X線と電子線による細菌べん毛フィラメントの構造解析

松下電器産業(株)国際研究所 難波啓一, 山下一郎, 長谷川和也

Keiichi NAMBA, Ichiro YAMASHITA and Kazuya HASEGAWA: Structure Analysis of Bacterial Flagellar Filament by X-ray Diffraction and Electron Cryomicroscopy

Bacterial flagellum consists of a rotary motor and a helical filament as a screw, and works for bacterial motility and taxis. The filament is built by a self-assembly process and has a polymorphic ability to be various forms of supercoils. Here, we describe a complementary use of X-ray diffraction and electron cryomicroscopy for structure analysis of this large helical complex. The structure reveals the molecular mechanism of self-assembly and polymorphism.

1. はじめに

細菌は大きさ1～2μm程の単細胞生物である。多くは大腸菌やサルモネラ菌のように、約20μm/秒の速度で水の中を活発に泳ぎ回り、栄養や温度など、より良い環境を探して集まる走性行動を示す。その運動パターンの特徴は2～3秒間の直線的泳ぎと0.1秒ほどの方向変換の繰り返しであり(図1)、移動に伴って生じる環境変化の向きに応じて方向変換頻度を制御することが走性のしくみである。菌体には数本のべん毛が生えていて、その細長いらせん形がスクリューとしての役割を果たす。長さは10数μm、直径は23nmで、根元のところで細胞膜に固定され、そこに直径30nm長さ50nm程の回転機構がある。これがべん毛モータで、スライドガラスに1本のべ

ん毛だけが付着すると菌体が回転するので、回転機構の存在が良くわかる。¹⁾

細長いらせん部分の大半はべん毛フィラメントと呼ばれ、1種類のタンパク質フラジェリンが自己構築機構によって重合した繊維である。野生型では、ピッチ約2.3μm、直径0.4μmの左巻きらせんであるが、モータの反転時にはらせんの巻き方を瞬時に右巻きに変えて細菌の方向変換を引き起こす、非常にダイナミックな構造体である。

ここでは、このいわゆる超分子機械の自己構築や形態変換のしくみを解明するための、X線と電子線の相補的な能力をうまく組み合わせた立体構造解析法と、構造から推察される構築制御やスイッチングの分子機構について、最近の研究成果を概説する。

2. べん毛の自己構築と多型変換

2.1 べん毛の自己構築

べん毛の構築はモータ部分から開始し、すべての重合過程は自己集合により先端で進む。フラジェリンなどのべん毛構成タンパク質は、べん毛の中心の細長い穴を通して先端に運ばれる。細胞内で合成されるべん毛構成タンパク質がその場で重合せず、所定の位置でのみ順序よく組立が進むためには、選択的輸送や構造形成位置認識の機構が必要で、複雑な構造体の自己構築には良く制御されたしくみが各分子の構造設計に織り込まれていなければならない。

そのしくみのひとつは、各構成分子の両末端のアミノ酸数十残基が、べん毛構築に重要な分子間相互作用を担うにもかかわらず、モノマーでいるあいだはしっかりと折り畳まっていないことである。²⁾ そのためモノマーどう

図1 バクテリアの運動パターン (Swimming pattern of bacteria). 直進, 方向変換, 直進を示す模式図. べん毛の回転方向は、直進時にはべん毛の先端から見て反時計方向で、べん毛フィラメントの左巻きらせんが推進力を発生し、方向変換時には時計方向に反転する。

しでは重合せず、相手がべん毛構造の先端である時のみ自身の両末端を折り畳みつつ重合する。このような部分構造の折り畳みを並行させた重合機構は、超分子機械の構築機構として細胞内外で一般に使われているモチーフであるらしい。^{3), 4)} べん毛フィラメントの構築におけるフラジェリン両末端の各部位の役割については、後に詳述する。

2.2 フィラメントの多型変換

べん毛モータは200～300Hzで回り、らせん型フィラメントをその軸の回りに回転させ推進力を発生する。直進時は数本のべん毛が菌体の後ろへなびいて束を作り、ひとつのスクリューとなる(図1)。方向変換はモータの反転によって引き起こされる。この時べん毛の束は瞬時にほぐれ、菌体にかかる力のバランスが崩れて菌体は方向を変える。

フィラメントはフラジェリンと呼ばれる分子量約50kDaのタンパク質一種類が集合したものである。同一構造のサブユニットの単純ならせん状集合体は直線型のチューブ構造体にしかないが、フィラメントはそれがさらに大きならせん(スーパーコイル)を形成してスクリューとなる。しかも、モータの反転時にべん毛の束が瞬時にほぐれるように、フィラメントはそのらせん型を通常の左巻きから右巻きに変換する能力を持つ。⁵⁾ 変換を起こすのはモータの急反転によるねじれの力である。フィラメントはまたイオン強度やpHの変化、アミノ酸置換によってもさまざまならせん形に変換し、それを多型変換能と呼ぶ。

まったく同型のサブユニットがこのように集合したときに、曲がりやねじれが生じることがそもそも不思議である。しかし図2に示すように、2つのわずかに違ったコンフォメーションなり相互作用があるとすれば、それを繊維構造の中に規則的に混在させて歪みを作り、コンフォメーション変化のための自由エネルギーと歪みの弾性エネルギーの和よりも大きな負のエネルギーを、サブユニット間の結合エネルギーでまかなえば、その歪んだ構造は安定になる。フラジェリンという分子はそうように設計されていると考えられる。⁶⁾ 逆に2種類の相互作用のうち1つだけが使われると、歪みのない直線型のフィラメントが生じるはずである。

実際に突然変異株から、図2aとdに見られるような2種類の直線型のフィラメントが単離された。⁷⁾ チューブ構造を作る11本の素繊維(ほぼ軸方向のサブユニット配列)の傾きから、L型(a)およびR型(d)と呼ぶ。それぞれのフィラメントを脱重合させて得たモノマーを共重合させると混合比に応じてさまざまならせんができるので、それぞれのサブユニットコンフォメーションあるいは相互作用が、らせん型フィラメントを構成するサブユニットの基本的な2状態を代表するものと考えられる。

図2 べん毛フィラメントのサブユニット配列と多型のモデル (Subunit packing of flagellar filaments describing a model of polymorphism). 濃淡はコンフォメーションの違いを示す。(a) L型直線、(b) 左巻きらせん(直進時)、(c) 右巻きらせん(方向変換時)、(d) R型直線

よってL型とR型の2つの構造が、らせん構造の成り立ちと多型変換のしくみの解明に重要な手がかりを与えてくれるはずである。

フィラメントは、タンパク質分子のダイナミックな性質が直接眼で、しかも実時間で見られるという特異な系である。高分解能の立体構造から、わずかな力や外部環境の変化に応じて敏感に構造を変えるこの分子機械の巧妙なしくみを解明することにより、他の多くの分子機械の動作機構を支える基本的なダイナミクスについての理解が進むと期待される。

3. べん毛の構造解析

最近のX線結晶構造解析法の進歩はめざましく、良い結晶ができれば分子量数万Daのタンパク質の構造解析はすでにそう困難ではない。ただ、べん毛はその各部分でさえ巨大な構造体である。例えばモータの回転子は分子量が150万Daもあり、しかも膜タンパクという非常に結晶化の困難な部類に入る。べん毛フィラメントのような長い繊維構造にいたっては、普通の結晶学的解析法は無力である。ここでは、繊維状超分子の構造解明へのアプローチとして、X線と電子線がそれぞれの長所を生かしていかに相補的な役割を果たすかについて述べる。

3.1 X線繊維回折法

X線繊維回折法による高分解能の立体構造解析は、タバコモザイクウイルス(TMV)⁸⁾ など数少ない例がある

のみで、理論的には可能であるが実際にはかなりの困難を伴う。理由の一つは、試料が結晶ではなく配向した液晶ゾルであり、個々の繊維状粒子が溶液中で物理的に独立に存在するために生じる有限な配向分布である。それにより回折層線上の各点が弧状に広がって隣り合う層線どうしが融合し、強度データの収集を困難にする。それを回避するためには、できるだけ配向分布の小さな試料を準備しなければならない。そのためにはできるだけ濃度を高くして繊維軸の方向自由度を制限すればよく、これは回折像のS/Nを改善することにも有効であるが、単純な遠心濃縮では配向は難しい。もう一つの理由は、試料内で繊維が完全に配向したとしても、軸の周りには無配向であるという点である。結晶からの回折データ収集のように試料を回転して3次元の回折強度分布を得ることは、この無配向ゆえに不可能で、円筒平均された回折強度が1枚の2次元回折像として得られるだけである。これら2つの問題点をいかに解決するかが、構造解析の重要な戦略となる。

3.1.1 配向試料の作成法

液晶ゾル試料の配向分布をできるだけ小さくするために、べん毛のような超分子繊維に一般的に応用可能な配向法を開発した⁹⁾。要点は、1) 繊維状粒子の長さをコントロールして、軸比20以上に長くしない、2) 遠心濃縮により10～15%濃度のフィラメントのゾルを作成するときに、溶媒を低イオン強度で試料のpIに近いpHとする、3) いったんある程度配向した液晶ゾルの配向を長時間の低速遠心濃縮や強磁場処理によりさらに改善する、の3点である。要点1)も2)も、濃縮したゾルの流動性を高く保ち液晶化を容易にするためである。さまざまな溶媒条件の探索の結果、塩の種類によらず20～30mMのNaClに相当するイオン強度と繊維状粒子のpIにかなり近いpHが、最も良い結果、つまり高濃度の割には高い流動性を保ち配向しやすいゾルの形成に有効であることが判明した。また、長時間の低速遠心濃縮や強磁場による処理は、液晶化した小さなドメインの配向に有効である。このように複数のステップを順序よくたどることが、液晶試料の配向には必須である。

べん毛フィラメントの場合の実際の手続きは、50mMグリシン酢酸バッファ (pH5.0) 溶液中で、10,000gで20時間遠心濃縮したもの (約10%濃度のフィラメントゾル) を直径約1mmのガラスキャピラリーに長さ10mm程に詰め、1/10体積の塩溶液を端に加え良く混合してイオン強度を調整し、一端を封じた後キャピラリーの軸方向に遠心力がかかるように遠心チューブを工夫して、2,000g程の緩い遠心力で20時間以上遠心濃縮する。この遠心濃縮過程で濃度勾配が生じ、底部では配向分布はかなり小さくなり回折層線もシャープになるが、最後にはさまざまな向きの小さなドメインに分かれてしまい、全体の配

図3 べん毛フィラメント配向液晶のX線回折像 (X-ray diffraction patterns from oriented liquid-crystalline sols of flagellar filaments). 左半面はL型から、右半面はR型からのもの。3.5Å分解能までを示す。

向は悪くなる。ただし、ドメインごとの配向分布は高濃度のため非常に小さく保たれているため、これを超電導磁石中の13.5テスラの強磁場に5～10日静置して各ドメインを再配向させると、試料全体の配向分布は最高で分布角0.6度 (ガウス分布の1 σ) まで小さくすることができた。図3は回折像の例である。¹⁰⁾

3.1.2 回折像の記録と強度データ処理

回折像は、高輝度微小焦点 (0.1×0.1mm) のX線源 (リガクFR-C) からの発散ビームを全反射ミラーで0.15mmほどに収束して試料を約10時間照射し、イメージングプレート (富士フィルムBA100, あるいはリガクRAXIS4) に記録した。その回折強度分布を、逆空間のc*軸 (繊維軸をc軸とする) を含む断面に投影し、円対称なバックグラウンドを差し引いて、L型を図3の左半面にR型を右半面に示した。層線反射が3Å分解能近くまでははっきりと観測できる。¹⁰⁾

層線位置から周期長など構造パラメータを精密決定し層線強度分布を精度良く抽出するために、2次元プロファイルフィッティングによるデータ処理法を開発した。¹⁰⁾ まず、低角の強く孤立した反射から粗く周期長とらせん対称性を決め、それから予想される層線上の各点にビームサイズや配向分布による広がりを考慮した点広がり関数を置き、加重加算して得られた全体の強度プロファイルが観測強度に合うように、つまり各画素の強度残差の総和が最小になるようにそれぞれの点広がり関数の重みを決める。その上で、ビームサイズ、配向分布、各構造パラメータなどの精密化を交互に行う。特に構造パラメータの精密化は、各パラメータの微小な変化に対して

表1 X線回折像から得られたL型とR型の構造パラメータ

型	らせん対称性 (サブユニット/ターン)	周期 (Å)	d_{11} (Å)
L	5.5130 (849/154)	4063.5	52.67
R	5.4697 (361/66)	1698.8	51.86

らせん対称性の測定誤差は ± 0.0002 で、括弧内はその精度の範囲内で近似できる分数を示す。周期は繊維軸に沿った結晶学的周期を、また d_{11} は素繊維に沿ったサブユニット間距離を示す。その測定誤差の見積もりは $\pm 0.01\%$ である。

大きく層線位置の変化する層線ピークを選び、その付近の強度残差が各パラメータについて最小になるように行った。装置の測定精度と合わせて評価した結果、有効数字4桁半ほどの精度が得られた。

L型とR型の回折像から得られた、それぞれの構造周期長やらせん対称性を表1に示す。¹⁰⁾ これらの数値から素繊維に沿ったサブユニット間の距離が求められ、L型のそれは $52.7\text{\AA}$ でR型の $51.9\text{\AA}$ より $0.8\text{\AA}$ 長い。後で詳述するが、この原子ひとつ分より小さな距離の差がらせん状フィラメントの曲率を決めている。

3.1.3 フーリエベッセル解析による立体構造の導出

図3のような円筒平均を受けた回折像による立体構造解析法の詳細については、TMVの構造解析についての解説¹¹⁾をご参考願うとして、とにかく構造がらせん対称性を持つゆえに2次元のデータから3次元の構造を解くことが可能となる。実際の解析手続きとしては、結晶構造解析の場合と同様に重原子同型置換法を応用して、フィラメントの各サブユニットの特定部位に重原子を結合させた時の回折強度変化を精密に測定し、その変化から各回折波の位相を求める。得られた2次元の構造因子は3次元逆空間の中央断面部分のそれにあたり、これをらせん対称性によって円筒座標系の3次元逆空間に展開し、フーリエベッセル変換（円筒座標系でのフーリエ変換）により3次元の電子密度分布を計算する。ただし、円筒平均により独立なフーリエベッセル成分が重なって記録されるため、位相を求めるために必要な重原子同型置換体の数がその重なり数の2倍になるという困難を伴う。

2次元プロファイルフィッティング法によって、すぐ隣の強度の高い第一層線に両側から挟まれて単独に強度の求めにくい赤道線の強度分布でさえ精度良く得られるようになり、その $10\text{\AA}$ 分解能までは0次のフーリエベッセル成分のみが寄与することを利用して図7 aのような動径電子密度分布が求められた。¹²⁾ 他の層線も含めたより高分解能の立体構造解析は現在進行中である。

3.2 極低温電子顕微鏡像の解析

タンパク質分子集合体の電子顕微鏡像の解析は、長い間 $20\sim 30\text{\AA}$ 分解能どまりであった。しかし、顕微鏡の性能、試料の調整法、解析法のすべてにわたって最近の進歩はめざましく、べん毛フィラメントのような1次元のらせん状集合体では $10\text{\AA}$ 分解能を越え、¹³⁾ 膜タンパクな

図4 急速凍結氷包埋したべん毛フィラメントの電子顕微鏡像 (a) とフーリエ変換像 (b) (Electron cryomicrograph of a frozen hydrated flagellar filament and its Fourier transform). 像のスケールは 25nm . フーリエ変換像の分解能は約 $20\text{\AA}$. 層線の数字は対応するらせんのスタート数。

どの2次元結晶の場合には $3\text{\AA}$ 分解能を越えて、¹⁴⁾ X線結晶解析の困難な構造を解明できるまでになった。いくつかの重要な点は以下のようなものである。

まず、急速凍結による氷包埋試料の極低温観察が可能になったこと。酢酸ウランなどで陰染色することなしに水溶液中の分子を急速凍結し、生体中の構造のままのタンパク質像を観察できるようになった。¹⁵⁾ 極低温観察のもう一つの良い点は電子線照射による試料損傷の低減である。液体ヘリウムによる極低温ステージ (4K) では室温の約20倍も損傷を軽減できる。もともと軽原子ばかりのために吸収散乱コントラストが小さい生体分子像は、電子線量の制限のために非常にS/Nが悪い。これは薄暗闇で写真を撮るのに等しい。構造解析の分解能を上げるための工夫は、この悪いS/Nをいかにして増大させるかという一点につく。分子の規則的配列を利用した像のフーリエ解析もその点をめざしたものである。そのために、照射損傷軽減に向けて極限の工夫を凝らした極低温ステージが藤吉により開発された。¹⁶⁾ これは、超流動相の液体ヘリウムにより 1.5K まで冷却可能で、そのお陰で到達分解能が以前よりはるかに高くなった。安定な電界放射型の電子銃が利用可能になったことも、大きな寄与をしている。干渉性の良い電子線は像質の明らかな向上をもたらした。

最後は、解析法の工夫である。散乱吸収コントラストの小さい生体分子の像は、焦点をずらすことによってレンズの球面収差により生じる位相コントラストを主に記録する。その像から焦点のズレ量や非点収差の方向と大きさを決めコントラスト伝達関数 (CTF) を補正するこ

とによって, はじめて正しい像が得られる. このCTF補正を含むさまざまな画像処理の工夫が, 高分解能への道を切り開いた.

急速凍結により氷包埋したフィラメントの像は, 図4 aのように非常にコントラストが低い. しかしそのフーリエ変換像(図4 b)は, 20Å分解能あたりまではX線回折像とはほぼ同じ層線強度分布を与える. 高分解能領域のS/Nは悪くなるが, それでも10数本のフィラメント像を平均することにより9Å分解能まで解析が可能であった.¹³⁾

2次元のフーリエ像から立体像を得るためにらせん対称性を用いるのは, X線繊維回折法の場合と同様である. しかし, 像から構造因子を計算するので位相データが直接得られる点がX線と異なる.

L型とR型のフィラメントの立体像を図5に示す. 多型変換にかかわるこの2つのコンフォメーションの違いは, X線回折像から求められたサブユニット間の距離の差と同様に非常に小さなものである. このわずかなサブユニット間相互作用の違いを明らかにするため, X線と電子線の相補的な協力が必要となる.

3.3 X線と電子線による相補的データの組み合わせ

X線はレンズが使えないので分子像は記録できないが, 回折像は高分解能まで高いS/Nで得られる. 電子線は像

図5 電子顕微鏡像の画像解析により得られたフィラメントの立体構造 (Three dimensional structures of the filaments deduced by image analysis of electron micrographs). L型(左)とR型(右)の比較. 上は軸方向, 下は側方から見た図. スケールは10nm.

図6 X線による振幅と電子線による位相を組み合わせ得られた電子密度の等高線図 (Contour maps of electron density distribution obtained by combining amplitudes from X-ray diffraction patterns and phases from electron micrographs). (a) 約50Å厚の横断面, (b) フィラメント軸付近から手前の約50Å厚の縦断面. 滑らかな等高線は20Å分解能, 詳細な等高線は9Å分解能の電子密度図を示す. (c) ドメインD0(上)とD1(下)の手前半分の立体視対. (c)のスケールは50Å.

図7 ベン毛フィラメントの断面図におけるドメイン構造とアミノ酸配列の対応 (Correspondence between the domain structure and amino acid sequence of flagellin in the cross section of the filament). (a) 赤道線のX線回折強度から求められた動径電子密度分布, (b) 横断面図でのドメイン構造, (c) フラジェリンのアミノ酸配列および予測された2次構造と、構造ドメインとの対応. アミノ酸配列上のシンボルは予測された2次構造で、白四角は α ヘリックス、黒四角は β 構造、小さな黒四角は β ターンを示す. F40とF27はフラジェリンの酵素による限定分解で得られる安定なフラグメント. 最下部は多型を起こすアミノ酸変位の位置.

拡大をするが、照射線量の制限のため高分解能のデータのS/Nは低い. 両者の良いところを組み合わせると、解けない構造が解ける. X線回折像から得られた構造振幅と、電子顕微鏡像から得られた位相を組み合わせ、溶媒領域の平滑化等により位相の改善を図ると、同じ9Å分解能でもより詳細な電子密度分布が見えるようになった. フィラメントの半径60Åまでのコアの部分に、フィラメントの軸にほぼ並行に延びた棒状の密度がたくさん見られ、フラジェリンの両末端に多数予測される α ヘリックスの束であると解釈することができる (図6).¹⁰⁾

10Å分解能レベルの電子顕微鏡像解析は、アミノ酸10残基程度の大きさを区別することができるので、フラジェリンの末端を少しずつ特異的酵素で切り取り再構成したフィラメントの構造を解析し、切り取った部分にあたる構造部位を特定することができた.¹⁷⁾ 赤道線のX線回

折データの解析による動径密度分布からは、サブユニットの4つの構造ドメインの正確な分子量が得られた.¹²⁾ これらのデータをもとに構造ドメインとアミノ酸配列の対応をまとめたのが図7である. フラジェリンの494残基のうち、N末端が最内側のドメインD0から始まり、D0とD1で α ヘリックスの束を形成した後D3、D2へと順にたどって β 構造を作り、また α ヘリックスの束を形成しつつD1にもどり最後にD0にもどる. 末端をわずかも失ったフラグメントを高塩濃度で自発的に形成させたフィラメントは多型変換能を持たない直線型であるが、野生型のらせん型フィラメントを核として重合させるとコイルと呼ばれる形態のらせん型を形成することから、多型変換能を持つ構造形成には隣接するサブユニットの両末端がD0で直接相互作用をすることが必須であるが、実際のスイッチングはD1のみで起こるらしいことが明らかになった.¹⁷⁾

4. ベン毛フィラメントの構造と機能

原子レベルの分解能が得られていない現段階でも、得られた構造から自己構築制御や多型変換のしくみを考察することができる.

4.1 部分折り畳みを伴う自己構築の制御機構

両末端を欠如するためにフィラメント形成能力を失ったフラグメントがフィラメント構造の各ドメインを占有する比率から、自己構築の制御機構が推察できる. 図7cに示されたフラグメントF40はフィラメント形成能がないのに、それより10数残基長いフラグメントがフィラメントを形成することと、構造形成に必要なD1の約20%だけがF40では欠失していることから、F40で欠失している両末端部分があるのに折り畳まていないフラジェリンモノマーどうしても、D1での分子間相互作用のわずかな欠落によりフィラメント形成が阻害されると考えられる. 結合相手となるサブユニットがフィラメントの末端にあってD1部分の構造をしっかりと作ってれば、それを核としてモノマー両末端の折り畳みが起こり、重合してフィラメントが伸長する. TMVの形態形成にも同様な構造変化をともなった制御機構が見られ、¹⁸⁾ 巨大分子複合体の自己構造形成は、おおむねこのように制御されているようである.^{3), 4)}

4.2 スwitch機構とスーパーコイルのモデリング

前述のように、多型変換に関わる分子間相互作用のスイッチングはドメインD1で起こるため、そのしくみを考察するためにD1に注目する. X線回折像から求められたD1でのL型とR型のサブユニット配置を重ね合わせて比較すると、図8aの右図に示されるように素繊維が素繊維間の距離を変えずにスライドし、同時に素繊維に沿ったサブユニット周期 (格子点間距離) がわずかに変化する (L型の52.7ÅとR型の51.9Å). 図6に示された

図8 ドメインD1を含む円筒表面上でのL型とR型のサブユニット配置の比較とスイッチングのモデル (Comparison of the L- and R-type subunit arrangements and a model of switching on the cylindrical surface containing domain D1). (a) 左側は繊維軸を縦にして5個のサブユニット (格子点) の配置をそのまま比較, 右側は素繊維にあたる11スタートらせんが重なるように回転した. (b) 左側はL型, 右側はR型の7個のサブユニットの配置と相互作用を示す. 各サブユニットの数字は1スタートらせんに沿って数えたもの. A_L-A' および B_L-B' (白-灰) はL型, A_R-A' および B_R-B' (白-黒) はR型の相互作用を表す.

ように, D1では軸方向に配向した α ヘリックスの束が密に詰まっているので, 分子間相互作用のスイッチングはこの α ヘリックス間で起こるヘリックス軸方向のわずかなスライディングであることが推察される. このスイッチングの様子を図8 bに模式的に示した.¹⁰⁾ 結合部位A-A'では, A_R と A_L の距離が $2.6\text{\AA}$, B-B'では B_R と B_L の距離が $1.8\text{\AA}$ で, 結果として素繊維に沿ったサブユニット間距離はL型からR型になったときに $0.8\text{\AA}$ 短くなる. α ヘリックスのらせんピッチが $5.4\text{\AA}$ であるから, 相互作用するアミノ酸側鎖のコンフォメーション変化によって起こりうるズレの距離を考慮すると, $2.6\text{\AA}$ のスイッチングは α ヘリックスの1ピッチを乗り越え側鎖の結合相手を変えて起こる可能性がある. 一方, $1.8\text{\AA}$ のスイッチングは側鎖のコンフォメーション変化だけによる可能性が示唆される. この構造変化をより詳細に明らかにするため,

図9 らせん型フィラメントのモデル (Models of supercoiled filaments). 各長方形タイルはサブユニットのドメインD1を表し (図8 b参照), L型, R型のストランド間相互作用を混在させて作った表す. 上の列はフィラメントの一部を, 下の列はらせんの形態を示す. スケールはそれぞれ, $100\text{\AA}$ と $1\mu\text{m}$.

図10 らせん型フィラメントのねじれ率と曲率 (Twist and curvature of model and observed supercoils). 白丸がモデル計算値, その他のシンボルは観測値. 図9と同様に, 左から右へ向かってR型のストランド数が0から11まで増加する. 両端の曲率0の黒四角は, 2つの直線型フィラメントのX線による測定値.

高分解能の構造が待たれるところである.

図8 bに示された2つのサブユニット間相互作用を混在させてスーパーコイルのモデルを作った (図9).¹⁹⁾ 11本のストランド (素繊維間相互作用) 中に混在するL型とR型の数により, 解析された2つの直線型とともに10個のらせん型ができる. このモデルらせんの曲率とねじれ率を, 暗視野光学顕微鏡などで計測されたさまざまなフィラメントの値^{20), 21)}と比較したのが図10である.¹⁰⁾ モデル計算値と観測値の一致度は高く, 2状態モデルと使われた構造パラメータが実際の多型変換機構を良く反映

していることを示す。

5. むすび

フラジェリンのおおまかな主鎖の折り畳みが明らかとなり、多型変換に関わるフィラメントのコアの α ヘリックスの束の構造変化がかなり具体的なイメージとして得られた。また自己構築の制御をつかさどるフラジェリン両末端部の、分子間相互作用による協調的な折り畳み機構が明らかになった。現在、X線繊維回折法や電子顕微鏡による構造解析を高分解能へと進めるのと並行してF40などのフラグメントの結晶構造解析も進みつつあり、この大きな構造体の自己構築および動作機構がその原子立配置をもとに解明されるのも、そう遠いことではないと期待される。

文 献

- 1) M. Silverman and M. Simon: *Nature* **249**, 73 (1974) .
- 2) F. Vonderviszt, S. Kanto, S.-I. Aizawa and K. Namba: *J. Mol. Biol.* **209**, 127 (1989) .
- 3) D.L.D. Caspar and K. Namba: *Adv. Biophys.* **26**, 157 (1990) .
- 4) K. Namba and F. Vonderviszt: *Quart. Rev. Biophys.* **30**, 1 (1997) .
- 5) R.M. Macnab and M.K. Ornston: *J. Mol. Biol.* **112**, 1 (1977) .
- 6) S. Asakura: *Adv. Biophys.* **1**, 99 (1970) .
- 7) R. Kamiya, S. Asakura and S. Yamaguchi: *Nature* **286**, 628 (1980) .
- 8) K. Namba, R. Pattanayak and G. Stubbs: *J. Mol. Biol.* **208**, 307 (1989) .
- 9) I. Yamashita, H. Suzuki and K. Namba: *J. Mol. Biol.* submitted.
- 10) I. Yamashita, K. Hasegawa, H. Suzuki, F. Vonderviszt, Y. Mimori-Kiyosue and K. Namba: *Nature Str. Biol.* in press (1998) .
- 11) K. Namba: 日本結晶学会誌 **30**, 330 (1988) .
- 12) I. Yamashita, F. Vonderviszt, Y. Mimori, H. Suzuki, K. Oosawa and K. Namb: *J. Mol. Biol.* **253**, 547 (1995) .
- 13) Y. Mimori, I. Yamashita, K. Murata, Y. Fujiyoshi, K. Yonekura, C. Toyoshima and K. Namba: *J. Mol. Biol.* **249**, 69 (1995) .
- 14) Y. Kimura, D.G. Vassylyev, A. Miyazawa, A. Kidera, M. Matsushima, K. Mitsuoka, K. Murata, T. Hirai, Y. Fujiyoshi: *Nature* **389**, 206 (1997) .
- 15) J. Dubochet, M. Adrian, J.-J. Chang, J.-C. Homo, J. Lepault, A.W. McDowell and P. Shultz: *Quart. Rev. Biophys.* **21**, 129

(1988) .

- 16) Y. Fujiyoshi, T. Mizusaki, K. Morikawa, Y. Aoki, H. Kihara and Y. Harada: *Ultramicroscopy* **38**, 241-251 (1991) .
- 17) Y. Mimori-Kiyosue, F. Vonderviszt and K. Namba: *J. Mol. Biol.* **270**, 222 (1997) .
- 18) K. Namba and G. Stubbs: *Science* **231**, 1401 (1986) .
- 19) K. Hasegawa, I. Yamashita and K. Namba: *Biophys. J.* in press (1998) .
- 20) R. Kamiya and S. Asakura: *J. Mol. Biol.* **106**, 167 (1976) .
- 21) R. Kamiya and S. Asakura: *J. Mol. Biol.* **108**, 513 (1977) .

プロフィール

難波啓一 Keiichi NAMBA

松下電器産業(株)国際研究所 〒619-02 精華町光台3-4

および ERATO Protonic NanoMachine Project, JST

Tel : 0774-98-2543 Fax : 0774-98-2575

e-mail : keiichi@crl.mei.co.jp

最終学歴：1980年大阪大学大学院基礎工学研究科物理系専攻博士課程修了

専門分野：生物物理学

現在の研究テーマ：細菌べん毛の構造と動作機構

山下一郎 Ichiro YAMASHITA

松下電器産業(株)国際研究所 〒619-02 精華町光台3-4

e-mail : ichiro@crl.mei.co.jp

最終学歴：1978年京都大学大学院工学研究科電気工学専攻修士課程修了

専門分野：生物物理学

現在の研究テーマ：細菌べん毛の構造と動作機構

長谷川和也 Kazuya HASEGAWA

大阪大学大学院理学研究科高分子学専攻博士課程
および 松下電器産業(株)国際研究所 〒619-02 精華町光台3-4

e-mail : kazuya@crl.mei.co.jp

最終学歴：1996年大阪大学大学院理学研究科専攻系修士課程修了

専門分野：X線繊維回折法による構造解析

現在の研究テーマ：細菌べん毛の構造と動作機構