- 31) J. Lederberg: *Genetics*, **46**, 1475 (1961)
- 32) T. Iino: *J. gen. Microbiol.*, **27**, 167 (1962)
- 33) M. H. Richmond: *Bacteriol. Review*, **26**, 398 (1962)
- 34) U. M. Ingram: *Nature*, **180**, 326 (1957)
- 35) C. Yanotsky, D. R. Helinski, B. D. Maling: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **26**, 11 (1961)
- 36) S. A. Berson, R. S. Yalow: *Nature*, **191**, 1392 (1961)
- 37) A. F. Fox, J. B. Burnett: *Biochim-Biophys. Acta*, **61**, 108 (1961)
- 38) R. P. Ambler, Personal comm.
- 39) M. W. McDonough, *Biochem. J.*, **84**, 114 (1962)
- 40) M. Enomoto, T. Iino, unpublished data
- 41) M. Enomoto, T. Iino: *Ann. Rept. Natl. Inst. Genetics (Japan)*, in press
- 42) T. Iino: *ibid.* **10**, 111 (1959)
- 43) T. M. Toys, B. A. D. Stocker: *Nature*, **197**, 413 (1963)
- 44) R. P. Ambler, M. W. Rees: *ibid.* **184**, 56 (1959)
- 45) B. A. D. Stocker, M. W. McDonough, R. P. Ambler: *ibid.* **189**, 556 (1961)
- 46) F. Jacob, J. Mond: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**, 193 (1961)
- 47) B. A. D. Stocker, N. D. Zinder, J. Lederberg: *J. gen. Microbiol.* **9**, 410 (1953)
- 48) T. Iino: *Ann. Rept. Natl. Inst. Genetics (Japan)*, **9**, 96 (1958)
- 49) T. Iino, M. Enomoto: *ibid.* **13**, 73 (1962)
- 50) T. Iino, I. Haruna: *ibid.* **11**, 74 (1960)
- 51) T. Iino: *Jap. J. Genetics*, **36**, 268 (1961)
- 52) T. Iino: *Ann. Rept. Natl. Inst. Genetics (Japan)*, **13**, 72 (1962)
- 53) T. Iino: *Genetics*, **46**, 1465 (1961)
- 54) B. McClintock: *Amer. Nat.*, **95**, 265 (1961)
- 55) E. B. Lewis: *Adv. in Genetics*, **3**, 73 (1950)
- 56) T. Iino: *Ann. Rept. Natl. Inst. Genetics (Japan)*, **14**, in press.
- 57) H. Hirokawa, T. Iino: *ibid.*, **12**, 81 (1961)
- 58) T. Iino: *Proc. XIth Intern. Congress of Genetics*, in press

バクテリアのべん毛

——構造・形成・運動に関する諸問題——

名古屋大学理学部 朝倉 昌
分子生物施設

I 緒 言

編集委からの注文は“生体の運動”という題でしたが、今広くこの問題についてまとめるのが難しいので、私が現在扱っているバクテリアのべん毛をとり上げ、その構造・形成・運動について解説を試みることにします。バクテリアべん毛の遺伝については、飯野徹雄さんが本誌(17頁)に綜説されています。

同じべん毛(flagella)と呼ばれても、バクテリアのべん毛だけは、共通した構造をもつ高等動物の精子の尾、原生動物や藻類のべん毛(乃至せん毛, cilia)と、基本的に異っています。この差をはっきりさせるため、¹⁾まず後者のグループのべん毛について述べておきます。精子のべん毛には長さ200 μ にも及ぶものがあり、その構断面に9+2本のfibrilがみられることは有名です。周辺の9本のfibrilは夫々2本のsubfibrilからなり、各subfibrilは200~300 $\text{\AA}$ の太さの管状(壁の厚み40 $\text{\AA}$ 程度²⁾)をしています。バクテリアのべん毛は、この

1本のsubfibrilに対応するものと思えばよい。9+2の系は、多様の構造蛋白、酵素蛋白から成っています^{3,4)}。ATP分解酵素の存在から、筋肉収縮と類似の運動機構が議論されています⁵⁾。

精子のべん毛運動については、光学顕微鏡による詳細な運動解析が行われ、流体力学的理論と相まって、べん毛自体がエネルギー変換系であることが結論されています。バクテリアべん毛の場合はどうでしょうか。菌体は1~2 μ の径をもち容易に顕微鏡の対象となりますが、べん毛は長さ~10 μ としても太さの方が100~200 $\text{\AA}$ しかなく、観察は容易でない。しかも通常菌は50 μ /秒以上の速さで直進運動します。従って媒質に高分子物質を加え減速してやるとか、ストロボを使って高速度カメラにとるとかいった別の工夫が必要です。現在バクテリアのべん毛は菌の運動器官と信じられていますが、これを示す直接証拠はないのです。べん毛の運動機構を解明する上にも、生きた状態で菌体+べん毛の運動を正確に記述することが是非望まれる

* Sho Asakura, Institute of Molecular Biology, Faculty of Science, Nagoya University.

ところす。

II 構 造

A ペン毛型

Leifson という人の本をみると、160 頁にわたりペン毛をつけたバクテリアの（固定染色）顕微鏡写真がのっています。菌には夫々 *Proteus vulgaris* だの *Salmonella typhimurium* だの、素人になじみにくい名前がついています。とにかく55の属にわたり、さまざまな菌がさまざまにペン毛をつけている。ペン毛の本数/菌は種類によりまちまちです。ある菌は回転だ円体状の菌体の一端にたった1本ペン毛を生じていますし、ある菌は菌体一面に7、8本ものペン毛をつけています。しかし、ペン毛1本1本についてみると、少数の例外を除いて、ひろく共通した点が認められる。それはペン毛が基部から先端まで比較的一様な波型をしている点です（図1）。この波型の山と山との間隔でペン毛の波長 λ が定められます。ペン毛の λ は、普通の培養条件ではその菌株に特有のものです。表1に *Proteus* 菌のペン毛の λ を挙げました。

ところで上の例に示したように、 $\lambda=2.3\mu$ 程度のペン毛型と並んで、ほぼその $\frac{1}{2}$ の波長をもつペン毛型が存在します。前者は normal 型、後者は curly 型とよばれます。2つのペン毛型の存在することは、上の例に限らず、数多くの属のバクテリアにひろく共通した点です。ペン毛毛型と運動性には密接な相関があります。図1のaの菌が速かな直進運動をしたのに比べ、

bの方は運動性にとぼしく菌体な自転運動のようなことをくりかえすだけでした。ペン毛型は遺伝されます。この問題については飯野さんの解説をお読み下さい。他方菌株によっては、培地の条件でペン毛型が変化することがあります。媒質のpHを7.2 $\rightleftharpoons$ 6.2と変化させることにより、*Proteus* 菌のペン毛が normal 型 $\rightleftharpoons$ curly 型に変化したという報告があります。

Leifson の写真のようなペン毛像は、元来3次元的らせん状をしていたフィラメントが、平面上につぶれて生じたものです。実際培養液中の静止した菌（死んだ菌）のペン毛が3次元らせんをしていることが顕微鏡で観察されます。らせんの1ピッチは、固定染色後得られる1波長にほぼ等しい。

ここで強調したいのは、バクテリアペン毛が一様ならせん（ピッチ2 $\sim$ 3 μ ）をなすことの一般性、そしてこれらのらせんが培地の条件でピッチ $\frac{1}{2}$ の curly 型に変換し得る可能性です。特殊な例として、1菌体から normal と curly の両方の型のペン毛が生えている例、更に1本のペン毛上に normal と curly の両方の波型が共存している場合が示されています。このような例は、ペン毛が運動中 normal $\rightleftharpoons$ curly の型の変化を

表1 *Proteus* 菌のペン毛の波長 (μ)

菌 種	normal 型	curly 型
<i>P. mirabilis</i>	2.13	1.06
<i>vulgaris</i>	2.25	1.07
<i>morganii</i>	2.14	1.11
<i>Providencia group</i>	2.31	1.16

図1 *Salmonella* 菌の顕微鏡写真⁶⁾（固定染色）a: normal 型, b: curly 型。

図2 *Salmonella* 菌のべん毛の EM 像 (Negative Staining.)

行っていたのではないかと思います。菌に normal 型と curly 型の変異株があり、これらが遺伝されることは確かです。恐らくべん毛の蛋白分子に何らかの変異を生じているのでしょう。しかしこのことは、運動中べん毛が normal-curl の間の形態変換をおこなっている可能性と矛盾するものではありません。

B 構成蛋白

Proteus や *Salmonella* 菌のけん濁液を激しく振とうすると、べん毛は菌体から切れ、両者を遠心分離することが出来ます^{7,8)}。単離したべん毛の EM 像は、太さ、波型の点で菌体についていたときと区別つきません(図2)。

単離したべん毛は 7.5 万 g, 30 分間で容易に沈殿します。精製した材料は、98% 以上が蛋白で、これに約 1% のリビドが強く結合していることが見出されています。又クレオチド、燐酸が特別に結合しているということはない。又何らの酵素活性も認められていません。溶液の pH を 3~4 に下げるとべん毛は容易に脱

表 2. べん毛蛋白のアミノ酸組成 (g 残基/10⁵ g)

アミノ酸	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. vulgaris</i>
gly	80	81
ala	148	104
val	60	61
leu	75	81
isoleu	48	52
glu	96	93
asp	154	156
ser	58	64
thr	100	81
tyr	24	12
phen	14	24
try	0	0
pro	11	0
cys/2	0	6
met	3 (?)	6
lys	32	46
ϵ -N-methyl-lys	26	0
arg	27	36
his	0	0

重して、単一成分の蛋白が得られます。尿素、加熱、アセトン乾燥などの処理によっても同様に脱重合ができます。バクテリアべん毛は単一蛋白から構成されています。これに flagellin という名前がつけられました⁹⁾。表2に2種類のバクテリアのべん毛蛋白のアミノ酸組成を挙げました^{10,11)}。his, try は両者に共通して欠けています。けれどもアミノ酸組成全体としては、両者の間にかんがりの差があります。属によりべん毛蛋白

のアミノ酸組成には相当の差異があるらしい。特に *typhimurium* は、 ϵ -アミノがメチル化された lys を含んでいます。*P. vulgaris* では N 端の分析が行われ、約 2 万 g あたり 1 個の ala が見出されています。上の表と併せて、べん毛蛋白は分子量約 2 万の (sub-) unit をもつことが予想されます。

他方(古く weibull により、)物理的方法による分子量の決定が行われ、*Proteus* 菌のべん毛蛋白に 4 万という分子量が見出されています⁸⁾。別に Koffler らは、酸処理により脱重合したべん毛蛋白の、中性にもどしてからの分子量を求め、同様 4 万の値を得ました¹²⁾。更に、溶液の pH が 4.0~4.5 以下では、このモノマーが分子量 2 万の subunit 2 個に可逆的に分かれることを見出しています。べん毛蛋白は分子量 2 万の subunit 2 個から形成されていると考えられます。

C 微細構造

Astbury らは *Bacillus*, *Proteus* から単離したべん毛方向づけてフィルムを作り、広角 X 線解析を行いました。長さの方向に 4.65 Å (cross β) と 5.1 Å (α -helix) の周期を出しています。(Cross β と α -helix の混在は、いわゆる m-k-e-f グループに特有のことで) 別に長さ方向に 410 Å の周期が認められます。この値は筋肉蛋白アクチンの繊維にも見受けられるものです。この周期の由来については、いずれの場合にもはっきりしたことは判っていません。

最近 Kerridge らが高分解能の EM によって、単離した *Salmonella* 菌のべん毛の微細構造の解析に成功しました¹³⁾。Negative staining による長いべん毛像と、べん毛を長さ方向に直角方向に切って得た断面像とを組合せ、図3の構造を結論しています。べん毛は直径 45 Å の球状の単位からなると推定されます(但し球状の単位を negative staining で浮きあがらせるのには、試料を予めゆるく音波振動にかけるなどの処理が必要でした)。直径 45 Å の球は、密度 1.3 の蛋白とみなせば、

図3 べん毛の微細構造¹³⁾

分子量 3.7 万に対応します。Kerridge らは観察された球状単位がべん毛蛋白分子に相当すると考え、それらをじゅうずつなぎにした strand が平行に 5 本、乃至らせん状に 3 本集ってべん毛を構成していると推定しています。いずれにせよ、球状蛋白が構造単位になって繊維状構造を作る例は、精子のべん尾の subfibril²⁾、アクチンフィラメント等にも見出されつゝあります。¹⁴⁾

図 3 によればべん毛は管状をなし、芯は数 10 Å の中空になっています。Negative staining すると、暗い線がべん毛の中心をまっすぐに走って見える場合があります。このような管状構造は、べん毛を長さ方向にそって切った切片により、より明確に把握されました。¹⁵⁾ この場合壁の厚み約 35 Å 、中空の部分の巾 45 Å とされています。

図 3 はべん毛の局所的な規則性を近似的に表わすものと考えなくてはなりません。もしこの構造をこのまゝ延長すると、べん毛特有のらせん形状態が得られないからです。とにかくこのモデルによれば、長さ $L \text{ Å}$ のべん毛は、 $(L/9)$ 個の蛋白分子から構成されていることになり、波長 2.5μ を示すべん毛の 1 ピッチには約 3,000 個の蛋白分子が含まれることになります。

こんなに多数の球状蛋白が集って、ようやくべん毛の 1 ピッチを構成しているということは、構成分子間の配位が驚くべき規則性と厳密さをもっていることを物語ります（この規則性は当然個々の蛋白分子に由来します）。この故に、べん毛はべん毛蛋白の結晶とよばれるにふさわしい。すでに 1953 年に Pauling がこの点に関するすぐれた所見をのべています。¹⁶⁾

以上要約すると、バクテリアべん毛は球状蛋白分子が結晶的に凝集したもので、見方によれば 2 次元結晶ともみえます。こゝで A、B に述べたことを思い出す必要がある。べん毛には normal と curly の 2 つの形態がありました。言いかえれば、normal と curly に対応する 2 つの安定な結晶型が存在することになる。これを構成するべん毛蛋白は、極めて特異な性質をもつものでなくてはならないでしょう。ところが、バクテリアの種類により、べん毛蛋白のアミノ酸組成は相当大きく変わっていると考えられます。

一般にべん毛蛋白にどのような特性を想定すれば、上にのべたような要求を充せるでしょうか。理論的な考察が待たれるところです。差当たり局所的構造としては図 3 を取入れ、単位はすべて合同のものとするのが妥当でしょう。こゝで注意すべきは、蛋白分子の異方性により、1—4 方向、2—5 方向、3—6 方向の分子間相互作用はすべて性質を異にし、条件によって 3 種の結合のバラスが変化し得るという点です。

べん毛構造の問題に関係して、Jarosch¹⁷⁾ という人が面白いモデルを示しています。ピッチの異った 2 本乃至 3 本の鋼らせんをゆるくより合わせることににより、大きな波長をもつ超らせんを得ました。又要素のらせんに適当な回転を与えることにより、超らせんの波長が不連続的に $\frac{1}{2}$ に変化し、あたかも curly 型の超らせんが得られることを示しています。

III 形 成

こゝで扱うのはべん毛蛋白からべん毛構造が形成される過程です。In vitro には単離したべん毛を一度蛋白分子にまで脱重合させ、適当な条件により再びべん毛様フィラメントに構成させる問題です。この際最終的に得られたフィラメントが、もとのべん毛と同じ構造をもつことを示すのが大切です。これにはべん毛内の蛋白分子の詳細な配置を調べなくても、出来上がったフィラメントが低倍率の EM で観察して、もとのべん毛と区別つかない波型を示せば、充分な証拠になるでしょう。

A ベん毛の再構成

この問題で、Abram¹⁸⁾とKofflerが最近注目すべき報告をしています。彼等は*Proteus* 菌からとったべん毛を酸処理により一度脱重合し、0.05Mリン酸緩衝液の存在下で注意深くpHを上げてやるだけの操作で、もとのべん毛と区別がつかない型のフィラメントを再構成することが出来ました。この結果は蛋白分子→べん毛の過程が、熱力学的に可逆的なものであることを示唆します。

いろいろの酵素蛋白で、1次構造が与えられれば2次3次構造が自然に定まり、ひとりでに活性が現れることは周知の通りです。Abramらの結果をそのまま受けとるならば、べん毛蛋白が生合成されれば、あとは溶解条件だけでひとりでにべん毛構造が形成されることになる。バクテリアべん毛は、一応一個の独立した器官とみなせます。従って構成蛋白の一次構造が与えられるだけで、一個の器官の形成までが決ってしまうように見えます。もっとも酵素蛋白の再活性化の例でも、1次構造→2次3次構造の過程が原理的に熱力学的安定化であっても、この過程が実際行われる速度が問題で、既にある例では他の酵素がこの過程の速度を速めることが見出されています。べん毛の再構成の場合にも速度論的解析が大切な訳です*。Abramらとは独立に、私も飯野さん(遺伝研)、江口さん(名大理生物)と共同で再構成の実験を行い、その可能なことを見出してました¹⁹⁾。以下少し詳しく私たちの仕事を紹介することにします。

B ベん毛形成の自己触媒的性格

まずべん毛フィラメントの形成が、べん毛蛋白の結晶化に相当した現象であることを示しましょう。結晶化的とは、この過程が核の形成とその生長の、2つの段階に分離できることを意味します。これは構造が結晶的であったことから当然予想されるところでしょう。使ったのは*Salmonella* 菌です。

(1) 定性的実験——単離したべん毛を4~5 mg/mlになるよう予め0.2 MKCl、0.01 Mリン酸緩衝液、pH 7.0の塩溶液にとかしておきましょう。今後もの出し入れはしません。この原液は大体 $\eta_{sp}/c=5\sim10$ の大きな粘度を示します。これに強力な音波振動をかけて、フィラメントを切断します。すると $\eta_{sp}/c=1$ 程度に粘度は下ります。これをEMでみると、平均の長さが0.2~0.3 μ 、太さはもとのべん毛と殆ど等

しいフラグメントになっていることがわかります(図6のa)。このような試料を F^* と呼ぶことにします。次に F^* の一部をとり加熱します。熱し方に余りきつい条件はありません。例えば65°に15分間もつけてやれば充分です。これを室温にもどすと、粘度は $\eta_{sp}/c=0.1$ 程度に低下しています。これをMと呼ぶことにします。5,000倍程度のEMでみても、何ら構造らしいものは見当りません。超遠心にかけて調べると、単一な成分として、 $S_{20}=2.8$ 程度で沈降します。この速度から推して、フラグメントは完全に蛋白分子に脱重合したと考えられます。

さてこのようにして作ったMと F^* の試料を、夫々室温に放置しても、粘度、沈降、EMで調べて、何ら見立った変化は観測されません。特にMは加熱により不可逆的に重合性を失ったかのように見えます。従来はそう思われて来た訳です。ところがこれは誤りで、Mの試料に少量の F^* を加えると、それだけで蛋白分子の速かな重合が始まり(図4)、数時間のうちに長いべん毛様フィラメント(図6)が完成されることが判りました。

図4 ベん毛蛋白の重合。

終濃度: M 5.9 mg/ml, f^* 1.2 mg/ml, KCl 0.2 M, リン酸緩衝液 0.01M, pH 7.0, 温度 30°C。1: M+ f^* , 2: M, 3: f^* 。
曲線上的数値は室温に12時間放置後の値を示す。

* Abramらは上記の実験で、pH 5.5、28°Cにおいて2 mg/mlの蛋白が4時間内にほとんど重合を完了したと述べています。

このような現象は、事新しいものではありません。蛋白を結晶化させるとき、予め用意した結晶を少量加えてやるのと同じにみえます。たゞし今の場合フィラメントの太さは変わらず、長さ方向にだけ成長します。フラグメント F^* の末端にだけモノマーが結合して行ったと考えられます。フラグメントの末端が結晶化の核として働いたことになります。

こゝで興味深いのは、核が加えられれば速かに重合し得るモノマーが、同じ条件下でそれ自体では事実上重合し得なかった点です。0.2 MKCl, pH 7.0, 室温という条件下では、ペン毛構造は熱力学的な安定状態にあると考えられます。M 中で重合がおこらなかったのは、事実上核の形成がおこらなかったためです。それでペン毛蛋白は過飽和状態にとどまっていたことになる。

F^* の中でもフィラメントの成長はみられません。これは単に衝突の確率によるのかも知れません。若しフラグメントの平均長さが $2,700 \text{ \AA}$ とすれば、平均 300 個の蛋白分子が含まれていることになる。フラグメントの末端同志が衝突する確率は非常に小さいことが予想されます。別にも原因が考えられます。図 3 の構造によれば、音波処理で切断されたフラグメントの切口は、一様ではなく不規則なことが予想されます。互に適合し合わない末端をもったフラグメント同志が end-to-end に衝突しても、結合出来ない可能性があります。

(2) 定量的実験——上の結果をもう少し定量化する実験を試みましょう。試料は前と同じ F^* と M を使えばよい。問題は M と F^* とをある体積比 r で混ぜたら、長時間後に得られるフィラメントの平均長さ $\langle L \rangle$ はどのように r によるか？ これにはまず予備実験が必要です。(i) F^* の試料を超遠心にかけて調べると、たゞ 1 つの鋭い山が現れ ($S_{20} \sim 80$)。その前後に他の成分は認められません。この事実は F^* 中の蛋白が、すべて EM で観察されるフラグメントとして存在していることを保証します。(ii) M を調製するときの熱処理で、何%かのモノマーは重合性を失っているかも知れない。この点を調べるため、熱変性(熱脱重合ではない)の速さを測りました。結果は 0.2 MKCl, pH 7 中で 65° に熱すると、10%/30 分の速さの熱変性が認められました。けれども M 中に重合性を失った蛋白が混入していることは (5%) 誤差範囲で無視出来ます。

さて本番の実験では、M と F^* の体積比 r を 0, 1, 2, 3 と変えた混液を作り、室温に 15 時間放置し

て重合を完成させました。得られたフィラメントの $\langle L \rangle$ を求めるのには、各試料を EM 写真にとって、視野に現れたフィラメント (100~200 本) の長さを曲線定規を使って測定し、結果を数平均しました。ところが長さの測定の段になって、1 点から数本のフィラメントが放射状に伸びている例がかなり見出され、再構成のとき枝分れがおこることがわかりました(音波処理によってフィラメントの局所に部分的な構造の破壊——例えば 5 本の strand のうち 2, 3 本が切れる可能性があります。このような点は、フラグメントの末端同様、モノマーの重合の核として働き、分枝点となることが考えられます)。従ってこのような特異点から放射しているフィラメントは、夫々独立なものとして勘定しました。

このようにして得た $\langle L \rangle$ を r に対して目盛ったのが図 5 です ($r=0$ すなわち F^* のみを放置した場合、 $\langle L \rangle = 0.26 \mu$ の値に有意な変化を認めませんでした)。図の実線は

$$\frac{\langle L \rangle_r}{\langle L \rangle_{r=0}} = 1 + r$$

の関係を示します。例えば M と F^* を等量混ぜると ($r=1$)、長時間後に得られるフィラメントの平均長さが、核として加えたフラグメントの平均長さの 2 倍になることを意味します。実験結果はこの理論値に極めてよく合っています。以上の実験結果から次の結論が引きだせます。(i) $M + F^*$ 中でも、モノマーばかりで新しい核を作ることはないし、又フィラメント同志が連って核の数を減すことはない。(ii) フィラメ

図 5 完全に成長したフィラメントの平均長さ $\langle L \rangle$ と、混合したモノマーとフラグメントの蛋白量比 r の関係。

ントの成長は、フィラメントの末端とモノマーの相互作用だけでおこる。(iii) 加えたフラグメントと新生したフィラメントの部分は等しい構造をもつ。

こゝに得た結果は、べん毛形成の重要な性格を示すものと思われます。系に含まれるフィラメントの数は、最初種として存在したフラグメントの数で決ってしまう。言いかえれば、はじめ存在したフラグメントと生長を完成したフィラメントの間には、1対1の対応がつくことになります。これはべん毛形成が熱力学的安定化であるという原理と矛盾するかのようです。しかしこの過程が結晶化的であることから、みかけ上又實際上成立するのです。

C ベん毛成長速度

(1) 塩条件—今度は塩を含まない中性のべん毛溶液から出発し例によって熱処理により M 、音波振動で f^* の試料を作ります(べん毛を音波処理するとき、塩のあるなしで壊れ方が異なります。それで F^* と f^* を区別しました。 f^* に塩を加えると F^* が得られます)。今度は M と f^* を混ぜ合せただけでは、フィラメ

ントの成長はおこりません。 $M+f^*$ に塩を加えてはじめて可能です(中性無塩溶液中のべん毛は熱力学的に不安定のようにみえます。但し常温においてべん毛の脱重合は極めてゆっくりとしかおこりません)。

フィラメントの形成はいろいろの手段で追跡できるでしょう。こゝでは流動複屈折で追います。べん毛の原液は低速度勾配 (33 sec^{-1}) においても比較的大きな正の複屈折を示します。又實際上流動屈折を示さないような $M+f^*$ の試料を作ることが可能です。これに適当な塩を加えると流動複屈折 Δ が発生し、時間と共に増加して遂に飽和値に達します。 Δ が飽和値の $\frac{1}{2}$ の値に達するまでの時間の逆数で、いろいろの塩環境におけるべん毛の形成速度を比較できます(表3)。この結果、(i) KCl 濃度については $0.2 \sim 0.3 \text{ M}$ 内に至適条件があり、 0.05 M 以下になると成長速度は著しく小さくなる。(ii) 5 mM CaCl_2 乃至 MgCl_2 は至適濃度の KCl より大きな成長速度を与える、ことがわかります。

図6 種のフラグメントと成長したあるフィラメント
 M 5 mg/ml , F^* 0.3 mg/ml , KCl 0.2 M , pH 7.0 , 28°C .
 a: F^* , b: 120分後の F^* , c: 8分, d: 20分, e: 120分。

表3 いろいろな塩環境における
べん毛成長速度 $1/t_{1/2}$ の比較

溶 媒	d_f	$1/t_{1/2}$ (min^{-1})
KCl 0.075 M	108	0.013
0.15 M	109	0.049
0.3 M	108	0.065
0.5 M	109	0.053
MgCl ₂ 5 mM	109	0.083
CaCl ₂ 5 mM	112	0.091
KCl 0.15M + CaCl ₂ 2mM	109	0.059

M: 4.2 mg/ml, f*: 0.8 mg/ml, Tris-HCl 8 mM,
pH 7.8, 25°C.

d_f : 流動複屈折度の飽和値 (arbitrary scale).

図7 成長しつつあるフィラメントの長さの分布
実験条件は図6と同じ。N: 使ったフィラメント数,
点線: 平均長さ。

a: 種, b, c, d, e, f は夫々 4, 8, 12, 16, 20 分後の分布

(2) 成長速度——上の測定では、1本1本のフィラメントの成長速度を知ることが出来ません。そこで低倍率EMを使ってフィラメントの成長速度を求めることを試みましょう。この際、KCl濃度が0.01 M程度に下ると事実上フィラメントの成長が停止する事実を利用します。MとF*はB(1)で述べたと同じようにして作ります(蛋白5mg/ml, KCl 0.2M, pH 7.0)。今度はMに対し加えるF*を1/15程度に下げ、長いフィラメントが得られるようにします。MとF*を混合した時刻から成長がはじまります。一定時間毎に混液の一部をとって、水で20倍以上にうすめ成長を止めます。うすめた液を等量の2%リンタングステン酸(pH 7.5)と混ぜ、EMの試料としました。図6にF*及び(M+F*)中に成長しつつあるフィラメントのEM像を示しました。又図7は、4分おきにとったEM写真のフィラメントの長さをB(2)でやると同様に測定した結果をまとめたものです。これをみると、時間と共に分布の山が2つに分れ、一方は元にとどまり、他方の山だけが生長していることがわかります。前者は、加えたフラグメント中に、核として働かない不活性のものが混在したためと考えられます。その割合は約20%と推定されます。図7の平均長さをそのまま使って成長の初速度を求めると、0.065 μ/min の値が得られます。しかしこれは過小評価で、不活性なフラグメントの存在を考慮し、0.065/0.8=0.08 μ/min とするのがより正しいでしょう。別に図7の分布でmost frequentな長さに着目すると、はじめの20分間に0.2~0.3 μ から1.5~1.7 μ に移動しています。

(3) in vivo との比較——Stocker と Campbell²⁰⁾は、log phaseにある *Salmonella* 菌を使って in vivo のべん毛形成速度を求め、37°において0.10 μ/min の値を得ています。これと in vitro で得られた値を比較してみましょう。これには先づ条件の比較が必要です。私たちの使った塩、pH、温度の条件は、in vivo のものと桁違いに違うことはないでしょう。問題は蛋白濃度の比較です。実際 in vivo のべん毛蛋白の有効濃度を知ることが絶望的です。けれども一つの目安をうるために、次の計算は有効です。菌体を長さ2 μ 、太さ1 μ の回転だ円体とし、菌あたり長さ10 μ のべん毛7本が生えているとします。そこで菌体外にあるべん毛を菌体内におしこんで、中で一様に分布させたときのべん毛蛋白濃度を計算します。これはII Cにのべた Kerridge らのモデルを使えば容易にできて、約5 mg/ml という結果が

得られます。in vivo のべん毛形成は恐らくべん毛蛋白の生合成と併行して行われるでしょう。すると菌体内の蛋白濃度を 5 mg/ml と見積ることは過大評価になります。他方、生合成されたべん毛蛋白は菌体内で何等かの不均一な分布をとり、これにより蛋白の有効濃度は、それを一様にならしたときより大きな値をとる可能性も考えられます。このような考察から、べん毛蛋白の生合成が充分速かにおこってくれること、及び合成されたモノマーが菌体内の適当な部位に集積されることを予想して、モノマーの有効濃度を数 mg/ml と推定することは、そんなに自然でなく思われます。すると in vivo で得られた $0.10 \mu/\text{min}$ というべん毛成長速度は特に速い話ではなくて、in vitro でも実現しうる値であることになる。速度論的な立場からすれば、べん毛蛋白→べん毛の過程に、特別なエネルギー源だの、この過程を加速するための酵素系の存在を想定する必要がないように見えます。

くどいようですが、だからと云ってべん毛蛋白の生合成すなわちべん毛の形成と云うのではない。私たちの議論では、既成のべん毛構造——Kerridge らのモデルによれば長さ数 $100 \text{ \AA}$ あれば充分でしょう——の存在が、實際上不可欠の前提になっています。菌がべん毛をもって分裂増殖を続けるのには、新生する細胞にべん毛蛋白合成能が引きつがなければならない。私たちの議論を推進めるならば、別にべん毛のフラグメント——量的にはべん毛全体の数%で充分——が分裂に際し両方のセルに分配されなければならない。理論的には、べん毛蛋白は正常に合成するが、核を缺くために過飽和状態にとどまり、べん毛を生じないような菌株の存在が予想されます。

In vitro の実験でべん毛構造を加えるとべん毛蛋白が重合するところから、in vivo においてもべん毛構造そのものがべん毛の組織者であると想定して来ましたが、in vivo の実際の組織者は別に存在しているのかも知れません。異物の導入が結晶化の核となり得る例はよくあることです。

D ベン毛型

私たちの使った *Salmonella* 菌は、安定して normal 型のべん毛を形成する株です。菌体についたまゝのべん毛は波長 2.3μ を示します (図 2)。再構成して得られるフィラメントも、 0.2 M KCl , pH 7.0 で行う限り 2.3μ の波長を示します (図 6 の e)。ところが再構成を 5 mM CaCl_2 , pH 7.8 の条件で行うと、波長 2.3μ をもったフィラメントの他に、curly 型に対応

した波長 1.2μ のフィラメントが相当の割合で混在することが見出されました。同じべん毛蛋白が、重合条件により normal と curly の 2 つの安定な型をとりうることははっきりした訳です。In vivo の実験で pH 変化によりべん毛型が可逆変換することについてすでに述べましたが、 Ca^{++} などの 2 価金属イオンもべん毛型の変換に関与している可能性があります。

VI 運 動

こゝではバクテリアの運動器官としてべん毛が、どのような形式・機構により運動するか、について考察します。²³⁾ 但しわかっていることは非常に少く、こゝに述べることは今後の研究のための問題の整理にとどまります。

A. 運動中のべん毛運動

たとえば運動中の *Salmonella* 菌 (数本のべん毛をもつ) を限外顕微鏡で観察すると、不思議なことに、菌体のうしろに光るらせん状フィラメントがたゞ 1 本みえます。²⁴⁾ Stocker は、この光ってみえるらせんは何本ものべん毛が束になったものと考えています。とにかく光るフィラメントは (methyl cellulose を加えた高粘度の溶媒中で)、あたかもらせんが自転して生ずるような波状運動を示します。ストロボを使ってとった写真はらせんのピッチが静止したべん毛のピッチにほぼ等しいことを示しています。²⁵⁾ Piper らは、菌の運動中に、光るフィラメントのピッチが突然 $1/2$ に変化すること、この変化が可逆的なことを見出しました。更に、高速度で菌が直進するとき、光るフィラメントがらせん状→直線状に可逆的に変形することが観察されています。²³⁾ 運動中の菌のべん毛は、その意義が何であれ、型の変化を行っているようにみえます。

こゝに 1 つの疑問があります。暗視野に現れた 1 本の光るフィラメントの運動が、はたして数本のべん毛の運動を代表しているかどうか？ 菌の運動に積極的に参加しているべん毛は、限外顕微鏡で観察されなかったかも知れない。この心配を除くには、生菌の運動解析に 1 本だけべん毛を生じた菌株を使用すべきです。もしこの種の菌に光るフィラメントが見えなかったら、フィラメントの運動は必ずしもべん毛運動を表わさないことになる。

B ベン毛運動の形式

精子の運動について²⁶⁾ Taylor, Gray と Hancock,²⁷⁾ Machin²⁸⁾ らに詳しく論じられているように、バクテリアでも菌体 (径 1μ) を高速度 ($>50 \mu/\text{sec}$) で動か

す力は、大部分粘性抵抗にバランスし、慣性項は無視することが出来ます。簡単のため、右まきらせんのべん毛を1本だけもった菌を考えましょう。このらせんが、菌の進行方向にむかって右まきに回転すると、粘性抵抗により推進力を生じます。菌+べん毛の系には進行方向のまわりに外力が働かないことから、らせんの右まき回転に対し菌体は左まきに回転して、両者にかゝる粘性抵抗はバランスしなければなりません。このような菌体+べん毛の運動が行われる一つの形式は、べん毛らせんが剛体で、菌体がこのらせんを積極的に回転させればよい。(この場合、菌の運動に必要なエネルギーは、菌体とべん毛の接合点だけに生じる。)けれどもこのような模型は、べん毛の菌体に対する回転速度が毎秒数10〜数100回転という大きなものであることから、極めて不自然なものにすぎない。

上とは対称的に、べん毛は基部で菌体に固定されており、べん毛自体が積極的周期的に構造変化して、構造変化の波が一方に伝播する場合があります。こゝで典型的な2つの形式が可能にみえる。(i)べん毛上を一定ピッチの波が一方に伝わるように見える場合。これにはべん毛上の各部位は常時周期的な構造変化をついていて、異なる部位の周期に一定の位相差がなくてはならない。(ii)べん毛上に2つの異なるピッチ、 λ と $\lambda/2$ のらせん型が共存し、 $\lambda/2$ の区間が基部から先端にある速度で走行する場合。この場合には、(最近接)2蛋白分子間の変位は、 $\lambda/2$ 区間に入る時と出る時だけおこります。何れにせよ、べん毛内の最近接蛋白分子間の変位は、蛋白分子の大きさ¹⁶⁾に比べ微少なものでよいでしょう。

C エネルギー源

上の形式でべん毛が運動するとすれば、その各部位におこる構造変化は、何らかの不可逆過程を共役したサイクリックな過程でなくてはなりません(菌の運動により生ずるまさつ熱を補償しなければならぬ)。共役する不可逆過程としては、先づ筋肉を代表として9+2 fibrilをもつべん毛にも見されている、ATP分解反応が頭にうかびます。ところがバクテリアべん毛にはATPase活性は見出されていませんし、べん毛蛋白とATPとが特異に結合することもあります。ATP以外にエネルギー源を求めなくてはならない。バクテリアべん毛は、アクトミオシン-ATP系とは異った、もっとprimitiveなmechanochemical系として存在しているように思われます。別のエネルギー源としては、

差当り H^+ とか Ca^{++} のような、低次の物質の拡散が利用されている可能性が考えられます。

こゝで注意すべき2つの点があります。第1は、べん毛自体がエネルギー変換機構をもつとしても、菌体なしにはどうにもならない可能性があることです*。単離したべん毛に一方の運動をさせることは困難でしょう。盛んな代謝を行っている菌体には、いろいろの物質の秩序立った出入りが行われている筈です。例えば菌体から排泄されるある物質が、特異的にべん毛と相互作用してその構造を変化させる可能性があります。これと関係して、べん毛が管状構造をとっていたこと、それを通して物が運ばれる可能性のあることが興味深い。第2の点は、菌が激しく運動しているとき、全長 10μ に及ぶらせん状のべん毛には、相当大きな粘性抵抗が働くことです。これによりフィラメントに生ずる変形のエネルギーは、優に熱運動エネルギーを上まわる筈です。べん毛構造を変化させる要因として、環境の化学的物質的な条件の他に、運動により生ずる機械的な力も考えに入れなくてはなりません。Mechanochemical系には、力学的な要因が化学的過程を抑制する面もなくてはなりません。

文 献

- 1) M. A. Sleight: *The Biology of Cilia and Flagella*, Pergamon Press, (1962)
- 2) D. C. Pease: *J. Cell Biol.*, 18, 313 (1963)
- 3) L. Nelson: *Spermatozoan Motility*, Am. Assoc. for the Adv. of Sci., Washington (1962), p. 171
- 4) I. R. Gibbons: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 50, 1002 (1963)
- 5) T. Hayashi: *Spermatozoan Motility*, Am. Assoc. for the Adv. of Sci., Washington (1962), p. 279
- 6) E. Liefson: *An Atlas of Bacterial Flagellation*, Academic Press, New York and London, (1960)
- 7) S. Gard: *Ark. Kemi. Min. Geol.*, 19a, No. 21
- 8) C. Weibull: *Disc. Faraday Soc.*, 11, 195 (1951)
- 9) W. T. Astbury, E. Beighton, C. Weibull: *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 9, 282 (1959)
- 10) T. Kobayashi, J. N. Rinker, H. Koffler: *Arch. Biochem. Biophys.*, 84, 342 (1959)
- 11) R. P. Ambler, M. W. Rees: *Nature*, 184, 282 (1959)
- 12) S. R. Erlander, H. Koffler, J. F. Foster: *Arch. Biochem. Biophys.*, 90, 139 (1960)
- 13) D. Kerridge, R. W. Horne, A. M. Glaupert: *J. Mol. Biol.*, 4, 227 (1962)
- 14) J. Hanson, J. Lowy: *J. Mol. Biol.*, 6, 46 (1963)
- 15) G. W. Claus, L. E. Roth: *J. Cell Biol.*, 20, 217 (1964)
- 16) L. Pauling: *Disc. Faraday Soc.*, 13, 170 (1953)

* 形態的に正常の波型のべん毛をもちながら、運動しない菌株が存在します(paralyzed.)。

17) R Jarosch: <i>Primitive Motile System in Cell Biology</i>, Academic Press, New York and London (1963) p. 599 18) D. Abram, H. Koffler: <i>J. Cell Biol.</i>, 19, 3A(1963) 19) S. Asakura, G. Eguchi, T. Iino: <i>J. Mol. Biol.</i>, 提出中 20) B. A. D. Stocker, J. C. Campbell: <i>J. Gen. Microbiol.</i>, 20, 670 (1959) 21) C. Weibull: <i>The Bacteria</i> (ed. Gunsalus, Stanier) 1, 153, Academic Press, New York and London	(1960) 22) B. A. D. Stocker: <i>Symp. Soc. Gen. Microbiol.</i>, 4, 19 (1956) 23) A. Pijper, M. L. Naser, G. Abraoam: <i>J. Gen. Microbiol.</i>, 14, 371 (1956) 24) G. I. Teylor: <i>Proc. Roy. Soc.</i>, 211A, 225 (1952) 25) J. Gray, G. J. Hancock: <i>J. Exp. Biol.</i>, 32, 802 (1955) 26) K. E. Machin: <i>Proc. Roy. Soc.</i>, 211 B, 88 (1963)

*旋光強度が直接に測定できる 島津円偏光二色性測定装置

用 途

1. 有機・無機光学活性物質の分子構造の研究
2. 有機・無機化合物の立体配置の研究
3. 有機・無機光学活性物質の定性・定量への応用

- 島津光電分光光度計に取り付けて使用する装置です。
- 旋光分散測定装置と異なり、直接旋光強度の測定ができます。
- 測定波長範囲は、220~700m μ ときわめて広

い範囲にわたっています。

- 光学系が明るく、光源に水素放電管30Wを用いても、紫外領域で精度の高い円偏光二色性の差スペクトルが測定できます。

科学器械事業部 京都市中京区西ノ京桑原町18 京都 81-1111
本社 京都・支社 東京・支店 大阪 福岡 名古屋 広島 札幌 仙台

島津製作所