typhimurium* и *Esherichia coli*. Однако, жгутики грамположительных бактерий, монотрихи и лоботрихи имеют свои особенности. И уж совсем немного известно о жгутиках архей, которые, судя по имеющимся данным, значительно отличаются от жгутиков эубактерий. Более того, к настоящему моменту сложилось мнение, что жгутики архей представляют

особую форму подвижности прокариот, отличную от бактериальной. После того, как в 1978 г. была окончательно сформулирована «концепция архебактерий», которые в настоящее время принято именовать археями, как нового царства в системе взглядов на природу, возник интерес и к подвижности этих прокариот.

БЖ представляет интерес и как звено в цепи передачи информации из внешней среды в клетку (различного рода таксисы), а также как один из поверхностных антигенов бактериальной клетки. Кроме того, имеются данные, что подавлением подвижности бактерий можно регулировать степень их патогенности.

Поскольку обзоров на данную тему крайне мало, ниже мы постараемся как можно полнее осветить эту проблему.

II. УЛЬТРАСТРУКТУРА БАКТЕРИАЛЬНОГО ЖГУТИКА

Присутствие жгутиков у подвижной бактерии было замечено еще в конце прошлого столетия, однако, основные сведения о структуре и свойствах БЖ получены только за последние 40—50 лет.

Морфологически жгутик построен из трех основных частей: *базального тела*, вращающегося в толще клеточной стенки и выполняющего роль миниатюрного электромотора, наружной полужесткой *спиральной нити*, построенной из белка *флагеллина* и играющей роль винта при движении бактерий в среде, и так называемого «*крюка*», гибкой белковой структуры, связывающей базальное тело и наружную нить [11, 53, 110]. Однако этим не исчерпывается вся структура двигательного аппарата бактерии. Имеется еще дополнительное количество белков и белковых образований в цитоплазме и цитоплазматической мембране, участвующих во вращении жгутика, однако, аккумулируют их в своем составе эти три основные части.

БАЗАЛЬНОЕ ТЕЛО

Базальная область БЖ — наиболее сложная и функционально наиболее важная часть органеллы. За последние 10—12 лет произошел значительный прогресс в выяснении структуры базального тела жгутика. Обнаружен ряд функционально важных составных белковых компонентов, примыкающих к базальному телу со стороны цитоплазматической мембраны, встроенных в нее и участвующих во вращении базального тела. Более того, обнаружен целый белковый комплекс, примыкающий к проксимальному диску базального тела со стороны цитоплазмы, обеспечивающий сборку и вращение базального тела в клеточной стенке.

До недавнего времени базальным телом так называемого «интактного жгутика», структуры, выделяемой из бактериальной клетки стандартным набором биохимических методов, назывался набор **дисков** или **колец** на стержне: L-, P-, M- и S-диски у грамотрицательных бактерий, и M- и S-диски у грамположительных бактерий. Впервые такую структуру интактного жгутика рода *Bacillus* и *Escherichia coli* предложили Диммит и Саймон [54] и ДеПамфилис и Адлер [53]. С этого момента под формулировкой «интактный жгутик» подразумевается структура, состоящая из нити, крюка и двух или одной пары дисков базального тела.

Изучая прикрепление базальных тел жгутиков *E. coli* к поверхности бактериальной клетки, ДеПамфилис и Адлер обнаружили, что каждое из четырех колец — L, P, S и M — находится в определенном слое клеточной стенки. L-кольцо находится в наружном липополисахаридном слое, P — контактирует с пептидогликановым слоем, S — находится в периплазматическом пространстве над цитоплазматической мембраной, а M-кольцо является интегральной частью цитоплазматической мембраны (рис. 1а).

S-кольцо расположено дистально по отношению к M-кольцу и представляет собой домен белка, образующего M-кольцо [211, 212]. P- и L-кольца вместе образуют внешний цилиндр в клеточной стенке [53] и формируют нечто вроде «втулки». Компоненты этих четырех колец идентифицированы генетически и биохимически [21, 202]. Для белковых субъединиц колец определены последовательность ДНК и, соответственно, аминокислотная последовательность [88, 89, 106, 107, 128].

Анализ белковых компонентов M- и S-колец показал, что они состоят из одного белка FliF [211], как и отрезок стержня, на котором они располагаются. Дальнейшая работа в этом направлении показала, что, действительно, проксимальный конец жгутикового базального тела состоит из структуры, названной MS-кольцевым комплексом (MSKк): два кольца (M и S) различной толщины расположены близко друг к другу на отрезке стержня, выходящего из центра S-кольца [212]. Авторы, используя триптический гидролиз, методы молекулярной биологии и электронную микроскопию показали, что MSKк состоит из мультиплетных копий единственного белка FliF (мол. масса 61 кДа). В этой же работе предложена модель укладки полипептидной цепи FliF, в которой единственная аминокислотная последовательность дает три разные субструктуры. Следует подчеркнуть, что этот случай представляет собой экстраординарный пример, когда единственный белок отвечает за конструирование трех морфологически различных структур — двух дисков и части стержня.

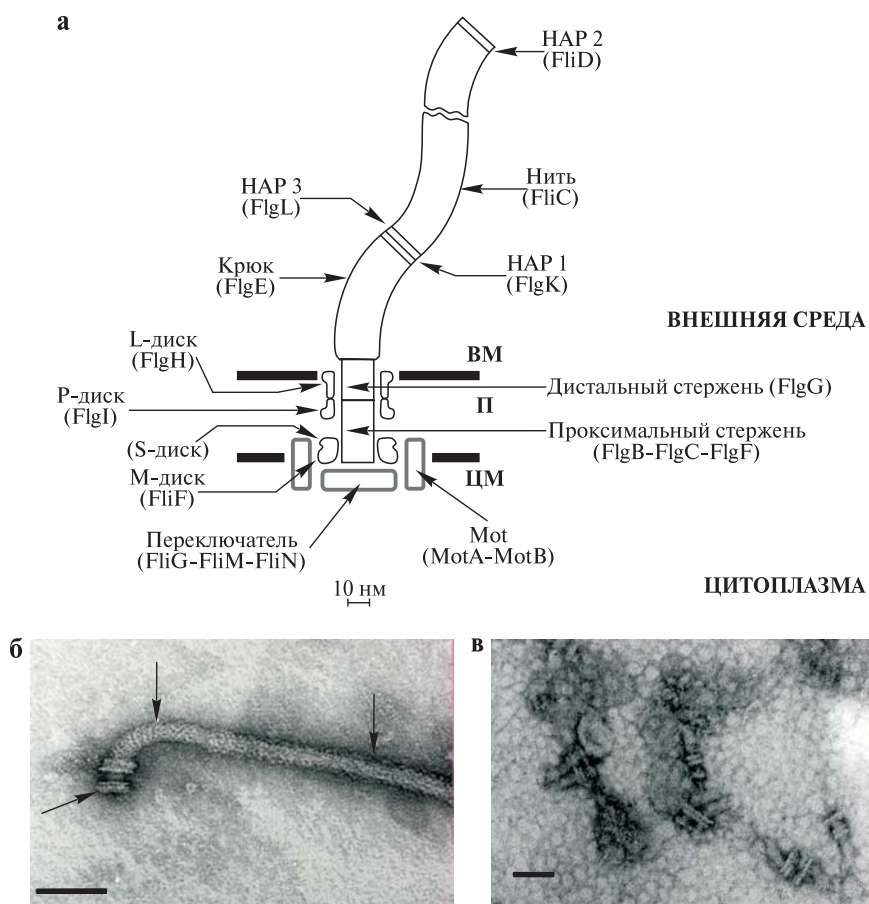


Рис. 1. Схематический и электронномикроскопический вид бактериального жгутика и БВВ.

ВМ — внешняя мембрана, ЦМ — цитоплазматическая мембрана; П — периплазма. Соответствующие белковым структурам гены приведены в таблице (стр. 235).

а — схема жгутика [108];

б — электронная микрофотография жгутика *E. coli* MS 1350 (собственные данные). Стрелками указаны базальное тело, крюк и нить. Масштабная линейка — 50 нм.

в — электронная микрофотография БВВ жгутика *E. coli* MS 1350 (собственные данные). Масштабная линейка — 50 нм.

По мере развития электронномикроскопической техники становилось ясно, что и у других бактерий в базальном теле их жгутиков присутствуют основные структурные элементы [5, 9, 32], обнаруженные ранее у жгутиков *E. coli* и *B. subtilis* [53]. Правда, иногда размеры и количество дисков у жгутиков разных бактерий варьировали. У *Ectothiorhodospira mobilis Pelsh* [179] базальное тело состоит из трех дисков диаметром 20—25 нм. Базальное тело *Caulobacter crescentus*, имеющей один жгутик на клетку, имеет пять дисков — два верхних и три нижних [178]. А базальное тело жгутика *B. brevis* var. G.-V.p+ содержит над L-кольцом дополнительную структуру, так называемый «воротничок» [9].

Крепление дисков базального тела в клеточной стенке несколько отличается у грамтрицательной бактерии *Aquaspirillum serpens* [51], у которой, как и в случае *E. coli*, L-диск находится внутри липополисахаридной мембраны, а Р-диск располагается, по-видимому, не в толще, а на поверхности пептидогликанового слоя. В цитоплазматическую мембрану погружено S-, а не М-кольцо, как у *E. coli*, а М-кольцо находится, по всей видимости, под мембраной. Такие отличия могут регламентироваться особенностями строения клеточной стенки каждой конкретной бактерии, но с другой стороны вызывают удивление, если их обсуждать с позиций имеющейся на сегодня информации о работе БЖ.

«Интактные жгутики», выделенные и очищенные набором биохимических методов, предложенным ДеПамфилисом и Адлером [53], состоят из длинной наружной нити, «крюка» и базального тела (рис. 1б). После деполимеризации флагеллиновой нити кислотой, щелочью, или нагреванием остается комплекс *крюк-базальное тело* (*hook-basal body, HBB*), который длительное время, до внедрения методов геной инженерии, являлся предметом изучения у жгутиков различных видов бактерий (рис. 1в). И хотя базальное тело в том виде, в каком его обычно выделяют из клетки, нельзя считать истинным жгутиковым мотором, так как при выделении теряется часть важных структурных компонентов, в том числе Mot- и Switch-белки [21, 152], тем не менее совершенно очевидно, что это ключевая, базовая часть мотора.

Белковые субъединицы и соответствующие им гены идентифицированы для М-, Р- и L-колец [21, 85, 107] (рис. 1а; табл.). Как уже отмечалось, S-кольцо является продолжением М-кольца, и построено из FliF, как и М-кольцо [107, 197, 212]. L-кольцо кодирует *flgH*, Р-кольцо — *flgI*. Определены последовательности этих генов и аминокислотная последовательность их продуктов [86, 107]. FlgH и FlgI (L- и Р-кольца), экспортируемые через клеточную мембрану и периплазматическое пространство, содержат типичную N-концевую сигналь-

Таблица.
Гены и их продукты в аппаратах подвижности
Escherichia coli и *Salmonella typhimurium* [151]

Ген	Продукт гена и его функция	Ген	Продукт гена и его функция
Гены района I			
<i>flgA</i>	необходим для прибавления Р-диска	<i>cheA</i>	автофосфорилируется; перенос фосфатов на CheY и CheB с целью их активации
<i>flgB</i>	структурный белок стержня	<i>motA</i>	необходим для вращения мотора
<i>flgC</i>	структурный белок стержня	<i>motB</i>	необходим для вращения мотора
<i>flgD</i>	полное построение стержня	<i>flhC</i>	сигма-фактор транскрипции оперонов-II-уровня
<i>flgE</i>	структурный белок крюка	<i>flhD</i>	сигма-фактор транскрипции оперонов-II-уровня
<i>flgF</i>	структурный белок стержня	Гены района III	
<i>flgG</i>	дистальный белок стержня	<i>fliA</i>	сигма-фактор транскрипции оперонов III уровня
<i>flgH</i>	структурный белок L-диска	<i>fliB</i>	N-метилование некоторых остатков лизина флагеллина; не обнаружен в <i>E. coli</i>
<i>flgI</i>	структурный белок Р-диска	<i>fliC</i>	структурный белок нити жгутика (флагеллин)
<i>flgJ</i>	не известен	<i>fliD</i>	структурный белок НАР2, ограничивающий рост нити
<i>flgK</i>	НАР1 структурный белок	<i>fliS</i>	не известен
<i>flgL</i>	НАР3 структурный белок	<i>fliT</i>	не известен
Гены района II			
<i>flhE</i>	не известен	<i>fliE</i>	компонент базального тела
<i>flhA</i>	не известен	<i>fliF</i>	структурный белок MS-комплекса
<i>flhB</i>	не известен	<i>fliG</i>	switch-компонент мотора
<i>cheZ</i>	антагонист функции CheY в моторе жгутика, возможно дефосфорилирует CheY, восстанавливая вращение мотора против часовой стрелки	<i>fliH</i>	не известен
<i>cheY</i>	вызывает вращение мотора жгутика по часовой стрелке	<i>fliI</i>	не известен
<i>cheB</i>	метилэстераза, изменяет рецепторы для того, чтобы приучить клетку к уровню стимуляции в данный момент	<i>fliJ</i>	не известен
<i>cheR</i>	метилэстераза, изменяет рецепторы для того, чтобы приучить клетку к уровню стимуляции в данный момент	<i>fliK</i>	контролирует длину крюка
<i>tap</i>	рецепторы для дипептидов, не обнаружен в <i>S. typhimurium</i>	<i>fliL</i>	не известен
<i>tar</i>	рецепторы для аспартата, мальтозы, Co^{+2} и Ni^{+2}	<i>fliM</i>	switch-компонент мотора
<i>cheW</i>	усиление фосфорилирования CheA, необходимое для передачи информации от рецепторов к CheA	<i>fliN</i>	switch-компонент мотора
		<i>fliO</i>	не известен
		<i>fliP</i>	не известен
		<i>fliQ</i>	не известен
		<i>fliR</i>	не известен
		Гены <i>Salmonella fli</i> -района	
		<i>fliA</i>	репрессор транскрипции <i>fliC</i>
		<i>fliB</i>	структурный белок нити (флагеллин)
		<i>hin</i>	инвертаза, контролирующая фазовую вариацию жгутиков

ную последовательность, в то время как FlIF (MS-комплекс), включенный в цитоплазматическую мембрану, теряет сигнальный пептид [85, 86]. L- и P-кольца, расположенные во внешней мембране и периплазматическом пространстве, образуют цилиндр, служащий своеобразной «втулкой» для вращения стержня жгутика. По-видимому, этот цилиндр играет пассивную роль, действуя как закрепляющее устройство для стержня, проходящего через его большое отверстие. В частности, такая роль L- и P-дисков подтверждается их отсутствием у грамположительных бактерий [53]. То есть эти два кольца являются принадлежностью конкретной клеточной стенки определенных видов бактерий.

К настоящему времени установлены этапы морфогенеза БЖ. Использование различных *fla* мутантов и анализ сборки базальных тел температурочувствительных *fla* мутантов, меченых *in vivo* [84, 108, 110, 202, 203], показали, что сборка базальных тел идет с проксимального конца к дистальному. Морфогенез жгутиковой системы бактерий начинается со сборки внутренних колец, связанных со слоями клеточной поверхности. По-видимому, в этот этап морфогенеза вовлекаются какие-то компоненты и структуры поверхностных слоев бактериальной клетки, так как мутации, их затрагивающие, тормозят ранние стадии морфогенеза жгутиковой системы даже тогда, когда гены, ответственные за образование жгутика, функционируют нормально [96]. Для осуществления сборки и включения базального тела в стенку бактерий необходим локальный гидролиз пептидогликанового слоя, что может происходить под действием автолизиннов, широко встречающихся у бактерий [173].

Биосинтез и сборка жгутиков изучены, главным образом, у *E. coli* и *S. typhimurium*. Известно, что НБЖ представляет собой полую цилиндрическую структуру. Внутри жгутика имеется канал, по которому транспортируются молекулы мономерного флагеллина [58, 164]. Современная модель биосинтеза жгутика включает транслокацию флагеллина, белков крюка и стержня через канал базального тела, а в дальнейшем через канал внутри крюка и нити к дистальному концу жгутика, где и происходит сборка флагеллиновой нити. Эта модель предложена на основании многочисленных экспериментальных данных, которые подтверждают, что у БЖ *аксиальные белки* жгутиковой системы — флагеллин, белок крюка, NAPs, белки стержня — *не транспортируются* через цитоплазматическую мембрану нормальным сигнал-пептидным путем, а проходят по внутреннему каналу жгутика при помощи специфичной транспортной системы [110]. Об аппарате, контролирующем этот процесс, практически ничего неизвестно. Одно из предположений состоит в том, что концевое разупорядочивание

субъединиц аксиальных жгутиковых белков может быть их общим структурным свойством и направлять экспорт этих белков к месту сборки [218]. Считается, что аппарат, регулирующий транспорт жгутиковых белков, расположен в основании жгутика, а АТФ-зависимая транслоказа принимает участие в этом процессе [215]. Сборка БЖ представлена на рис. 2.

Стержень, проходящий сквозь все четыре кольца базального тела, заканчивается закругленным окончанием практически в цитоплазме [197]. Он может быть расщеплен на две части, стыкующиеся где-то в районе Р-кольца. Дистальная часть стержня кодируется геном *flgG*, а часть, расположенная ближе к цитоплазме, кодируется тремя генами — *flgB*, *flgC* и *flgF* [21, 88, 89]. Дистальная часть содержит приблизительно 26 копий FlgG, а проксимальная — по 5—6 копий каждого из продуктов генов *flgB*, *flgC* и *flgF* [109, 168]. Стержень имеет, по-видимому, тот же самый тип поверхностной решетки укладки субъединиц, что и крюк, НАРы и нить, так как имеется явная гомология среди этих белков в N- и C-концевых областях их первичных последовательностей (определено на основе последовательностей генов) [89]. И хотя вращение стержня еще не было продемонстрировано непосредственным образом, по-видимому, он все-таки является той структурной деталью базального тела, которая служит для передачи вращательного момента, генерируемого в цитоплазматической мембране, на крюк, а далее на флагеллиновую нить. Расщепление стержня на две части происходит при инкубации базального тела при низких значениях рН [194] или при выращивании мутанта по *fliF* гену (MS-комплекс) в достаточно вязкой среде [168]. Дистальная и проксимальная части стержня имеют разные диаметры — 18 нм и 13 нм, соответственно. Причина такой разницы в диаметре единой структурной составляющей части базального тела неясна, но предполагается, что таким образом внешний цилиндр удерживается на стержне и не скользит по нему [194].

Дополнительные структуры базального тела

Существует несколько дополнительных компонентов базального тела, обнаруженных в НВВ жгутиков *S. typhimurium*, которые синтезируются под контролем главного жгутикового оперона [108]. Функция этих белков неясна. Идентификация их генов и определение первичной последовательности составляющих их белков помогли бы в выяснении их роли в базальном теле.

Базальные тела нескольких видов бактерий с единственным полярно расположенным жгутиком содержат дополнительную струк-

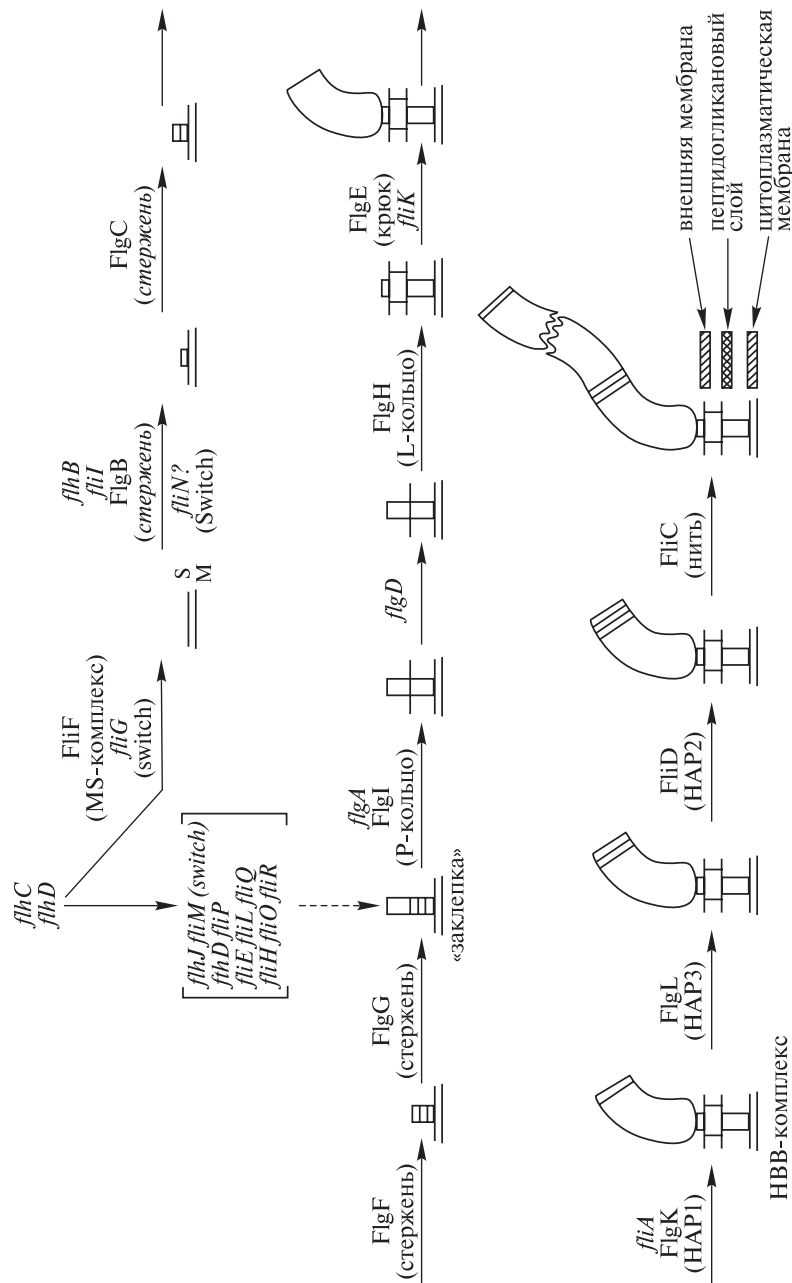


Рис. 2. Сборка жгутиков бактерий. На схеме обозначены гены, принимающие участие в биогенезе жгутиков [110].

туру, состоящую из одного или пары больших дисков 80—170 нм в диаметре, чувствительных к протеазам и ассоциированных с внешней мембраной [45, 46, 47, 61, 67, 136]. Такие диски обнаружены и изолированы у жгутиков *Wolinella succinogenes* [61, 136]; похожие структуры обнаружены у *Aquaspirillum serpens* и обозначены как SMRs диски (диаметр 90 нм) [46], а также у *Vibrio cholerae* и *Campylobacter fetus* [67]. Следует особо подчеркнуть, что эти диски никогда не встречаются у бактерий с перитрихальным жгутикованием, а встречаются только у монотрихов. Функция их неизвестна, возможно, они играют роль опорки или закоривающего устройства для единственного жгута.

Нить бактериального жгутика

Нить БЖ (НБЖ), которую грубо можно представить как закрученную винтом цилиндрическую белковую структуру, составляет более 95% от общей массы жгутика и построена из субъединиц единственного белка — флагеллина [26]. У живой клетки эта структура достигает 20 мкм, а в растворе нить нормальной формы выглядит как спираль, имеющая шаг от 2,0 до 2,5 мкм и диаметр около 0,4 мкм. Параметры спирали варьируют в зависимости от вида и штамма микроорганизма [118, 132]. При высушивании жгутиков на пленке-подложке для электронной микроскопии они принимают форму правильной синусоиды. Согласно Лейфсону [145], определяющими параметрами для жгутика являются длина и амплитуда его синусоиды. Отношение длины волны к ее амплитуде постоянно для каждого штамма. Нормальный жгутик имеет длину около 100 мкм и длину волны (λ) ~2,5 мкм. Но существуют жгутики с аномальной, вдвое меньшей длиной волны, чем у нормальных жгутиков. Это так называемые «curly»-жгутики. Существуют и прямые жгутики. Поскольку форма надспирали БЖ является одним из условий его функционирования, этому будет посвящен раздел «Строение НБЖ и ее полиморфные переходы».

Большинство изученных в настоящее время НБЖ перитрихальных бактерий имеет диаметр около 20 нм, однако, существуют отклонения от этого значения, поскольку молекулярная масса молекул флагеллина колеблется в довольно широком интервале даже в пределах одного вида. В частности, известно, что молекулярная масса флагеллинов *E. coli* у разных штаммов находится в интервале 37—69 кДа, а диаметр их жгутиков колеблется от 19 нм до 27 нм [142]. Иногда в состав НБЖ некоторых видов бактерий входят два флагеллина как, например, у *Caulobacter crescentus* [184], *Bdellovibrio bacteriovorus* [207] и *Helicobacter pylori* [133]. Жгутик *Campylobacter coli* VC167 также является гетерополимером двух различных флагеллинов, и оба они требуются для нормального функционирования филамента [77].

Другие штаммы *Campylobacter coli* и *Campylobacter jejuni* имеют два флагеллиновых гена, хотя оба не обязательно экспрессированы [77]. В нитях *Campylobacter*, родственника *Helicobacter pylori*, два флагеллина собираются в две различные области: 57 кДа-флагеллин образует минорную крюк-проксимальную область, а 56 кДа-флагеллин образует весь оставшийся филамент [133]. Два флагеллина жгутиковой нити *Rhizobium meliloti* также собираются в различных ее областях [175]. А полностью функциональная нить *C. crescentus* собрана из четырех областей: 60 нм крюк-проксимальная зона собрана из 29 кДа-флагеллина; 1–2 мкм зона — 27,5 кДа; переходная зона из двух 27,5 и 25 кДа флагеллинов; четвертая зона (оставшаяся часть нити) из 25 кДа флагеллина [56, 162].

Почему жгутики некоторых немногочисленных видов эубактерий состоят из нескольких флагеллинов, неизвестно. Возможно, по мере изучения функционирования жгутиков архей, имеющих мультифлагеллиновый состав, кое-что прояснится и для жгутиков бактерий. Однако, на сегодняшний день можно констатировать лишь то, что вариант мультифлагеллинового состава НБЖ является исключением из правила, *обычно у эубактерий нить жгутика однокомпонентна и состоит из единственного флагеллина.*

Основополагающими в области изучения физико-химических свойств флагеллина в составе НБЖ являются работа Абрама и Коффлера [18] и работа Асакуры с соавторами [28]. В них впервые убедительно показано, что диссоциированные на отдельные мономеры флагеллина НБЖ способны к самосборке в условиях *in vitro*. При этом образуются неотличимые от интактных нити с теми же свойствами. Самосборка НБЖ является отдельной областью изучения этих структур, поэтому ей ниже будет посвящен отдельный раздел.

Флагеллин — глобулярный белок с изоэлектрической точкой в области рН 4–5 и широким спектром молекулярных масс — от 25 до 69 кДа в зависимости от вида и штамма микроорганизма. Аминокислотный состав флагеллина имеет характерные особенности, свойственные только этому белку, и молярное соотношение входящих в его состав аминокислот у разных бактерий меняется сравнительно мало. Аминокислотный анализ нескольких десятков флагеллинов различных бактерий показал полное отсутствие цистеина и триптофана; тирозин и фенилаланин присутствуют в очень незначительном количестве. То есть дисульфидных связей флагеллин не имеет и содержит очень мало ароматических аминокислот [48, 160, 191, 193]. Так, в молекуле флагеллина *Bacillus subtilis* 168, состоящей из 304 остатков аминокислот, обнаружено 5 молекул фенилаланина и 1 молекула тирозина [49]. Все исследованные флагеллины содержат немного

гистидина и пролина, свойством которых является прерывание α - и β -спиралей, причем последний часто вообще отсутствует [160, 193]. Для флагеллина характерно высокое содержание дикарбоновых аминокислот и аланина. На их долю приходится до 50% от общего количества аминокислот. Интересно, что все наружные белки (кроме белков оболочки эндоспор) теряют цистеин, а пролин и триптофан содержат в очень небольших количествах [227].

В 1973 году впервые определена полная аминокислотная последовательность флагеллина *B. subtilis* 168. При этом отмечена высокая степень гомологии N- и C-концов этого флагеллина с N- и C-концами *B. subtilis* W23 [48]. В дальнейшем появилась возможность определения первичной структуры флагеллинов по нуклеотидной последовательности их генов. Это проделано для флагеллинов *C. crescentus* [74]; *E. coli* [139]; четырех штаммов *Salmonella* [111, 222]. При сравнении первичной структуры этих флагеллинов с ранее известными отмечена высокая степень гомологии аминокислотных последовательностей N- и C-концов — 80% и 60% гомологии, соответственно; и всего 20% гомологии в центральной части. Предполагалось, что по степени гомологии можно судить об эволюционном родстве разных штаммов бактерий. Эти исследования подтвердили ранее высказанное Иино предположение [96], что концевые участки молекулы флагеллина отвечают за общие для всех флагеллинов полимеризационные свойства, а центральная часть молекулы отвечает за антигенные свойства, меняющиеся от штамма к штамму. К настоящему моменту установлены нуклеотидная и аминокислотная последовательности для 29 флагеллинов [227], широко представляющих многие ветви эубактериального филогенетического древа, включая спирохеты, γ (+) виды, пурпурную филогенетическую группу и т.д. Анализ этих последовательностей подтверждает наличие трехдоменной структуры флагеллинов.

Флагеллин ряда штаммов рода *Salmonella* содержит необычную аминокислоту — ϵ -N-метиллизин, содержание которой близко к содержанию лизина [25]. Здесь же обнаружено присутствие производной этой аминокислоты — ϵ -N-диметиллизина [76]. Небольшое количество ϵ -N-метиллизина обнаружено у флагеллина *Spirillum serpens* [76]. Синтез ϵ -N-метиллизина происходит уже в составе молекулы флагеллина путем метилирования лизина с помощью S-аденозилметионина [124, 210]; метилированные остатки лизина находятся на поверхности молекулы флагеллина. Биологический смысл образования лизиновых производных может заключаться в том, что молекула после метилирования становится более устойчивой к воздействию внешних факторов.

Крюк бактериального жгутика.

Крюк БЖ представляет собой особую структуру небольших размеров и изогнутой формы, отчетливо видимую на электронных микрофотографиях и отличающуюся от НБЖ по характеру расположения субъединиц. Крюк выполняет роль связующего звена между базальным телом и нитью. Длина крюка жгутика *E. coli* составляет 45 нм и 90 нм — у *S. typhimurium* [190]. Крюки более устойчивы, чем нити жгутиков, к воздействию органических растворителей, детергентов, кислот и щелочей. Это их свойство используется исследователями для получения комплексов крюк-базальное тело (НВВ) и для выделения крюков в отдельную фракцию [19, 53, 54].

Крюки состоят из молекул единственного белка, отличного от флагеллина. Молекулярная масса белка крюка (БК) нормального и мутантного штамма *E. coli* равна 42 кДа [79], у *B. subtilis* — 33 кДа [54], у *Salmonella* и *Pseudomonas* — 43 кДа [112, 183] и у *Caulobacter crescentus* — 72 кДа [185]. Спектр кругового дихроизма БК *Salmonella* несколько необычен. В то время как значение молярной эллиптичности при 222 нм у флагеллина равно $9 \text{ см}^2\text{град}^{-1} \text{ моль}^{-1}$, молярная эллиптичность БК при 222 нм составляет 1/9 от этого значения, что свидетельствует об очень низком содержании в белке α -спирали [112].

На примере жгутиков *E. coli* [188], *S. typhimurium* [112] и *C. crescentus* [185] показано, что аминокислотный состав БК, также как и флагеллина, характеризуется отсутствием триптофана и цистеина, но, в отличие от флагеллина, не содержит ϵ -N-метиллизин, и N-концевой аминокислотой у него является серин [112]. Полученная антисыворотка к целому крюку или БК избирательно взаимодействует только с крюком и не взаимодействует с НБЖ. Этот факт подтверждает, что крюки имеют антигенную специфичность, отличную от нити жгутика [54, 112]. Характерным фактом является и то, что, в отличие от антигенной активности НБЖ, у крюков последняя полностью сохраняется при нагревании до 72 °С и теряется лишь при нагревании до 80 °С [54].

Крюк представляет собой короткий сегмент правовращающей спирали, образованный 120 копиями единственного белка, организованного в гексагональную решетку с параметрами, почти идентичными параметрам нити жгутика [79, 188, 219]. Трехмерная реконструкция крюков обнаружила наличие ложбинок, идущих в 6-заходном направлении [219]. Эти ложбинки позволяют крюку изгибаться без стерических взаимодействий между мономерами на внешнем радиусе, что обеспечивает функционирование крюка как гибкого сочленения для образования пучка нитей жгутиков при плавании клетки. В то время как в нитях жгутиков протофиламенты образуют 11-заходную

спираль, в крюках 16-заходоная спираль образует структуру крюка [122]. Если это так, то различия в упаковке субъединиц НБЖ и крюков требуют дополнительные стыковочные устройства между ними, каковыми и являются НАР1 и НАР3.

НАР-белки бактериальных жгутиков

НАР-белки (hook-associated proteins) были сначала идентифицированы как минорные компоненты, сопровождающие выделение крюков в отдельную фракцию [83]. Всего их в структуре жгутика оказалось три — НАР1, НАР2 и НАР3. НАР1 и НАР3 находятся на стыке между крюком и нитью, причем зона НАР1 является проксимальной по отношению к клетке. НАР2 — кэпирующий белок, располагается на дистальном конце НБЖ (рис. 1а).

Установлено, что один жгутик содержит 10—15 копий НАР1, 10—30 копий НАР3 и 6—12 копий НАР2 [99, 109]. Введением радиоактивной метки в НВВ-комплекс определили, что жгутик содержит около 13 молекул НАР1 [109]. Поскольку НАР1 и НАР3 присутствуют в эквимольных количествах [83], можно предположить, что оба белка могли бы образовать два поворота основной спирали в жгутике, если они собираются на той же самой решетке, что крюк и нить. Четыре таких витка образуют сегмент около 10 нм в длину, что согласуется с размерами стыковочной области, наблюдаемой в электронном микроскопе [99]. НАР1 и НАР3 локализованы на границе между нитью и крюком жгутиков. Функция НАР1 не ясна; данный белок не требуется для регуляции роста крюка, поскольку у мутантов, не имеющих этого белка, длина крюка нормальная [81]. НАР3, по-видимому, участвует в стабилизации структуры нити, поскольку некоторые мутации в НАР3 приводят к неправильной спиральности нити.

Белок НАР2 (FliD) имеет молекулярную массу 49 кДа. Его роль заключается в регулировании присоединения синтезированного в клетке флагеллина на конце жгутика и в защите жгутика от присоединения экзогенного флагеллина из среды [84]. Мутант по *fliD* неподвижен из-за потери флагеллиновой нити, а сами молекулы флагеллина у такого мутанта уходят в культуральную среду, причем флагеллин как таковой сохраняет способность полимеризоваться *in vitro* [100]. Эти же авторы [101], используя FliD сверхпродуцирующую плазмиду, получили значительное количество чистого FliD и показали, что при физиологических условиях и высокой концентрации FliD образуется достаточно большой комплекс пентагональной формы с внешним диаметром 10 нм. Этот размер соответствует размеру кэпирующей структуры на конце флагеллиновой нити жгутика

дикого типа клеток. При добавлении этой пентагональной кольцевой структуры в культуральную среду мутанта *Salmonella* по *fliD* почти все клетки становились подвижными.

Так же как флагеллин и белок крюка, НАР-белки экспортируются флагеллин-специфическим путем, то есть без сигнального пептида непосредственно по центральному каналу [88]. Эксперименты по реконструкции *in vitro* крюков с НАР-белками [84, 99] показали, что эти минорные белки собираются в порядке НАР1-НАР3-НАР2, так же как они располагаются и в структуре интактного жгутика. То, что НАР1 и НАР3 не образуют вытянутые полимеры *in vitro* даже при очень высокой концентрации мономеров, говорит о том, что НАР1 и НАР3 обладают способностью к саморегулированию размеров соответствующих зон на жгутике.

Структура и экспорт аксиальных компонентов

Жгутиковые структуры делятся на кольцевые и аксиальные. Кольца базального тела относятся к первой категории; стержень, крюк, флагеллиновая нить, крюк-филамент адапторы (НАРs-структуры) — ко второй категории. Известно, что аксиальные белки образуют длинную полую трубку. Возможно, они обладают определенными характеристиками конструции, позволяющими экспортировать белки флагеллин-специфическим способом [88]. Действительно, гомология аминокислотных последовательностей среди аксиальных компонентов жгутика *S. typhimurium* указывает на то, что эти белки родственные, а также, что они являются частью общей структурной организации [89].

Как и у флагеллинов, N- и C-концевые последовательности аксиальных белков более консервативны по сравнению с центральной частью, которая варьирует по длине и составу у этих белков разных бактерий. Вондервист с соавт. показали, что N- и C-концевые области БК (возможно и НАР2), также как и у флагеллинов, разупорядочиваются в растворе, что также указывает на общность их структуры [218]. Для экспорта аксиальных компонентов, по крайней мере, на уровне первичной последовательности должен существовать общий сигнал. Хомма предположил, что этот сигнал возникает на уровне вторичной или более высоких уровней молекулярной структуры. Однако, правильная сборка жгутика требует, по-видимому, различных сигналов для различных компонентов [88, 89]. Вондервист считает, что концевое разупорядочивание является как раз той структурной особенностью, которая направляет экспорт аксиальных белков [218]. На сегодняшний день можно утверждать лишь то, что должен существовать контрольный механизм такого особого экспорта аксиальных

белков. Так как эти белки экспортируются и собираются упорядоченным способом, возможно, что комбинация первичной последовательности и конформации служит сигналом для экспорта этих белков.

Сборка НБЖ in vivo

На живой бактериальной клетке рост НБЖ происходит за счет надстройки его дистального конца. Впервые этот факт продемонстрирован в 1959 году, когда клетки, имеющие оборванные жгутики нормальной формы, инкубировали в среде с аналогом фенилаланина — п-фторфенилаланином. Восстановление нормальной длины жгутиков, то есть ее рост происходил за счет образования на дистальном Т-конце спиральных участков с параметрами «курчавых» жгутиков [123]. Подобные эксперименты были проведены позднее с использованием меченого тритием лейцина [58]. Метка также обнаруживалась на достраивающихся дистальных концах жгутиков. Более того, удалось достроить прямые жгутики истощенных клеток мутанта *S. typhimurium* экзогенным флагеллином, полученным от родительского штамма с нормальными жгутиками [58, 97]. Эти мутанты с фрагментами прямых жгутиков помещали в среду с высоким содержанием родительского флагеллина и создавали условия для его полимеризации. Экзогенный флагеллин включался в состав жгутиков на дистальном конце и при этом неподвижный мутант приобретал подвижность, так как на концах жгутиков полимеризовалась нить нормальной формы.

Изолированные в отдельную фракцию крюки также способны служить центром полимеризации флагеллина, причем полимеризация идет только на дистальных концах крюков [94, 95, 96].

Приведенные результаты дополняют картину синтеза всей органеллы *de novo*, основанную на работах по изучению морфогенеза БЖ (см. «Базальное тело»).

III. СИСТЕМА ГЕНОВ ЖГУТИКОВОЙ ПОДВИЖНОСТИ

В образовании и осуществлении подвижности жгутика участвуют около 40 генов, и еще десять генов кодируют компоненты хемотактической системы [110, 151]. Эти гены образуют 13 оперонов. Имеется функциональная гомология почти между всеми соответствующими генами *E. coli* и *S. typhimurium* [52, 230].

Существуют три категории фенотипов: безжгутиковый (Fla^-), неподвижные мутанты (Mot^-) и с отсутствующим хемотактическим ответом (Che^-). Обозначение генов жгутиковой системы основано на расположении генов на хромосоме: *flg* (район I), *flh* (район II), *fli*

(район IIIa или IIIb) и *flj* (особый район, обнаруженный только у *S. typhimurium*). За исключением некоторых генов-рецепторов, которые расположены на отдельных локусах, гены жгутиковой системы и близкие им у *S. typhimurium* и *E. coli* обнаружены только на нескольких хромосомных локусах, где они образуют протяженные кластеры значительных размеров. Эти кластеры обозначены районами I, II, III. Недавно показано, что район III содержит длинное пространство ДНК, не имеющее никакого отношения к жгутикам, и поэтому этот район был разделен на два района — IIIa и IIIb [151].

Каждый район включает несколько оперонов, содержащих от 1 до 9 генов. Все эти опероны организованы как регулоны с определенной иерархией. В таблице представлены гены и их продукты вместе с описанием их функций. Многие гены крюка и базального тела обнаружены в районе I, включая некоторые гены стержня (*flgB*, *flgC*, *flgF*, *flgG*), наружных колец (*flgH*, *flgI*), крюка (*flgE*) и нить-крюк взаимодействия (*flgK*, *flgL*). Из остальных, чья функция известна, *flgD* контролирует сборку жгутика от стержня до крюка. Для сборки наружных колец базального тела необходим *flgA*, в то время как *flgM* предотвращает экспрессию поздних генов, подобных генам нити, до тех пор, пока полностью не произойдет сборка комплекса крюк—базальное тело.

Таким образом, район I определяет синтез проксимальных компонентов структуры жгутиков. Район II содержит все гены хемотаксиса (*cheA*, *cheB*, *cheR*, *cheW*, *cheY*, *cheZ*), два рецепторных гена (*tar*, *tap*), и гены подвижности (*motA* и *motB*). Продукты этих генов используются только после полной сборки базального тела.

Продукты двух генов *motA* и *motB* требуются для энергизации мотора; жгутики *che* мутантов функциональны, но имеют измененную переключающую мотор в различные режимы систему, поэтому клетки не способны адекватно отвечать на изменение условий окружающей среды [150, 170].

Район IIIa, самый маленький, содержит главным образом гены, необходимые для сборки жгутиков. Он содержит *fliC* — ген флагеллина, ген s-фактора, который инициирует транскрипцию гена *fliC* и других поздних генов. Исследование неполных базальных структур, образованных мутантами по генам района IIIb, показало, что гены этого района необходимы на ранних стадиях процесса сборки базального тела. К нему относится ген MS-кольца (*fliF*) и другие ранние компоненты базального тела (*fliE*), *switch*-переключения вращения базального тела (*fliG*, *fliM*, *fliN*), возможно, часть экспортного аппарата (*fliH*, *fliI*). Здесь же находится *fliK*, который отвечает за контроль длины крюка.

Наиболее изученные жгутики *S. typhimurium*, *E. coli* [139] и *B. subtilis* [49, 96] состоят из одного флагеллина, однако, имеется ряд бактерий, у которых в нити жгутика обнаружено несколько флагеллинов, кодированных несколькими генами. Так, например, у *C. crescentus* имеется 2 кластера генов, кодирующих флагеллины [165].

IV. САМСОСБОРКА НИТЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЖГУТИКОВ

НБЖ — один из наиболее удобных объектов изучения общих принципов самосборки биологических структур. Молекулы флагеллина, из которых состоят НБЖ, не образуют ковалентных связей, поэтому эту надмолекулярную структуру можно диссоциировать на мономеры понижением рН до 2,0 [18, 28], спиртом [156], нагреванием или обработкой ацетоном [28] и др. Образующиеся различными способами мономеры представляют один и тот же белок, свойства которого не меняются в зависимости от способа получения.

Асакура с соавт. [28] заметили, что в отсутствие солей при обработке ацетоном происходит лишь частичная (80%) деполимеризация нитей. Если убрать ацетон и добавить в образовавшуюся смесь полимера и мономера 0,3 М КСl, резко возрастает вязкость раствора. Если же полимерную фракцию предварительно осадить, вязкость не возрастает. Таким образом была обнаружена возможность реконструкции НБЖ на затравках. В дальнейшем этот способ стал широко применяться для изучения свойств реконструированных жгутиков, а в качестве затравки использовались короткие фрагменты НБЖ, полученные ультразвуковой обработкой [29, 30].

Реконструкция (полимеризация, самосборка) флагеллина происходит при 2 °С и даже в замороженных образцах, следовательно не является ферментативной реакцией [18]. Было продемонстрировано, что средняя длина жгутиков, растущих на затравочных фрагментах, линейно увеличивается с возрастанием количественного соотношения мономер/затравочные фрагменты [28]. Согласно этой работе, процесс полимеризации флагеллина — это полимеризационное равновесие в системе флагеллин-НБЖ, которое устанавливается в два этапа. На первом этапе достигается ситуация, когда содержание мономера находится в обратимом равновесии с существующим в растворе полимером [169]. На примере флагеллина *Salmonella* было показано, что при 40 °С скорость полимеризации равна скорости деполимеризации, а концентрация флагеллина в растворе стремится к постоянному значению, определяемому температурой. То есть обратимость равновесного состояния означает, что образованная структура полимера не постоянна, состояние каждой молекулы на

конце жгутика не фиксировано, в результате чего часто происходят акты диссоциации и реассоциации нити жгутика. Равновесная концентрация флагеллина не зависит от количества жгутиков в растворе и определяет критическую концентрацию, при которой начинается образование жгутиков [71].

Перераспределение в количестве и размерах полимеров происходит лишь после того, как устанавливается равновесная концентрация мономера. Изменение в длине каждого полимера происходит как диффузный процесс, а время, необходимое для того, чтобы концентрация мономера приблизилась к равновесной, намного короче времени, требуемого для завершения перераспределения длины полимеров. Полностью процесс достижения полимеризационного равновесия в системе флагеллин-НБЖ можно представить состоящим из четырех этапов:

Нуклеация → рост → равновесие мономер-полимер →
→ перераспределение длины жгутиков.

Для нуклеации достаточно столкновения четырех мономеров [26, 220]. Эта цифра меньше количества продольных рядов субъединиц флагеллина в составе жгутика и равна числу мономеров, необходимому для образования затравки при полимеризации другого белка — актина [169]. Стадия нуклеации есть лимитирующая стадия процесса и во многом определяет его скорость. Нуклеация в ряде случаев происходит самопроизвольно. Так, спонтанная нуклеация была обнаружена при нейтрализации закисленного раствора флагеллина жгутиков рода *Bacillus* [6, 18, 138], а также при полимеризации флагеллина в присутствии высаливающих агентов [20, 149, 220]. Даже при полимеризации метастабильного раствора флагеллина, полученного нагреванием НБЖ, можно добиться спонтанной нуклеации, если повысить концентрацию белка [213] или проводить реконструкцию НБЖ в тонком слое раствора, помещенном между двумя стеклами [102].

Визуальное наблюдение растущего жгутика обнаружило, что скорость роста каждого отдельного жгутика практически постоянна. Однако, периоды линейного роста НБЖ через разные промежутки времени сменяются периодами остановки роста, которые также различаются своей продолжительностью, а затем рост НБЖ возобновляется. В результате при практически одинаковой скорости роста полимера длина образующихся НБЖ значительно различается [102]. Наличие периодов остановки роста НБЖ *in vitro* авторы объясняют тем, что к концу растущего жгутика может присоединиться денатурированная молекула флагеллина или какой-то примесный материал, и возобновление роста будет зависеть от того, является присоединение обратимым или необратимым [102].

Процесс полимеризации флагеллина сопровождается значительными конформационными изменениями белковой молекулы. Флагеллин разных бактериальных видов содержит в мономерной форме около 30% α -спирали, а в полимерной форме — около 50%. Методами дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма продемонстрировано, что при включении мономера в состав НБЖ содержание α -спирали возрастает более чем в 1,5 раза. Изменение конформации флагеллина обратимо [6, 130, 213]. Ранее мы показали, что при деполимеризации НБЖ (рН 2) снижение содержания α -спирали сопровождается одновременным нарастанием антипараллельной β -структуры в составе флагеллина. Полимеризация же флагеллина сопровождается увеличением содержания α -спирали и соответственно снижением количества β -структуры [7].

Изучая сополимеризацию флагеллина *Proteus* и флагеллина *Salmonella*, Курода столкнулся с интересным фактом. В одних и тех же физиологических условиях флагеллин *Salmonella* полимеризовался быстрее флагеллина *Proteus*, но в тех же условиях при сополимеризации из смеси двух компонентов флагеллин *Proteus* успешно конкурировал с флагеллином *Salmonella* даже на затравках *Salmonella* [138]. На основании этих экспериментов Асакура предложил модель двухступенчатой полимеризации флагеллина [27]. В этой модели мономерный флагеллин в растворе находится в метастабильном состоянии и не способен полимеризоваться. При добавлении затравки начинается полимеризация в две стадии: первая — обратимое связывание, вторая — внедрение мономера в состав полимера. Во время второй стадии происходят конформационные изменения молекулы флагеллина, в результате которых она оказывается способной встроиться в полимер и в дальнейшем присоединить следующую молекулу. Предложенная модель объясняла результаты Куроды тем, что для флагеллина *Proteus* более длительной являлась вторая стадия, а для флагеллина *Salmonella* — первая.

Предложенная Асакурой модель — существование промежуточного конформационного состояния флагеллина до его непосредственного включения в состав полимера при самосборке — подтверждена экспериментально нами [166]. Мы заблокировали реконструкцию НБЖ использованием модифицированного по тирозину флагеллина. Такой флагеллин сохранял основные свойства интактного белка, но терял способность к полимеризации. А в качестве реагента, сдвигающего равновесие в сторону образования полимера, был использован полиэтиленгликоль. При такой постановке эксперимента нам удалось зафиксировать методом кругового дихроизма изменение конформации белка в интервале рН 4,3—10,0, то есть при тех значениях рН, при

которых в обычных условиях флагеллин находится в полимерной форме. Результаты этой работы отражают, по-видимому, возможную для флагеллина структурную перестройку в процессе его полимеризации до включения в состав полимера.

V. СТРОЕНИЕ НБЖ И ЕЕ ПОЛИМОРФНЫЕ ПЕРЕХОДЫ

Способность НБЖ принимать несколько различных спиральных форм обозначена термином «полиморфизм». Таким свойством обладают как жгутики на живой клетке, так и изолированные в отдельную фракцию НБЖ [26, 96, 154]. Более того, изменение формы и размеров надмолекулярной спиральной структуры БЖ есть условие его функционирования.

Исследуя окрашенные жгутики под световым микроскопом, Лейфсон и Пален [146] предложили для обнаруженных ими двух различных форм нитей жгутиков *Salmonella* термины «нормальные» и «курчавые». Отличаются эти формы длиной волны синусоиды, образующейся при проекции этих жгутиков на плоскость. Дальнейшее изучение ими форм нитей, различающихся по длине волны и амплитуде, дало возможность добавить еще две формы — «полукольцевые» и «кольцевые» [147].

Лейфсон показал при сравнительном изучении многочисленных видов сальмонелл и протей, что длина волны нити определяется как генетическими, так и внешними факторами [146]. Были получены мутанты, НБЖ которых имели необычную форму, например, неподвижные мутанты с прямыми жгутиками. Интересно, что достаточно всего одной аминокислотной замены аланина на валин, чтобы у *V. subtilis* 168 вместо нормальных образовались прямые жгутики, а клетки потеряли подвижность [157].

Способность «нормальных» жгутиков трансформироваться в «курчавую» форму обнаружена еще в 1955 г. как случайное явление, и этот феномен был обозначен термином «biplicity» [174]. После этого неоднократно высказывались предположения о тесной взаимосвязи между способностью жгутиков к проявлению полиморфизма и механизмом бактериальной подвижности [10, 26, 145], однако, доказательства этой взаимосвязи появились только в 70-х годах. Оказалось, что *in vivo* при перемещении клетки в среде происходит постоянный переход между «нормальными» и «курчавыми» НБЖ [153, 154]. Нормальный жгутик имеет левозакрученную спираль с шагом 2,3 мкм и диаметром 0,4 мкм [186]. При линейном движении все нити жгутиков имеют «нормальную» форму и переплетены в тяж, благодаря вращению которого и происходит движение клетки. При этом мотор каждого

отдельного жгутика вращается против часовой стрелки (counterclockwise, CCW). При необходимости изменения направления движения клетки в среде моторы жгутиков переключаются на вращение по часовой стрелке (clockwise, CW), при этом происходит расплетение пучка жгутиков, клетка «дрожит» на месте, и это состояние называется «tumbling». В таком состоянии клетка нить жгутика из нормальной левозакрученной спирали переходит в «курчавую» правозакрученную спираль с шагом 1,1 мкм и диаметром 0,3 мкм. Такое состояние клетки является переходным при выборе ею другого направления движения. Трансформация происходит не мгновенно. Правые спирализации движутся от проксимального к дистальному концу жгутика. В месте перехода жгутик изгибается, образуется как бы перелом нити. Макнаб и Орнстон [154] заключили, что гидродинамическая сила, воздействующая на жгутик, является причиной правой спирализации. Когда вращение правостороннее, сила вязкости закручивает жгутик вправо. В вязкой среде сопротивление вращающемуся тяжу больше, и, следовательно, возрастает эффективность стабилизации правоспиральной формы. Возможно, что небольшая длина волны и амплитуда правозакрученных «курчавых» жгутиков уменьшает возможность образования тяжа, поэтому тяж расплетается в состоянии «tumbling», и клетка дрожит на месте. Затем базальные тела опять начинают вращаться CCW, НБЖ приобретают левозакрученную «нормальную» форму спирали, и клетка движется в другом направлении [154].

Иначе обстоят дела у бактерий с полярно расположенными жгутиками. У *Chromatium okenii* тяж из 50 жгутиков образуется на одном из полюсов. Вместо дрожания клетка периодически реверсирует, двигаясь тяжем вперед [35]. Если бы жгутики изменили свою спиральность, то правосторонний тяж, вращаясь по часовой стрелке, должен был бы толкать клетку, а не тянуть ее. Поэтому, вероятно, жгутики остаются левоспиральными, в то время как тяж, вращаясь направо, тянет клетку.

У биполярной клетки два пучка флагелл находятся на противоположных полюсах. Ведущий тяж загнут назад и вращается вокруг тела клетки; дистальный тяж является продолжением клетки и вращается вокруг своей оси. Передний тяж, по-видимому, изогнут под действием силы трения. Тяжи периодически меняют направление вращения и реориентируются, вызывая реверсию клетки [135].

Явление полиморфизма плодотворно изучалось *in vitro* при реконструкции НБЖ. На затравках мутантов с «прямыми» или «курчавыми» жгутиками мономерный флагеллин полимеризовался в форму «нормальных» НБЖ [90]. Процессы, происходящие в НБЖ при движении бактерий, были смоделированы *in vitro* и наблюдались

при помощи темнопольной световой микроскопии [92]. НБЖ приклеплялись антителами к стеклу одним концом и помещались в поток вязкого раствора метилцеллюлозы, при этом в них происходили переходы из левозакрученной «нормальной» спирали в правозакрученную «курчавую» форму. Происходящие изменения в НБЖ снимали на киноплёнку, что позволило обнаружить трехэтапный переход одной формы в другую. Первый этап — инициации, то есть возникновение на «нормальной» нити «курчавого» участка; второй этап — роста, то есть удлинение этого участка и третий этап — перемещения, когда «курчавый» участок как бы перемещается к противоположному концу нити. Переходы начинались с закрепленного конца, как и предполагалось, под действием гидродинамических сил. Аналогичные переходы наблюдались в растворах при добавлении этиленгликоля и метанола [91]. Нужно отметить, что в свободно плавающих клетках переходы НБЖ происходят значительно быстрее, чем в прикрепленных к стеклу.

Полиморфные переходы НБЖ *in vitro* вызываются самыми разными факторами. На форму жгутиков влияют изменения температуры и рН [78, 121, 159]. Образование прямых НБЖ наблюдалось при высаливании сульфатом аммония в присутствии 1,5 М NaCl [117], изменениях рН [18], разрушении НБЖ мочевиной с последующей реконструкцией при диализе [6, 7, 11].

Для ответа на вопрос, что же лежит в основе полиморфных трансформаций БЖ, была предложена модель, основанная на постулате о существовании в составе жгутиков молекул флагеллина, находящихся в разных конформационных состояниях [26, 40]. Модель базировалась на данных рентгеновской и оптической дифракций, и ее развитие шло параллельно с накоплением информации о свойствах и строении молекул флагеллина в составе жгутиков [42, 167].

Молекулы флагеллина организованы в псевдогексагональную решетку на поверхности нити. На один оборот спирали приходится 5,5 мономеров при основной 1-заходовой спирали. Термин «заходовой» («start») обозначает число идентичных «прядей» мономеров, которые могут вместе охватить все субъединицы в нить. На поверхности жгутика выделено четыре типа спиралей: 1-, 5-, 6- и 11-заходовые спирали. 5- и 6-заходовые, идущие в разных направлениях, образуют на поверхности НБЖ картину, названную «шевроном» [167]. Вершина «шеврона» всегда направлена к проксимальному концу жгутика [167, 187].

В 1967 г. Клуг [131] предложил гипотезу, согласно которой образование суперспирали и изменение ее конфигурации при полиморфных переходах обусловлено внутренними свойствами самой нити жгутика,

а точнее, уникальными свойствами молекул флагеллина в его составе. Согласно Клогу, жгутик в живой клетке имеет спиральную форму; каждая его субъединица рассматривается как часть спирального тяжа, свернутого в другую спираль, и имеет два типа связей, находящихся на разных радиусах. Расположение субъединиц соответствует минимальной свободной энергии («квазиэквивалентное» состояние). Чтобы поддержать субъединицы в таком состоянии при функционировании жгутику требуется совсем незначительная перестройка молекул флагеллина $\sim 0,1$ нм. Это обязательно должно привести к деформации оси цилиндра и трансформации его в такую спираль, в которой энергия напряжения каждой связи окажется минимальной, причем эта форма будет способна принимать своё конечное состояние без какой-либо поставки энергии извне. Параметры спирали должны зависеть от мест локализации связей между субъединицами, а сами субъединицы оказываются в неравноценных, квазиэквивалентных состояниях, что отразится прежде всего на их конформации [131].

По версии Асакуры [26] субъединицы флагеллина в НБЖ могут находиться в двух различных конформациях, в то время как Калладин [41] предлагает альтернативные межсубъединичные взаимодействия. Обе версии модели подразумевают некоторое искажение субъединиц при упаковке в нить. Продольные ряды субъединиц, представляющие собой 11-заходовую спираль, включают в себя молекулы флагеллина в какой-то одной конформации. Изменение конформационного состояния субъединиц внутри продольных рядов, которое вероятнее всего происходит на уровне третичной структуры, приводит к изменению соотношения продольных рядов, что отражается в изменении угла наклона 11-заходовой спирали. В свою очередь, между наклоном продольных рядов и изгибом спирали жгутика имеется предсказанная Калладином тесная взаимосвязь, следствием которой является синусоидальный вид НБЖ [41]. Параметры полиморфных производных, выявленные ранее в экспериментах по сополимеризации и трансформации НБЖ [31, 118, 119], находятся в хорошем соответствии с этой теоретически обоснованной кривой, причем, согласно модели возможно существование двенадцати форм НБЖ, из которых в настоящее время известно девять [120]. Среди таких теоретически предсказанных форм БЖ должны существовать два типа прямых жгутиков, полностью состоящих из молекул флагеллина какой-то одной конформации. Один из них должен иметь наклон продольных рядов субъединиц вправо (7°), другой — влево ($2,5^\circ$). Действительно, такие типы прямых жгутиков были обнаружены и изучены методами оптической и рентгеновской дифракции, кроме того, была проведена сополимеризация их флагеллинов [167]. Изменение количественного

соотношения флагеллинов, образующих два разных типа прямых жгутиков, привело к появлению целого ряда спиральных форм сополимеров, в том числе спиралей, имеющих нормальную и «курчавую» формы [120]. Эти результаты явились хорошим подтверждением предложенной модели, объясняющей полиморфные переходы в НБЖ.

Ряд данных указывает на существование подвижного участка в молекуле флагеллина [187]. Такой участок, возможно, отвечает за конформационные изменения, подобные предложенным в работе Калладина [41], и имеет непосредственное отношение к полиморфизму НБЖ. Интересен факт существования мутанта, жгутики которого легко меняют свою форму [98]. Наличие такого мутанта можно объяснить тем, что мутация произошла как раз в подвижном участке молекулы флагеллина, при этом субъединицы НБЖ получили способность к частым переходам между двумя конформационными состояниями, а жгутик — легко изменять форму.

Поверхностная зона молекулы флагеллина не участвует в образовании связей между субъединицами, поэтому изменения, происходящие в этой зоне, не влияют на способ упаковки субъединиц, но влияют на антигенные свойства жгутиков. БЖ — хорошо известный Н-антиген, иммунологические свойства которого определяются экспонированной на поверхность жгутика частью флагеллиновых молекул [96, 140, 142]. Генетический и химический анализ структуры молекулы флагеллина убедительно доказали существование в этом белке консервативных и вариабельных зон [59, 65, 96, 216]. Проведенные российскими, а следом за ними и японскими учеными работы [22, 65, 134, 216, 217] показали, что флагеллины имеют ярко выраженную доменную организацию, одинаковую у всех штаммов и даже видов бактерий. Было показано, что молекула флагеллина состоит из трех достаточно независимых частей. Один из доменов образован центральной частью полипептидной цепи и формирует поверхность филамента. Этот поверхностный домен отвечает за антигенную специфичность НБЖ, ее диаметр, а также молекулярный вес образующих НБЖ субъединиц. За возможность молекул флагеллина встраиваться в состав упорядоченной полимерной структуры НБЖ отвечают N- и C-концы полипептидной цепи данного белка. Особенно нужно подчеркнуть *высокую консервативность N- и C-концов флагеллиновой молекулы БЖ*. Эти концы легко поддаются протеазной атаке и составляют 160 аминокислотных остатков с N-конца и 90 остатков с C-конца. Часть концевых участков, примыкающих к поверхностному домену, имеет жесткую спиральную структуру и у мономерной и у полимерной форм флагеллина. А оставшиеся 66 остатков с N-конца и 43 остатка, расположенных в C-концевой части молекулы, приобретают регулярную структуру только в процессе встраивания в полимер [17, 65].

VI. СТРУКТУРНЫЕ БЕЛКИ МОТОРА БАКТЕРИАЛЬНОГО ЖГУТИКА И ЕГО ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ

Как органелла движения БЖ обладает уникальными свойствами. Это дискретная структура, имеющая в своем составе внутриклеточный микроэлектромотор, приводящий во вращение довольно объемную структуру, каковой является флагеллиновая нить. Механические свойства таких нитей, способных организовываться во вращающиеся пучки, также уникальны. Будучи левосторонней спиралью, нить жгутика, вращаясь против часовой стрелки и образуя нечто вроде винта или штопора, заставляет клетку направленно двигаться. Перитрихальные жгутики переплетаются в тяж, вращающийся со скоростью 50 об/сек [223]. Тело клетки при этом вращается в 10 раз медленнее в противоположном направлении. Бактериальные клетки периодически меняют направление движения, что обусловлено изменением направления вращения жгутикового мотора на противоположное.

Долгое время энергетика и механика вращения жгутика оставались неизвестными. В этом отношении вторая половина 70-х годов оказалась переломным моментом, поскольку, наконец, был обнаружен энергетический источник вращения жгутика. Им оказался трансмембранный градиент ионов водорода [2, 75, 141, 155, 158]. Позднее было показано, что жгутиковый мотор бактерий — алкалофилов работает на ионах натрия [82], но механизм его работы, по-видимому, такой же [192].

Вращающаяся модель БЖ изящно доказана экспериментами Сильвермана и Саймона [189]. Клетки *E. coli* дикого типа выращивали в присутствии глюкозы; число жгутиков при этом снижалось приблизительно до одной на клетку вследствие катаболитной репрессии. Суспензию флагеллиновых антител помещали на предметное стекло, и антитела адгезировались на его поверхности (по неизвестной причине). К такому препарату добавляли каплю с бактериями, и клетки прикреплялись жгутиками к поверхности стекла. Прикрепленные клетки быстро вращались, периодически меняя направление вращения. К поверхности стекла антителами к БК прикрепляли также мутантные клетки, у которых вместо жгутиков были поликрюки. В этом случае клетки тоже вращались, причем, если 2 соседних поликрюка «сшивали» антителами по всей их длине, вращение прекращалось.

Таким образом, в 80-х годах стали вырисовываться энергетические и функциональные аспекты работы БЖ, и задача состояла в том, чтобы выяснить подробный механизм вращения базального тела. Мотор жгутика, как уже говорилось выше, погружен в клеточную стенку, состоит из значительного количества белков и способен вращать жгутиковую нить со скоростью ~20 000 об/мин [148]. Но ключевую роль в работе жгутика играют, как оказалось, вполне

определенные структурные белки базального тела, а именно **Mot**-белки и **Switch**-белки [38, 231, 232]. Как выяснилось в последние годы, именно эти белки составляют статор и ротор жгутикового мотора. Первые (**Mot**-белки) располагаются в цитоплазматической мембране и примыкают к М-кольцу, вторые (**Switch**-белки) образуют так называемое С-кольцо [69] и подходят к М-кольцу со стороны цитоплазмы (рис. 36).

Аппарат мотора жгутика содержит около 25 различных белков, однако, мутации только в пяти из них — *motA*, *motB*, *fliG*, *fliM*, *fliN* — лишают клетку подвижности без каких-либо изменений в структуре базального тела [62, 80, 231]. Выяснилось, что **MotA** и **MotB**, образуя комплекс, функционируют как трансмембранные ионные каналы [38, 39, 198]. Имеется ряд доказательств, что эти белки образуют комплекс, то есть для проведения протона необходимы оба белка [38, 198, 226]. Анализ последовательности **MotA** показал, что данный белок «вплетен» в мембрану четырьмя гидрофобными α -спиралями; здесь также присутствуют две области с высоким зарядом, которые могли бы служить для транспорта протона [51]. По данным Блейера и Берга [38] **MotA** функционирует как мономер в комплексе с мономером **MotB** и одним или несколькими **Switch**-белками (**FliG**, **FliM**, **FliN**). В мембране размещаются значительные количества **MotA**, хотя число возможных мест его локализации ограничено. Количество **MotA** на клетку составляет 600 молекул, а при наличии у *E. coli* пяти-шести жгутиков на клетку требуется небольшое количество **MotA**; остальная часть этого белка просто присутствует в мембране. При сверхпродукции **MotA** до 30000 копий этот белок еще может размещаться в мембране, не участвуя в работе мотора, следовательно, излишек белка не вредит клеточной подвижности [38, 225].

MotB оказался наилучшим кандидатом для заякоривания мотора в клеточной стенке и является, по-видимому, интегральной частью цитоплазматической мембраны [180]. Используя протеолиз и воздействие щелочной фосфатазы, Хан и Паркинсон [43] показали, что **MotB** пересекает мембрану и имеет большой С-концевой периплазматический домен, который, как они предполагают, взаимодействует с пептидогликановым слоем, привязывая этот силовой генератор мотора к клеточной стенке.

В 1988 г. Хан с соавт. [125] обнаружили вокруг места вхождения жгутиков в клетку особые внутримембранные частицы, так называемые «studs» — «шляпки», организованные в кольцевые структуры. Эти структуры идентифицированы как компоненты жгутикового мотора, так как их распределение соответствовало распределению жгутиков и они отсутствовали у нефлагеллированных мутантов *E.*

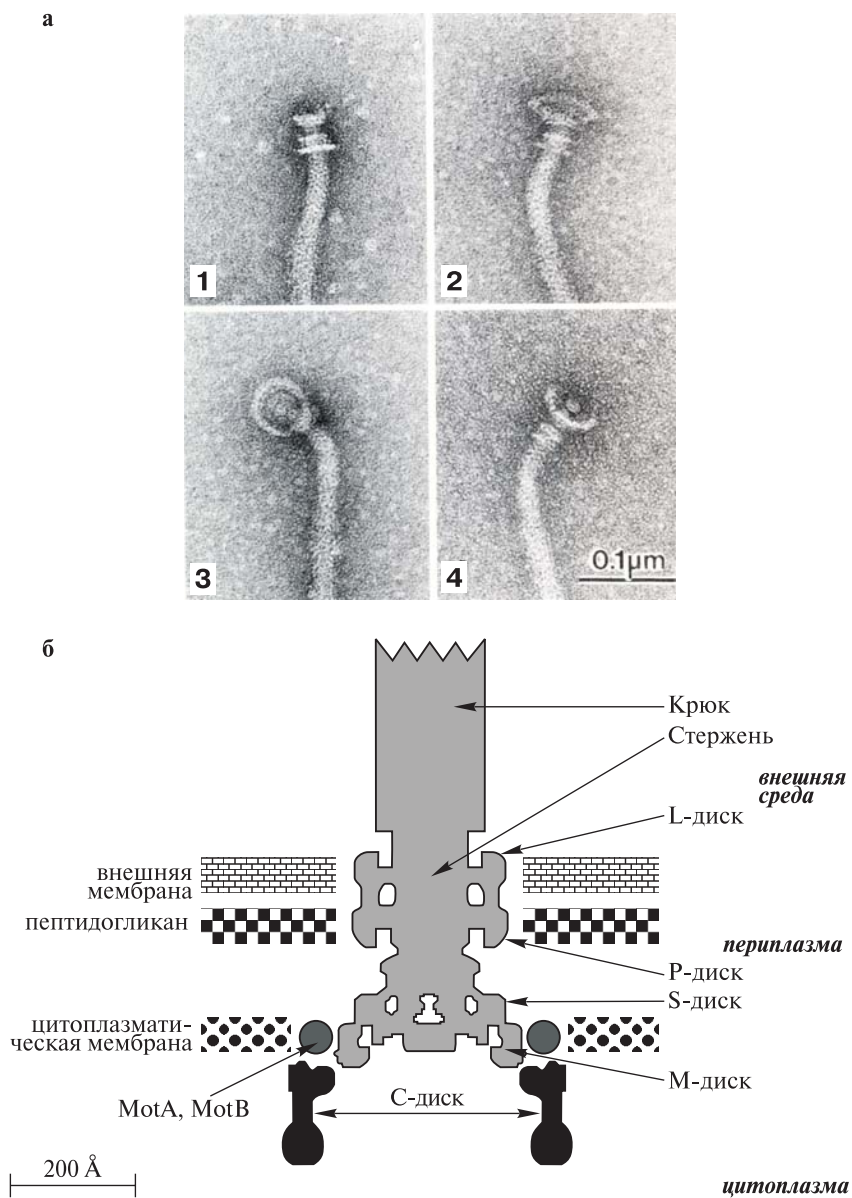


Рис. 3. Электронномикроскопическое (а) [127] и схематическое (б) [69] изображения «вытянутого жгутикового базального тела, ЕВВ».

а) 1 — обычная структура НВВ; 2, 4 — «bell»- базальная структура [127]; 3 — вид «вытянутого жгутикового базального тела, ЕВВ» анфас (объяснение в тексте).

coli. Количество этих «шляпок» в мембране либо восемь [37], либо десять [125]. Обычно *mot*⁻ клетки генерируют нормальный протонный градиент, однако, жгутики у таких клеток нефункциональны. То, что одновременное введение *motA* и *motB* приводило к восстановлению и подвижности, и «шляпок», подтверждает их принадлежность к генерирующему вращающий момент жгутиковому комплексу. Но никогда этого не происходило при введении одного из двух генов *mot*. Целый ряд работ указывает на то, что MotA и MotB ассоциируют с друг другом, формируя протонный канал или статор жгутикового мотора, и при этом они образуют достаточно хорошо идентифицируемые кольцевые структуры [37, 125, 198]. Количество субъединиц MotB в клеточной оболочке неизвестно, хотя имеются данные о синтезе этого белка в количестве 1/20 от количества MotA [51]. Однако, эти результаты еще не окончательны.

Периферическими мембранными белками, играющими важную роль во вращении жгутика и работающими в комплексе с Mot-белками, являются так называемые *Switch*-белки: FliG, FliM и FliN [87, 177, 180]. Так как мутации в любом из генов, отвечающем за синтез этих белков, дают клетки нефлагеллированные (*fla*), неподвижные (*mot*) или нехемотактичные (*che*), сделан вывод, что эти белки нужны для сборки жгутиков, конверсии трансмембранной протондвижущей силы в энергию вращения, а также для переключения направления вращения мотора [50, 172, 221, 231, 232]. Ямагучи с соавторами [231, 232] привели доказательства, что эти белки физически взаимодействуют в клетке, образуя «*switch*-комплекс». Некоторые мутации в белках *switch*-комплекса могут быть частично компенсированы мутациями в MotB, CheA, CheY и CheZ белках [171, 172, 231, 232], что согласуется с выводом об участии этих белков в системах подвижности и хемотаксиса. Гены *fliG*, *fliM* и *fliN* *S. typhimurium* клонированы. На основании нуклеотидной последовательности определена их аминокислотная последовательность, которая, как оказалось, соответствует белкам с молекулярными массами 36809, 37815 и 14772 Да соответственно [128]. Эти белки негидрофобны, поэтому можно предположить, что, примыкая к цитоплазматической мембране, они находятся вне ее пределов. Важно то, что комплекс FliG-FliM-FliN ассоциирован с мембраной и является частью жгутика, примыкающей к М-кольцу [177, 231, 232]. Кроме того показано, что *Switch*-белки взаимодействуют с финальными компонентами сенсорной цепи, цитоплазматическими белками CheY и CheZ, а также с белками MotA и MotB в мембране, что необходимо для прохождения протонов через жгутик [172].

Известен еще и четвертый *Switch*-белок — FliL, предшествующий FliM, однако, функция его пока неизвестна [128]. Этот белок имеет мол. массу 17082 Да и гидрофобный профиль, показывающий, что он должен быть интегральным мембранным белком. Сравнение аминокислотных последовательностей трех *Switch*-белков в двух бактериальных видах (*S. typhimurium* и *E. coli*) выявило их 90% идентичность, и только FliL выпал из этого ряда, так как расхождение в последовательностях этого белка у приведенных видов бактерий весьма значительно.

Последние десять лет многое дали в плане выяснения состава, структуры и взаимодействия белков мотора БЖ. Наиболее важным оказалось сообщение о дополнительной цитоплазматической части жгутикового аппарата, так называемом **С-диске** или **С-кольце**. Методом электронной микроскопии на клетках, прикрепленных к подложке, а затем лизированных и окрашенных, была обнаружена дополнительная структура, прикрепленная к цитоплазматической стороне MS-комплекса [57]. На электронномикроскопических микрофотографиях, полученных другими авторами [126], видно, что жгутик входит в цитоплазму. Мы также наблюдали дополнительную структуру у изолированных НВВ жгутиков *E. coli*, которая на срезах клеток *Vibrio alginolyticus* располагалась под М-диском в цитоплазме [8].

Использование целого набора методов доказало, что под М-кольцом имеется еще одна структура, которая состоит из продуктов генов *fliG*, *fliN* и *fliM*, образующих тонкостенный цилиндр высотой 17 нм и внешним диаметром 45 нм (напомним, что диаметр М-кольца — 29 нм) [57, 69, 127, 129, 233, 234, 235]. Эта структура выглядит по-разному, если смотреть на нее под разными углами (рис. 3а). Ранее Хан и др. [127] обнаружили цитоплазматическую структуру, близкую по размерам к С-диску, но имеющую куполообразную форму (*bell*-структура). Однако, в дальнейшем методом реконструкции электронномикроскопических изображений С-диска, полученных при разных углах наклона этой структуры, было доказано, что «*bell*» и С-диск являются одной и той же структурой, но расположенной под разными углами зрения [69]. То есть наблюдаемый «купол» («*bell*») есть не что иное, как наклоненный С-диск (рис. 3а).

Как распределяются составляющие эту структуру белки? Показано, что утолщающаяся часть М-кольца содержит не только продукт гена *fliF* (белок М-кольца), но и продукт гена *fliG*, а комплекс С-диска содержит FliM и FliN. Большой диаметр С-диска дает ему возможность взаимодействовать и с М-кольцом и с кольцом, состоящим из «шляпок» MotA/MotB кольцевого комплекса в цитоплазматической мембране [69]. Возможно, что существуют и другие белки, форми-

рующие С-диск, но то, что к ним не относятся FliI, CheY, CheZ и CheW, авторы убедительно доказали.

Является ли базальное тело с С-диском полным базальным телом? Похоже, что это так. На аксиальных срезах М-кольцо выглядит шире и толще, чем это видели раньше [195], как если бы к нему был добавлен какой-то материал. По-видимому, присутствие FliG дает такое утолщение [68]. Эксперименты по декорированию С-диска анти-FliM и анти-FliN позволяют предположить, что FliM и FliN составляют часть или весь С-диск. С-дисковый комплекс имеет мол. массу $\sim 5 \times 10^6$ Да. Если FliM и FliN являются единственными составляющими С-диск белками, то их должно быть ~ 100 субъединиц на кольцо. В работе группы Хана в 1996 г. [234, 235] показано, что сборка вытянутой цитоплазматической структуры (С-диска) происходит полностью на ранних стадиях морфогенеза, а использование антител к FliG и FliN позволило авторам продемонстрировать, что антитела садятся по периметру С-кольцевого вытянутого образования, давая замкнутую «везикулу». Подобные «везикулы» наблюдались и раньше, в том числе и нами, однако, им не уделялось достаточного внимания [3, 57, 214]. Таким образом, в настоящее время к терминам «интактный жгутик» (intact flagella) и «крюк-базальное тело» (hook-basal body, **НБВ**) добавился термин «вытянутое жгутиковое базальное тело» (extended flagellar basal body) или «вытянутое базальное тело» (extended basal body, **ЕВВ**) [234, 235], включающее четыре диска (L-, P-, S-, M-) и вытянутую структуру С-диска.

Имеется достаточно доказательств работы жгутикового мотора за счет трансмембранного градиента ионов водорода [2, 75, 141, 155, 192]. Подсчитано, что на один оборот жгутик расходует $\sim 1000 \text{ H}^+$ [158]. Но механизм утилизации энергии проходящего через мембрану протона пока неясен. В разные периоды изучения этого биологического мотора были предложены самые разные модели [70, 75, 204, 206], однако, несмотря на значительное увеличение информации о строении базального тела и роли конкретных белков в осуществлении вращательного момента, на сегодняшний день нет исчерпывающего ответа на вопрос, как работает БЖ. Но ряд соображений на этот счет имеется.

Одна из первых моделей вращения БЖ была предложена в 1978 г., когда еще не были известны Mot- и Switch-белки и не были проделаны многочисленные генноинженерные работы по изучению взаимодействия белков мотора БЖ [75]. Авторы допустили, что локализованное в мембране М-кольцо окружено пояском из NH_2 -групп; одна из аминокислотных групп открывается в верхний протонпроводящий путь. Анионная группа, например, карбоксильная, прикреплена к мембране в

начале протонпроводящего пути. Протонирование NH_2 приводит к электростатическому притяжению между NH_3^+ и COO^- группами. Поскольку NH_3^+ прикреплена к М-кольцу, последнее повернется, чтобы сблизить NH_3^+ и COO^- . Постулируется, что расстояние между двумя протонными каналами равно расстоянию между двумя соседними аминокислотными группами. Таким образом, вращение М-кольца приводит к перемещению следующей NH_2 к верхнему протонному пути. Протонирование COO^- NH_2 -группой сопровождается выбросом H^+ в цитоплазму. Число транслоцированных за один оборот H^+ равно числу NH_2 -групп.

Для демонстрации того, как трансформировались первые модели работы БЖ за довольно небольшой период, кратко изложим одну из последних моделей, предложенную ДеРозиером и его коллегами [206].

Еще в работе ДеПамфилиса и Адлера [53] утверждалось, что вращательная симметрия М- и S-колец равна 26. Позднее методами радиоавтографии меченых S^{35} белков комплекса базального тела [109] и сканирующей трансмиссионной электронной микроскопии [195] это значение вращательной симметрии для белков L-, P- и MS-колец было подтверждено. В дальнейшем, когда были выявлены белки *switch*-комплекса, и, в частности, показано, что толщину М-кольца составляет не только FliF, но и FliG [69, 233], понятие М-кольца заменили понятием «вытянутой структуры», образованной FliG, который связан с FliF (см. выше). Полагают, что мотор имеет $\text{FliG}/\text{FliF} = 1/1$ стехиометрию [68], что подразумевает существование ~26 копий FliG на М-кольце в соответствии с симметрией М-кольца.

В одной из последних публикаций группы ДеРозиера [206] показано, что вращательная симметрия С-кольца составляет 34. Авторы, используя имеющиеся и вновь полученные данные по вращательной симметрии М- и С-колец, а также исходя из числа motA/motB комплекса («шляпок») равному восьми [37], предложили модель работы БЖ (рис. 4).

Итак, если у дикого типа, в среднем, имеется 34 субъединицы в С-кольце, а в М-кольце — 26, то на С-кольце должно быть $34 - 26 = 8$ позиций, которым нет соответствующих позиций на М-кольце. Эти позиции названы «непарными». В рамках этой модели генерация вращательного момента должна осуществляться за счет таких «непарных» позиций на С-кольце. Предполагается, что М- и С-кольца соединены некими мостиками, образованными, например, из FliM, поскольку доказано взаимодействие FliG с FliM [204]. На рис. 4 схематично изображено, как переключаются тонкие рычаги, соединяющие М- и С-кольца, благодаря чему создается момент вращения. М- и С-кольца представлены как линии, снабженные эластичными

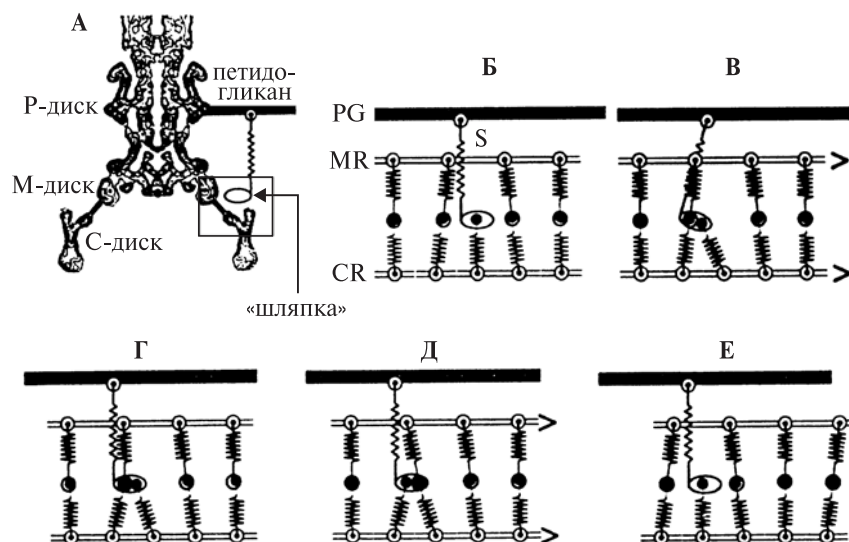


Рис. 4. Модель вращения жгутикового мотора [206].

(А) Контуры усредненной оптической плотности «вытянутого жгутикового базального тела», ЕВВ. «Шляпка» (stud) и ее соединение с пептидогликановым (PG) слоем изображены в выделенном прямоугольнике. «Шляпка» на этом рисунке не прикреплена к С- или М-кольцу; на рис. 4Б она уже прикреплена.

(Б—Е). (Б) Изображение фрагмента мотора, находящегося в прямоугольнике рис. 4А. Показано 5 субъединиц С-кольца (CR), 4 субъединицы М-кольца (MR) и 1 «шляпка» (S) (MotA-MotB-комплекс), которая соединена с пептидогликановым слоем (PG). Разное число субъединиц в С- и М-кольцах (36 и 24, соответственно) отражает число субъединиц этих колец в базальных телах жгутиков.

(В—Д) Этапы взаимодействия эластичного рычага «шляпка» (MotA–MotB-комплекс) и субъединиц на С- и М-кольцах при вращении мотора (объяснение в тексте).

рычагами. Поскольку существуют вакантные места на С-кольце по отношению к М-кольцу, на рис. 4Б С-кольцо имеет пять рычагов по отношению к четырем рычаг-связывающим местам на М-кольце. Пятый рычаг при наличии «непарной» симметрии образует комплекс с «шляпкой» MotA/MotB, которая закорена в пептидогликане. Нужно помнить, что «шляпка» является частью статора, то есть фиксированной частью мотора. Комплекс «шляпка»—С-кольцо—рычаг качается (возможно, за счет броуновского движения), подтягиваясь налево или направо, в зависимости от нужд клетки, где он прикрепляется к соседнему С-М-кольцевому-рычаговому комплексу. В результате образуется комплекс, состоящий из «шляпки» (MotA/MotB)

и двух рычагов (FliM и FliG). Авторы предполагают, что вращательный момент генерируется вытягиванием эластичного элемента в рычаг—«шляпка» комплексе. Таким образом, оба — М- и С-кольца — двигаются (рис. 4В и Г). «Шляпка» теперь связывается с другим рычагом С-кольца (рис. 4Г и Д). После смены рычага «шляпка» диссоциирует, захватывая при этом рычаг, ранее связанный с М-кольцом. Снова генерируется вращательный момент, потому что одно из ограничений на С- и М-кольцах устраняется. Оба кольца перемещаются (рис. 4Д и Е) в конце каждого цикла, каждый на одну несимметричную субъединицу. Поскольку два кольца имеют разную вращательную симметрию (26 и 34), они передвигаются на разные углы: М-кольцо — на $1/26$ от полного оборота, С-кольцо — на $1/34$.

Единственный рычаг-«шляпка»-комплекс генерирует одну единицу вращательного момента. Вторая «шляпка» может работать независимо от первой, потому что она имеет свое собственное место взаимодействия. При этом должен генерироваться дополнительный момент вращения. Только восемь «шляпок» могут создавать вращательный момент, так как существует только восемь мест со связанным рычагом. При таком положении вещей мотор может вращаться в обоих направлениях, достаточно сменить контакты. Возможно, существуют некоторые особенности С-кольца, преграждающие переключение рычагов в одном из направлений, тогда тормозятся все восемь свободных рычагов, и клетка плывет в одном направлении или «дрожит» на месте.

Есть еще один интересный момент у этой модели. Существуют два такта на цикл, генерирующих вращательный момент. Первый происходит, когда свободный рычаг С-кольца и «шляпка» прикрепляются к свободному месту на М-кольце (рис. 4В), и второй — когда комплекс разъединяется после замены ручек рычага (рис. 4Д). Если существует 26 ступеней на один оборот М-кольца, то существует $26 \times 2 = 52$ генерирующих вращательный момент тактов на один оборот. Если существует 8 генераторов, то при условии нахождения их всех в работе должно существовать $52 \times 8 = 416$ генерирующих тактов на один оборот. Это находится в согласии с 400 тактами вращения мотора [182].

Известно, что 1000 протонов расходуется на один оборот мотора. В этой модели протон или протоны могут быть использованы на любой ступени работы мотора; например, H^+ мог бы быть использован при связывании, освобождении и/или смене ручек рычагов. Места взаимодействия колец в этой модели являются также и местами генерации вращательного момента. Предложенная модель интересна тем, что кое-какие определенные ранее параметры укладываются в нее (8 генераторов вращательного момента, 400 тактов вращения).

Кроме этого, модель предсказывает положения, которые можно проверить. Например, если привязать к какой-нибудь поверхности нить жгутика и таким образом фиксировать М-кольцо, то С-кольцо, то есть клетка, должно вращаться со скоростью $8/34$ от обычной скорости вращения.

Интересная модель работы БЖ предложена также в работе Гарза с соавт. [70].

В заключение этого раздела следует отметить, что механизм работы БЖ при всем обилии имеющихся экспериментальных данных пока находится в стадии выяснения.

VII. АРХЕБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЖГУТИКИ

АРХЕИ КАК ОТДЕЛЬНЫЙ ДОМЕН ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ

Интереснейшей группой прокариотических клеток являются архебактерии или археи, которые отличаются не только от эукариотических клеток, но и от бактерий (эубактерий). Анализ нуклеотидных последовательностей и состава 16s рРНК позволил Вузу с соавт. предложить существование трех эволюционных линий происхождения организмов: эукариоты, эубактерии и архебактерии [228]. В дальнейшем новое название «домены» предложено для больших делений, названных *Bacteria*, *Eucarya* и *Archaea* [60, 229].

Домен *Archaea* включает большую группу экстремальных галофилов, метаногены и различные серозависимые, термофильные и гипертермофильные организмы. Археи, несмотря на их прокариотическое происхождение, совершенно особая, связанная между отдельными видами организмов группа. Это показано при изучении 16s и 23s рРНК разных архей. В ряде субгрупп архей, например, обнаружены необычные мембранные липиды, уникально модифицированные тРНК, необычные флагеллины, транслокационные аппараты [55, 104, 105]. В ряде случаев археи кажутся близкими к эукариотическим клеткам. Так, археи обладают 12 особенностями, близкими к эукариотам, и только 2 особенностями, близкими к бактериям [105].

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ЖГУТИКОВ АРХЕЙ

Жгутики присутствуют у всех основных групп архей и даже у вида *Thermoplasma*, потерявшего клеточную стенку [105]. Интерес к исследованию подвижности архей поддерживается еще и экстремальными условиями их обитания — насыщенные солевые растворы, строго анаэробное окружение, экстремально низкие и высокие рН и экстремально высокие температуры.

Ультраструктура жгутиков архей пока не выяснена. Известно лишь, что нить их жгутиков, также как и НБЖ, представляет собой полимер спиральной формы. Морфологически нити жгутиков архей (НЖА) несколько отличаются от НБЖ. Во-первых, они в два раза тоньше и имеют диаметр 10—13 нм [103]. Правда, известны тонкие жгутики бактерий, например, у *C. crescentus* (12 нм; [209]), но это является исключением из правила. Во-вторых, НЖА, в отличие от НЖБ, состоят из нескольких флагеллинов; единственным исключением является жгутик *Thermoplasma volcanium*, который по данным электрофореза содержит единственный флагеллин с мол. массой 41 кДа [64]. Флагеллины архей присутствуют в жгутиковой нити в разных количествах [116]. Возможно, что некоторые флагеллины являются минорными компонентами этой двигательной органеллы и каким-то образом способствуют сборке НЖА.

В отличие от флагеллинов бактерий, флагеллины архей часто гликозилированы, причем гликозилирование проходит с внешней стороны цитоплазматической мембраны [199]. На самых ранних этапах изучения жгутиков *Halobacterium halobium* при их SDS-ПААГ-электрофорезе наблюдались три основные полосы, соответствующие мол. массам 23,5, 26,5, и 31,5 кДа, которые состояли из подполос и при хорошем разрешении выглядели как «лестницы». Белки названы флагеллинами — Fla I, Fla II и Fla III. Было высказано предположение, а затем и доказано, что такая «лестница» является следствием гликозилирования флагеллинов *H. halobium*. Дополнительные отрицательные заряды сульфогрупп, по-видимому, играют важную роль в стабилизации структуры жгутиков в условиях экстремально высокой ионной силы среды обитания *H. halobium*, что является частью адаптационного механизма [224]. Хелатирование Mg^{+2} ЭДТА ингибирует передачу сульфоолигосахаридов флагеллину в результате специфического ингибирования Mg^{+2} -зависимой олигосахаридтрансферазы [199, 200]. Интересно, что ингибирование гликозилирования происходит без вхождения ЭДТА в клетку. Бацитрацин также ингибирует повторение сульфированной единицы сахара в S-слое *H. halobium* и опять без вхождения в клетку [161]. Внеклеточная локализация гликозилирования флагеллина продемонстрирована также в работе [143].

Обычно используются карбогидратные красители для определения сахаров во всех флагеллинах архей. Так, например, для единственной из рода *Methanococcus M. deltae* гликозилирование продемонстрировано окрашиванием флагеллина тимолсульфокислотой. А для флагеллина из *Methanococcus voltae* гликозилирование этим методом не обнаружено, хотя при SDS-ПААГ-электрофорезе данный флагеллин мигрирует с большей скоростью, чем это можно было ожидать на

основании его первичной структуры [115]. Возможно, что обычно используемые карбогидратные красители не определяют олигосахара во всех флагеллинах архей, поэтому, несмотря на отсутствие окрашивания, на основании данных электрофореза жгутиков *M. voltae* предположили наличие олигосахаридного остатка. Так, в мутантах *M. voltae*, в которых блокировано отщепление лидерного пептида, полоса, имеющая перекрестную реакцию с антисывороткой, полученной против флагеллина *M. voltae* с мол. массой 31 кДа, имеет мол. массу приблизительно 20 кДа [105]. Химическое дегликозилирование флагеллинов *M. hungatei* JF1 и *H. halobium* приводит к снижению мол. массы нативных флагеллинов на 10 кДа [144, 196]. Этот же факт отмечен и для флагеллинов *Methanococcus deltae* — при ингибировании гликозилирования бацитрацином [34].

Хотя функция гликозилирования жгутиков архей до конца не ясна, предполагают, что гликозилирование играет важную роль при вхождении субъединицы в продукт сборки. Так, в частности, показано, что в присутствии бацитрацина (100 мг/мл) жгутики отсутствуют, и это является следствием именно ингибирования гликозилирования, а не диссоциации нити из-за возможного «детергентного» действия бацитрацина [34].

По аминокислотному составу флагеллины жгутиков архей мало отличаются от бактериальных флагеллинов. Правда, у флагеллинов некоторых метаногенных архей обнаружено присутствие цистеина и триптофана, отсутствующих у флагеллинов бактерий. Как и у бактерий, у флагеллинов архей наблюдается преобладание кислых и нейтральных аминокислот [104]. В настоящее время известны 22 N-концевых аминокислотных последовательности флагеллинов из 10 различных архей (*M. voltae*, *Methanococcus jannaschii*, *M. deltae*, *Methanococcus vannielii*, *Methanoculleus marisnigri*, *Methanospirillum hungatei* GPI и JF1, *H. halobium*, *Thermoplasma volcanium*, *Sulfolobus shibatae*), продемонстрировавших высокую степень консервативности N-концевой части в позициях с 3 по 23 [64]. Однако, в ряде флагеллинов, например, в жгутиках *Natronobacterium pharaonis* и *Natronobacterium magadii*, попытка изучить N-концевую последовательность оказалась неудачной из-за их устойчивости к деградации по Эдману, что свидетельствовало о блокировании белка с N-конца [13].

Для *H. halobium* впервые определена нуклеотидная последовательность в семействе генов флагеллинов и получены первые данные, свидетельствующие о том, что жгутиковые системы архей и бактерий различны, так как *флагеллины архей не имеют никакой гомологии в первичных структурах с бактериальными флагеллинами*. У флагеллинов экстремальных галофилов идентифицированы две транскрип-

ционных единицы, из которых одна, кодирующая 2 тандема флагеллиновых генов, обозначена как *flgA1* и *flgA2*, а другая, кодирующая 3 тандема, как *flgB1*, *flgB2* и *flgB3* [72]. Все 5 продуктов генов идентифицированы в очищенных жгутиках [73]. Эти 5 генов кодируют белки от 193 до 196 аминокислот со значительными участками высоко консервативных последовательностей, включая 70 N-концевых аминокислот. N-конец флагеллина Fla I суперфлагеллы (мол. масса 23,5 кДа) устойчив к деградации по Эдману [72], так что присутствие какого-либо лидерного пептида не могло быть определено.

Второе флагеллиновое архейное генное семейство клонировано и секвенировано из мезофильного метаногена *M. voltae* [115]. При сравнении с экстремальными галофилами наблюдается значительное отличие в генах флагеллинов этих двух представителей архей. Определены две транскрипционные единицы, одна из которых кодировала один флагеллин (*flaA*), а вторая — три флагеллина (*flaB1*, *flaB2*, *flaB3*). Гены, кодирующие флагеллины *M. voltae*, оказались более длинными по сравнению с генами *H. halobium*, и кодируют белки длиной от 216 до 239 аминокислот. Как и у галофилов, у метаногенов оказались консервативными N-концевые аминокислотные последовательности флагеллинов.

Изучение генных последовательностей археобактериальных флагеллинов обнаружило присутствие 12 коротких аминокислотных сигнальных участков, которых нет у бактериальных флагеллинов [115]. При сравнении первичных последовательностей флагеллинов галофилов и метаногенов обнаруживается высокая степень консервативности в позициях от 12 до 59. Первые 12 аминокислот представляют собой лидерный пептид, и только последующие 50 N-концевых аминокислот имеют большое сходство [114]. Подобная высокая консервативность одинаковых полипептидных отрезков у флагеллинов различных архей, расположенных в совершенно различных экологических нишах, подразумевает, что N-концевые области молекул играют важную роль в сборке или функции жгутика архей. Лидерные же пептиды у флагеллинов архей имеют не только необычно короткую длину, но и последовательности их различны [105].

Гидрофобные профили флагеллинов из *M. voltae*, *N. magadii* и *H. holobium* очень похожи как между собой, так и на пилин IV типа, но не имеют ничего общего с бактериальными флагеллинами [14, 105]. Сравнение аминокислотных последовательностей белка FlaB2 из *N. magadii* и пилина из *N. gonorrhoeae* указывает на некоторую гомологию во всей последовательности данных белков [14]. В связи с этим высказано предположение о сходстве механизмов отщепления лидерного пептида, а также транспорта флагеллинов у жгутиков архей и пилинов

бактерий при сборке этих надмолекулярных структур [105]. Специфической чертой лидерной пептидазы, проводящей отщепление пептида у пилинов, является, по-видимому, узнавание инвариантного глицина, находящегося перед гидрофобным участком белка. Таким глицином, возможно, является Gly11, который присутствует во флагеллинах архей, кодируемых генами *flaB2* и *flaB3* *N. magadii* [14]. По-видимому, можно говорить о существовании короткого 10 аминокислотного лидерного пептида и у флагеллинов архей, и у пилинов [105]. Обнаружение сходства между первичными структурами флагеллинов архей и пилинов IV типа бактерий является весьма интересным фактом, позволяющим предположить существование общности между этими белковыми структурами в механизмах их синтеза.

Жгутики метаногенов и галофилов устойчивы к обработке ферментами и более устойчивы к высоким температурам, чем НБЖ [63б, 66]. В отсутствие NaCl жгутики галофильных архей диссоциируют на составляющие их флагеллины [24]. Исходя из свойств флагеллинов БЖ, можно было предположить возможность реконструкции жгутиков *H. halobium* при диализе раствора мономерного флагеллина против 4М NaCl. Оказалось, однако, что флагеллины архей не собираются в нить при переходе от низкой к высокой концентрации соли [66]. Этот факт косвенно подтверждает различие структуры жгутиков бактерий и архей. Изучение диссоциации жгутиков архей обнаружило у них интересные свойства. Так, у жгутиков галоалкалофильных архей *N. magadii* и *N. pharaonis* были обнаружены полимерные структуры, названные протофиламентами, образующиеся при диссоциации данных жгутиков при понижении концентрации NaCl [12, 66]. В этих же работах показано, что связи между протофиламентами менее стабильны, чем между субъединицами в протофиламентах. Также с достаточной степенью убедительности показано, что С-концевая часть флагеллинов архей не участвует в образовании межсубъединичных контактов в протофиламентах, так как ферментативный гидролиз, приводящий к отрыву С-концевых последовательностей, не приводит к разрушению полимерной структуры [176]. По-видимому, определяющую роль в образовании четвертичной структуры жгутиков галоалкалофильных архей играют гидрофобные взаимодействия N-концевых участков флагеллинов, а С-концевые участки входят в состав внешних доменов.

По аналогии с БЖ были сделаны попытки обнаружить у жгутиков архей базальные тела. Электронно-микроскопические исследования жгутиков метаногенов, изолированных из клеток с использованием различных детергентов, не обнаружили каких-либо структур, похожих на базальные тела БЖ. У этих жгутиков на их конце наблюдалась

лишь узелковая структура и утолщение нити в примыкающих к этой структуре участках [113]. Однако, трудно предположить, что наблюдаемая структура и есть базальное тело. По-видимому, это образование является частью какой-то внутриклеточной структуры жгутиков, устойчивой к довольно жестким воздействиям при их изолировании [103, 104].

Первой работой по изучению жгутиков архей на примере экстремального галофила *H. halobium* стала работа Алама и Остерхельта [23]. Авторы предположили, что пучок жгутиков, не разлетающийся в стороны при изменении направления вращения, выходит из области, находящейся под цитоплазматической мембраной, и, возможно, основания жгутиков объединены какой-то единой структурой. Не получив положительных результатов по выделению «интактных жгутиков» архей различными биохимическими методами, мы попытались исследовать область вхождения жгутиков в клетку методом ультратонких срезов. Этот метод хорошо себя зарекомендовал в тех случаях, когда необходимо уточнить внутриклеточную локализацию выделяемых структур, а также если предполагается, что какие-то компоненты при выделении теряются. В составе жгутикового аппарата архей-галофилов под цитоплазматической мембраной мы впервые обнаружили новую структуру, отсутствующую у эубактерий [1] (рис. 5). Структура имеет вид диска до 250—300 нм в диаметре и располагается непосредственно в основании пучка жгутиков в цитоплазме на расстоянии около 20 нм от мембраны. Эта структура, названная нами *дискообразной пластинчатой структурой* (ДПС), состоит из ряда слоев и, по-видимому, включает мембраноподобное образование. Эксперименты по разрушению клеток снижением

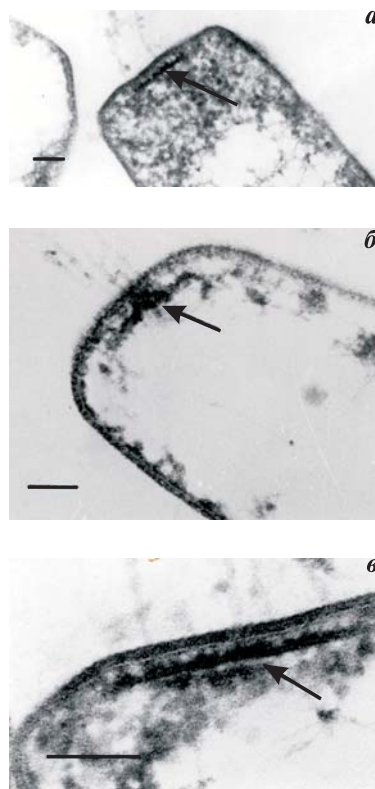


Рис. 5. Электронные микрофотографии дискообразной пластинчатой структуры (ДПС) на полюсе клетки *H. salinarium* при разных фиксациях и увеличениях. Масштабная линейка — 100 нм [1, 16].

концентрации NaCl показали, что ДПС и пучок жгутиков достаточно прочно связаны с клеточной оболочкой (рис. 5б). Позднее в лаборатории Остерхельта из клеток *H. salinarium* вместе со жгутиками были изолированы объединяющие их основания структуры, названные авторами «polar cap structures» [137]. Их размеры соответствуют размерам ДПС и поэтому вполне логично предположить, что эти структуры имеют отношение к обнаруженным нами ДПС. Аналогичную структуру мы наблюдали и в клетках *Natronobacterium magadii* (неопубликованные данные). Таким образом, складывается впечатление, что нам удалось идентифицировать связывающую основания жгутиков особую цитоплазматическую структуру, типичную для архей, но отсутствующую у бактерий. Принципиально иная организация клеточной стенки архей и экстремальные условия их обитания позволяют предположить особый способ крепления их жгутиков. Интересен в этой связи археон *Thermoplasma acidophilum*, лишенной клеточной стенки, но который, тем не менее, имеет жгутики и подвижен [36]. Представляется вероятным, что пучки жгутиков в клетках архей (все исследованные на сегодняшний день археи оказались лофотрихами) закреплены главным образом при помощи цитоплазматических структур, подобных описанной нами ДПС.

Непосредственно под мембраной вблизи полюсов клеток галобактерий мы обнаружили еще одну сложноорганизованную структуру, на первый взгляд напоминающую ДПС, однако, имеющую совершенно иное строение и локализацию [15, 16]. На отдельных срезах при небольшом увеличении структура имеет вид параллельной цитоплазматической мембране электронно-плотной линии, однако эта линия никогда не простирается в зону вхождения жгутиков (рис. 6). Описываемая структура «подстиляет» цитоплазматическую мембрану приблизительно на том же расстоянии, что и ДПС, но, в отличие от нее, не содержит мембраноподобного образования. В ее составе можно разглядеть ряд глобул, каждая из которых соединена с цитоплазматической мембраной мостиком-септой. Ранее эта структура была описана как «исчерченный пласт» [181] и иногда отмечалась на одиночных срезах. Морфологические характеристики этой структуры полностью соответствуют имеющимся в литературе описаниям «полярной органеллы» бактерий [44, 163, 214]. По нашим предварительным данным [16] эта структура, так же как и «полярная органелла» бактерий, подвергается цитохимическому окрашиванию при выявлении АТФ-азной активности по методике Таушела [205].

Несмотря на то, что на срезах часто наблюдается очень близкое взаимное расположение ДПС и полярной органеллы, четкой связи между ними обнаружить не удалось. На рис. 7 представлено схема-

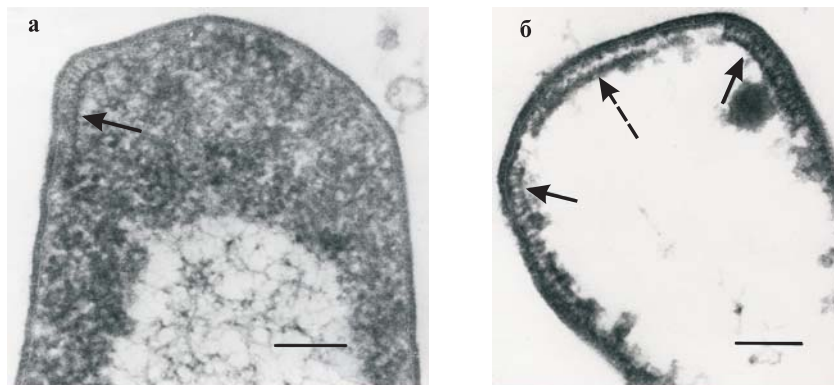
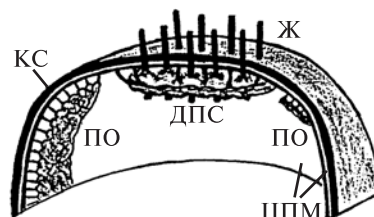


Рис. 6. Электронные микрофотографии полярной органеллы клеток *H. salinarium*. Сплошными стрелками указана «полярная органелла», прерывистой — ДПС. Масштабная линейка — 100 нм [16].

Рис. 7. Схематическое изображение полюса клетки галофильного археона (продольный разрез).

Ж — жгутики, КС — клеточная стенка, ЦПМ — цитоплазматическая мембрана, ДПС — дискообразная пластинчатая структура, ПО — полярная органелла. Масштаб не соблюден [16].



тическое изображение полярных структур исследованных нами галофильных архей [15, 16].

ПРЕДПОЛАГАЕМАЯ МОДЕЛЬ СБОРКИ ЖГУТИКОВ АРХЕЙ

Итак, на сегодняшний день имеется убедительно подкрепленное экспериментальными данными мнение, что НБЖ представляет собой цилиндрическую структуру, а молекулы флагеллина транспортируются через ее внутренний полый канал на дистальный конец жгутика и включаются в надмолекулярную структуру спиральной нити. Важно, что флагеллин не транспортируется через мембрану при помощи сигнального пептида, а проходит по всей длине внутреннего канала нити с помощью специфичной для жгутика бактерий (и пока не установленной) транспортной системы.

Механизм сборки жгутиков архей к настоящему моменту не известен, но все имеющиеся факты довольно убедительно говорят в

пользу существенного его отличия от бактериального. Во-первых, жгутики архей имеют мультисетчатый состав, причем их флагеллины содержат лидерные пептиды, которые отсутствуют у флагеллинов бактерий. По-видимому, флагеллины архей транспортируются не по внутреннему каналу, а через цитоплазматическую мембрану. Во-вторых, флагеллины архей гликозилированы, и гликозилирование происходит с внешней стороны мембраны [201], что также затрудняет сборку нити по бактериальному механизму. Сложно представить, что система гликозилирования может находиться на конце жгутика. В-третьих, диаметр жгутиков архей в два раза меньше диаметра БЖ и сомнительно, что молекулы флагеллинов могли бы передвигаться по внутреннему каналу. Возможно, его просто не существует [105].

Группа Джаррелла впервые обратила внимание на гомологию консервативного гидрофобного N-концевого участка флагеллинов архей и N-концевого участка пилинов IV типа [63]. Пилины IV типа — это нитевидные структуры, состоящие из спирально уложенных белковых субъединиц. В то время как жгутики выполняют, в основном, функцию движения, пили относятся к гетерогенной группе и ответственны за ряд процессов, включая адгезию, конъюгацию и особый вид транслокации (*twitching motility*). Основной особенностью этих белков является гомология в их N-концевой части в районе 20—25 аминокислот. Кроме того, у этих белков имеется короткий лидерный пептид из 6—7 аминокислот, который отщепляется по остатку инвариантного глицина, расположенного перед гидрофобным участком [93]. Все белки этого семейства довольно небольшие — 100—240 аминокислот. Имеются также данные, что N-концевая область пилинов IV типа участвует во взаимодействии субъединиц в филаменте. Рост пилей происходит на проксимальном конце, при этом белок пилей собирается в линейные полимеры, которые упаковываются в правозакрученные спирали после транслокации через специфические каналы, образованные единственным белком в наружной мембране [93, 208].

Флагеллины архей имеют некоторые общие свойства с пилинами IV типа, а именно, наличие гомологии в гидрофобном N-концевом участке и наличие небольшого лидерного пептида. Но в отличие от пилинов, для флагеллинов архей не обнаружены вспомогательные белки, участвующие в сборке жгутиков. Тем не менее ряд свойств флагеллинов архей дает возможность предположить, что в сборке жгутиков архей участвуют вспомогательные белки, возможно это белки-шапероны [4]. Известно, что флагеллины архей обладают гидрофобным N-концевым участком. Чтобы предотвратить их неспецифическую агрегацию, этот участок должен быть экранирован сразу

после синтеза на рибосоме. В клетках эукариот эту роль выполняют шапероны, относящиеся к семействам шоковых белков Hsp70 и Hsp60. На основании этих данных была предложена модель сборки жгутиков архей [105] (рис. 8). Непосредственно после трансляции префлагеллины (с лидерными пептидами) взаимодействуют с цитоплазматическими шаперонами, образуя интермедиаты, которые предотвращают неспецифическую агрегацию префлагеллинов за счет гидрофобного N-концевого участка (1). Лидерные пептиды префлагеллинов определяют места транслокации на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны в области полярной мембраноподобной структуры (2). Там шапероны высвобождаются из комплекса, лидерные пептиды отщепляются от префлагеллинов, а гидрофобный N-концевой участок белков используется для их транспорта через цитоплазматическую мембрану (3). Субъединицы подвергаются гликозилированию и включаются в основание растущего жгутика. Рост нити жгутиков заканчивается включением минорных видов флагеллинов (4).

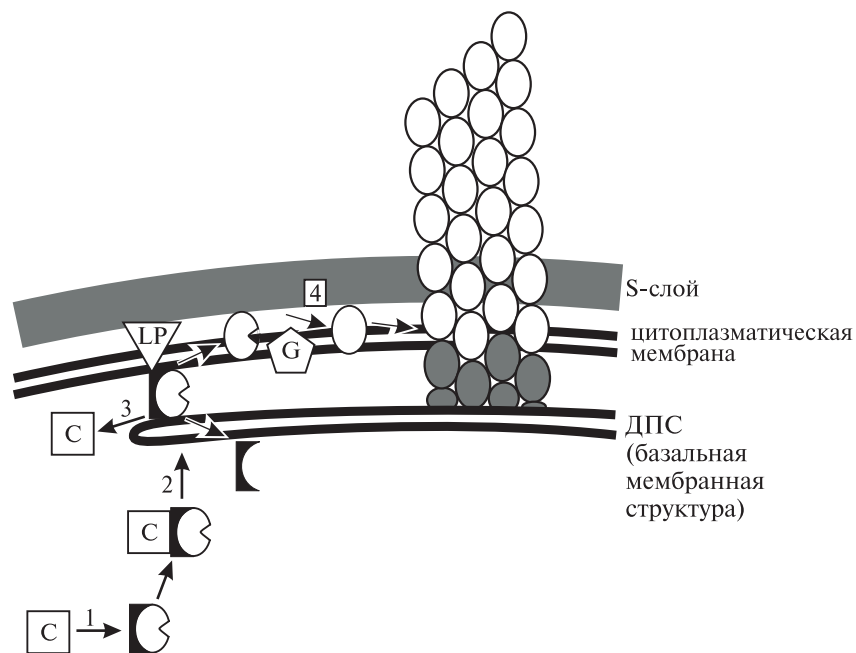


Рис. 8. Модель сборки жгутика архей [105].

C — белок-шаперон, L.P. — лидерная пептидаза, G — гликозилирование. Базальная мембранная структура, по-видимому, соответствует обнаруженной нами ДПС [1] (объяснение в тексте).

Предложенная схема, основанная на экспериментальных данных целого ряда работ, не имеет ничего общего с образованием надмолекулярной структуры БЖ. Многие подвижные археи имеют очень простую структуру клеточной стенки, состоящую только из белкового S-слоя, лежащего на цитоплазматической мембране. Трехмерная реконструкция показала, что у архей, возможно, имеется пространство между мембраной и S-слоем, аналогичное периплазматическому пространству бактерий, и белки, отвечающие за сборку жгутиков архей, могут находиться именно в этом пространстве [33].

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные в настоящем обзоре данные свидетельствуют о том, что БЖ являются сложной мультикомпонентной системой, базальная внутриклеточная часть которых выполняет разнообразные функции: транспорт ионов, генерацию движущей силы, взаимодействие с сигнальными молекулами, осуществление переключения между альтернативными функциональными состояниями, экспорт белков и многое другое. Прогресс в изучении жгутиков архей позволяет надеяться, что и их структурные компоненты, ответственные за перечисленные функции, будут идентифицированы в ближайшем будущем. Однако, уже сейчас на основании обширного экспериментального материала можно сделать вывод, что *эти два типа органелл подвижности прокариот существенно отличаются и по структуре, и по способу их сборки*. Их основные различия следующие:

- жгутики бактерий, в основном, состоят из единственного флагеллина, а жгутики архей имеют мультиплетный флагеллиновый состав;
- флагеллины архей, в отличие от флагеллинов бактерий, гликозилированы;
- диаметр жгутиков архей в два раза меньше, чем у жгутиков бактерий;
- в жгутиках бактерий у флагеллинов консервативны N- и C-концы, у жгутиков архей предположительно консервативны только N-концы флагеллинов;
- при сходном аминокислотном составе первичные структуры флагеллинов бактерий и архей не имеют никакой гомологии, однако, флагеллины архей имеют гомологию с белком бактериальных пилинов;
- механизмы сборки жгутиков бактерий и архей, по-видимому, различны.

В предложенном обзоре рассмотрен частный случай интереснейшего феномена — биологического мотора, каковым является базальное тело БЖ. Это не самый маленький представитель такой категории биологических систем; известна, например, протонная АТФсинтаза, подробно изученная вплоть до взаимодействий субъединиц в активном центре. Базальное тело БЖ пока остается загадкой с точки зрения того, как энергия протонного градиента на цитоплазматической мембране инициирует вращение дисков базального тела БЖ. Тем не менее достигнуты большие успехи в изучении белкового состава этой системы. Имеются, например, интересные сведения о том, что аминокислотная последовательность одного из белков базального тела жгутика — FliI — похожа на последовательность протон-транслоцирующей бактериальной F_0F_1 АТФазы [215]. Предполагается, что FliI представляет собой часть аппарата, контролирующего экспорт флагеллина и аксиальных белков за пределы клетки при образовании жгутика. По мере получения новых данных предлагаются различные модели работы БЖ. Однако, в настоящий момент можно говорить пока только о накоплении фактического материала, что несомненно даст качественный скачок в изучении этой замечательной биологической конструкции.

Гораздо меньше известно о жгутиках архей, но то, что уже известно, аргументированно свидетельствует о качественном отличии их структуры и сборки от того же самого у БЖ. И здесь же следует сделать акцент на еще одном интереснейшем факте, касающемся этих двух систем подвижности прокариот. Так, в обзоре совсем не рассмотрен вопрос о прокариотическом жгутике как составляющей сенсорной хемотактической системы бактерий и архей. А исследования в этой области обнаружили, что при различных молекулярных структурах жгутиков бактерий и архей имеется практически полная гомология их хемотактических систем [63а]. И это делает эти организмы еще более привлекательными с точки зрения понимания происхождения и эволюции данных представителей прокариот, в частности, их систем подвижности и хемотаксиса.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 95–04–12713); фонда поддержки ведущих научных школ (грант № 96–15–980190).

ЛИТЕРАТУРА

1. Бакеева Л.Е., Метлина А.Л., Новикова Т.М., Сперанский В.В. // Докл. РАН. 1992. Т. 326. С. 914—915.
2. Белякова Т.Н., Глаголев А.Н., Скулачев В.П. // Биохимия. 1976. Т. 41. С. 1478—1483.
3. Бирюзова В.И., Поглазова М.Н., Метлина А.Л., Мишина Т.И., Поглазов Б.Ф. // Микробиология. 1979. Т. 48. вып. 5. С. 868—872.
4. Костюкова А.С., Полосина Я.Ю., Пятибратов М.Г., Тиктопуло Е.И., Федоров О.В. // Докл. РАН. 1994. Т. 339. С. 544—546.
5. Мельник С.И., Метлина А.Л., Поглазов Б.Ф. // Микробиология. 1988. Т. 57. Вып. 3. С. 431—434.
6. Метлина А.Л., Поглазов Б.Ф. // Докл. АН СССР. 1969. Т. 187. С. 459—461.
7. Метлина А.Л., Поглазов Б.Ф. // Биохимия. 1970. Т. 35. С. 994—1001.
8. Метлина А.Л., Бакеева Л.Е. // Микробиология. 1989. Т. 58. С. 624—626.
9. Новикова Н.А., Метлина А.Л., Зарубина А.П., Поглазов Б.Ф. // Микробиология. 1984. Т. 53. Вып. 1. С. 103—107.
10. Поглазов Б.Ф. // XXXII Баховские чтения. 1977. М. Наука.
11. Поглазов Б.Ф., Метлина А.Л., Новиков В.В. // Известия АН СССР, сер. биол. 1981. Т. 5. С. 672—690.
12. Пятибратов М.Г., Костюкова А.С., Тарасов В.Ю., Федоров О.В. // Докл. РАН. 1993. Т. 330. С. 116—119.
13. Серганова И.С., Полосина Я.Ю., Костюкова А.С., Метлина А.Л., Пятибратов М.Г., Федоров О.В. // Биохимия. 1995. Т. 60. С. 1261—1267.
14. Серганова И.С. // Дисс. на соиск. уч. степени канд. биол. наук. 1998. Ин-т биохимии им. А. Н. Баха РАН. Москва.
15. Сперанский В.В., Метлина А.Л., Новикова Т.М., Бакеева Л.Е. // Биофизика. 1996. Т. 41. С. 159—163.
16. Сперанский В.В. // Дисс. на соиск. уч. степени канд. биол. наук. 1996. Ин-т биохимии им. А. Н. Баха РАН. Москва.
17. Федоров О.В. // Дисс. на соиск. уч. степени докт. биол. наук. 1994. Ин-т белка РАН. Пушкино.
18. Abram D., Koffler H. // J. Mol. Biol. 1964. Vol. 9. P. 168—185.
19. Abram D., Mitchen J.R., Koffler H., Vatter A.E. // J. Bacteriol. 1970. Vol. 101. P. 250—261.
20. Ada G., L., Nossal G.J.V., Pye J., Abbot A. // Nature. 1963. Vol. 199. P. 1257—1259.
21. Aizawa S.-I., Dean C.E., Jones C.J., Macnab R.M., Yamaguchi S. // J. Bacteriol. 1985. Vol. 161. P. 836—849.
22. Aizawa S.-I., Vondervist F., Ishima R., Akasaka K. // J. Mol. Biol. 1999. Vol. 211. P. 673—677.
23. Alam M., Oesterhelt D. // J. Mol. Biol. 1984. Vol. 176. P. 459—475.
24. Alam M., Oesterhelt D. // J. Mol. Biol. 1987. Vol. 194. P. 495—499.
25. Ambler R.P., Rees M.W. // Nature. 1959. Vol. 184. P. 56—57.
26. Asakura S. // Adv. Biophysics. 1970. Vol. 1. P. 99—155.
27. Asakura S. // J. Crystal Growth. 1974. Vol. 24/25. P. 123—129.
28. Asakura S., Eguchi G., Iino T. // J. Mol. Biol. 1964. Vol. 10. P. 42—56.
29. Asakura S., Eguchi G., Iino T. // J. Mol. Biol. 1966. Vol. 16. P. 302—316.
30. Asakura S., Eguchi G., Iino T. // J. Mol. Biol. 1968. Vol. 35. P. 227—236.
31. Asakura S., Iino T. // J. Mol. Biol. 1972. Vol. 64. P. 251—268.
32. Bakeeva L.E., Chumakov K.M., Drachev A.L., Metlina A.L., Skulachev V.P. // Biochim. Biophys. Acta. 1986. Vol. 850. P. 466—472.
33. Baumeister W., Wildhaber I., Phipps B.M. // Can. J. Microbiol. 1989. Vol. 35. P. 215—227.

34. Bayley D.P., Kalmokoff M.L., Jarrell K.F. // Arch. Microbiol. 1993. Vol. 160. P. 179—185.
35. Berg H.C. // Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1975. Vol. 4. P. 119—123.
36. Black F.T., Freundt E.A., Vinther O., Christiansen C. // J. Bacteriol. 1979. Vol. 137. P. 456—461.
37. Blair D.F., Berg H.C. // Science. 1988. Vol. 242. P. 1678—1681.
38. Blair D.F., Berg H.C. // Cell. 1990. Vol. 60. P. 439—449.
39. Blair D.F., Berg H.C. // J. Mol. Biol. 1991. Vol. 221. P. 1433—1442.
40. Calladine C.R. // Nature. 1975. Vol. 255. P. 121—124.
41. Calladine C.R. // J. Mol. Biol. 1978. Vol. 118. P. 457—479.
42. Champnes J.N. // J. Mol. Biol. 1971. Vol. 56. P. 295—310.
43. Chan S.Y., Parkinson J.S. // Science. 1988. Vol. 239. P. 276—278.
44. Choen-Bazire G., London J. // J. Bacteriol. 1967. Vol. 94. P. 458—465.
45. Coulton J.W., Murray R.G.E. // Biochim. Biophys. Acta. 1977. Vol. 465. P. 290—297.
46. Coulton J.W., Murray R.G.E. // J. Bacteriol. 1978. Vol. 136. P. 1037—1049.
47. Curry A., Fox A.J., Jones D.M. // J. Gen. Microbiol. 1984. Vol. 130. P. 1307—1311.
48. De Lange R.J., Chang J.Y., Shaper J.H., Martinez R.J., Komatsu S.K., Glazer A.N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973. Vol. 70. P. 3428—3431.
49. De Lange R.J., Chang J.Y., Shaper J.H., Glazer A.N. // J. Biol. Chem. 1976. Vol. 251. P. 705—711.
50. Dean G.E., Aizawa S.-I., Macnab R.M. // J. Bacteriol. 1983. Vol. 154. P. 84—90.
51. Dean G.E., Macnab R.M., Stader J., Matsumura P., Burke C. // J. Bacteriol. 1984. Vol. 159. P. 991—999.
52. DeFranco A.L., Parkinson J.S., Koshland D.E. // J. Bacteriol. 1979. Vol. 139. P. 107—112.
53. DePhamphilis M.L., Adler J. // J. Bacteriol., 1971. Vol. 105. P. 376—407.
54. Dimmitt K., Simon M. // J. Bacteriol. 1971. Vol. 105. P. 369—375.
55. Doolittle W.F. // In: M.Kates et al. (eds). The biochemisrty of archaea (archaebacteria). Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1993. Epilogue. P. 565—571.
56. Driks A., Bryan R., Shapiro L., DeRosier D.J. // J. Mol. Biol. 1989. Vol. 206. P. 627—636.
57. Driks A., DeRosier D.J. // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 211. P. 669—672.
58. Emerson S.U., Tokyuasu K., Simon M.I. // Science. 1970. Vol. 169. P. 190—192.
59. Emerson S.U., Simon M.I. // J. Bacteriol. 1971. Vol. 106. P. 949—954.
60. Engel D.R., Doolittle W.F. // Cell. 1997. Vol. 89. P. 995—998.
61. Engelhardt H., Schuster S.C., Baeuerlein E. // Science. 1993. Vol. 262. P. 1046—1048.
62. Enomoto M. // Genetics. 1966. Vol. 54. P. 1069—1076.
- 63a. Faguy D.M., Farrel K.F. // Microbiology. 1999. Vol. 145. P. 279—281.
- 63b. Faguy D.M., Jarrell K.F., Kuzio J., Kalmokoff M.L. // Can. J. Microbiol. 1994. Vol. 40. P. 67—71.
64. Faguy D.M., Bayley D.P., Kostyukova A.S., Thomas N.A., Jarrell K.F. // J. Bacteriol. 1996. Vol. 179. P. 902—905.
65. Fedorov O.V., Kostyukova A.S., Pyatibratov M.G. // FEBS Lett. 1988. Vol. 241. P. 145—148.
66. Fedorov O.V., Pyatibratov M.G., Kostyukova A.S., Osina N.K., Tarasov V.Yu. // Can. J. Microbiol. 1994. Vol. 40. P. 45—53.
67. Ferris F.G., Beveridge T.J., Marceau-Day M.L., Larson A.D. // Can. J. Microbiol. 1984. Vol. 30. P. 322—333.
68. Francis N.R., Irikura V.M., Yamaguchi S., DeRosier D.J., Macnab R.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 6304—6308.

69. Francis N.R., Sosinsky G.E., Thomas D., DeRosier D.J. // J. Mol. Biol. 1994. Vol. 235. P. 1261—1270.
70. Garza A.G., Biran R., Wohlschlegel J.A., Manson M.D. // J. Mol. Biol. 1996. Vol. 258. P. 270—285.
71. Gerber B.R., Asakura S., Oosawa F. // J. Mol. Biol. 1973. Vol. 74. P. 467—487.
72. Gerl L., Sumper M. // J. Biol. Chem. 1988. Vol. 263. P. 13246—13251.
73. Gerl L., Deutzmann R., Sumper M. // FEBS Lett. 1989. Vol. 244. P. 137—140.
74. Gill P.R., Agabian N. // J. Biol. Chem. 1983. Vol. 258. P. 7395—7401.
75. Glagolev A.N., Skulachev V.P. // Nature. 1978. Vol. 272. P. 280—282.
76. Glazer A.N., De Lange R.J., Martinez R.J. // Biochim. Biophys. Acta. 1969. Vol. 188. P. 164—165.
77. Guerry P., Alm R.A., Power M.E., Logan S.M., Trust T.J. // J. Bacteriol. 1991. Vol. 173. P. 4757—4764.
78. Hasegawa E., Kamiya R., Asakura S. // J. Mol. Biol. 1982. Vol. 160. P. 609—621.
79. Hilmen M., Silverman M., Simon M. // J. Supr. Struct. 1974. Vol. 2. P. 360—372.
80. Hilmen M., Simon M. // Motility and structure of bacterial flagella. In: Cell Motility. / Eds. Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. 1976. P. 35—45.
81. Hirano T., Yamaguchi S., Oosawa K., Aizawa S.-I. // J. Bacteriol. 1994. Vol. 176. P. 5439—5449.
82. Hirota N., Imae Y. // J. Biol. Chem. 1983. Vol. 258. P. 10577—10581.
83. Homma M., Kutsukake K., Iino T., Yamaguchi S. // J. Bacteriol. 1984. Vol. 157. P. 100—108.
84. Homma M., Iino T., Kutsukake K., Yamaguchi S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83. P. 6169—6173.
85. Homma M., Ohnishi K., Iino T., Macnab R.M. // J. Bacteriol. 1987. Vol. 169. P. 3617—3624.
86. Homma M., Aizawa S.-I., Dean G.E., Macnab R.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. Vol. 84. P. 7483—7487.
87. Homma M., Iino T., Macnab R.M. // J. Bacteriol. 1988. Vol. 170. P. 2222—2228.
88. Homma M., DeRosier D.J., Macnab R.M. // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 213. P. 819—832.
89. Homma M., Kutsukake K., Hasebe M., Iino T., Macnab R.M. // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 211. P. 465—477.
90. Hotani H. // J. Mol. Biol. 1976. Vol. 106. P. 151—166.
91. Hotani H. // BioSystems. 1980. Vol. 12. P. 325—330.
92. Hotani H. // J. Mol. Biol. 1982. Vol. 156. P. 791—806.
93. Hultgren S.J., Normark S., Abraham S.N. // Annu. Rev. Microbiol. 1991. Vol. 45. P. 383—415.
94. Iino T. // Bacteriol. Rev. 1969. Vol. 33. P. 454—475.
95. Iino T. // J. Supramol. Struct. 1974. Vol. 2. P. 372—384.
96. Iino T. // Ann. Rev. Genet. 1977. Vol. 11. P. 161—182.
97. Iino T., Suzuki H., Yamaguchi S. // Nature New Biology. 1972. Vol. 237. P. 238—240.
98. Iino T., Oguchi T., Kuroiwa T. // J. Gen. Microbiol. 1974. Vol. 81. P. 37—45.
99. Ikeda T., Homma M., Iino T., Asakura S., Kamiya R. // J. Bacteriol. 1987. Vol. 169. P. 1168—1173.
100. Ikeda T., Yamaguchi S., Hotani H. // J. Biochem. 1993. Vol. 114. P. 39—44.
101. Ikeda T., Oosawa K., Hotani H. // J. Mol. Biol. 1996. Vol. 259. P. 679—686.
102. Ishikihara A., Hotani H. // J. Mol. Biol. 1980. Vol. 139. P. 265—276.
103. Jarrell K.F., Koval S.F. // Crit. Rev. Microbiol. 1989. Vol. 17. P. 53—87.
104. Jarrell K.F., Bayley D.P., Faguy D.M. // Current Topics in Mol. Genet. (Life Sci. Adv.). 1993. Vol. 1. P. 15—31.

105. *Jarrell K.F., Bayley D.P., Kostyukova A.S.* // *J. Bacteriol.* 1996. Vol. 179. P. 5057—5064.
106. *Jones C.J., Homma M., Macnab R.M.* // *J. Bacteriol.* 1987. Vol. 169. P. 1489—1492.
107. *Jones C.J., Homma M., Macnab R.M.* // *J. Bacteriol.* 1989. Vol. 171. P. 3890—3900.
108. *Jones C.J., Macnab R.M.* // *J. Bacteriol.* 1990. Vol. 172. P. 1327—1339.
109. *Jones C.J., Macnab R.M., Okino H., Aizawa S.-I.* // *J. Mol. Biol.* 1990. Vol. 212. P. 377—387.
110. *Jones C.J., Aizawa S.* // *Advan. Microbial Physiology.* 1991. Vol. 32. P. 109—172.
111. *Joys T.M.* // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 15758—15761.
112. *Kagawa H., Owaribe K., Asakura S., Tabahashi N.* // *J. Bacteriol.* 1976. Vol. 125. P. 68—73.
113. *Kalmokoff M.L., Jarrell K.F., Koval S.F.* // *J. Bacteriol.* 1988. Vol. 170. P. 1752—1758.
114. *Kalmokoff M.L., Karnauchoy T.M., Jarrell K.F.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990. Vol. 167. P. 154—160.
115. *Kalmokoff M.L., Jarrell K.F.* // *J. Bacteriol.* 1991. Vol. 173. P. 7113—7125.
116. *Kalmokoff M.L., Koval S.F., Jarrell K.F.* // *Arch. Microbiol.* 1992. Vol. 157. P. 481—487.
117. *Kamiya R., Asakura S.* // *J. Mol. Biol.* 1974. Vol. 87. P. 55—62.
118. *Kamiya R., Asakura S.* // *J. Mol. Biol.* 1976. Vol. 106. P. 167—186.
119. *Kamiya R., Asakura S.* // *J. Mol. Biol.* 1977. Vol. 108. P. 513—518.
120. *Kamiya R., Asakura S., Yamaguchi S.* // *Nature.* 1980. Vol. 286. P. 628—630.
121. *Kamiya R., Hotani H., Asakura S.* // *In: Prokaryotic & Eucaryotic Flagella.* / Eds. Amos W.B. & Duckett J.G. Soc. Exp. Biol. Symp. Cambridge Univ. Press. 1982. P. 53—76.
122. *Kato S., Okamoto M., Asakura S.* // *J. Mol. Biol.* 1984. Vol. 173. P. 463—468.
123. *Kerridge D.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1959. Vol. 31. P. 579—581.
124. *Kerridge D.* // *J. Gen. Microbiol.* 1966. Vol. 42. P. 71—82.
125. *Khan S., Dapice M., Reese T.* // *J. Mol. Biol.* 1988. Vol. 202. P. 575—584.
126. *Khan S., Khan I.H., Reese T.S.* // *J. Bacteriol.* 1991. Vol. 173. P. 2888—2896.
127. *Khan I.H., Reese T.S., Khan S.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. Vol. 89. P. 5956—5960.
128. *Kihara M., Homma M., Kutsukake K., Macnab R.M.* // *J. Bacteriol.* 1989. Vol. 171. P. 3247—3257.
129. *Kihara M., Francis N.R., DeRosier D.J., Macnab R.M.* // *J. Bacteriol.* 1996. Vol. 178. P. 4582—4589.
130. *Klein D., Foster J., Koffler H.* // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1969. Vol. 36. P. 844—850.
131. *Klug A.* // *In: Formation and fate of cell organelles.* / Ed. K.B. Warren. N.-Y.—London. Acad. Press. Symposium of the international society for cell biology. 1967. Vol. 6. P. 1—18.
132. *Kondoh H., Hotani H.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1974. Vol. 336. P. 117—139.
133. *Kostrzynska M., Betts J.D., Austin J.W., Trust T.J.* // *J. Bacteriol.* 1991. Vol. 173. P. 937—946.
134. *Kostyukova A.S., Pyatibratov M.G., Filimonov V.V., Fedorov O.V.* // *FEBS Lett.* 1988. Vol. 241. P. 141—144.
135. *Krieg N.R.* // *Bacteriol. Rev.* 1976. Vol. 40. P. 55—62.
136. *Kupper J., Wildhaber I., Gao Z., Baerlein E.* // *J. Bacteriol.* 1989. Vol. 171. P. 2803—2810.
137. *Kupper J., Marwan W., Typke D., Grunberg H., Uwer U., Gluch M., Oesterheld D.* // *J. Bacteriol.* 1994. Vol. 176. P. 5184—5187.
138. *Kuroda H.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1972. Vol. 285. P. 253—267.
139. *Kuwajima G., Asaka J., Fujiwara T., Node K., Kondo E.* // *J. Bacteriol.* 1986. Vol. 168. P. 1479—1483.

140. *Kuwajima G.* // *J. Bacteriol.* 1988. Vol. 170. P. 485—488.
141. *Larsen S., Reader R., Kort E., Tso W.-W., Adler J.* // *Nature.* 1974. Vol. 249. P. 74—75.
142. *Lawn A.M.* // *J. Gen. Microbiol.* 1977. Vol. 101. P. 121—130.
143. *Lechner J., Wieland F., Sumper M.* // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 8984—8989.
144. *Lechner J., Wieland F.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1989. Vol. 58. P. 173—194.
145. *Leifson E.* // *Atlas of bacterial flagellation.* Acad. Press. New York. 1960.
146. *Leifson E., Palen J.* // *J. Bacteriol.* 1953. Vol. 70. P. 233—238.
147. *Leifson E., Carhart S.R., Fulton M.* // *J. Bacteriol.* 1955. Vol. 69. P. 73—82.
148. *Lowe G., Meister M., Berg H.* // *Nature (London).* 1987. Vol. 325. P. 637—640.
149. *Lowy J., McDonough M.W.* // *Nature.* 1964. Vol. 204. P. 125—127.
150. *Macnab R.M.* // In «*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology» / Eds. Neidhardt F.C., Ingraham J., et al. 1987. Am. Soc. Microbiol. Washington. DC. P. 732—759.
151. *Macnab R.M.* // *Annu. Rev. Genet.* 1992. Vol. 26. P. 131—158.
152. *Macnab R.M., Aizawa S.-I.* // *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 1984. Vol. 13. P. 51—83.
153. *Macnab R.M., Koshland D.E.* // *J. Mol. Biol.* 1974. Vol. 84. P. 399—406.
154. *Macnab R.M., Ornston M.K.* // *J. Mol. Biol.* 1977. Vol. 112. P. 1—30.
155. *Manson M.D., Tedesko P., Berg H.C., Harold F.M., van der Drift C.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. Vol. 74. P. 3060—3064.
156. *Martinez R.J., Brown A.N., Glazer A.N.* // *J. Mol. Biol.* 1967. Vol. 28. P. 45—51.
157. *Martinez R.J., Ichiki A.T., Lundh N.P., Tronock S.N.* // *J. Mol. Biol.* 1968. Vol. 34. P. 559—564.
158. *Matsuura S., Shioi J.-I., Imae Y.* // *FEBS Lett.* 1977. Vol. 82. P. 187—190.
159. *Matsuura S., Kamiya R., Asakura S.* // *J. Mol. Biol.* 1978. Vol. 118. P. 431—440.
160. *McDonough M.W.* // *J. Mol. Biol.* 1965. Vol. 12. P. 343—355.
161. *Mescher M.F., Strominger J.L.* // *FEBS Lett.* 1978. Vol. 89. P. 17—41.
162. *Minnich S.A., Ohta N., Taylor N., Newton A.* // *J. Bacteriol.* 1988. Vol. 170. P. 3953—3960.
163. *Murray R.G.E., Birch-Andersen A.* // *Can. J. Microbiol.* 1963. Vol. 9. P. 393—401.
164. *Namba K., Yamashita I., Vonderviszt F.* // *Nature (London).* 1989. Vol. 342. P. 648—654.
165. *Newton A., Ohta N.* // *Annu. Rev. Microbiol.* 1990. Vol. 44. P. 689—719.
166. *Novikov V.V., Metlina A.L., Poglazov B.F.* // *Biochem. Molecular. Biol. Intern.* 1994. Vol. 33. P. 723—728.
167. *O'Brien E.J., Bennett P.M.* // *J. Mol. Biol.* 1972. Vol. 70. P. 133—152.
168. *Okino H., Isomura M., Yamaguchi S., Magariyama Y., Kudo S., Aizawa S.-I.* // *J. Bacteriol.* 1989. Vol. 171. P. 2075—2082.
169. *Oosawa F., Asakura S.* // *Thermodynamics of the polymerization of protein.* Acad. Press. London.—N.-Y.—San Francisco. 1975. P. 18—27; 51—54; 62—69.
170. *Parkinson J.S.* // *Annual Review of Genetics.* 1977. Vol. 11. P. 397—408.
171. *Parkinson J.S., Parker S.R.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. Vol. 76. P. 2390—2396.
172. *Parkinson J.S., Parker S.R., Talbert P.B., Houts S.E.* // *J. Bacteriol.* 1983. Vol. 155. P. 265—274.
173. *Pein J.F.* // *J. Bacteriol.* 1979. Vol. 137. P. 933—946.
174. *Pijper A.* // *Nature.* 1955. Vol. 175. N 4448. P. 214—215.
175. *Pleier E., Schmitt R.* // *J. Bacteriol.* 1991. Vol. 173. P. 2077—2085.

176. Pyatibratov M.G., Kostyukova A.S., Tarasov V.Yu., Fedorov O.V. // Intern. Symp. «Biological Motility». Abstr. Pushchino. 1994. P. 283—284.
177. Ravid S., Eisenbach M. // J. Bacteriol. 1984. Vol. 158. P. 1208—1210.
178. Reid J.C., Walsh M.P., Bert E., Shapiro L. // J. Bacteriol. 1979. Vol. 138. P. 984—989.
179. Remsen C.C., Watson S.W., Waterbury J.B., Truper H.G. // J. Bacteriol. 1968. Vol. 95. P. 2374—2392.
180. Ridgway H.F., Silverman M., Simon M. // J. Bacteriol. 1977. Vol. 132. P. 657—665.
181. Robertson J.D., Schreil W., Reedy M. // J. Ultrastruct. Res. 1982. Vol. 80. P. 148—152.
182. Samuel A.D., Berg H.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1995. Vol. 92. P. 3502—3506.
183. Schmitt R., Raska I., Mayer F. // J. Bacteriol. 1974. Vol. 117. P. 844—857.
184. Sheffery M., Newton A. // J. Bacteriol. 1977. Vol. 132. P. 1027—1030.
185. Sheffery M., Newton A. // J. Bacteriol. 1979. Vol. 138. P. 575—583.
186. Shimada K., Kamiya R., Asakura S. // Nature. 1975. Vol. 254. P. 332—334.
187. Shirakihara J., Wakabayashi T. // J. Mol. Biol. 1979. Vol. 131. P. 485—507.
188. Silverman M., Simon M. // J. Bacteriol. 1972. Vol. 112. P. 986—993.
189. Silverman M., Simon M. // Nature. 1974. Vol. 249. P. 73—74.
190. Silverman M., Simon M. // Ann. Rev. Microbiol. 1977. Vol. 31. P. 397—419.
191. Simon M.I., Emerson S.U., Shaper J.H., Bernard P.D., Glazer A.N. // J. Bacteriol. 1977. Vol. 130. P. 200—204.
192. Skulachev V.P. // Eur. J. Biochem. 1985. Vol. 151. P. 199—206.
193. Smith R.N., Koffler H. // Adv. Microbiol. Phys. 1971. Vol. 6. P. 219—339.
194. Sosinsky G.E., Francis N.R., Stallmeyer M.J.B., DeRosier D.J. // Biophysical J. 1988. Vol. 53. P. 417—423.
195. Sosinsky G.E., Francis N.R., DeRosier D.J., Wall J.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 4801—4805.
196. Southam G., Kalmokoff M.L., Jarrell K.F., Koval S.F., Beveridge T.J. // J. Bacteriol. 1990. Vol. 172. P. 3221—3228.
197. Stallmeyer M.J.B., Aizawa S.-I., Macnab R.M., DeRosier D.J. // J. Mol. Biol. 1989. Vol. 205. P. 519—528.
198. Stolz B., Berg H. // J. Bacteriol. 1991. Vol. 173. P. 7033—7037.
199. Sumper M. // Biochim. Biophys. Acta. 1987. Vol. 906. P. 69—79.
200. Sumper M., Herrmann G. // Eur. J. Biochem. 1978. Vol. 89. P. 229—235.
201. Sumper M. // Biochim. Biophys. Acta. 1987. Vol. 906. P. 69—79.
202. Suzuki T., Iino T., Yamaguchi S. // J. Bacteriol. 1978. Vol. 133. P. 907—915.
203. Suzuki T., Komeda Y. // J. Bacteriol. 1981. Vol. 145. P. 1036—1041.
204. Tang H., Braun T.F., Blair D.F. // J. Mol. Biol. 1996. Vol. 261. P. 209—221.
205. Tauschel H.-D. // Methods in Microbiol. 1988. Vol. 20. P. 237—259.
206. Thomas D.R., Morgan D.G., DeRosier D.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 10134—10139.
207. Tomashov I.S., Rittenberg S.C. // J. Bacteriol. 1985. Vol. 163. P. 1038—1046.
208. Tonjum T., Koomey M. // Gene. 1997. Vol. 11. P. 1155—1163.
209. Trachtenberg S., DeRosier D.J. // J. Bacteriol. 1992. Vol. 174. P. 6198—6206.
210. Tronick S.R., Martinez R.J. // J. Bacteriol. 1971. Vol. 105. P. 211—219.
211. Ueno T., Oosawa K., Aizawa S.-I. // J. Mol. Biol. 1992. Vol. 227. P. 672—677.
212. Ueno T., Oosawa K., Aizawa S.-I. // J. Mol. Biol. 1994. Vol. 236. P. 546—555.
213. Uratani Y., Asakura S., Imahori K. // J. Mol. Biol. 1972. Vol. 67. P. 85—98.
214. Vaituzis Z., Doetsch R.N. // J. Bacteriol. 1969. Vol. 100. P. 512—521.
215. Volger A.P., Homma M., Irikura V.M., Macnab R.M. // J. Bacteriol. 1991. Vol. 173. P. 3564—3572.
216. Vondervist F., Kanto S., Aizawa S.-I., Namba K. // J. Mol. Biol. 1989. Vol. 209. P. 127—131.

217. *Vondervist F., Uedaira H., Kidokoro S.-I., Namba K.* // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 214. P. 97—103.
218. *Vonderwist F., Ishima R., Akasaka K., Aizawa S.-I.* // J. Mol. Biol. 1992. Vol. 226. P. 575—579.
219. *Wagenknecht T., DeRosier D., Aizawa S.-I., Macnab R.M.* // J. Mol. Biol. 1982. Vol. 162. P. 69—78.
220. *Wakabayashi K., Hotani H., Asakura S.* // Biochim. Biophys. Acta. 1969. Vol. 175. P. 195—203.
221. *Warrik H.M., Taylor B., Koshland D.E., Jr.* // J. Bacteriol. 1977. Vol. 130. P. 223—228.
222. *Wei L.-N., Joys T.M.* // Nucleic Acids Res. 1986. Vol. 14. P. 8227—8232.
223. *Weibull C.* // In: Gunsalus I.C., Stanier R.Y. The Bacteria. N.Y. Acad. 1960. Vol. 1. P. 153.
224. *Wieland F., Paul G., Sumper M.* // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260. P. 15180—15185.
225. *Wilson M.L., Macnab R.M.* // J. Bacteriol. 1988. Vol. 170. P. 588—597.
226. *Wilson M.L., Macnab R.M.* // J. Bacteriol. 1990. Vol. 172. P. 3932—3939.
227. *Wilson D.R., Beveridge T.J.* // Can. J. Microbiol. 1993. Vol. 39. P. 451—472.
228. *Woese C.R., Fox G.E.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. Vol. 74. P. 5088—5090.
229. *Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. Vol. 87. P. 4576—4579.
230. *Yamaguchi S., Fujita H., Taira T., Kutsukake K., Homma M., Iino T.* // J. Gen. Microbiol. 1984. Vol. 130. P. 3339—3342.
231. *Yamaguchi S., Fujita H., Ishihara A., Aizawa S.-I., Macnab R.M.* // J. Bacteriol. 1986. Vol. 166. P. 187—193.
232. *Yamaguchi S., Aizawa S.-I., Kihara M., Isomura m., Jones C.J., Macnab R.M.* // J. Bacteriol. 1986. Vol. 168. P. 1172—1179.
233. *Zhao R., Schuster S.C., Khan S.* // J. Mol. Biol. 1995. Vol. 251. P. 400—412.
234. *Zhao R., Pathak N., Jaffe H., Reese T.S., Khan S.* // J. Mol. Biol. 1996. Vol. 261. P. 195—208.
235. *Zhao R., Amsler C.D., Matsumura P., Khan S.* // J. Bacteriol. 1996. Vol. 178. P. 258—265.