

書 5335 乙 第 2 冊 第 1 巻

細菌べん毛繊維のX線繊維回折法による構造解析

山下一郎





①

細菌べん毛繊維のX線繊維回折法による構造解析

山 下 一 郎

1997年



## 要旨

細菌べん毛繊維は単一のタンパク質フラジェリンが自己集合により形成したらせん形の繊維で細菌が泳ぐ時にスクリューの働きをする。細菌の泳ぎは直進と方向変換の繰り返しで、その方向変換の頻度を調節することにより、より快適な環境へ向かって泳いでいく。この時べん毛繊維が左巻きから右巻きへと形態変換することが方向変換機構に重要な役割を果たしており、これを多型変換能と呼ぶ。この自己集合能と多型変換能のメカニズムを解明するためには、べん毛繊維内のサブユニット間の相互作用の情報を得る必要がある。そこでべん毛繊維の構造をそのまま解析できるX線繊維回折法を用いてL型とR型及びLt型の3種類の直線型べん毛繊維の構造解析を進めた。

X線繊維回折法はらせん対称性を持つ繊維の構造解析には有効だが、極めて配向度の高い繊維ゾルを作製する必要がある。本研究ではこの配向度の高い繊維ゾルを作製するために、液晶化と高配向度化を達成する一般的に応用可能な新しい手法を開発し、これにより高配向べん毛繊維ゾルを作製することに成功した。この手法を用いて得た配向べん毛繊維ゾルからのX線繊維回折像は、べん毛繊維のらせん対称性による層線反射が明瞭に分離し、赤道方向には約 5 Å まで、子午線方向には 3.5 Å まで明瞭な層線が観察できた。

L、R、Lt 型べん毛繊維の構造的特徴を、極低温電子顕微鏡を用いて解析し、さらにR型べん毛繊維について、電子顕微鏡画像解析から得られた位相とX線繊維回折法で得られた振幅を組み合わせ、溶媒領域平滑化法による位相改善を行ってべん毛繊維の 9 Å 分解能電子密度像を得た。この結果べん毛繊維中心部に同心円状の2重チューブ構造、Inner-tube と Outer-tube があり、これらが軸にほぼ平行な  $\alpha$  ヘルックスからなることが明らかになった。さらに立体構造解析に必要な位相情報を得るために、重原子置換体2種類と、その他に遺伝子操作により導入したシステインを利用して水銀原子同型置換体を多種類得た。これらのX線回折像より2次元強度プロファイルフィッティング法を用いて回折強度を正確に抽出し、まず赤道振幅から構造因子を求め、これから精密な動径質量分布を求めた。この定量的なデータと、構造解析や生化学の情報とを合わせて考察し、べん毛繊維の動径方向に並ぶ4つの形態的なドメイン(繊維軸に近い方から D0~D3)とフラジェリンの



アミノ酸配列との対応付けを行った。その結果アミノ末端約30残基が D0 の一部を構成した後 D1 にはいり、Tyr178 付近から D2、D3 を構成してから再び D2 にもどり、Arg422 付近から D1 を構成し、最後に D0 を構成していることが示された。

X線回折像の良好な層線分離を利用してL型とR型のべん毛繊維のらせん対称性を決定し、べん毛繊維の重合に重要な半径でのサブユニット配置をもとに朝倉、Calladineらの提唱した Bi-stable モデルが予測するらせん形を計算した。得られたらせん形状は観測値と良く一致し、Bi-stable モデルが定性的、定量的に検証された。そして多型変換に重要なサブユニット間相互作用を担っている半径は、Outer-tube の部分であることが示され、Outer-tube における各サブユニットの  $\alpha$  ヘリックス間の相互作用のスイッチングが多型変換に重要な働きをすると結論された。また多型変換において Inner-tube は Outer-tube でのサブユニット配置を、多型変換を起こしているL型とR型の間の配置に固定する役割をしていることも明らかになった。



## Abstract

Bacterial flagellar filament is a helical filament composed of a single protein flagellin. The filament is driven by a rotary motor located at the base of each filament. When bacteria swim, a bundle of the filaments acts as the screw. Bacteria swim mostly straight but also tumble frequently to change their swimming direction. By regulating the tumbling frequency, bacteria approach the favorable environments. In the event of tumbling, the flagellar filaments go through polymorphic transition from their left-handed helix to right-handed one promoting dissociation of the filament bundle, upon which the uncoordinated propelling forces by the filaments cause the cell body to tumble. In order to understand the mechanism of the self-assembly and polymorphic transition ability of the flagellar filaments, information of the subunits interactions in the filaments is essential, and therefore the filament structures have to be studied to extract such information. The X-ray fiber diffraction method is suitable for this purpose, and we studied the structure of the L- and R-type straight flagellar filaments using this method.

The X-ray fiber diffraction method is in principle very powerful to solve the filament structures as has been proven in the case of TMV. However, this method requires very well-oriented specimens to solve the filament structure at high resolution. Therefore, we developed a new multiple-step method capable of producing exceptionally well-oriented liquid-crystalline sols and applied it to flagellar filament sols. Flagellar filament sol specimens produced by this method showed extremely high degree of orientation, whose disorientation angles were around 0.6 degree as 1 sigma of the distribution. The diffraction patterns from the R-type filament whose axial repeat distance is about 425 Å, showed distinct layer lines up to about 5 Å resolution in the equatorial direction and 3.5 Å resolution in the meridional direction. This method is in principle universally applicable to other systems.

Two heavy atom derivatives were obtained from the native filament and several mercury-atom derivatives were obtained using flagellar filaments of mutant flagellins with cystein residues introduced by site-directed mutagenesis. The equatorial amplitudes were precisely extracted from the native and heavy atom derivatives using two-dimensional profile



fitting program. Taking advantage of the fact that the phases of the equatorial structure factor out to around  $8\text{\AA}$  resolution are only 0 or  $\pi$ , the equatorial structure factors were deduced by isomorphous replacement phasing, and the radial mass distribution was obtained. The three dimensional density map of the filament was also obtained at  $9\text{\AA}$  resolution by combining the X-ray amplitude and phases from electron microscopy. The map showed a concentric double tubular structure in the filament core (domain D0 and D1) and well-resolved outer part (domain D2 and D3). Axially aligned rod-shaped densities were visible in the filament core, which were interpreted as  $\alpha$ -helical bundles. Combining three dimensional structure, the radial mass distribution and the biochemical knowledge of the flagellar filament structure, the four morphological domains of the flagellin subunit, D0 - D3 were assigned to the amino-acid sequence. The N-terminus starts from D0; after about 30 to 40 residues the main chain goes out to D1; then from about Tyr 178, the chain goes out to the outer part, domain D3, first then to domain D2, until it reaches to Arg 422; the chain comes back to domain D1 and then the last 30 to 40 residues form domain D0.

The two distinct lattices of subunit interactions, which are thought to coexist in the flagellar filaments to form supercoils, have been determined precisely from clearly separated layer lines in the X-ray diffraction patterns. Based on these structural parameters and the bi-stable subunit model proposed by S. Asakura and also by C. Calladine, the 10 possible supercoiled forms of the flagellar filament were calculated. Quantitative comparison of these forms to those observed by optical and electron microscopy show a quite good agreement indicating the bi-stable model is physically sound. The structure of the filament core suggests that the structural switching is most likely to be mutual translation of  $\alpha$ -helical coiled coils aligned almost parallel to the filament axis in the core. The outer-tube (D1) of the double tubes is essential for the polymorphic transition and inner-tube (D0) confines the helical arrangement of the outer-tube domains, so that it determines the ratio of the two distinct lattices to form a specific supercoil.



要旨	
1. 序論	
1.1 本研究の背景と目的	1
1.1.1 細菌べん毛モータ	1
1.1.2 べん毛繊維の特性: 多型変換・自己集合能	6
1.1.3 べん毛繊維の多型変換の仮説: Bi-stable モデル	7
1.1.4 Lt型べん毛繊維	10
1.1.5 本研究の目的	10
1.2 本論分の構成	11
2. X線繊維回折法	
2.1 らせん対称性を有する繊維のX線繊維回折像	12
2.2 細菌べん毛繊維で予想される層線回折像	15
3. X線繊維回折像データ処理	
3.1 背景と目的	17
3.2 X線繊維回折像の記録方法	17
3.3 逆空間への変換と円対称なバックグラウンド除去	18
3.3.1 IPに記録されたX線繊維回折像	18
3.3.2 S/Nの改善と円対称なバックグラウンド	19
3.4 2次元データ処理法	21
3.4.1 2次元データ処理の原理	21
3.4.2 回折像の極座標系への座標変換	22
3.4.3 その他のバックグラウンド処理	24
3.4.4 X線ビームの広がり	24
3.4.5 べん毛繊維の配向分布角と層線位置	25
3.5 RAD2Dの計算結果と層線強度の抽出	25
4. 直線型べん毛繊維の液晶化と高配向ゾルの作製	
4.1 研究の背景と目的	28



4.2 材料と方法	28
4.2.1 研究に使用したべん毛繊維	28
4.2.2 べん毛繊維の単離精製と再構成	29
4.2.3 X線繊維回折用試料:液晶ゾルの作製	30
4.2.4 偏光顕微鏡観察	31
4.2.5 遠心濃縮実験	32
4.2.6 磁場配向	33
4.3 結果と考察	35
4.3.1 べん毛繊維試料の流動性	35
4.3.1.1 溶液条件とゾルの流動性	35
4.3.1.2 べん毛繊維長と流動性	37
4.3.2 べん毛繊維ゾルの液晶化	39
4.3.2.1 緩衝液 pH による反発力の制御	39
4.3.2.2 塩による吸着力、反発力の調整	42
4.3.3 べん毛繊維液晶ゾルからのX線繊維回折像	44
4.3.4 遠心濃縮	45
4.3.5.1 短時間遠心	45
4.3.5.2 長時間遠心	47
4.3.5 高濃度液晶ドメインの配向	48
4.3.6.1 電場による配向	48
4.3.6.2 磁場による配向	50
4.4 その他繊維状タンパク質超分子への応用	55
4.5 まとめ	57
5. べん毛繊維の立体構造とアミノ酸配列	
5.1 背景と目的	58
5.2 材料と方法	59
5.2.1 使用したべん毛繊維とX線繊維回折用試料作製	59
5.2.2 溶媒領域平滑化法による位相改善	60
5.2.3 システイン導入	62



5.2.3.1 システイン導入方法	62
5.2.3.2 システイン導入位置	65
5.2.4 重原子置換体作製方法	66
5.2.5 動径質量分布計算理論	67
5.2.6 X線繊維回折像の記録	69
5.3 結果と考察	70
5.3.1 極低温電子顕微鏡によるべん毛繊維構造解析	70
5.3.2 X線繊維回折法と電子顕微鏡の位相組み合わせによる べん毛繊維電子密度像	75
5.3.3 重原子同型置換体作製結果	78
5.3.3.1 Soaking法による重原子動径置換体の作成結果	78
5.3.3.2 システイン導入べん毛繊維の水銀原子置換体	80
5.3.3.3 重原子動径置換体の重原子位置	82
5.3.4 べん毛繊維の動径質量分布	84
5.3.4.1 赤道回折振幅と位相付け	84
5.3.4.2 動径電子密度の決定	88
5.3.4.3 動径質量分布	90
5.3.4 アミノ酸配列とべん毛繊維ドメインの対応	92
5.4 まとめ	94
6. べん毛繊維のらせん対称性の決定と多型変換のメカニズム	
6.1 背景と目的	96
6.2 材料と方法	96
6.2.1 使用したべん毛繊維とX線繊維回折用試料作製	96
6.2.2 X線回折像の記録とデータ処理	98
6.3 結果と考察	98
6.3.1 らせん対称性の決定	98
6.3.1.1 L、R、Lt型べん毛繊維尾らせん対称性の違い	98
6.3.1.2 べん毛繊維1及び3重らせんのピッチ	99
6.3.1.3 1ターン中のサブユニットの数の決定	101



6.3.2 Bi-stable モデルの検証	106
6.3.2.1 サブユニットの作る格子	106
6.3.2.2 Bi-stable モデルの計算	107
6.3.2.3 Bi-stable モデル検証の意味するもの	112
6.3.4 べん毛繊維の多型変換スイッチング	114
6.3.5 Bi-stable モデルによるべん毛繊維 Outer-tube モデル	116
6.3.6 サブユニットタンパク質の準等価性と非等価性	118
6.3.7 Lt 型べん毛繊維について	120
6.4 まとめ	121
7. 結論と展望	122
8. 謝辞	124
参考文献	125



## 1. 序論

### 1.1. 本研究の背景と目的

生きていることと動くことは不可分である。大はほ乳類から小は細菌に至るまでそれぞれの環境で動き回っている。そしてその多様な運動様式は生物の進化の過程で生み出されてきたものである。しかしその多様な運動の基本的なメカニズムは、ほとんどが筋収縮機構に代表される滑り運動であり、人工的な運動のほとんどが回転モータにより遂行されていることと好対照である。しかし1970年代に生物界にも回転する運動器官が見つけられた。それは細菌の推進力を発生する超小型のべん毛モータで<sup>1),2),3)</sup>、らせん形のべん毛繊維をスクリュウとして高速に回転していた。以来多くの研究者がこの超小型の生物界唯一の回転モータに魅せられて、その研究を行ってきた。本研究ではこの細菌の運動器官のうち、スクリュウの役割を果たすべん毛繊維について研究を行った。

#### 1.1.1. 細菌べん毛モータ

多くの細菌は直径数 $\mu\text{m}$ の菌体からのびる複数本のべん毛を持っている。図 1.1 はサルモネラ菌の陰染色法による電子顕微鏡写真で、菌体から直径約 20nm、長さ 10 $\mu\text{m}$  程度のらせん形の繊維が複数本のびているのが観察される。このべん毛は菌体の周囲からランダムに生えているため周毛と呼ばれている。サルモネラ菌はこれらべん毛を、それぞれの根元にあるモータで回転して泳いでいる<sup>1),2),3)</sup>。この回転トルクを発生している部分をべん毛モータと呼ぶ。また、推進力を発生するらせん形の繊維をべん毛繊維と呼ぶ。細菌のべん毛は鞭打ち運動を行う真核細胞の鞭毛とは異なり、べん毛モータの回転トルクをピッチ約 2.4 $\mu\text{m}$  の左巻きらせんのべん毛繊維によって推進力に変換している。すなわちこの運動器官の動きは滑りではなく回転である。

このべん毛を用いた細菌の泳ぎ方には2つの状態がある。一つは直進して泳ぐ時で、すべてのべん毛モータは、菌体に向かって見たとき反時計方向(CCW)に回転し、図 1.1 で見られる菌体の周囲に生えた数本のべん毛繊維を菌体の後ろで東に



して泳ぐ。この束をうまく駆動するために、各モータには発生したトルクをそろえるための自在継手の役割を果たすフックと呼ばれる部品が備わっており、各モータの回転数も同じ速さになっている。この時のべん毛モータの回転数は、サルモネラ菌の場合で、約 200~300Hz で、ビブリオ菌では 1500Hz にまで達する<sup>4)</sup>。もう一つの状態は直進と直進の間にかかるタンブルと呼ばれる状態で、細菌が泳ぐ方向を変えるために生じる。タンブルでは、それぞれのべん毛モータは、ほぼ同時にその回転方向を CCW から時計方向(CW)へ瞬間的に反転し、これにより発生する回転応力で、べん毛繊維は通常の左巻きらせん形から、ピッチの小さい右巻きらせん形へ根元の方から形態変換していく<sup>5)</sup>。このべん毛繊維の変形の結果、束になって推進力を発生していた繊維はバラバラになり、その推進力の不均衡により菌体の方向が変化する。数十ミリ秒後に、べん毛モータは再び CCW に順転を始め、バラバラだったべん毛繊維は



図 1.1 サルモネラ菌の陰染色法による電子顕微鏡写真像  
菌体本体は染色により黒くつぶれているが、直径 $1\mu\text{m}$ 長さ $2\mu\text{m}$ 程度である。  
べん毛繊維は通常 6~8 本生えており周毛と呼ばれる。べん毛繊維の根元に  
それぞれ高速回転するべん毛モータがある。サルモネラ菌はべん毛繊維をス  
クリューのように回転し菌体を推進する。



もとのように束を形成し、細菌は再びスムーズに泳ぐようになる。この短時間に生じるタンブルすなわち、モータ反転・べん毛繊維の束の解消・菌体の回転・モータの順回転・べん毛繊維の束の再構築、の過程により細菌は泳ぐ方向を変える。この方向変換においてべん毛繊維の形態変化は非常に重要で、もしべん毛繊維が形態変換できなければ、べん毛繊維の束はバラバラにならず菌体は泳ぐ方向を変えられない。

タンブルによって生じる菌体の方向転換に規則性は無く、結果として菌体はランダムに泳ぐ方向を変える。このタンブルの頻度は細菌が誘因物質に近づく時に低く、忌避物質に近づく時に高くなる。これにより細菌は自己にとって良い環境へ到達することができる<sup>6)</sup>。さらに細菌はその付近で最適点と思われる地点に到達した場合でも止まることをしない。環境が変化してもっと良い地点ができた場合そちらを見つけることができ、局所最適点に陥ることが無い。常に変化する環境に対応するための有利なシステムになっている。

サルモネラ菌のべん毛は、これまでの研究からその構造がおおよそ分かってきている<sup>7)</sup>。図 1.2 はそれらの情報からまとめたべん毛の模式図である。べん毛モータのトルクは、固定子である MotA-MotB 複合体と回転子である FliF-FliG リングとの間で生じると考えられている。回転方向は回転子に付随しているスイッチ複合体と呼ばれる装置で切り替えられる。発生したトルクはロッドに伝えられ、高速に回転するロッドは軸受けである LP リングに支えられている。ロッドに伝えられたトルクは、自在継手であるフックによって方向が換えられ、べん毛繊維の束を回転駆動する。フックはねじれに対しては硬くてトルクを伝達でき、同時に曲げに対しては極めて柔らかい繊維で、弾性的異方性の大きい繊維状構造物である。そのためその構造は工学的見地からも興味を持たれる。スクリュウの役目をするべん毛繊維は  $10\mu\text{m}$  以上に達するが、直径が約  $20\text{nm}$  のらせん形構造物である。すなわち直径の 500 倍にも達する長いらせん形のスクリュウであり、この形を保持するためべん毛繊維は極めて硬いと考えられている<sup>8)</sup>。しかしこのべん毛繊維はただ硬いだけではない。前述のように方向変換時にはらせん形の巻き方が変換する。この硬さと柔軟な形態変化のメカニズムがどのように実現されているのか興味深い。弾性的異方性の大きいフックと硬くて弾性率が高いべん毛繊維との間には、異なる2つの性質を仲介するために結合タンパク質が2種類あり、



これらは HAP1、HAP3 と呼ばれている。さらにべん毛繊維の先端には HAP2 と呼ばれるキャップタンパク質があり、これが菌体内からべん毛繊維などの中心孔を通して分泌されるべん毛繊維サブユニットのフラジェリンが溶液に分散するのを防ぎ、べん毛繊維への付加を助けている。以上べん毛モータの構造を基部体部分から先端部分にわたって概説した。ここで気づくのは、この自然が作った微小回転モータであるべん毛モータの構造は人工のモータの構造とよく似ていることである。回転するモータを作るために無駄を省くと、結局はこの形になることを暗示しているのかもしれない。

この様な多数のタンパク質が組み合わされた構造を持つべん毛だが、その構築は構成タンパク質が自己集合的に組み上げられて自動的に完成する。すなわちこのべん毛の構造を作るために、何らかの外部の機構は存在しない。そして自己集合による構造構築を実現するため、べん毛モータのタンパク質発現は遺伝子レベルで3段階に調節されている。ナノメータサイズの分子機械を作るためには、この様な材料を順次供給しながら自己集合を用いて構造を作る方法が本質的に不可欠であると考えられる。べん毛のできあがる順序は、電子顕微鏡による詳しい観察から明らかになっている<sup>9)</sup>。それによると、はじめにべん毛モータは FliF リング (MS リング) が作られその上にロッドや軸受け (LPリング) などが構築されていき、根元から次第に組み上げられる。そしてさらに菌体の外側のフック、べん毛繊維などの部品が構築されていく。菌体外に部品を構築するため部品の構成タンパク質は何らかの手段で菌体内から成長部分へ運ばれなくてはならない。現在のところこの経路はこれらの繊維様構造物の中心部にある孔だと考えられている。少なくともべん毛繊維とフックでは中心部に孔があることは明らかになっている<sup>10)</sup>。このようにして中心孔を経由してタンパク質部品が供給されるのであれば、何らかの供給ゲートがべん毛モータの基部に存在しなければならぬが、これについてはまだよく分かっていない。

高速で回転しべん毛繊維の形態変換を起こすほどのトルクを発生するべん毛モータのエネルギー源は、これまでの研究から菌体の外にくみ出されたプロトンの濃度差  $\Delta pH$  と膜電位差  $\Delta \Psi$  によるプロトン駆動力  $\Delta p$  であることが判っている。すなわち、プロトンが菌体内へ流入するエネルギーで固定子の MotA-MotB 複合体と回転子の FliF-FliG リングとの間にトルクが生じる。これらのタンパク質のうち MotA はプロトン



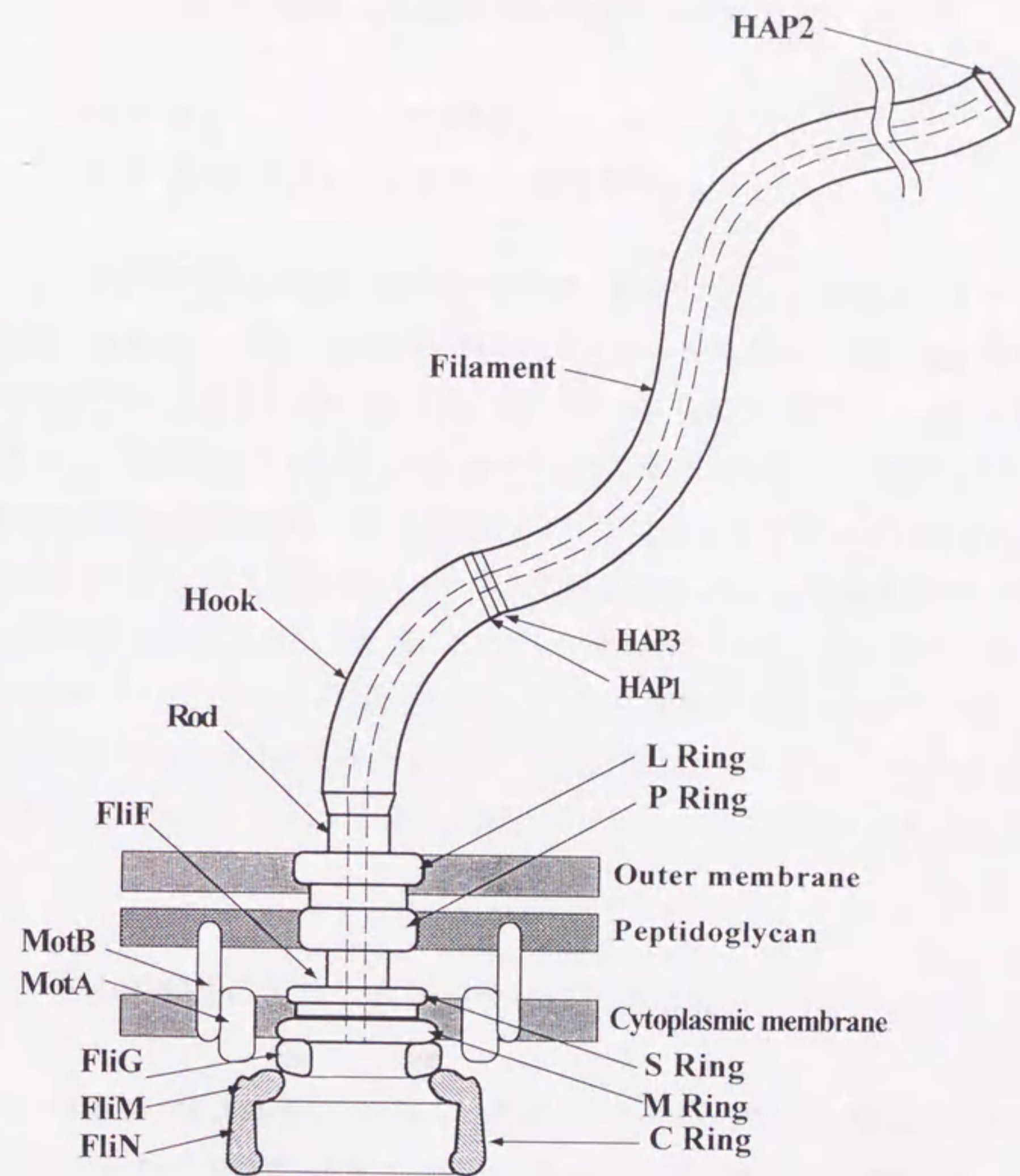


図 1.2 これまで得られた知識をもとにして描いた細菌べん毛の模式図  
 トルク発生部のべん毛モータは細菌の膜構造に埋め込まれており、MotA-  
 MotB タンパク質と FliF-FliG リングの間でプロトン駆動力を用いてトルクが発  
 生していると考えられている。フックは複数本のべん毛繊維を束にして回転  
 するために重要な自在継手の役目を果たし、べん毛繊維はトルクを推進力に  
 変換するスクリュウの働きをする。



チャンネルであることが示されており<sup>11)</sup>、このことから MotA をプロトンが通過する時にトルクが発生すると考えられる。

ここでプロトン駆動力  $\Delta p$  を数式で表せば次のようになる。

$$\Delta p = \Delta \Psi - (2.303RT/F) \cdot \Delta \text{pH} \quad \text{--- (1.1)}$$

R: ガス定数、F: ファラデー定数 T: 絶対温度

右辺の第2項はプロトン濃度差を電位差に換算したもので、300K において  $\Delta \text{pH}=1$  で約 60mV である。この式から判るようにプロトン駆動力  $\Delta p$  は電位差に換算することができ、通常サルモネラ菌では約 150~200mV 程度である<sup>12), 13)</sup>。室温の熱エネルギーは約 25mV であるから、べん毛モータの駆動力はその6~8倍程度である。これは駆動力に無視できないほどの熱揺らぎが存在することを意味し、べん毛モータの回転も揺らぐことが予想される。しかし現在の観測技術ではべん毛繊維はスムーズに回転しているように見える。また流れるプロトンの数は、モータの1回転に約250個から1000個<sup>14)</sup>と言われたり、観測されたりしているが、正確な数はまだ判っていない。むしろ可変である可能性が指摘されている。このようなことからべん毛モータでは入力と出力が1:1に対応していない可能性があり、ルースカップリングモデルが提唱されている<sup>15)</sup>。

### 1.1.2 べん毛繊維の特性：多型変換と自己集合能

細菌のべん毛繊維は 10  $\mu\text{m}$  以上の長さでらせん形の繊維で、運動器官のスクリュウとしての役目を果たしている。サルモネラ菌では、ただ1種類のサブユニットタンパク質、フラジェリンが重合してできあがっている。フラジェリンは分子量 51.5kDa の蛋白質で遺伝子 *fliC* の産物である。このサブユニットが 1ピッチ約 26Å の右巻きらせん 2 ターンに約 11 個積み上がってべん毛繊維が形成される。この構造は繊維軸にはほぼ平行な 11 本の素繊維から構成されていると見てもできる。

化学的に全く同一の蛋白質が、全く同じ相互作用でらせん状に重合すると、



形成される繊維は直線形のはずであるが、サルモネラ菌(野生株)のべん毛繊維は、波長約  $2.4 \mu\text{m}$ 、振幅約  $0.2 \mu\text{m}$  の左巻きのらせん形である。なぜこの様ならせん形の繊維が、同一のタンパク質サブユニットからできるのか、そのメカニズムはまだよく分かっていなかった。べん毛繊維は通常の左巻きらせん以外に、外部の環境により種々のらせん形を取る能力があることも報告されている。たとえば前述のモータ反転時などの回転応力や<sup>5), 16)</sup>、pH、塩濃度、温度などの環境の変化によりべん毛繊維はそのらせん形の巻き方を変える<sup>17), 18), 19), 20)</sup>。その他、アミノ酸の置換でもらせん形を変えることが知られている<sup>21), 22), 23), 24), 25), 26)</sup>。このらせん形の巻き方を変えることを多型変換、その能力のことを多型変換能と呼ぶ。この多型変換能は前述のようにサルモネラ菌の方向変換時に重要な役割を果たしている。

フラジェリン分子は、生理的イオン強度では核となる構造の上に重合し、高イオン強度下では核を自発的に形成してべん毛繊維を構築する能力も持つ<sup>27)</sup>。これは自己集合能と呼ばれ、フラジェリンはこの性質が極めて強く、多くの他タンパク質の存在下でも繊維を構築する。その他フラジェリンは合成が行われている菌体内では繊維を作らず、べん毛繊維の先端に運ばれてはじめて、キャップタンパク質 HAP2 の助けを借りてべん毛繊維の先端に重合し繊維を構成する。このような性質はべん毛モータを構築するときに必須のものであり、フラジェリンやべん毛繊維はこれを実現する巧妙なしくみを持っている。このようなしくみは工学的に極めて興味深い。

### 1.1.3 べん毛繊維多型変換の仮説 : Bi-stable モデル

サルモネラ菌のべん毛繊維が、なぜらせん形をとり、また多型変換能があるのかを説明するメカニズムとして、朝倉や Calladine らは図 1.3 に示すような Bi-stable 仮説を提唱している<sup>18), 28), 29), 30)</sup>。以下にこの Bi-stable モデルを、図を用いて説明する。

1. 図 1.3 の下半分で描かれた球はべん毛繊維のサブユニットであるフラジェリンを表し、上半分は繊維全体のらせん形状を示している。フラジェリンには図中で明るいオレンジと、赤紫で示された2つのコンフォメーションがある。両端のべん毛繊維



では、同一のコンフォメーションのサブユニットが同じ相互作用で重合しているため、繊維は直線となっている。ここで素繊維の間でサブユニット間相互作用をしている部分をストランドと呼ぶ。

2. フラジェリンは1本のべん毛繊維の中でもこの2つのコンフォメーションを取ることが可能であり、図の左から2番目と3番目のように、11本の素繊維の何本かが一方のコンフォメーションで、残りが他のコンフォメーションで構成されるようになる。同じコンフォメーションの素繊維がらせんの内側と外側にそれぞれ集まるのは、集中したほうが歪みエネルギーが小さくなるためである。
3. この時、赤紫色の素繊維と右隣の素繊維でサブユニット間相互作用が異なり、このストランドの長さが短くなるとする。すなわち赤紫の素繊維右隣のストランドが他のストランドより短くなると、長さの差から短いストランドを内側にしてべん毛繊維は曲がる。このときストランドは繊維軸に平行ではなく傾いているため、べん毛繊維は全体として大きならせん形をとるようになる。
4. べん毛繊維は、一方のコンフォメーションを持つ素繊維の数によりそれぞれ異なったらせん形を取る。その結果べん毛繊維は2つの直線と10個のらせん形を取ることが予想される。すなわちこれが多型変換を可能にする

この仮説を裏付けるように、実際に野生株サルモネラ菌 SJW1103 のべん毛繊維の突然変異体で、直線型のべん毛繊維が2種類発見された<sup>31)</sup>。一つは、変異株 SJW1655 で、フラジェリンのアミノ酸配列で 449 番目のアラニンがバリンに置き換わったもの、もう一つは変異株 SJW1660 で、同じくフラジェリンの 426 番目グリシンがアラニンに置き換わったものである<sup>26)</sup>。これらの直線型べん毛繊維の素繊維は、図 1.3 に示したように繊維軸に対して、それぞれわずかに右または左巻きのらせんを描いているので、右に傾いている SJW1655 のものはR型、左に傾いている SJW1660 のものはL型と名付けられた。またこれらの直線型べん毛を構成するサブユニットのコンフォメーションは、この繊維の呼び方と同様、R型、L型と呼ばれる。この2種類のフラジェリンは、Bi-stable モデルで予測されたように、混合して硫酸アンモニウムの添加により繊維を再構成すると、混合比に応じて種々のらせん形が得られた<sup>31)</sup>。



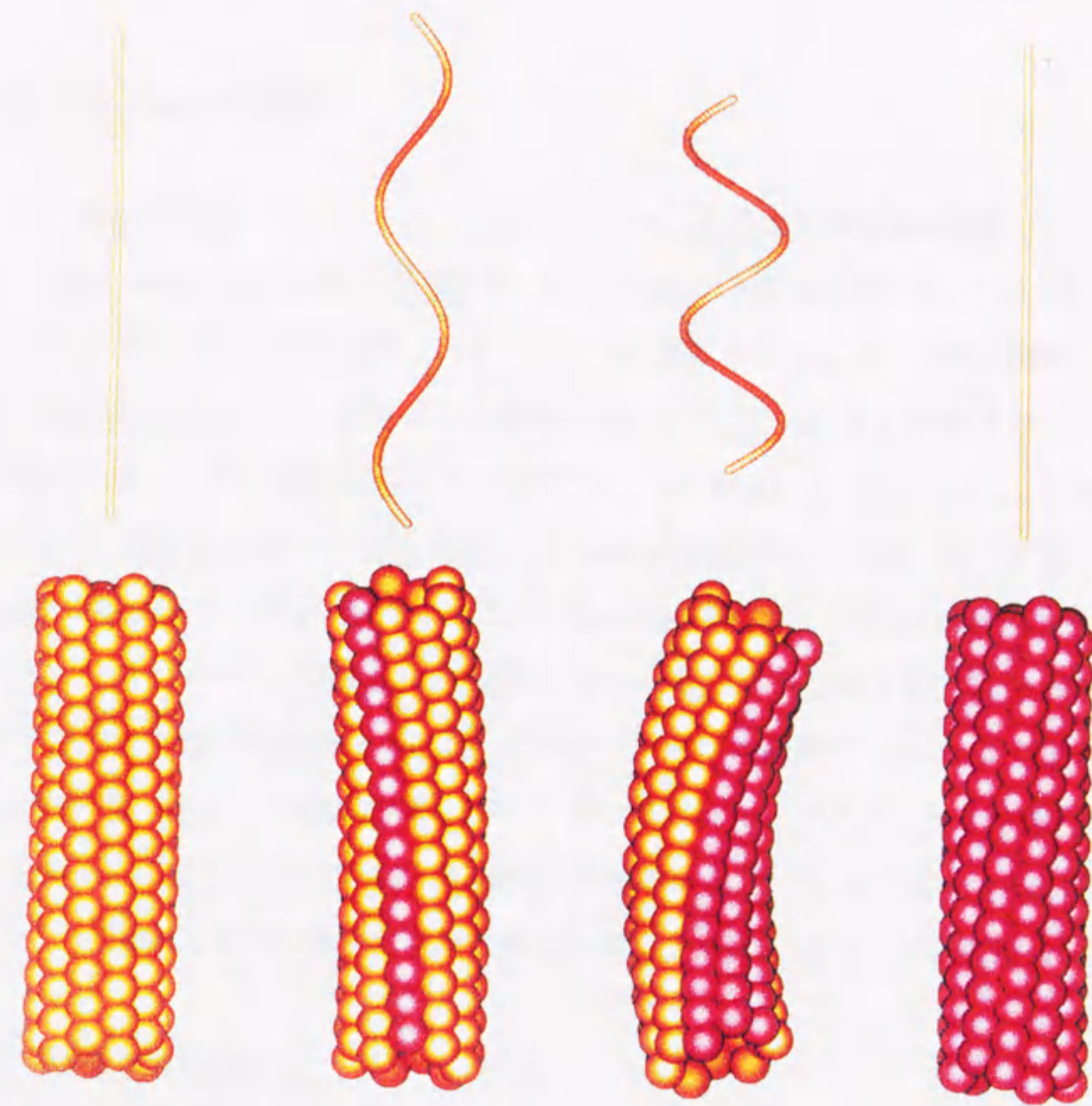


図 1.3 朝倉、Calladine らの Bi-stable モデル

2つのコンフォメーションをとるサブユニットが重合することで、べん毛繊維はらせん形をとることができる。一番左のべん毛繊維はオレンジ色のコンフォメーションのサブユニットだけからなり、直線型である。この中に赤紫色のコンフォメーションのサブユニットが混合し1つの素繊維に集中すると、オレンジ色と赤紫色の素繊維間の相互作用が変化しストランドの長さが変わる。その結果べん毛繊維はらせん形をとる。

これらの結果から、この SJW1655 と SJW1660 の 2 つの直線型べん毛繊維でのサブユニットのコンフォメーションやサブユニット間相互作用が Bi-stable モデルの 2 種類のコンフォメーションと考えられた。そこで、この L 型、R 型の 2 種類のべん毛繊維構造を詳しく調べ、この Bi-stable モデルの有効性を定量的に検証することにより、べん毛繊維の多型変換のメカニズム解明が可能になると考えられた。



#### 1.1.4 Lt 型べん毛繊維

べん毛繊維のサブユニットであるフラジェリンを限定酵素分解処理すると、そのN, C両末端は比較的簡単に分解され、N, C末端の一部が欠失したフラジェリンが得られる。このフラジェリンを硫酸アンモニウムで再構成すると、L型、R型と異なり、素繊維が左に大きく傾いた直線型べん毛繊維が得られる。そのらせん対称性は、N, C両末端の除去アミノ酸の数によらずすべて同じで、これを Lt 型と名付けた。Lは素繊維のらせんの傾きを、tはアミノ酸を除去した truncated を意味している。この Lt 型べん毛繊維は、繊維の安定性が低くサブユニット間の相互作用がL, R型とは異なると思われる。また Lt 型のべん毛繊維は直線形かららせん形へ多型変換を起こすことができない。しかし野生株の種繊維の上に Lt 型のフラジェリンを硫酸アンモニウムで重合させるとコイル型のらせん形繊維が得られる。<sup>53)</sup>また野生株のフラジェリンと Lt 型フラジェリンを混合して重合させてもらせん形繊維を再構成する<sup>53)</sup>。これらのことからこの Lt 型のべん毛繊維は多型変換能の考察に貴重な情報を与えてくれるものと考えられる。

#### 1.1.5 本研究の目的

以上述べてきたように細菌のべん毛繊維は種々の興味ある性質を示す。本研究ではこのべん毛繊維の自己集合能や多型変換能のメカニズムを、構造解析をとおしてより深く理解する事が目的である。

構造解析の手段としては、べん毛繊維全体の解析が行え繊維中のサブユニット相互作用の情報が得られるX線繊維回折法を用いる。この方法は試料のべん毛繊維ゾルに高配向度を要求するので、高配向度ゾルの作製方法を新しく考案する。そしてX線繊維回折法によるL型とR型の直線型べん毛繊維の構造解析とサブユニット間配置の構造情報から、べん毛繊維の多型変換のモデルである Bi-stable モデルの検証をめざす。さらにべん毛繊維の構造情報を用いて Bi-stable モデルをもとに多型変換のメカニズムを考察し分子レベルでのスイッチング機構の推察を行う。またフラジェリン分子の両末端を除去した Lt 型のべん毛繊維は多型変換能を持たないが、種繊維の上ではらせん形をとるなど多型変換の考察に貴重な情報を与えてくれるので、この



Lt型の構造解析を行い多型変換能をさらに深く理解することを試みる。

なお、これらべん毛繊維の構造解析を通じて得られたナノメートルサイズの超分子の知識は、将来のナノマシンやナノメートルサイズの機能構造体の作製に役立たせることができると考えられる。

## 1.2 本論文の構成

本論文は以下のように構成されている。

まず2章で、本研究の構造解析の手法として用いたX線繊維回折法に関して解説を行う。この原理は本研究の基礎となるものであるから初めにこの章をもうけた。X線繊維回折法の理論と細菌べん毛繊維に応用した場合の問題点を記述する。

3章では、本研究で用いたX線繊維回折像データ処理について記述する。実際のX線繊維回折像の記録方法と回折像から精度良く回折強度を抽出するために開発した2次元強度プロファイルフィッティングプログラム(RAD2D)について解説する。

4章では、X線繊維回折法が要求する良く配向した繊維試料を作製する方法について述べる。ここで完成された作製方法は、基本的にあらゆる繊維状超分子に応用可能であり、実際に他の系に応用した例についても述べる。

5章では、9 Å分解能のべん毛繊維電子密度像を計算する。またべん毛繊維とその重原子同型置換体のX線繊維回折像の赤道構造振幅から構造因子を決定してべん毛繊維の動径質量分布の計算をおこなう。そして、これまでに得られた構造解析データや生化学的情報とあわせて考察し、フラジェリンのアミノ酸配列とべん毛繊維の形態上のドメインとの対応をつける。

6章では、直線型べん毛繊維のL、R、Lt型べん毛繊維の対称性を精密に決定し、べん毛繊維の多型変換に重要な Outer-tube でのサブユニット間の位置関係から、Bi-stable モデルを検証する。そして考えられる多型変換のメカニズムについて考察し、Inner-tube の役割についても議論する。

最後に7章において本研究で得られた成果をまとめ、将来への展望を記述する。



## 2 X線繊維回折法

タンパク質の構造解析では通常3次元タンパク質結晶の作製を行いX線結晶構造解析により構造を得るのが一般的である。しかしながらべん毛繊維の場合は少し事情が異なる。べん毛繊維のサブユニットタンパク質フラジェリンの3次元結晶が作製できれば非常に重要な情報が得られるが、フラジェリンはらせん形のウイスキー様結晶つまりべん毛繊維になる性質が極めて高い。すなわちフラジェリンの3次元結晶化は非常に困難である。またもしフラジェリンの3次元結晶が作製でき原子レベルで構造解析ができたとしても、多型変換や自己集合に重要な働きをしているべん毛繊維内のサブユニット間相互作用の情報は得られない。すなわち結晶構造解析ではメカニズム解明に重要な情報が直接的には得られない。そのため本研究では、直線型べん毛繊維の構造解析を行う手法としてX線繊維回折法を用いた。

X線繊維回折法は、サブユニットがらせん対称性を持って構築された直線繊維状分子集合体の構造解析に適した方法である。この解析手法は理論的には極めて強力で、タバコモザイクウイルス(TMV)ではこの方法でその構造が原子レベルの分解能で解明されている<sup>32), 33)</sup>。そこでこのX線繊維回折法をもちいてL型やR型の直線べん毛繊維の構造解析を行えば、べん毛繊維全体の構造やサブユニット間相互作用の情報を得ることが原理的に可能である。ここでは本研究の基本となるX線繊維回折法による構造解析の原理について述べ、べん毛繊維のX線回折用試料に要求される条件について記述する。

### 2.1 らせん対称性を有する繊維のX線繊維回折像

一般に物体によるX線の散乱は干渉現象を伴い、散乱方向により異なる強度を持つようになり、これをフィルムで記録することでX線回折像が得られる。このX線回折像は、X線を散乱する実空間の物体の電子密度分布をフーリエ変換して得られる逆空間の構造因子の一部を記録したものである。すなわち逆空間において、物体の構造因子と、入射X線方向へX線波長の逆数 $1/\lambda$ だけ戻った位置を中心とする半径 $1/\lambda$ の大きさのエヴァルド球(反射球)との交差する部分が回折条件を満たし、回折像とし



て記録される。そのため半径  $2/\lambda$  より大きい領域の構造因子は得ることができない。そして半径  $2/\lambda$  内の全構造因子を得るためには、試料とX線の入射方向を変えて記録する必要がある。

らせん対称性を持つ繊維構造のX線繊維回折像として、1重らせん  $q$  ターン中にある  $p$  個のサブユニットからできあがる直線型繊維の場合を考える。このような繊維のフーリエ変換、すなわち構造因子は、円筒座標系を用いて次式のようになる。

$$F(R, \Psi, Z) = \sum_l F_l(R, \Psi, \frac{l}{c}) \quad \text{----- (2.1)}$$

$$F_l(R, \Psi, \frac{l}{c}) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} F_{nl}(R) \exp[in\Psi] \quad \text{----- (2.2)}$$

$$F_{nl}(R) = \exp(in\frac{\pi}{2}) \int_0^{\infty} \rho_{nl}(r) J_n(2\pi r R) 2\pi r dr \quad \text{----- (2.3)}$$

$$\rho_{nl}(r) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^c \rho_M(r, \psi, z) \exp[-i(n\psi - \frac{2\pi lz}{c})] d\psi dz \quad \text{----- (2.4)}$$

ここでそれぞれの記号は以下を指す。

$R, \Psi, Z$  : 逆空間円筒座標、 $r, \phi, z$  : 実空間円筒座標

$F(R, \Psi, Z)$  : 繊維の逆空間構造因子

$F_l(R, \Psi, \frac{l}{c})$  : 繊維の逆空間構造因子の  $Z = \frac{l}{c}$  面での成分

$F_{nl}(R)$  : 繊維の逆空間構造因子の  $Z = \frac{l}{c}$  面、 $\Psi$  について  $n$  回回転対称成分

$\rho_{nl}(r)$  : 繊維の  $z$  方向に  $\frac{c}{l}$  周期を持つ、 $n$  重のらせん対称性を持つ成分

$\rho_M(r, \psi, z)$  : 繊維のらせん対称性の非対称単位の密度分布関数

$c$  : 繊維構造の繰り返し長さ(結晶学的周期長)

$n$  : フーリエ変換に用いたベッセル関数の次数、  
 $z$  軸の周りの回転対称の次数

$l$  : 層線の次数



ただし $n, l$ はらせん対称性より決まる次の一定の関係を持つ

$$l = qn + mp \quad \text{----- (2.5) } \quad m \text{は任意の整数}$$

(2.4)式ではまず繊維の、 $z$ 方向に $\frac{c}{l}$ 周期を持つ、 $n$ 重らせんの対称性成分の振幅と位相を抽出している。(2.3)式では、この電子密度成分

$$\rho_n(r) \exp[i(n\psi - \frac{2\pi lz}{c})]$$

をフーリエ変換し、 $z$ 軸の周りに $n$ 回回転対称性を持つので $n$ 次のベッセル関数で展開されることが示される。また(2.2)に示すように、結晶学的周期長が $c$ であることから繊維の構造因子は $Z$ 軸、すなわち繊維軸と平行な方向に $1/c$ おきに分離して存在し、軸に垂直な層線状の回折像になることが判る。さらにそれぞれの層線において、 $\Psi=0$ での位相が明らかになれば、その層線の全周: $0 \sim 2\pi$ での全ての位相が決定できることも(2.2)式から判る。そして全体の構造因子は、(2.1)式に示したようにこれらの層線を足しあわせたものになる。ただし、 $n, l$ には、右巻き1重らせん $q$ ターン中に $p$ 個のサブユニットがあると言うらせん対称性から制限が生じ、ある $l$ 層線には(2.5)式の関係を満たす特定の $n$ 回対称性の構造因子だけが存在するようになる。この $n$ 回対称成分は、(2.3)式から分かるように $n$ 次ベッセル関数で表されるので、ある $l$ 層線は複数個の $n$ 次ベッセル関数が重なって作られている。しかし実際には解像度の低い部分すなわち $R$ の比較的低い部分では、ベッセル関数の絶対値がその次数より小さい変数の範囲で0に近似できるほど小さい性質、 $|J_n(x)| \approx 0 ; x < |n| - 4$ から、低い回転対称性の構造因子だけとなる。

以上説明したように、らせん対称性を持つ直線型繊維からの構造因子は(2.1)~(2.5)式で表すことができ、逆に構造因子が決定できれば元の構造の電子密度像を得ることができる。X線繊維回折法は各層線の強度を計測するので、層線の重なりが無い場合はその振幅が直接得られ、位相に関しては2つの重原子同型置換体を作製してその回折像から振幅を得れば計算できる。さらに層線が重なっている場合でも1つの層線につき2つの重原子置換体を作製すれば、計算によりそれぞれ独立に振幅と位相が得られる。すなわちX線繊維回折法でべん毛繊維構造を解くには、



- 層線分離の良い回折像の記録=高配向べん毛繊維試料ゾルの作製
- X線回折像から正確に回折強度を抽出するプログラム
- できるだけ多くの重原子同型置換体の作製

が必要である。

## 2.2 細菌べん毛繊維で予想される層線回折像

べん毛繊維の層線回折像を、R型べん毛繊維についてその電子顕微鏡から得られたおおよそのらせん対称性を用いて計算し、図 2.1 に描いた。べん毛繊維軸は垂直方向で、逆空間の上半分だけを  $10 \text{ \AA}$  分解能まで描いてある。繊維の半径は  $100 \text{ \AA}$  を仮定している。層線の間隔はおおよそ  $(1/425) \text{ \AA}^{-1}$  で、その間隔は極めて小さい。そのためべん毛繊維の配向が悪い場合は、各層線が傾き隣り合う層線が重なり合う。この重なったベッセル関数は理論的には高い S/N と十分なデータ点数があれば分離可能であるが、実際には実験的制約があり層線構造因子の分離抽出は難しい。そこで回折像に構造解析を行う分解能まで層線の重なりがないことが望まれる。実際にR型べん毛繊維で  $10 \text{ \AA}$  分解能まで層線の重なりを無くすために必要な繊維の配向度を計算すると、赤道上の層線で約  $1.3$  度以下となった。すなわちべん毛繊維の傾きを  $1.3$  度以下にしなければ  $10 \text{ \AA}$  分解能までの層線強度の抽出は難しい。ここではR型べん毛繊維の計算された回折像を示しているが、L型繊維からの回折像ではさらに層線間隔が約  $(1/1017) \text{ \AA}^{-1}$  と半分以下となり、層線が重なり始めるべん毛繊維の傾き角度もR型の場合よりさらに小さくなり半分以下となる。

このようにべん毛繊維の高分解能構造解析をX線繊維回折法で行うためには、配向分布角が  $1$  度以下の極めてよく配向したべん毛繊維ゾルを作製することが必要不可欠となる。



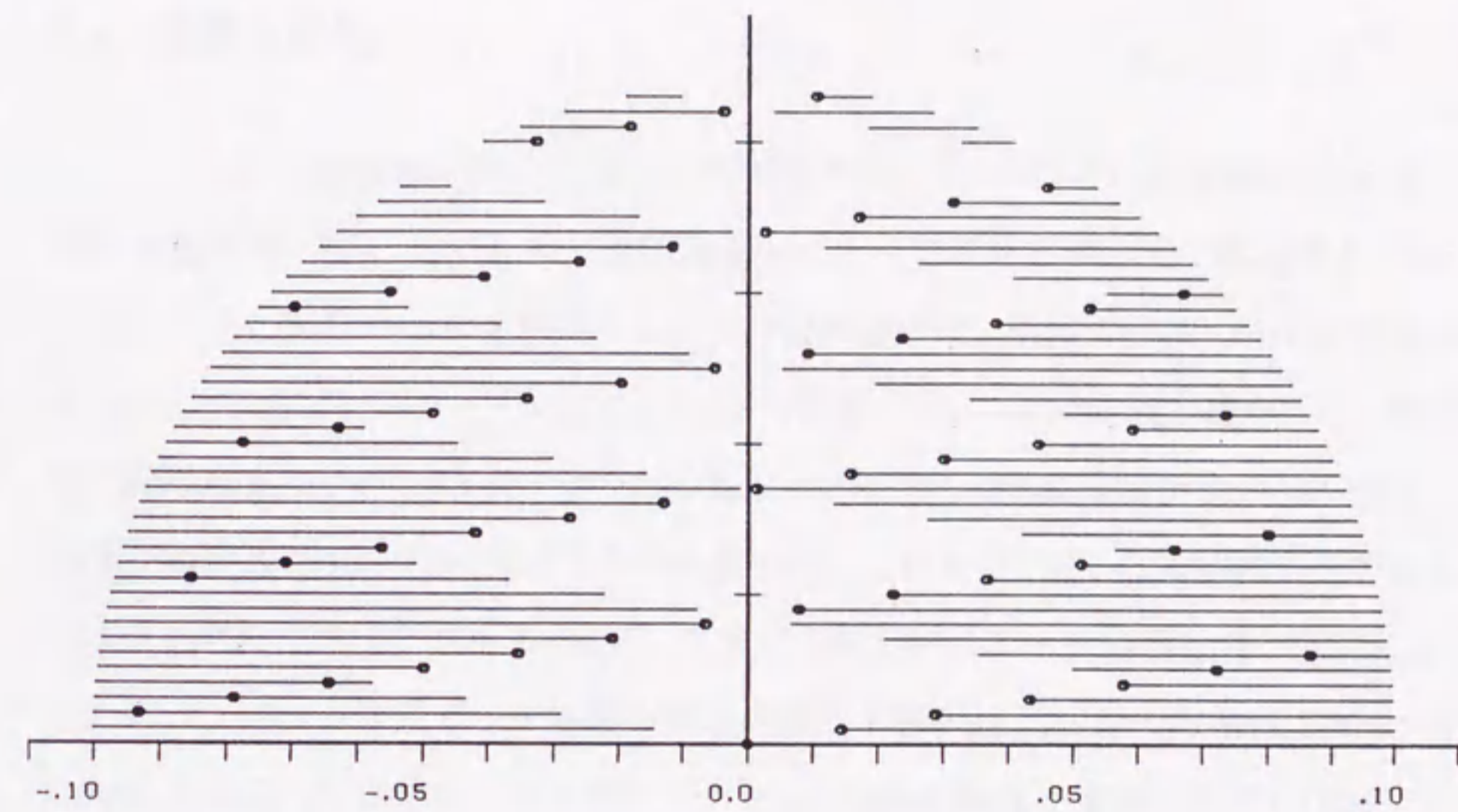


図 2.1 予想されるR型べん毛繊維のX線繊維回折像  
 分解能 10 Å までの層線を描いた。結晶学的周期長を 425 Å、17 ターン中に 93  
 個のサブユニットがあるとし、べん毛繊維の半径を 100 Å として計算を行った。黒  
 丸の位置によりそれぞれのベッセル関数の次数の正負が示されている。(右半  
 面: +、左半面: -)



### 3. X線繊維回折像データ処理

#### 3.1. 背景と目的

べん毛繊維軸が完全に揃った試料が作製できれば、そのX線繊維回折像は平行な層線群となり、その回折強度は層線をたどって容易に精度良く抽出することができる。しかし実際のべん毛繊維ゾルからの回折像では、繊維の配向分布による層線の広がりやX線ビームサイズなどによる広がりが有りさらに層線間隔が密なため、回折像の層線は重なり合っている。そのため重なった層線のX線繊維回折像から各層線の強度を精度良く抽出するプログラムが必要となる。これまで TMV のX線繊維回折像などに使用された抽出方法もあったが、完全に2次的にデータ処理を行うものでなかった<sup>38), 39)</sup>。また2次元データ処理の要求を満たす層線強度抽出の方法は Tibbits & Caspar らによって記述されているが<sup>40)</sup>、べん毛繊維特有の要求を満たしながら、X線繊維回折像から層線強度を精度良くかつ効率よく抽出する方法は独自に開発する必要があった。以下にこのデータ処理を行う2次元強度プロファイルフィッティングプログラム(RAD2D)の処理方法について、R型べん毛繊維の回折像を用いて述べる。

#### 3.2 X線繊維回折像の記録方法

X線繊維回折像のデータ処理はその回折像の記録方法と深く関わる。そのためまずここでX線繊維回折像の記録方法を記述する。なお本研究で行ったすべてのX線繊維回折像の記録はここで記述した方法を用いている。

X線は CuK  $\alpha$  線(波長 1.5418 Å)を用い、200x250mm サイズの Imaging Plate(富士写真フィルム:以下IPと略す)上に回折像を記録した。X線発生装置は回転対陰極を備えた RU-200 または FR 型(リガク電機)用い、フォーカスサイズは 0.1mmx0.1mm 程度であった。X線は Ni コートされたミラー光学系により集光した。RU-200 型を用いた場合は試料とIPの距離(以下カメラ距離と呼ぶ)はおおよそ 165mm とし、FR型では 500mm 程度で、その間には空気による散乱を避けるため、コーン状のヘリウムパスを設けた。またヘリウムパスとIPの間は出来るだけ小さな間隔と



し、ヘリウムパスのマイラ上にビームストップを設けた。X線露光時間は RU200 型で 20 時間程度、FR 型で 10 時間程度である。IP は BA100(富士写真フィルム)にて 0.1mm x 0.1mm ピクセルサイズで読みとられ、回折強度はデジタル化後 VAX コンピュータに転送され、層線強度データ抽出に使用された。また一部の回折像の記録には、FR 型 X線発生装置と RAXIS IV カメラ(リガク電機)の組み合わせを用いた。

カメラ距離は、 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  粉末結晶からのリング状の回折を記録し、特性 X 線  $\text{CuK}\alpha$  の波長 (1.5418 Å)、リングの位置、 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  の格子定数から計算して決定した。べん毛繊維のらせん対称性や周期長を精度良く決める場合には特にカメラ距離の測定に注意を払った。カメラ距離を計算するもととなる  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  の結晶格子定数は、Si 粉末結晶を内部標準として RINT-2200 回折装置(リガク電機)にて精密に決定した。得られた格子定数は以下のようになった。

$$a = 6.284 \text{ \AA}, b = 15.212 \text{ \AA}, c = 5.678 \text{ \AA}, \beta = 114.09 \text{ 度}$$

精度 標準偏差 0.001 Å、0.03 度

この値からそれぞれの回折像のカメラ距離を計算した。これにより幾何学的には長さの次元で 4~5 桁の精度が確保できたと考えらる。

### 3.3 逆空間への変換と円対称なバックグラウンド除去

#### 3.3.1. IP に記録された X 線繊維回折像

平面状の IP 上に記録されたべん毛繊維の X 線繊維回折像は、図 3.1 に示したように、逆空間でのべん毛繊維のフーリエ変換像すなわち軸方向に一定の間隔で分離された面状の構造因子とエヴァルド球の交線がエヴァルド球の中心から IP 面に向けて投影された層線状のものである。そのため赤道から離れた分解能が高い領域では、層線が赤道線から離れるように弓状に変形している。この様に変形した層線は強度データを得るための処理に不适当である。そこで記録された変形した層線を、逆空間の Z 軸を含む面内の回折像に幾何学的に変換することが望ましい。この変換は



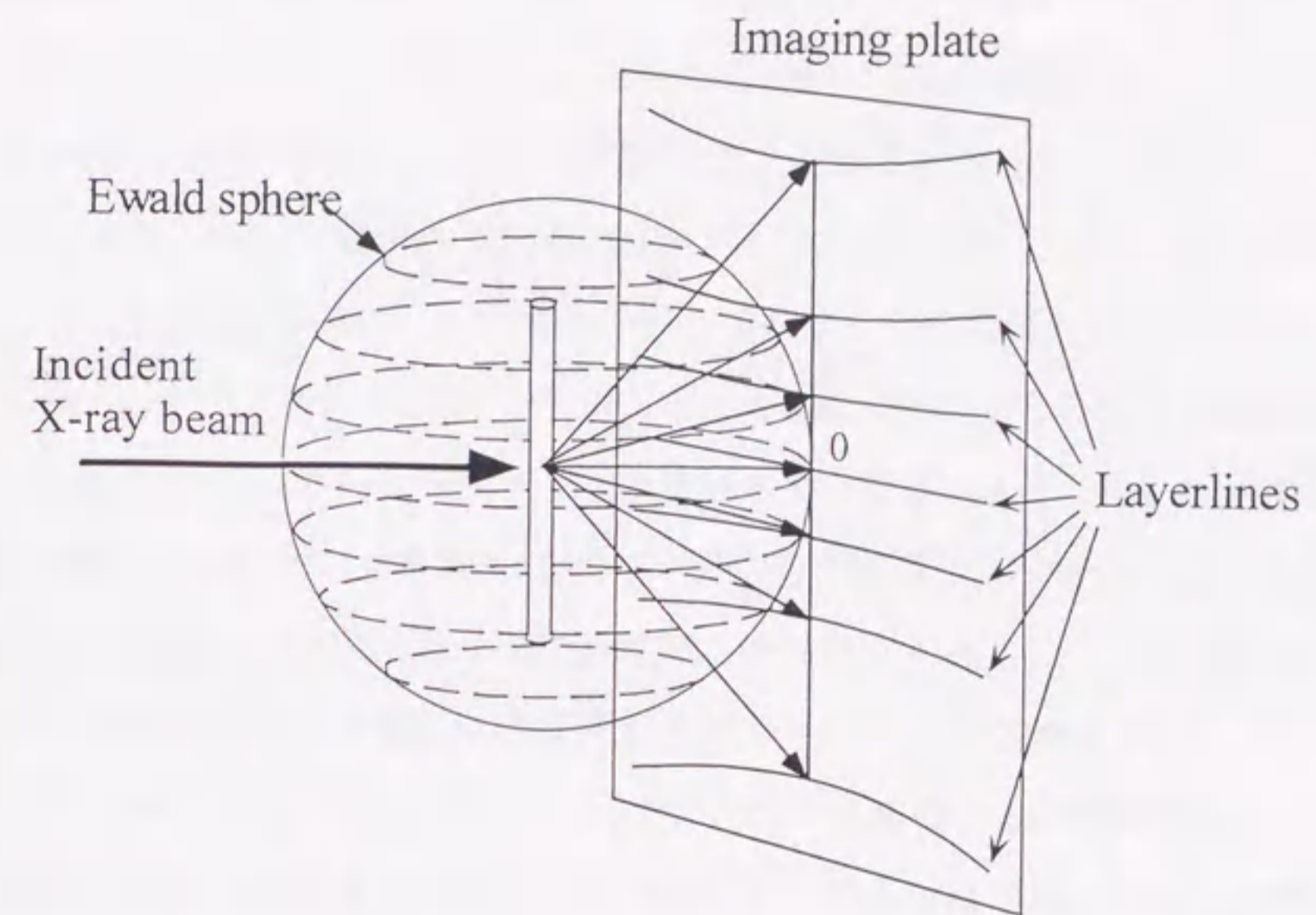


図 3.1 IP 上に記録されるX線繊維回折像の層線  
逆空間の層線状構造因子とエヴァルド球の交点が IP 上に記録されるため、  
べん毛繊維からの回折である層線は弓状に変形する。

エヴァルド球の半径  $= 1/\lambda$  ( $\lambda$  は X 線の波長) とカメラ距離、及びべん毛繊維軸と X 線ビームのなす角度をもとに幾何学的に計算できる。また X 線ビームはべん毛繊維軸に対してほぼ垂直に入射して X 線繊維回折像を撮るのでエヴァルド球は原点で逆空間の Z 軸に接する。そのため逆空間への変換後の層線回折像は、子午線近傍でデータの無い領域が生じる。このようなブラインド領域はべん毛繊維の軸を傾けて(すなわち逆空間の Z 軸を傾けて) X 線繊維回折像を記録しデータを収集する必要がある。また液晶状態のべん毛繊維ゾルは繊維軸をそろえて配向するが軸の周りの回転は自由なため構造因子は回転平均されて IP に記録されている。

### 3.3.2 S/N の改善と円対称なバックグラウンド

回折像の記録は 10~20 時間の X 線露光で行っているが、X 線回折像の記録



後にはべん毛繊維ゾル試料にX線ビームによるダメージが認められ、X線露光時間の延長によるS/Nの改善は難しい。一方べん毛繊維ゾルは一軸配向で上下の区別がなくまた回転も自由であることから、X線回折像は逆空間の原点を中心とする4象限で等価である。そこでX線繊維回折像の4半平面を足し合わせて、S/Nの改善を行った。

IP上に記録された回折像は、中心部や3Å分解能周辺部でわずかに混在するフラジェリンモノマーや試料の約90%を占める水分子等から発生する円対称なバックグラウンドを含んでいる。そのためこれを除去する必要がある。べん毛繊維のX線繊維回折像は理論上では層線だけとなるため、逆空間原点を中心とする円周上で、層線の間で回折強度の最も低い値を円対称バックグラウンドとした。この値を同一円周上の各強度データから差し引けば円対称バックグラウンドが除去できる。ただし低いS/Nのために、半径方向に円対称バックグラウンドを観察すると理論的にあり得ない高い周波数成分を持つ場合がある。そこでバックグラウンドは半径方向に一定幅のデータに対して曲線近似による平準化を行った。この円対称なバックグラウンドの除去はほぼ自動的に行えるが、作成したプログラムでは念のために画面上で、バックグラウンドを半径方向にプロットし、その妥当性を確認した上で差し引いている。

図3.2は、L型のべん毛繊維ゾルからの、IPに記録されたX線繊維回折像と、逆空間への変換後、円対称なバックグラウンドを差し引いたものを示している。IP上に記録された状態ではべん毛繊維からの層線がバックグラウンドによって不鮮明だが、円対称バックグラウンドを差し引いた後は層線回折がはっきり観察される。特に高分解能側での改善が著しい。この円対称バックグラウンド除去後の回折像で、赤道付近の $1/10 \text{ \AA}^{-1}$ 領域、子午線から近くの $1/5 \text{ \AA}^{-1}$ 領域で、X線回折強度が強くなっているのが観察される。このような特徴は、 $\alpha$ ヘリックスの束が子午線方向、すなわちべん毛繊維軸に平行に存在していることを示唆している。このことについては5章のべん毛繊維の立体構造で記述する。



L-type

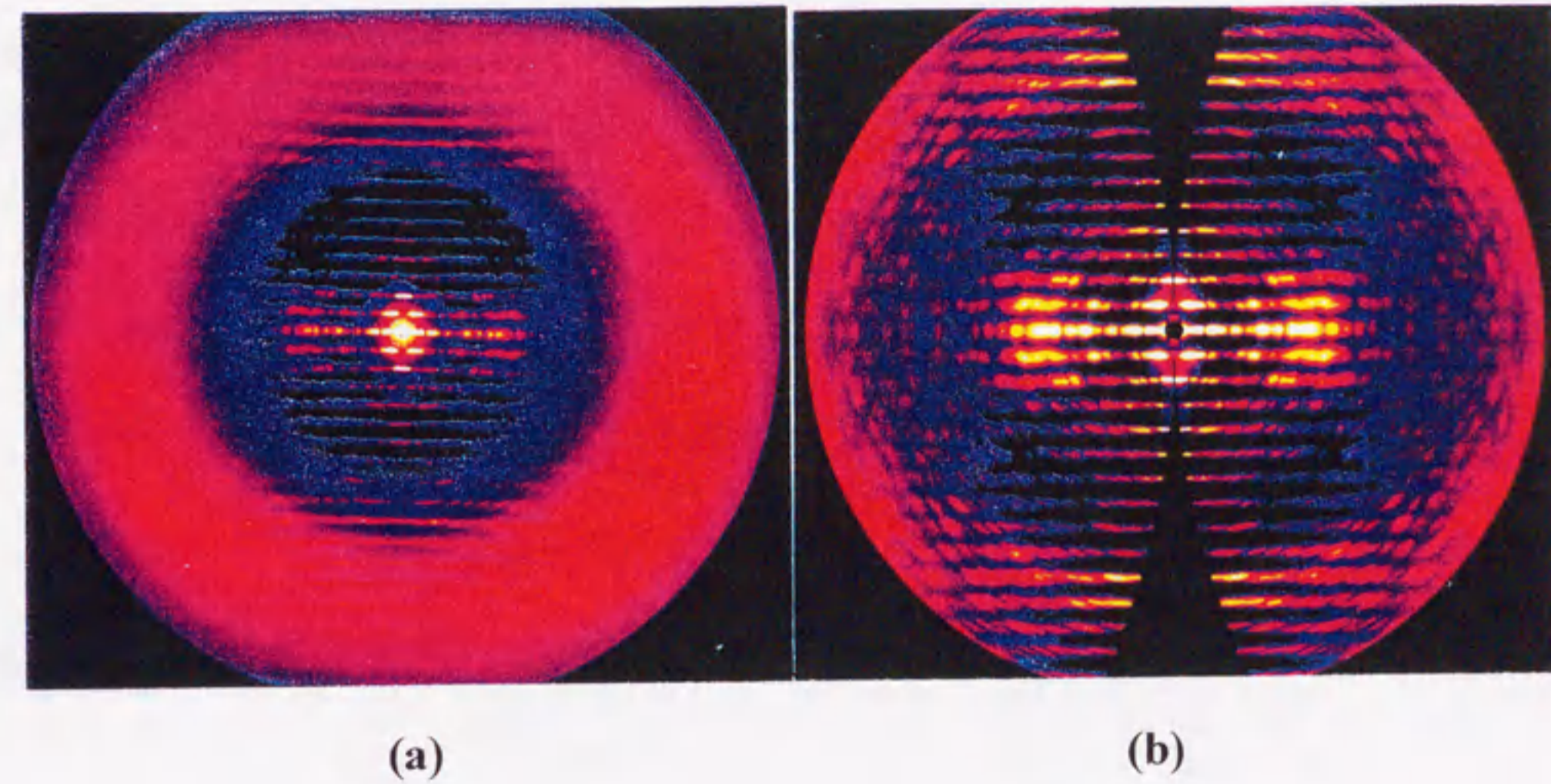


図 3.2 L型べん毛繊維からのX線回折像  
(a) IPに記録されたX線回折像、(b)逆空間へ変換し円対称バックグラウンドを除いた後の回折像。分解能 3.5 Åまでを示す。

### 3.4 2次元データ処理法

#### 3.4.1 2次元データ処理の原理

得られた逆空間の層線回折像を極座標系に変換し、新たに考案した2次元強度プロファイルフィッティングプログラム(RAD2D)を使用してこの回折データから回折強度を抽出した。ここで $\theta$ 方向は赤道を0度とし、子午線方向を90度とした。このプログラムは、べん毛繊維のらせん対称性と繊維半径から予想される層線上に(例えば図 2.1)、 $1/1000 \text{ \AA}^{-1}$ の間隔で仮想的な回折点を考える。この回折点にX線ビームの広がりとべん毛繊維の配向分布による広がりをもつ2次元強度ピーク関数( $R, \theta$ 方向)を重み付けしたものを配置する。そしてこれらを加算して得られる回折像と実測の回折像との残差が最小になるようにそれぞれの2次元強度ピーク関数の重み付けを変化させ、最終的に得られた重みをその回折点での回折強度とするものである。すなわち観



測回折強度との差に比例して各回折点の重みを繰り返し増減させて残差を最小化し回折強度を抽出する方法で、正確な回折強度抽出ができる。なお2次元強度ピーク関数は後述のようにガウス関数を組み合わせて生成する。ここで残差 Res は次の量である。

$$Res = \frac{\sum |I_{obs} - I_{calc}|}{\sum I_{obs}} \quad \text{----- (3.1)}$$

$I_{obs}$ 、 $I_{calc}$  はそれぞれ観測された強度及び計算された強度を示す。

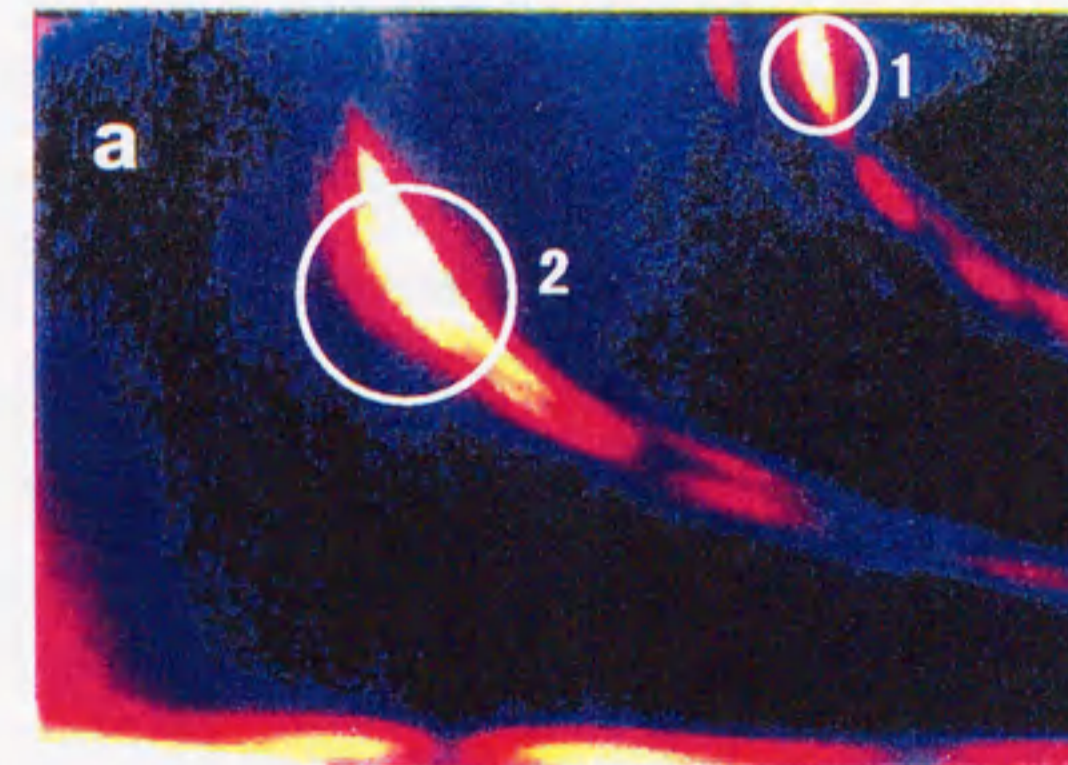
### 3.4.2 回折像の極座標系への座標変換

RAD2D では、前述のよう極座標系で計算を行う。これは液晶中のべん毛繊維の配向分布が  $\theta$  方向にのみ影響を与えR方向に影響を与えないので、極座標でのデータ処理の方が簡単のためである。そこでIPから逆空間への変換時に、読み込まれた  $0.1\text{mm} \times 0.1\text{mm}$  の直交座標ピクセルのデータから、R方向はIP上の  $0.1\text{mm}$ 、 $\theta$  方向は逆空間の  $0.5$  度に対応する極座標ピクセルへデータを変換した。この変換は逆空間で原点から離れた領域では、極座標ピクセルに対応する直交座標ピクセルが多数存在するため精度良く計算が行えるが、原点近くでは曲座標ピクセルに対応する直交座標ピクセルの数が少なくなり、極端な場合対応するピクセルが無くなることで精度の良い変換が困難となる。そこでIPに記録された一つの直交座標ピクセルを25等分し、この細分化されたピクセルを用いて極座標のピクセルのデータを計算し精度を確保した。なおプログラム上では前述の4象限の足し合わせ及び円対称バックグラウンドの除去もこの時同時に行っている。

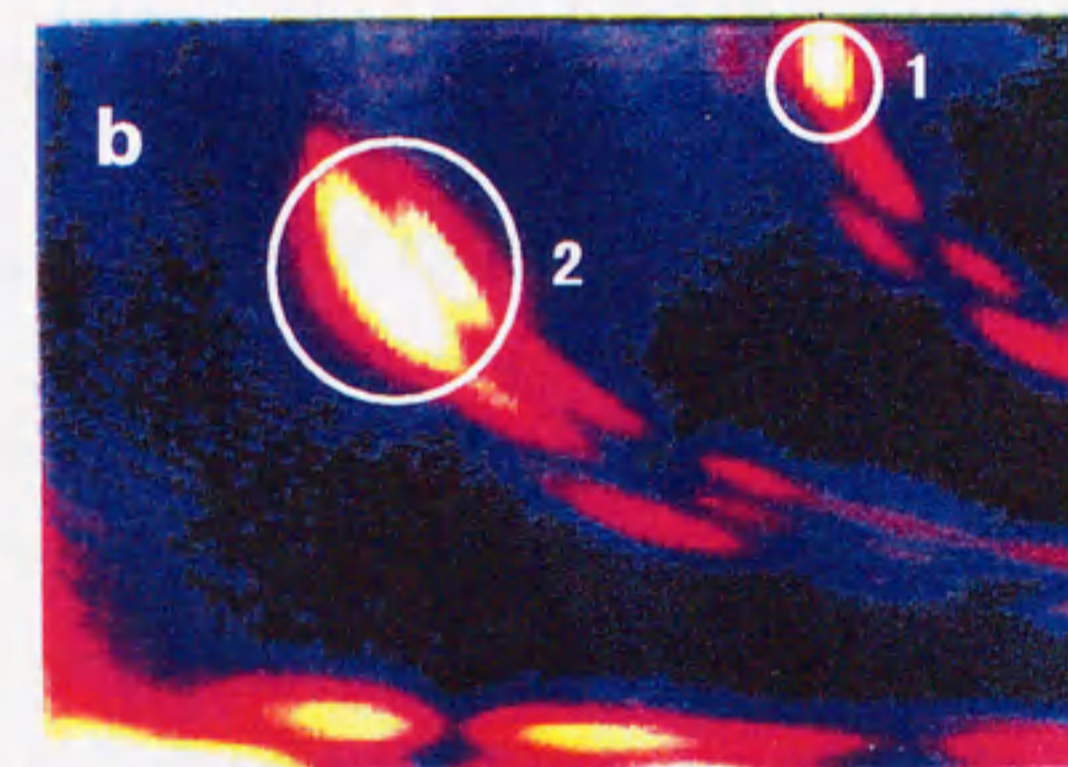
図 3.3 は、L、R、Lt型べん毛繊維の回折像をこのように変換して得られる極座標系でのX線繊維回折像である。図 3.2 の回折像の等価な4半平面の一つだけを示していることになる。縦軸は  $\theta$  方向の  $0$  度～ $90$  度を示し、底辺が赤道を上辺が子午線に相当する。横軸は逆空間原点からの距離である。各層線はこの変換により直線から曲線に変換される。



(a) L-type



(b) R-type



(c) Lt-type

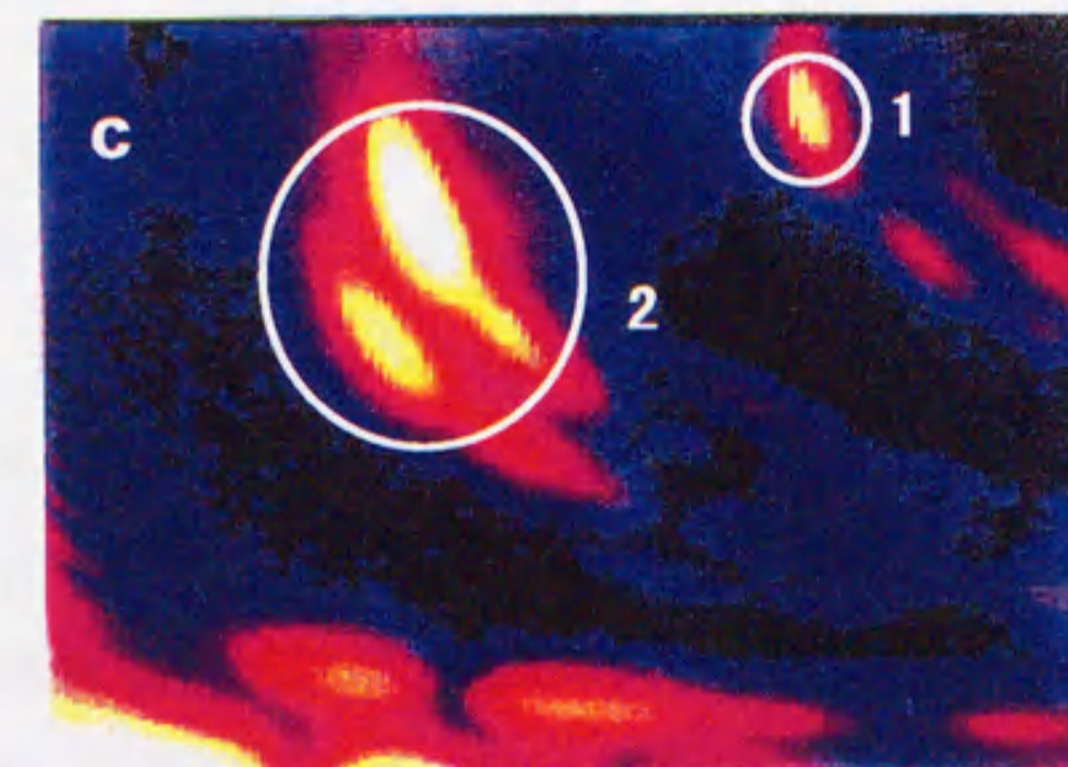


図 3.3 L、R、Lt型べん毛繊維の回折像の極座標系表示  
それぞれ (a)L型、(b)R型、(c)Lt型べん毛繊維のもの。縦軸は $\theta$ 方向の0度から90度を表し、底辺が赤道に、上辺が子午線に相当する。横軸はR方向  $0.008-0.05 \text{ \AA}^{-1}$ の範囲を示している。







### 3.4.5. べん毛繊維の配向分布角と層線位置

ここまででバックグラウンド除去とX線ビームのプロファイル決定を行った。次に重要なのはべん毛繊維の配向分布と層線位置の決定である。まず層線の位置を回折像からあらかじめ見積もっておく。次にべん毛繊維の配向分布を主従の2つのガウス分布によって近似し、図 3.3 の領域 2 の S/N の良い5重らせん6重らせんの層線ピークを利用してそれらの半値幅( $\sigma$ )を決定した。すでにX線ビームのプロファイルは決定されており、残るX線の広がりパラメータはべん毛繊維の配向分布だけなので、領域 2 の残差をモニターしながらガウス分布の半値幅を増減させることで2次元フィッティングがほぼ完了し、繊維軸の配向分布が決定できる。しかし層線位置が精密でないため、この配向分布を用いて層線位置をもう一度精密に決定する。これにより層線位置が少しずれて領域 2 でのフィッティングが悪くなるので、再び配向分布を精密化する。この作業は収束するまで行い、これにより繊維軸の配向分布と層線位置が精密に決定できる。この作業については6章に詳しく述べる。なお今後べん毛繊維の配向分布角と言うときは、繊維の配向分布をあらわす主たるガウス関数においてその値が平均配向方向に対して $e^{-0.5}$ となる角度をさす。

### 3.5. RAD2D の計算結果と層線強度の抽出

以上のようなプロセスで回折像から必要なパラメータを抽出決定し、RAD2Dを用いて回折強度を精度良く抽出した。このRAD2Dによる回折強度抽出が精度良く得られたかを評価するため、RAD2Dでシミュレーションされた回折像と観察された回折像を比較した。図 3.4 はその結果を示す。左半分が観測された回折像で右半分が計算された像である。バックグラウンド、層線の幅、層線回折強度等がほぼ忠実に再現できており、左右の差はほとんど認められない。このことは、パラメータ抽出が良好で、RAD2Dが有効に働いていることを示している。ここではR型べん毛繊維のものだけを示しているが、L、Lt型も同様に精度良く再現できる。

図 3.5 は以上のプロセスでR型べん毛繊維のX線回折像より  $1/1000 \text{ \AA}^{-1}$  間



隔で抽出した層線振幅の一部で、主な層線だけを示している。数字はそれぞれの層線に対応するベッセル関数の次数を示している。赤道構造因子は、ここで示した 10 Å 分解能の領域では 0 または  $\pi$  の位相しか取らないため正負の実数であり、その符号を変えると 0 点を通る(5.2.5 参照)。抽出された赤道振幅を見ると、0 点を通っていると思われる谷がはっきりと見られ、回折像の層線分離の良さと2次元強度プロファイルフィッティングの有効性がこれからもわかる。なお赤道の振幅が  $0.008\text{\AA}^{-1}$  以下でデータがないのはビームストップによりデータが記録されていないためで、この部分の補正については後述する。これらの層線の振幅データは複数のX線回折像から再現性よく得られる。

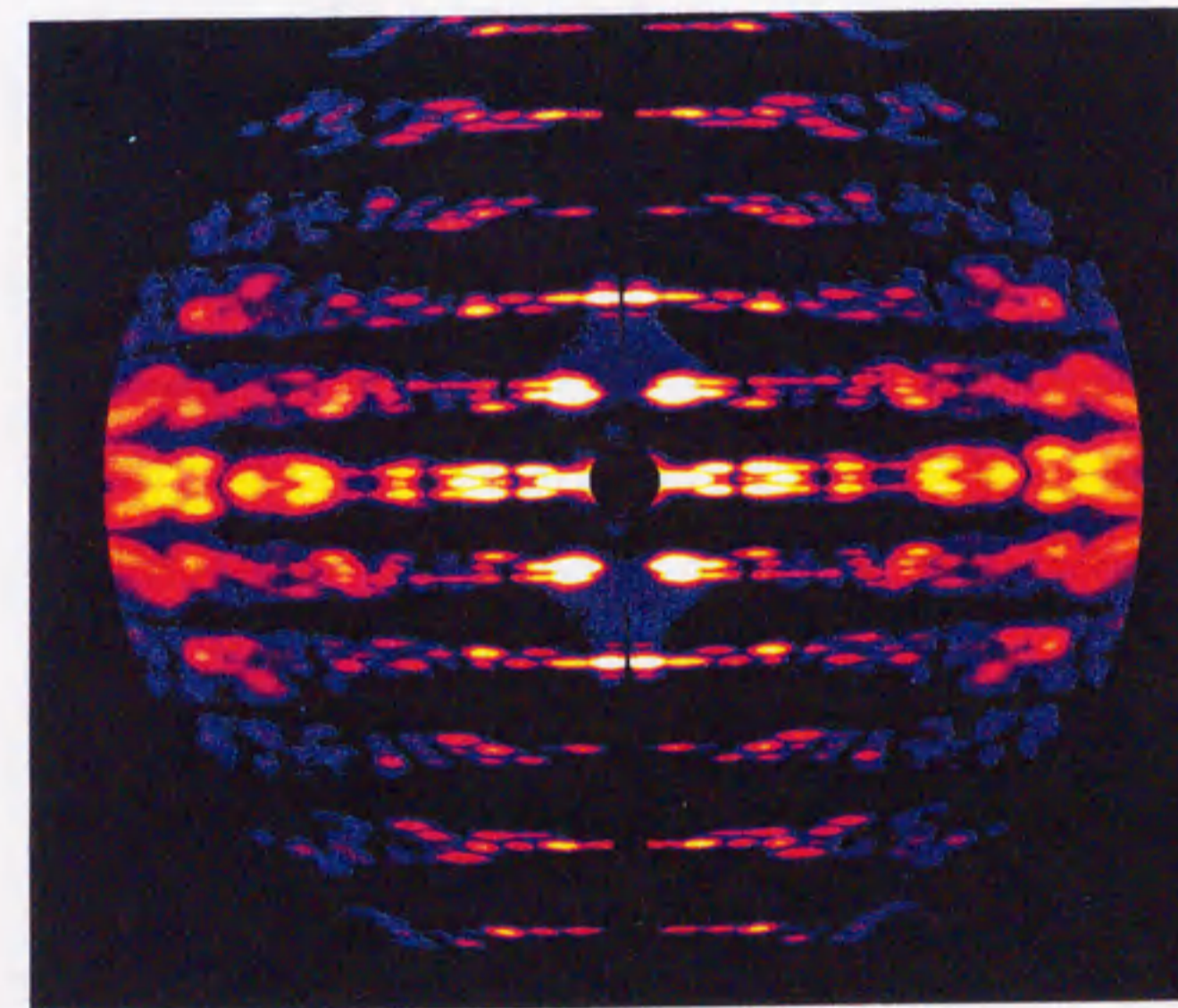


図 3.4 2次元強度プロファイルフィッティングプログラム(RAD2D)の有効性  
R型べん毛繊維の回折像(左)と、RAD2Dにより抽出されたデータやパラメータからミュレートされた回折像(右)の比較。分解能は9 Åまでを示している。



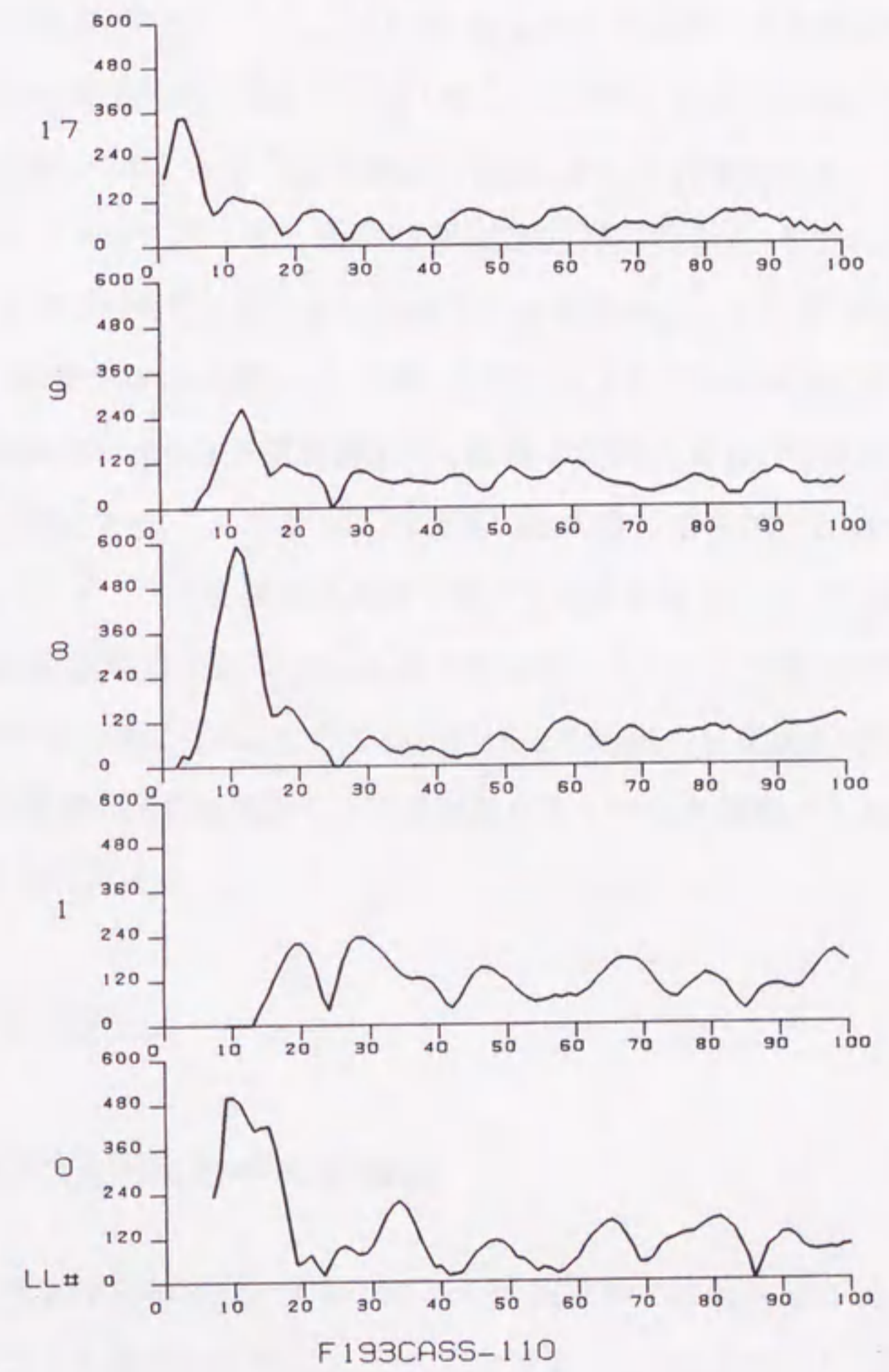
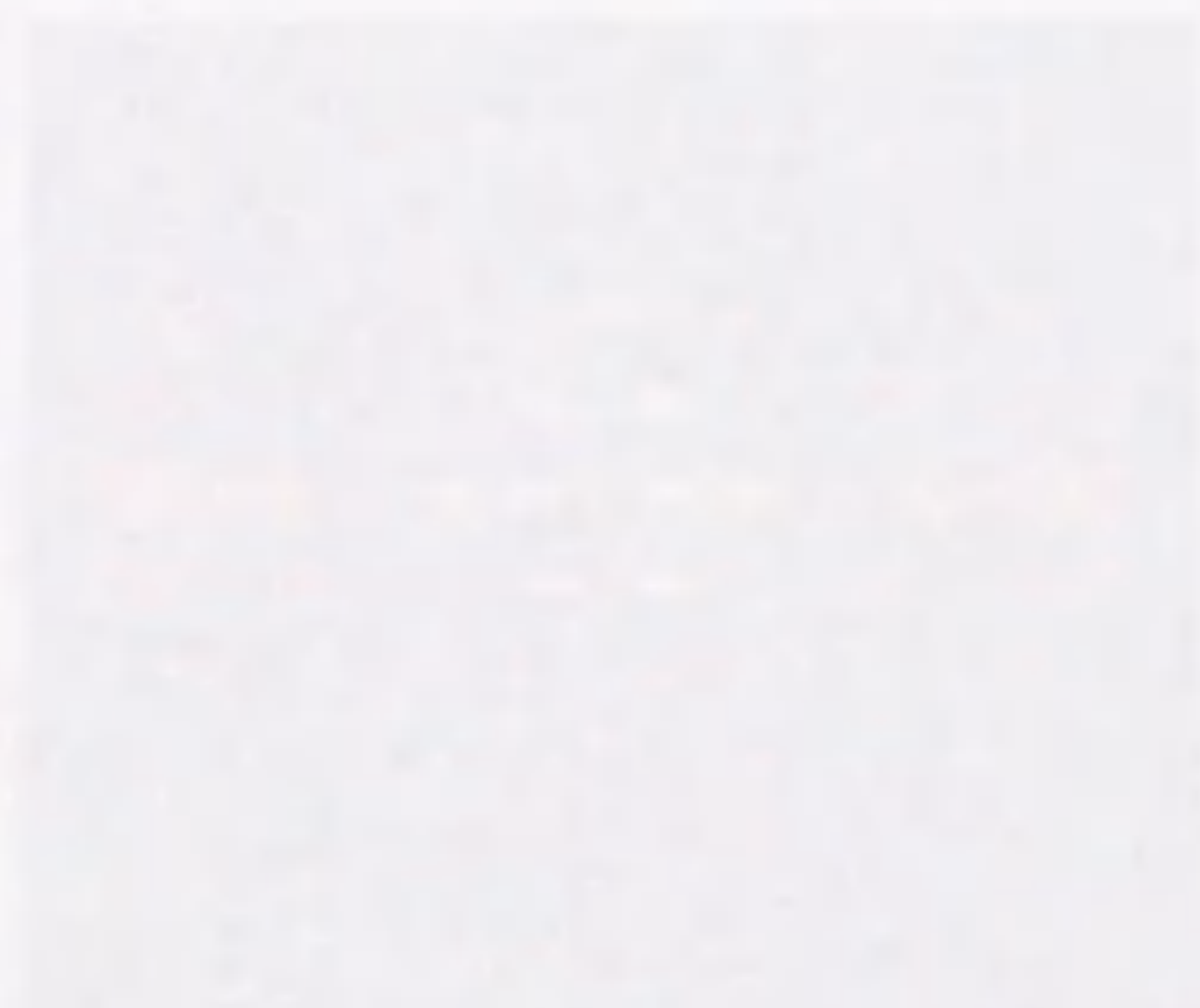


図 3.5 R型べん毛繊維の主要な層線の振幅値分布  
 RAD2Dにより抽出された主要な層線の振幅の絶対値を示している。グラフの左に書かれた数字は層線の次数を示す。横軸は  $1/1000 \text{ \AA}^{-1}$  単位で表した逆空間動径座標。縦軸は任意単位である。



## 4. 直線型べん毛繊維の液晶化と高配向ゾルの作製

### 4.1. 研究の背景と目的

X線繊維回折法はサブユニットがらせん対称性を持って構築された直線繊維状分子集合体の構造解析に適した方法である。この解析手法は理論的には極めて強力であり、例えば TMV では、X線繊維回折法により、その構造が原子レベルの分解能で解明されている<sup>32),33)</sup>。そこでこのX線繊維回折法によりL、R型の直線べん毛繊維の精密な構造解析を行えば、べん毛繊維の多型変換能、自己集合能のメカニズムを知るための重要な情報が得られると考えられる。しかし2章で考察したようにべん毛繊維のX線繊維回折法による構造解析は、繊維の配向分布角が1度以下のきわめて高い配向度を要求する。これまでこのような高い配向度は自発的に配向する TMV でしか達成されおらず、べん毛繊維を高度に配向する条件は全く見いだされていなかった。そこでX線構造解析に必要な配向分布角1度以下のべん毛繊維ゾルを作製できる条件を検討する必要がある。そのためまずべん毛繊維の自発的配向すなわち液晶化が行える緩衝液の条件を検討し、次に液晶化したべん毛繊維ゾルをさらに高配向度化する方法を考案する。

### 4.2. 材料と方法

#### 4.2.1. 研究に使用したべん毛繊維

べん毛繊維の液晶化と高配向ゾルの作製実験では菌株 SJW1655、SJW1660 から得られたべん毛繊維を使用した。その主な特徴とそれぞれのべん毛繊維を使用した実験を表 4.1 にまとめた。



表 4.1 本研究で用いたL型とR型の直線型べん毛繊維の特徴と使用した実験

	R型	L型
親株(野生株)	SJW1103→	SJW1103→
べん毛繊維変異株	SJW1655	SJW1660
アミノ酸配列の特徴	SJW1103:フラジェリンの 449 番目アラニン→バリンに置換	SJW1103:フラジェリンの 426 番目グリシン→アラニンに置換
べん毛繊維の形状	直線型	直線型
素繊維の傾き	右巻き	左巻き
使用した実験	<ul style="list-style-type: none"> <li>・べん毛繊維凝集体の pH の効果</li> <li>・液晶状態への塩の効果</li> <li>・遠心濃縮実験</li> <li>・磁場配向</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・流動性のべん毛繊維長さの効果</li> <li>・流動性への緩衝液の効果</li> <li>・磁場配向</li> </ul>

#### 4.2.2. べん毛繊維の単離精製と再構成

べん毛繊維は神谷律博士(東京大学大学院理学系研究科)より提供していただいたサルモネラ菌 SJW1655、SJW1660 より単離精製した。まず菌体を寒天培地に適当な濃度で撒き、37 度の恒温槽で一晩培養しシングルコロニーを得た。得られたシングルコロニーの菌体を数mlの 3%イーストエキストラクトにて 37 度で振とう培養し、適当な濁度に到達した後に 1ml ずつエッペンドルフチューブに分配し、最終濃度 10%のグリセロールを加えて-80 度に急冷し保存した。以後の実験はこのストックより菌体を取り出して使用した。

ストックされた菌体は、3から6l の 3%イーストエキストラクト溶液で一晩振とう培養した。培養液は適宜数  $\mu$ l 取り出し暗視野顕微鏡にてべん毛繊維を観察し直線型であることを確認した。600nm 光での OD が 1.5~2.0 になった時点で、培養液に PEG6000 が 1%、NaCl が 0.15M の濃度になるように加え、べん毛繊維の束を形成させた。このべん毛繊維の束を低速遠心で菌体とあわせて沈殿させ回収した。この菌体とべん毛繊維のペレットを 20 mM Tris-HCl pH7.8 溶液にて懸濁した後、溶液を注射針(20G; 0.90mmx38mm)に数回通し、せん弾力でべん毛繊維を菌体からはずした。この処理後の溶液を低速遠心して菌体を沈殿としてべん毛繊維を含む上澄みを回収



した。さらにこの上澄みを超遠心し、べん毛繊維をペレットとした。このべん毛繊維ペレットを再び 20 mM Tris-HCl pH7.8 にて懸濁し、65度10分の熱処理を行ってモノマーのフラジェリンとした。このフラジェリン溶液はまだ不溶性の異物、不純物を含んでいるため、超遠心を行い不純物を沈殿として除去した。上澄みとして得られた比較的純度の高いフラジェリン溶液に最終濃度 1M となるように硫酸アンモニウムを加えて1晩放置してべん毛繊維を再構成した。得られたべん毛繊維は2回の遠心と 20 mM Tris-HCl pH7.8 溶液の懸濁にて硫酸アンモニウムを除去した。この段階でべん毛繊維のペレットは SDS PAGE でフラジェリン以外のバンドは極めて微量であった。

さらに不純物を取り除くため、陰イオン交換カラムを使用した。べん毛繊維を再び 20 mM Tris-HCl pH7.8 溶液で懸濁した後、65 度 10 分の熱処理でモノマー化し陰イオン交換カラム (MonoQ:ファルマシア) にロードした。溶出のため NaCl 濃度を 100 mM から 150 mM まで約30分かけて増加し、溶出タンパク濃度を 280 nm の吸光度で検出した。フラジェリン溶出パターンは単一ピークと不純物と見られる接近した小さなピーク群が見られ、単一ピーク中心部分だけを回収し実験用とした。回収した高純度フラジェリン溶液は、再び硫酸アンモニウムにてべん毛繊維に再構成され2回の遠心と懸濁で 20 mM Tris-HCl pH7.8+150 mM NaCl の緩衝液に置換した。その後軽く遠心して緩いペレットを作り4度Cにて保存した。この緩いペレットのべん毛繊維は長期の保存後も問題なくX線繊維回折用のべん毛繊維ゾルに使用することができた。

#### 4.2.3. X線繊維回折用試料：液晶ゾルの作製

平均長の異なるべん毛繊維を得るため、ストックの繊維を 20 mM Tris pH7.8 溶液で懸濁し、65 度 10 分の熱処理を行って1~5ml 程度のフラジェリン溶液とし、これに飽和硫酸アンモニウム溶液を急速に混合してべん毛繊維を再構成した。この時最終タンパク濃度が 0.3mg/ml~10mg/ml、最終硫酸アンモニウム濃度が 1.0 あるいは 1.5M になるように調整した。ただし、このフラジェリン濃度と硫酸アンモニウム濃度は使用するべん毛繊維平均長を決定した後は固定した。

次に再構成したべん毛繊維を 20 mM Tris pH7.8 溶液で懸濁した後、20mg



程度の繊維を遠心して初期のペレットとした。これを 1~3ml の検討する試料作製用緩衝液で懸濁した後、これを遠心してペレットとし、もう一度 1ml の試料作製用緩衝液で懸濁した後、冷却遠心機 MRX-150(TOMY)にて1万gで15時間以上遠心を行なった。この一連の操作で試料作製用緩衝液中の約 100mg/ml のゆるいべん毛繊維ペレット(ゾル)を作製した。

得られたゾルを直径 0.7mm の石英ガラスキャピラリーに5~10mm程度の長さにて吸入し、これを前後に流動させることで一定の流動配向処理を行った後、キャピラリーの上下を2液性接着剤(アラルダイト)にて封じて試料とした。試料緩衝液への塩添加は、キャピラリーを封じる前に目的とする濃度の10倍濃度の塩溶液をゾルの 1/10 体積加え前後に流動させて混合均一化する事で行なった。ただしべん毛繊維ゾルの流動性検討時には、塩の添加は1万gの遠心時の緩衝液から行った。また繊維を平均長 300nm 程度に短くする方法としては、1万g遠心後のべん毛繊維のペレットを超音波処理する方法も用いた。

#### 4.2.4. 偏光顕微鏡観察

得られたべん毛繊維ゾルの、流動性、凝集状態、均一性、配向の程度などは、キャピラリー中のゾルを、直交した偏光顕微鏡の偏光子(直交クロスニコル状態のポラライザーとアナライザー)間に置いて観察し、必要に応じて写真撮影を行った。観察はキャピラリー軸と偏光子(ポラライザー)との角度が45度位と0度位(消光位)で行った。偏光子とキャピラリー軸との角度関係を模式的に図 4.1 に示す。粘性・流動性については、直径 0.7mm のキャピラリーにゾルを吸入する時の容易性や吸入後流動配向に要する時間を偏向顕微鏡45度位で観察評価して決定した。また配向状態を観察する時は消光位で状態を観察した。

使用した偏光顕微鏡は、キャピラリー中にゾルを吸入したり流動配向させるなどの作業を行う場合には VMZ(オリンパス光学工業(株))を、写真撮影には WILD M3Z(ライカ(株))を用いた。写真撮影では45度位と消光位でキャピラリーの同じ位置が撮影できるように回転式のキャピラリーホルダーを用いた。



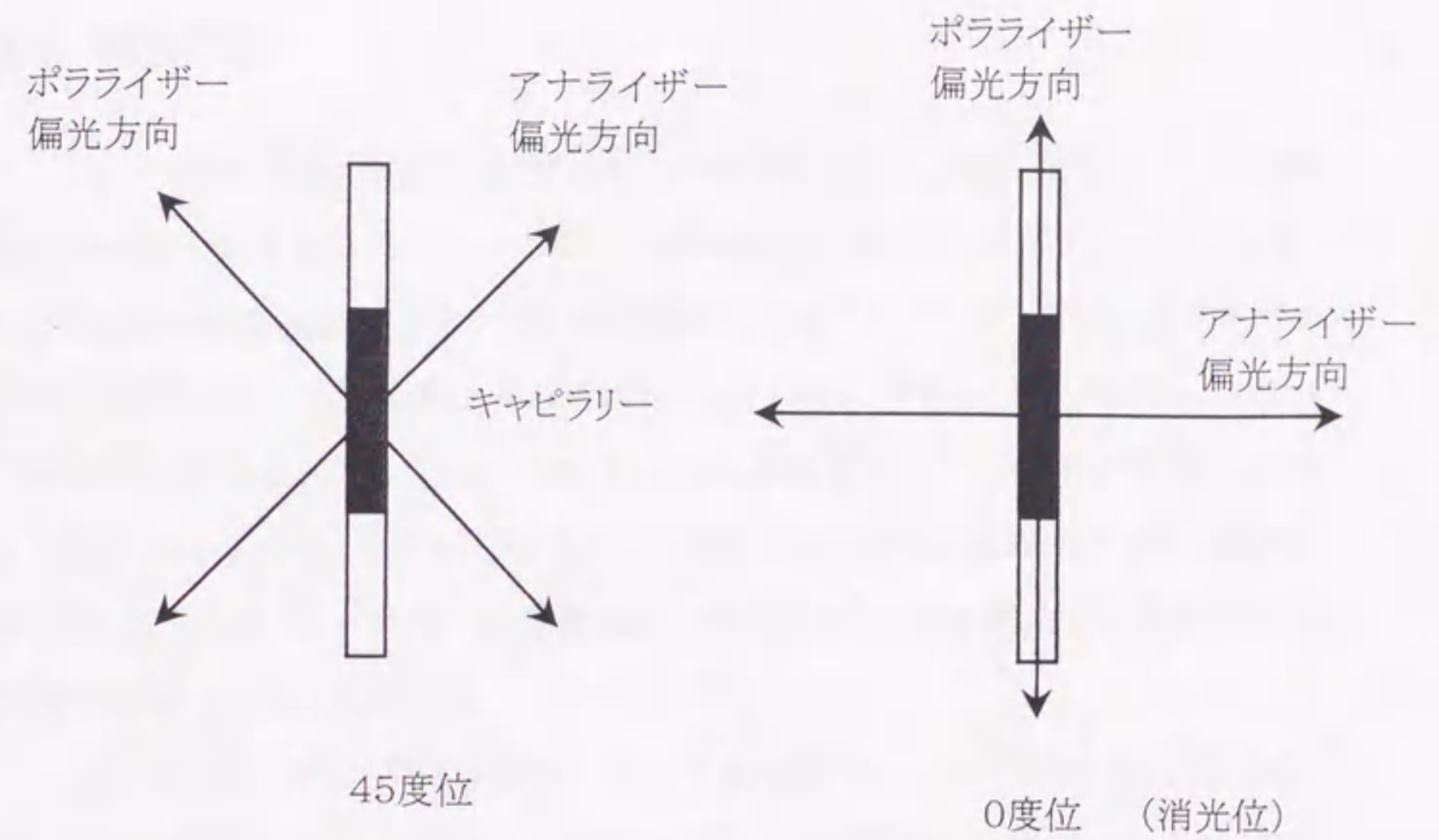


図 4.1 偏光顕微鏡におけるキャピラリーの観察位置

2つの偏光子は直交させその間に配向試料を置いて観察した。通常べん毛繊維ゾルはキャピラリー軸方向に配向しているのので、偏光と45度方向に配置した時に明るく観察される。偏光と平行な消光位では、配向度に応じてべん毛繊維ゾルの明るさが変化し配向が高いほど暗くなる。

#### 4.2.5. 遠心濃縮実験

べん毛繊維ゾルをキャピラリーに吸引し封じたものを、スイングロータによりキャピラリー軸を遠心方向に保持して低速遠心した。遠心は LC-120(TOMY) を使い、4℃、回転数 3500rpm、ゾルへの加速度 2000g で行った。斜め方向に短時間加速度を加える場合には、アングルロータ装着の MRX-150(TOMY)を用いた。

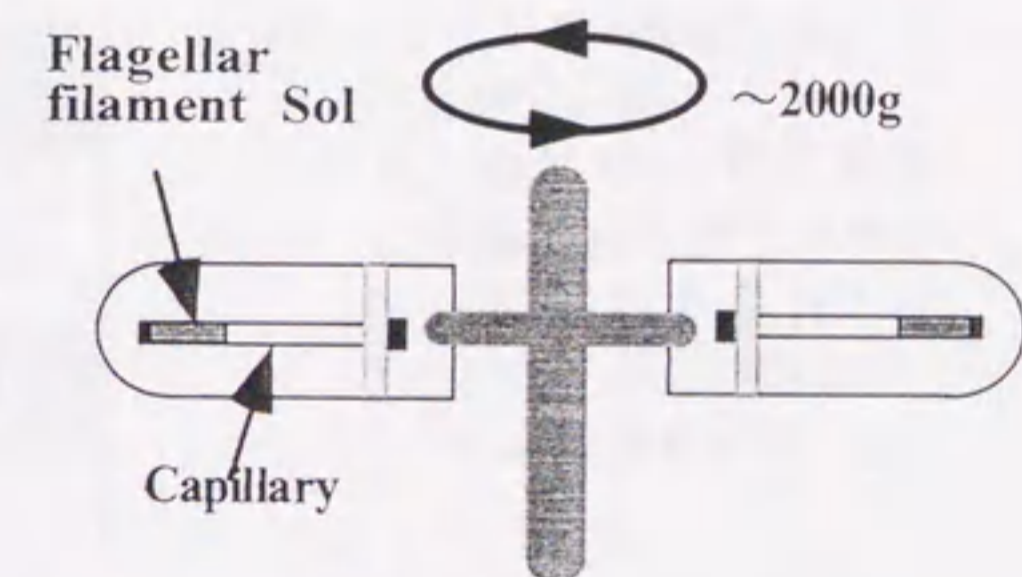


図 4.2 べん毛繊維ゾルの遠心濃縮法

低速遠心機にてスイングロータを用い、キャピラリー軸に平行に 2000g の遠心加速度を加えた。



#### 4.2.6. 磁場配向

1 テスラの磁場配向実験は図 4.3 に示す磁気回路を作製して行った。図中黒く塗られた部分が高保磁力をもつネオジウム鉄磁石で、表面は耐錆のペイントを施した。その他の磁気回路部分はヨークを含め純鉄で作製した。キャピラリーに封じたゾルの試料は磁気回路中心部を貫通する直径 1.2mm の孔に挿入し、中心部 3mm のギャップ部分で磁場印加を行った。ギャップ部分の磁場強度はホール素子で計測し、0.98 テスラであった。なおギャップ部分以外の孔では磁気回路の高透磁率により磁場は極めて小さい。キャピラリー中のべん毛繊維ゾルの偏光顕微鏡観察及びX線繊維回折像の記録は磁気回路から取り外して行った。

図 4.4 は 13.5 テスラ磁場配向に用いた超伝導マグネットの図面を示している。使用するキャピラリーが小型であることからマグネットのボア径を直径 12mm とし 1% 均一磁場の領域を長さ 20mm とした。さらに試料温度を室温として仕様を決め、(株)ジャパンマグネットテクノロジーに設計作製を依頼し完成させた。均一磁場領域を小さくし均一度を下げたことにより低価格で 13.5 テスラの高磁場が実現できた。

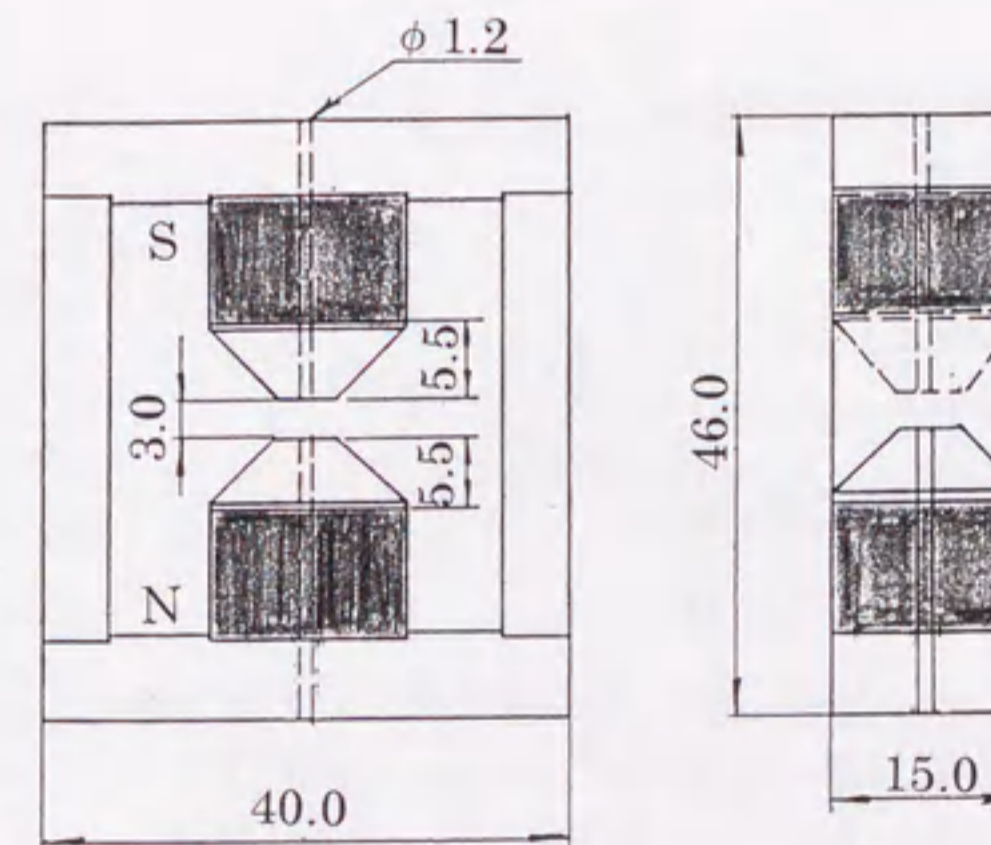


図 4.3 1 テスラ磁場配向に用いた磁気回路  
永久磁石として現在最高の保磁力を有するネオジウム鉄磁石を使用し、3mm のギャップ間に約 1 テスラの磁場を実現した。







### 4.3. 結果と考察

#### 4.3.1. べん毛繊維試料の流動性

べん毛繊維ゾルの流動性は実験的には極めて重要な要素である。それは粘性が高いべん毛繊維ゾルでは現実的な実験時間内(2~3週間)にその状態を変えることが不可能になるからである。このような極端な場合でなくとも、粘性が高くなれば試料作りに時間がかかりすぎて高配向度べん毛繊維ゾルを作製する条件を探索することが困難となる。そのためまず始めにべん毛繊維ゾルの粘性を下げ、流動性を高めることが必要条件である。流動性は、べん毛繊維濃度と緩衝液及びべん毛繊維の長さの影響を強く受ける。この中でべん毛繊維の濃度は、べん毛繊維の高配向化のために高く保つ必要がある。そこでべん毛繊維を1万 g で 15 時間以上遠心して得られる約 100mg/ml 程度のペレットをそのまま使い、残り2つの条件を探索した。

##### 4.3.1.1. 溶液条件とゾルの流動性

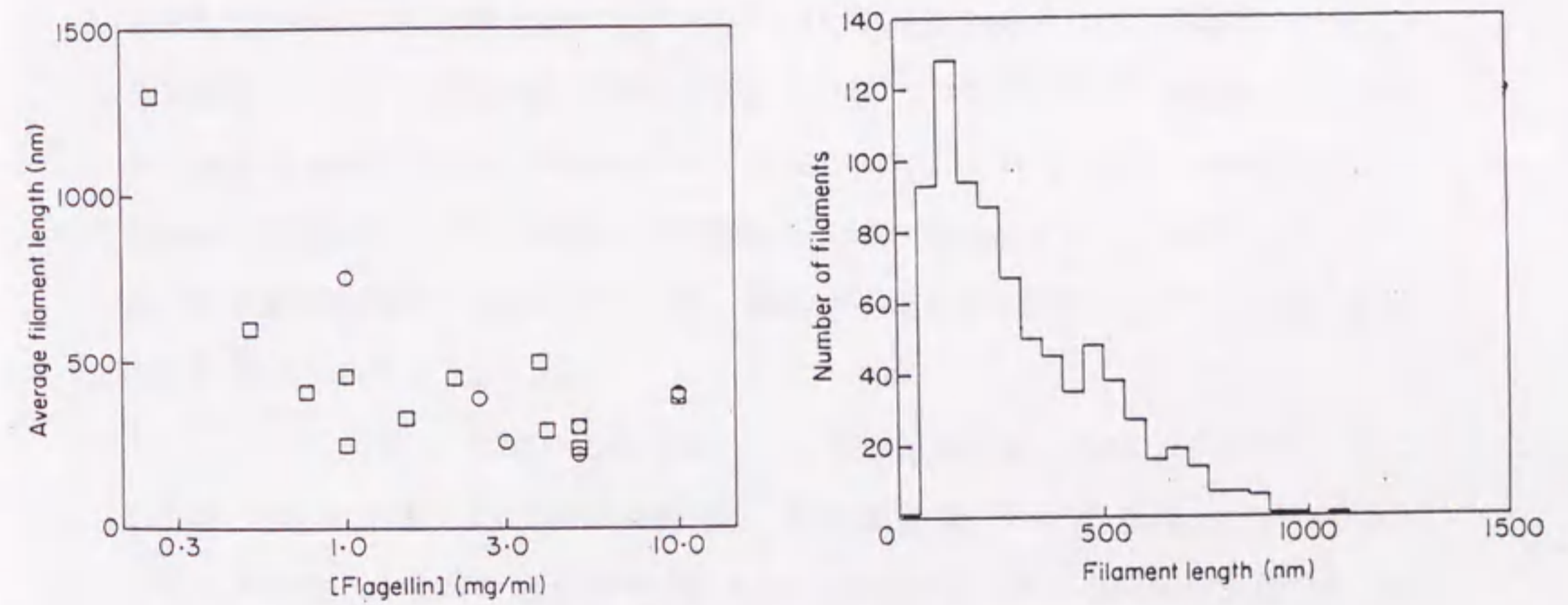
緩衝液のべん毛繊維ゾル流動性への影響を調べた結果を、表4.2に示す<sup>34)</sup>。なおここでは塩など添加は1万 g、15時間の遠心前に行った。流動性は低塩濃度の方が高く、良好な状態を示す。特に純水中では高い流動性を示した。しかし、純水で作成したべん毛繊維ゾルは極めて短時間に白濁し安定性を欠いていた。そのためある程度の塩濃度あるいはイオン強度が必要と判断された。一方塩を含んだ緩衝液ではべん毛繊維ゾルの粘性が増加する傾向がある。特に 150 mM の NaCl を含んだものは極めて流動性が低くなり、直径 0.7mm のキャピラリーには吸入が困難であった。また緩衝液もイオン強度を上昇させるものは流動性の低下が見られた。これらの表4.2の結果から、緩衝液として流動性の良好なグリシンを用いることとした。



表 4.2 ベン毛繊維ゾル流動性と安定性に対する各種緩衝溶液の影響

溶液	流動性	安定性
純水	良好	低い
5 mM NaCl	低い	○
> 10 mM NaCl	極めて低い	○
> 1mM CaCl <sub>2</sub>	極めて低い	○
> 1mM MgCl <sub>2</sub>	極めて低い	○
200 mM glycine NaOH ( pH 8.0 )	良好	○
200 mM glycine NaOH ( pH 8.0 ) + 0.2% PEG 6000	良好	○
200 mM glycine HCl ( pH 4.0 )	低い	○
200 mM glycine NaOH ( pH 9.0 )	低い	○
200 mM glycine NaOH ( pH 8.0 ) + 5mM NaCl	低い	○
200 mM glycine NaOH ( pH 8.0 ) + > 10mM NaCl	極めて低い	○
200 mM glycine NaOH ( pH 8.0 ) + 10mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	中間	○
200 mM glycine NaOH ( pH 8.0 ) + > 20mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	極めて低い	○
20 mM phosphate ( pH7.0 )	極めて低い	○
20 mM phosphate ( pH7.0 ) + 150mMNaCl	極めて低い	○
20 mM Tris HCl ( pH7.8 )	中間	中間
20 mM Tris HCl ( pH7.8 ) + > 5 mM NaCl	極めて低い	○
100 mM Tris HCl ( pH7.5 )	低い	○
20 mM Pipes ( pH7.0 , 7.5 ) + 150mM NaCl	極めて低い	○
100 mM Pipes HCl ( pH7.0 , 7.5 )	極めて低い	○

ベン毛繊維緩衝液溶液を変えながらゾルの流動性・粘性、および安定性を偏光顕微鏡下で観察し決定した。> ; 最小濃度以上の数点での観察結果を含む。○ ; 安定性良好を示す。



(a)

(b)

図 4.5 フラジェリン溶液と硫酸アンモニウムとの混合による再構成ベン毛繊維の平均長  
 (a) 再構成ベン毛繊維平均長のタンパク濃度・(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>濃度依存性を示す。  
 ○ ; 1.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、□ ; 1.0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (b) 濃度 5mg/ml のフラジェリンを  
 1.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で再構成した時のベン毛繊維の長さ分布: 平均ベン毛長約 300nm



#### 4.3.1.2. べん毛繊維長と流動性

べん毛繊維の長さも流動性の観点から重要である。ただし緩衝液の場合と異なりべん毛繊維の長さとの間には強い相関がある。理論的には、べん毛繊維の濃度が同じならば、より長いべん毛繊維を用いれば、より配向度の高いゾルが得られる。しかしながらべん毛繊維が長くなればなるほどゾルの粘性は増し、はなはだしい場合にはゲル化してしまう。そのためなるべく長く、同時に流動性も満足できるべん毛繊維長さを探索することが必要となる。

べん毛繊維の長さとの流動性の関係を知るためフラジェリン溶液に硫酸アンモニウムを加えて長さの異なる繊維を再構成した。図 4.5 は、再構成したべん毛繊維平均長への再構成時タンパク濃度と硫酸アンモニウム濃度の依存性、及び再構成されたべん毛繊維長の分布を示している。図 4.5 (a)からわかるように、べん毛繊維の平均長はタンパク濃度と硫酸アンモニウム濃度によりコントロールでき、200nm から 1000nm 以上までのものを作製することができる。また図 4.5 (b)は、平均長が 300nm の時の繊維長の分布例を示している。硫酸アンモニウムによる再構成法では、核形成とべん毛繊維の伸張が競合的に起こるためべん毛繊維の長さ分布は広範囲にわたる。平均長はこのような分布の単純平均で求めている。この例は平均長 300nm のものだが、繊維長分布は平均長が異なるものでもほぼ同様な分布を示した。なお図中 0~50nm の繊維が無く、50~100nm の繊維数が 100~150nm のものより減少しているのは、電子顕微鏡像で 100nm 以下の短い繊維が不純物と区別することができない場合があり、数えられないことによる。

こうして得られた種々の平均長のべん毛繊維溶液を、100mg/ml のペレットにした後、べん毛繊維ゾルの粘性・流動性を、偏向顕微鏡下で直径 0.7mm のキャピラリーにゾルを吸入する時の容易性や、吸入後に流動配向に要する時間を評価した。表 4.3 に観察結果を示す。粘性はべん毛繊維が短くなるにつれて減少し、流動性が増す。これはべん毛繊維の有効体積に寄与する長さが減少し高分子特有の軸に沿った多点相互作用の減少のためと考えられる。しかしあまり短くなると、べん毛繊維がロッド状でなくなり、液晶ドメインの形成能を失いべん毛繊維軸は配向しない。実際、偏向顕微



鏡観察では平均長 200nm 以下のゾルでは、多くのリング状の縞が発生し、配向したドメインも小さい。この配向度が低下する様子は、消光位におけるゾルの消光度の変化としても観察される。表 4.3 にはこの観察結果も示した。表 4.3 の結果から、配向試料を作製するためのべん毛繊維の平均長は、300 から 500nm 程度、すなわち直径の 15 から 25 倍程度が適していると判断した。この値は液晶化しやすい TMV の場合の約 20 倍に近い。

この結果からこの実験以降の本研究の実験では平均長 300 から 500nm のべん毛繊維を用いて行った。ただし、べん毛繊維の長さのコントロールとしては、処理の簡便性のため、比較的長いべん毛繊維を作製した後、約 100mg/ml の濃度のペレットを超音波処理にて短くしたものを用いた。

表4.3 べん毛繊維平均長に対するゾルの流動性と消光状態

べん毛平均長	200nm	400nm	600nm	800nm	1000nm
流動性	高い	高い	やや低い	低い	極めて低い
消光状態	悪い	良い	良い	—	—



#### 4.3.2. べん毛繊維ゾルの液晶化

高配向度のべん毛繊維ゾルを作製することは、溶液中でべん毛繊維軸をそろえることであり、このことはライオトロピック液晶を作製することと等価である。一般に液晶状態ができる条件は、吸着力を持たない（もっと積極的に反発力を持つ）ロッド状物体を一定濃度以上に濃縮することで満たされる。べん毛繊維ゾルの液晶化実験では約 100mg/ml の濃度を用いているが、流動性実験時にべん毛繊維が液晶状態をとるものがあった。そこで 100mg/ml の濃度はべん毛繊維溶液全体が液晶になる転移点より高いと考えられ液晶化条件の濃度の点は満足されていると判断できる。よって残る繊維間の相互作用の制御が重要となる。

##### 4.3.2.1. 緩衝液 pH による反発力の制御

まずべん毛繊維の等電点が pH4~5 であることを利用して、緩衝液の pH を 5~8 に調節してべん毛繊維に負の正味電荷量を調整し、これによって静電反発力の制御を試みた。緩衝液は、50mM glycine をトリズマベースと酢酸にて pH5~8 に調節したものを使用した。この緩衝液では比較的大きなイオンしか存在しないためイオン雰囲気によるシールド効果が少ない。またべん毛繊維溶液を 100mg/ml に濃縮した時に、タンパク質の緩衝能による溶液 pH への影響の可能性があったが、pH 試験紙にて調べたところ濃縮後もべん毛繊維ゾルの pH は調整時の pH を保っていた。

べん毛繊維ゾルはすべての pH で、キャピラリーに吸入された直後は流動性が高く、均一なゾルとなった。図 4.6 はこのようなべん毛繊維ゾルを一昼夜放置した後の偏光顕微鏡像で、キャピラリーの軸は偏光子に対し 45 度位のものを示してある。放置後は、すべての pH においてべん毛繊維ゾルは凝集状態となり、この凝集体はキャピラリー中で大きならせん状に凝集しているように見える。緩衝液 pH5~8 のうち、pH5 が最も収縮しており、2つに分離した。これは、pH5 がべん毛繊維の等電点に近くべん毛繊維の正味電荷の量が小さいため、繊維間の反発力が小さくなり、凝集、収縮が強く起こったためと考えられる。



この凝集状態を調べるため、これら試料からのX線回折像を記録した。図 4.7 はその中心近傍の低分解能部分を示す。回折像は赤道に長周期構造によるサンプリングを見せている。べん毛繊維は子午線方向に配向しており、赤道方向のサンプリングはべん毛繊維が横方向に長周期の配列格子を形成していることを示している。このサンプリング位置から、配列は六方格子であることが示され繊維軸間の距離は約 32~35nm であった。べん毛繊維の直径は約 23nm なので、べん毛繊維は表面間で約 11nm 離れて安定な凝集状態を形成していることとなり、いわゆるコロイド結晶であることが明らかになった。

以上の結果から、低イオン強度緩衝液中のべん毛繊維ゾルは、六方格子状に横方向に凝集して大きならせん形をとり、液晶状態にならないことが明らかになった。このべん毛繊維ゾルがコロイド結晶を形成する物理的原因は不明であるが、凝集状態が pH により変化することから静電的な相互作用との関わりが示唆される。

凝集状態のべん毛繊維は繊維軸と垂直方向に格子を形成していることから微小領域内では繊維軸が高度に配向していると思われる。しかし実際にはキャピラリー中で凝集体全体はらせん状の構造をとるため、X線ビームを回折するキャピラリー内の領域全体としては繊維軸の配向方向がバラバラで全体として配向度が悪くなる。その結果、図 4.7 に見られるように低角部分でも層線が広がりを持つことになり、X線繊維回折法のサンプルとしては適当でない。



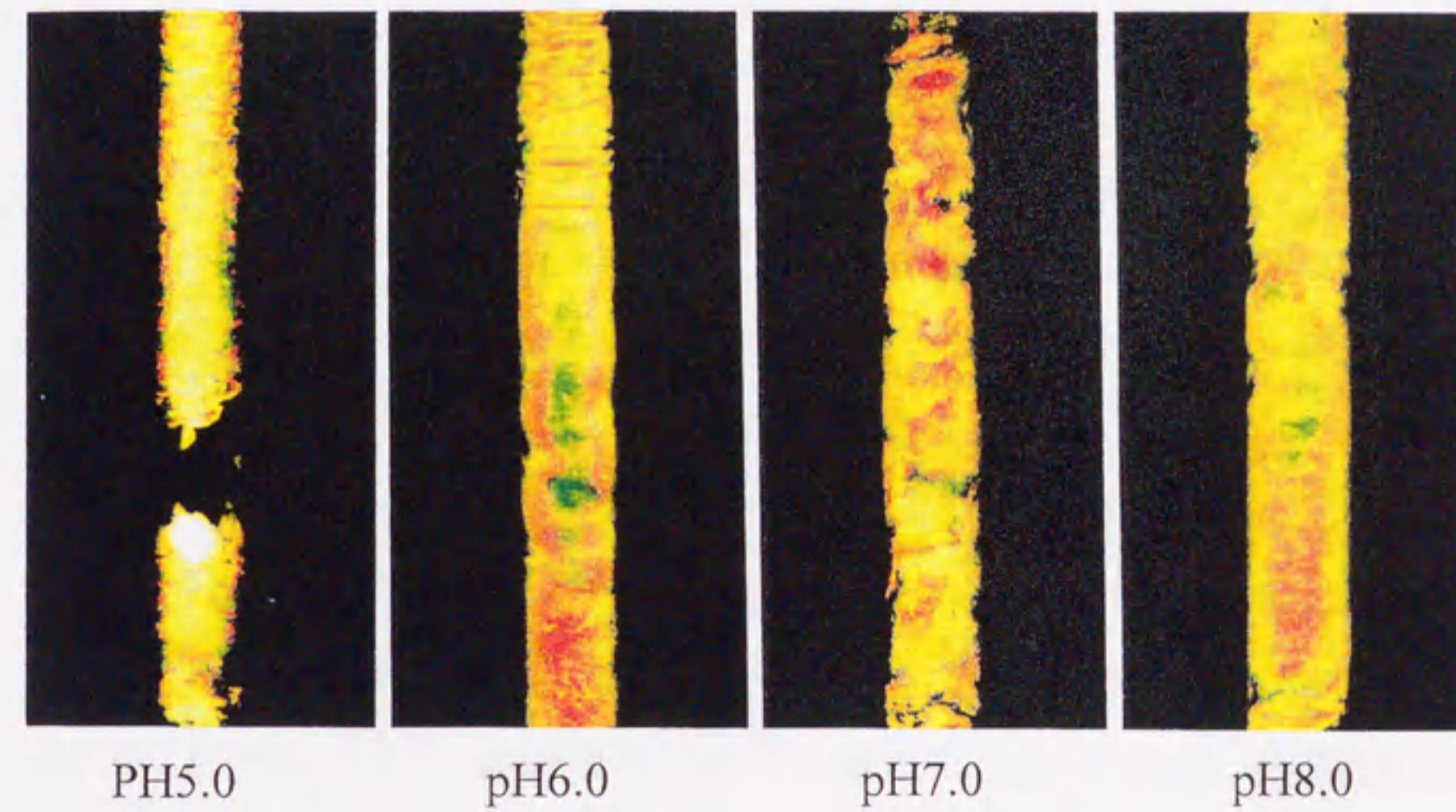


図 4.6 50mM glycine 緩衝液の pH によるべん毛繊維ゾルの状態変化  
べん毛繊維ゾルは等電点に近い pH5 では静電的な反発力が少なく、べん毛繊維が凝集し分離を起こしている。

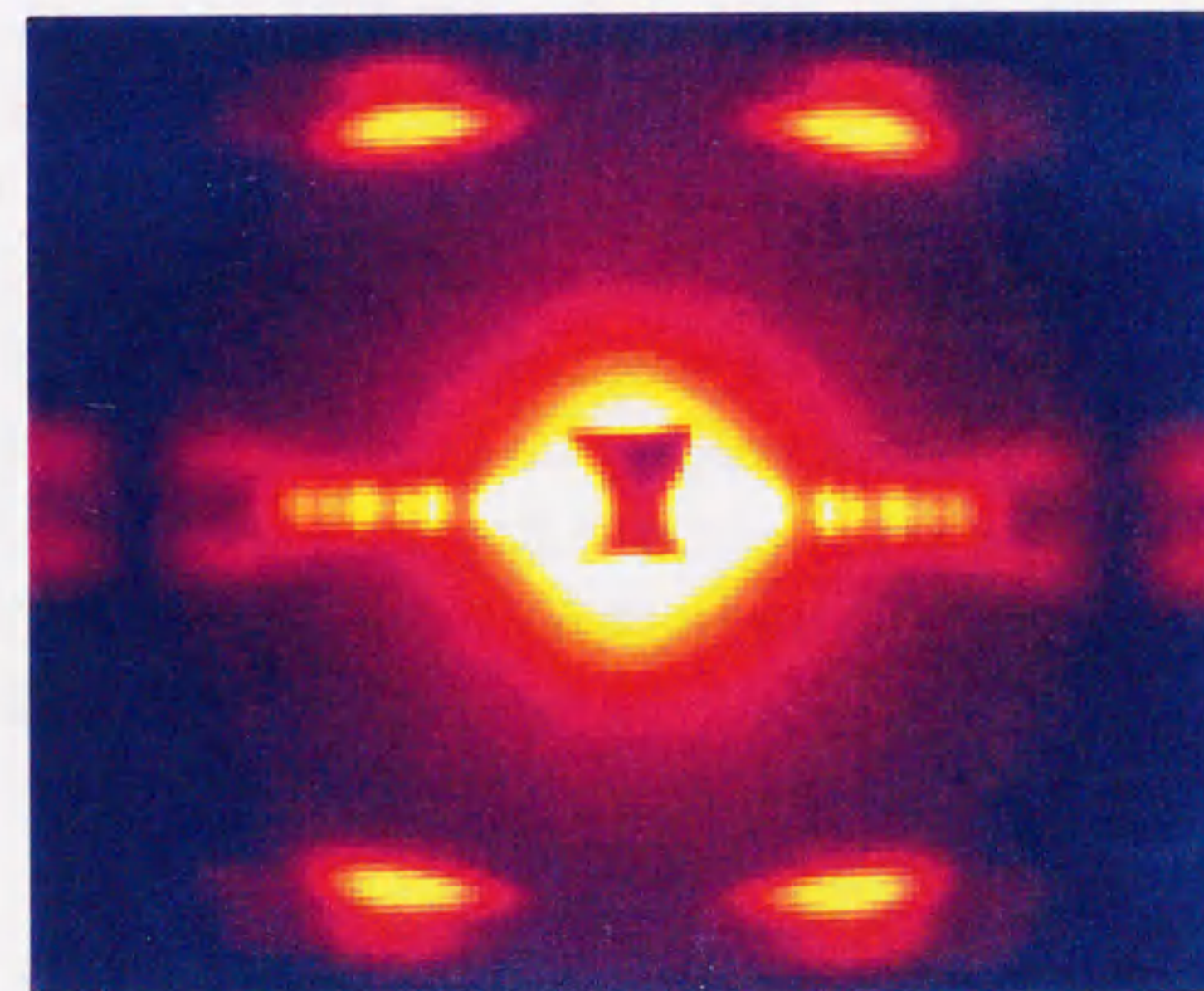


図 4.7 凝集状態のべん毛繊維ゾルのX線回折像に生じるサンプリング効果  
赤道上に繊維の配列格子によるサンプリング点が見られる。サンプリング点の位置から六方格子を作っていることが示された。格子定数は 34nm である。回折像の分解能は子午線方向が約 25 Å、赤道方向が約 20 Å である。

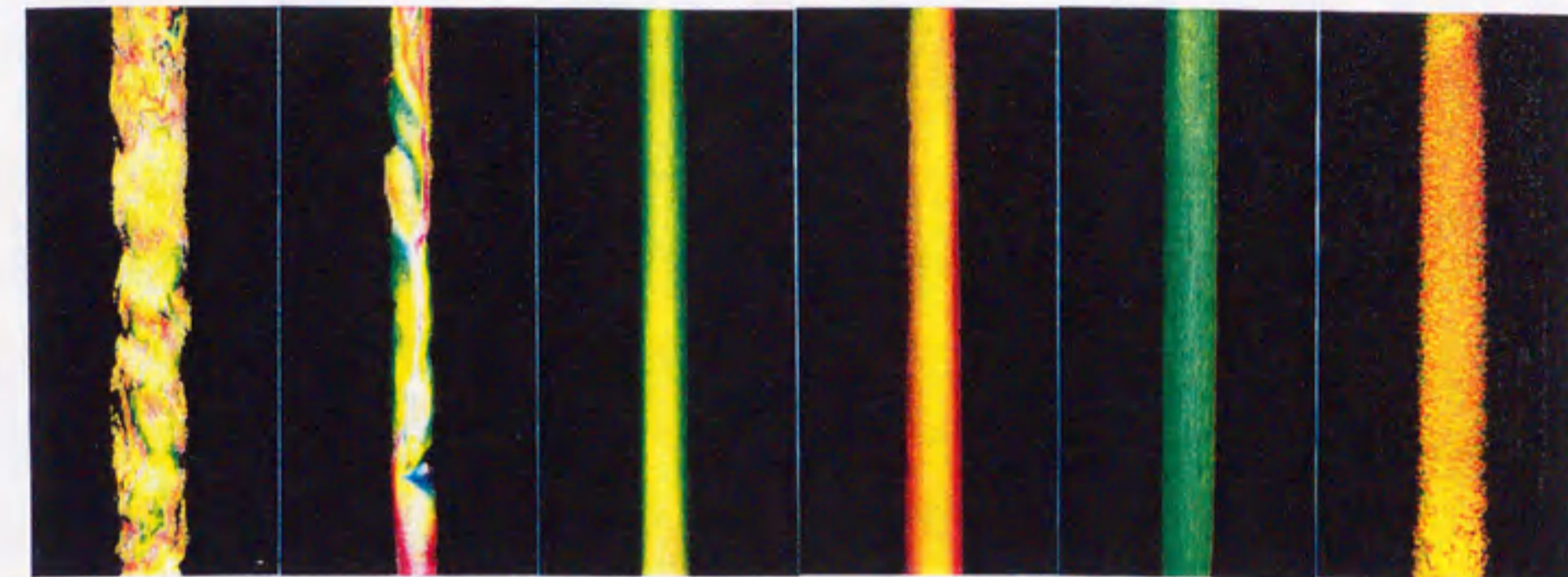


#### 4.3.2.2. 塩による吸着力、反発力の調整

べん毛繊維の凝集を抑制して液晶化するため、塩の添加による静電相互作用のシールド効果を検討した。図 4.8 は 50mM glycine-酢酸 pH5.0 の緩衝液中のべん毛繊維に塩として NaCl を 10~200mM 添加した場合のキャピラリー中ゾルの偏光顕微鏡 45 度位での観察結果である。緩衝液として H5.0 を用いたのは正味電荷の反発力が少なくなり、繊維間距離がより近くなるため最終到達配向度が高くなると予測したからである。凝集体であったべん毛繊維ゾルは、10mM の NaCl 添加により液晶状態に変化した。30mM の NaCl を添加したゾルでは流動性が高く、消光状態も良い液晶状態となった。このゾルは通常の視認でも、塩のない場合の白濁した凝集状態から透明なゾルに変化することが観察された。この液晶状態は 100mM 程度の塩濃度まで安定に観察されるが、200mM を越えるとゾルの中に粒状の構造が多数見られ、通常の視認でもゾルの白濁が観察された。

この塩による液晶化の効果は、NaCl だけではなく、他の塩、LiCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、硫酸アンモニウムでも同様に得られた。図 4.9 はべん毛繊維ゾルを液晶状態にするこれらの塩の濃度範囲を示している。1価のイオンでは、塩濃度は 10~100mM の範囲で、2 価のイオンでは 5~50mM の範囲で液晶化の効果が得られた。特に大きな効果が得られる塩は無く、この一価と二価のイオンにおける効果の差は、イオン強度換算すると等価と見なされることから、この塩添加による凝集体を解消する効果は、静電的相互作用をシールドすることによると推測される。以上の結果からべん毛繊維の凝集が何らかの静電的な相互作用と関係あると思われる。しかしこのコロイド結晶の成因はまだ不明である。





0 mM    10 mM    30 mM    50 mM    100 mM    200 mM

図 4.8 NaCl 濃度のべん毛繊維ゾルの液晶状態への効果  
50mM glycine-酢酸 pH5.0 緩衝液に NaCl を添加した。NaCl の添加によりべん毛繊維ゾルはらせん形の凝集体から液晶状態に変化する。また 200mM 以上の NaCl の添加はべん毛繊維の粒状の構造を作り凝集を生じた。

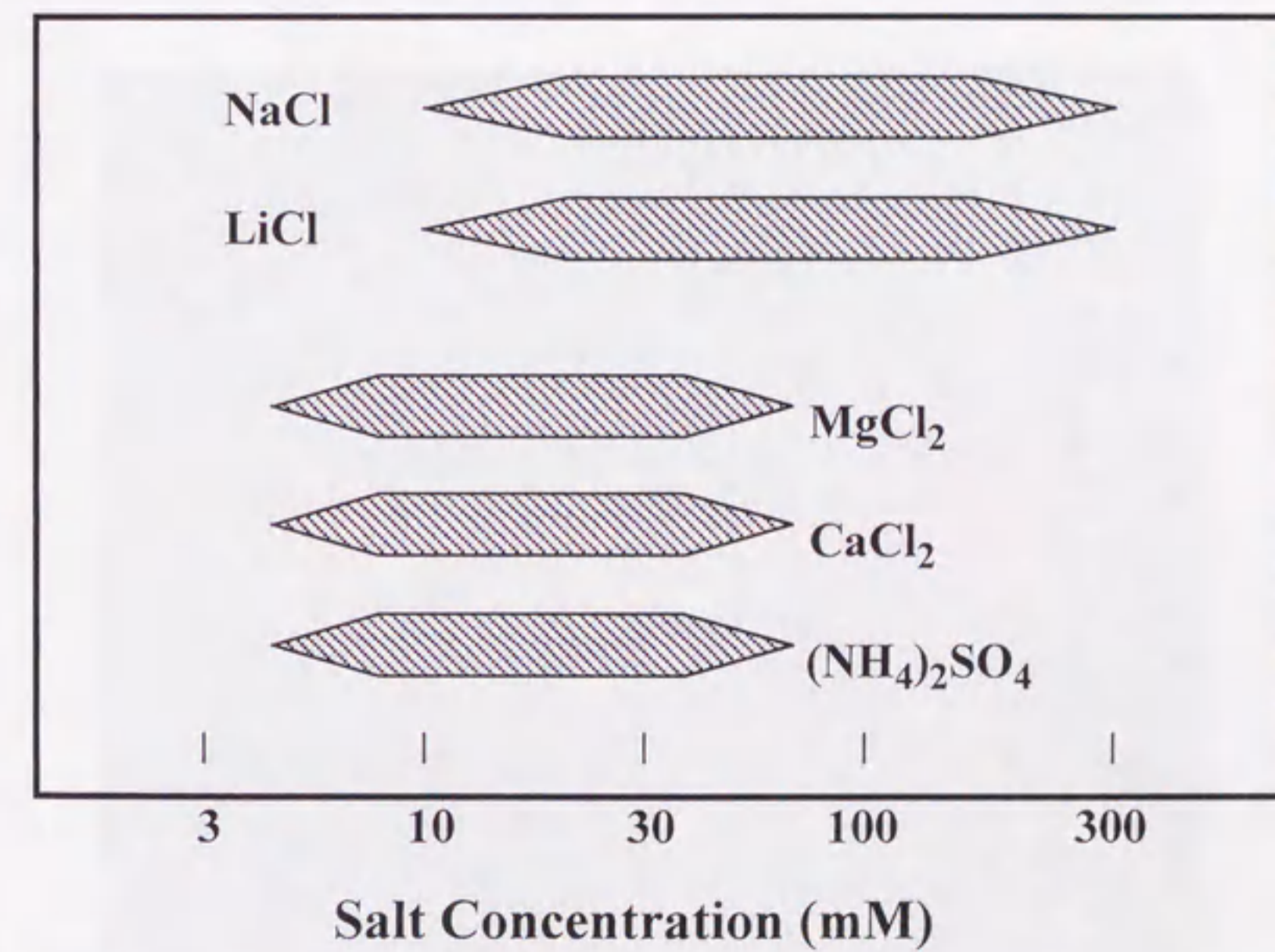


図 4.9 べん毛繊維ゾル液晶化に有効な各種塩の濃度  
各種塩におけるべん毛繊維ゾル液晶化に有効な濃度範囲を示す。二価イオンは一価イオンより効果が大きく、ほぼ半分の濃度で同等な効果を示す。



#### 4.3.3. べん毛繊維液晶ゾルからのX線回折像

これまでの検討した条件で最も良好な液晶である、50mM glycine-酢酸 pH5.0 に 30mM NaCl を加えた緩衝液中の約 100mg/ml 濃度のべん毛繊維液晶ゾルを、0.7mm のキャピラリーに吸入してX線繊維回折像を記録した。図 4.10 にその結果を示す。X線回折像は元の回折像を逆空間に変換し円対称のバックグラウンドを差し引いたものであり、キャピラリーとべん毛繊維軸は図中で垂直方向である。べん毛繊維ゾルは液晶状態になることで配向度が高まり、X線回折像は層線が分離し始めている。しかしまだ繊維の配向が不十分で、子午線から離れた層線が密な部分ではそれぞれの層線は重なり合ってぼやけた太い層線となっている。この回折像の解析の結果、べん毛繊維の配向分布角は約 3 度であった。

この程度の配向度のX線回折像では目標の1度に及ばず、低分解能の構造解析しか行えない。高分解能の構造解析を進めるためには、さらに配向度を高める必要がある。しかしこのゾルの配向度は、タンパク濃度約 100mg/ml、平均べん毛長 300

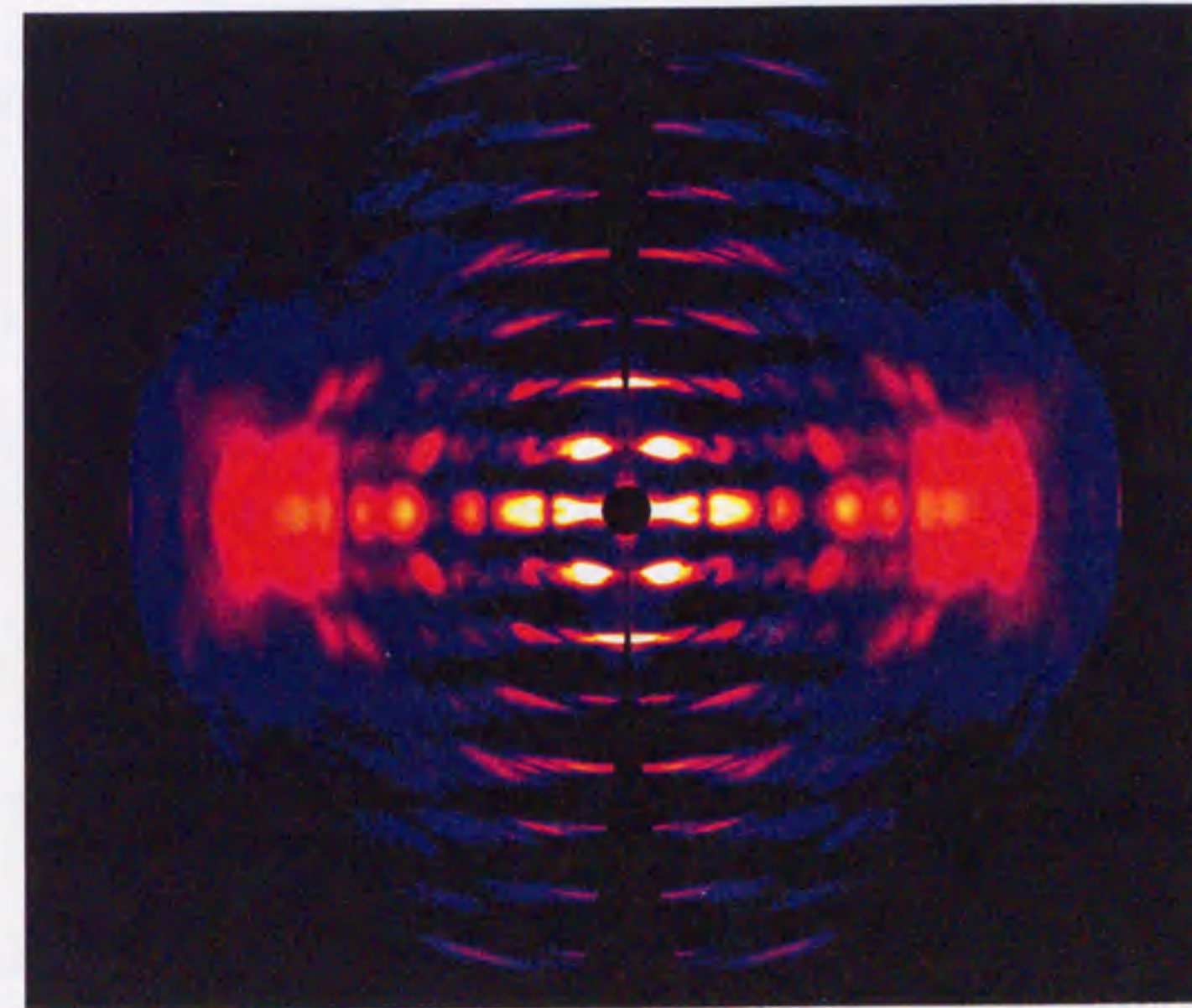


図 4.10 液晶状態べん毛繊維ゾルから得られるX線繊維回折像 50mM Glycine pH5.0 に 30mMNaCl を加えた緩衝液で液晶化されたR型べん毛繊維 から得られた回折像。分解能 6 Åまでを示している。



～500nmと、緩衝液が 50mM glycine-酢酸 pH5.0、塩が 30mM NaCl という条件で実現される液晶状態で決定されるものである。そのため、この状態からゾルの配向度を高めるためには、液晶状態を変えるか、外力によらなければならない。

#### 4.3.4. 遠心濃縮

始めに液晶状態を変えて高配向度化を行うためべん毛繊維ゾルの遠心濃縮を行った。これは排除体積効果を利用するもので、図 4.11 にその原理を示した。べん毛繊維が理想的な剛体であれば、遠心によりべん毛繊維密度を高くすることにより、個々の繊維はその周りにある他の繊維によって軸の傾きが制限される。その結果繊維軸の配向分布角は小さくなり、液晶ゾルの配向度が向上する。

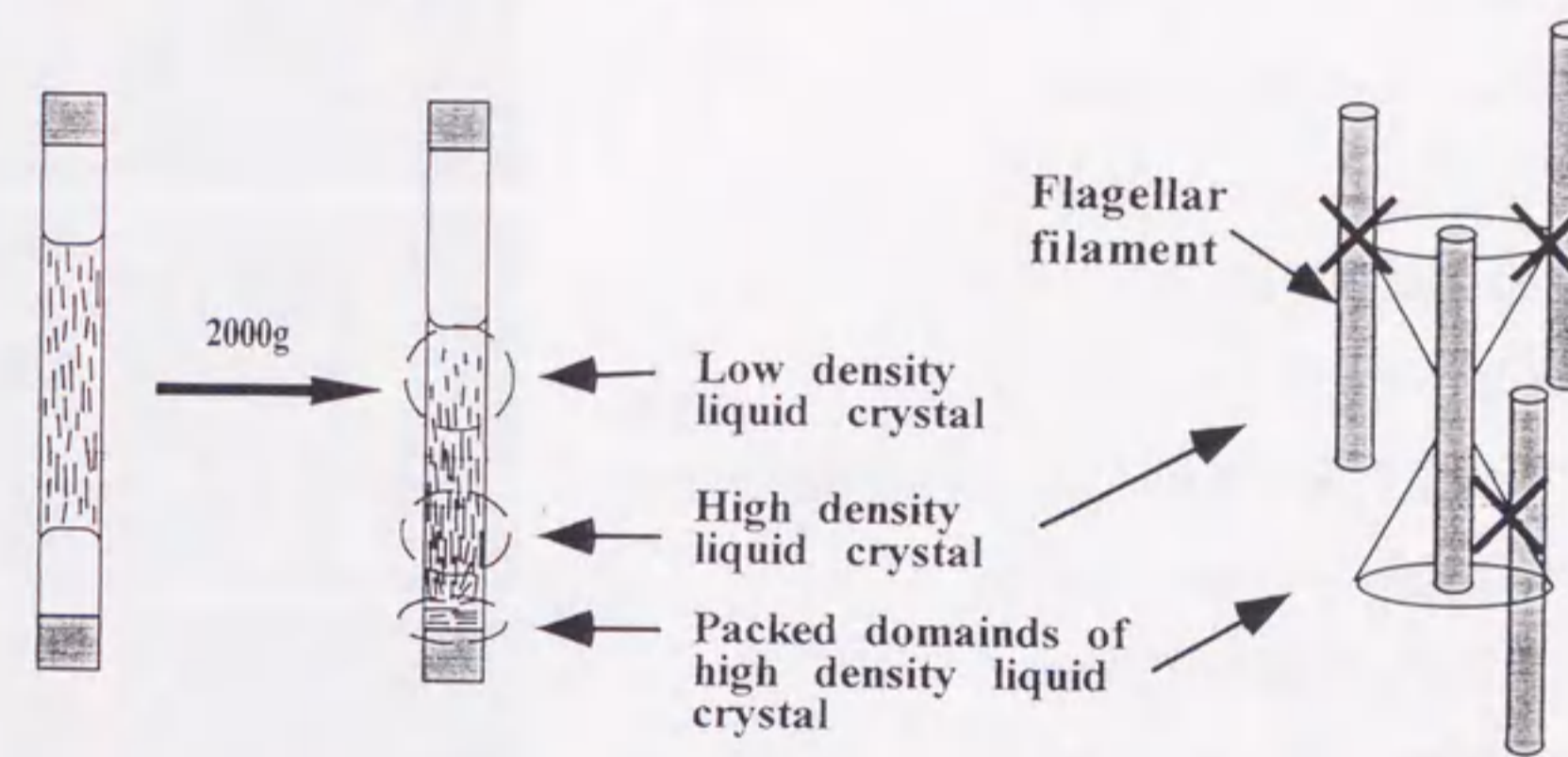


図 4.11 べん毛繊維の遠心濃縮と排除体積効果

べん毛繊維ゾルの入ったキャピラリーを遠心すると、底部では強くパックされ細かいドメインとなり、その直上では比較的高濃度の液晶相ができる。これらの部分ではべん毛繊維の排除体積効果により配向度が高くなる。

##### 4.3.4.1. 短時間遠心

まず短時間の遠心によるべん毛繊維ゾルの変化を 2000g、1分の遠心後に観察した。図 4.12 はこの結果を示したもので、短時間遠心でべん毛繊維軸が加速度方向に揃う現象が観察された。遠心直後のべん毛繊維ゾルは一様でなく、偏光顕微鏡

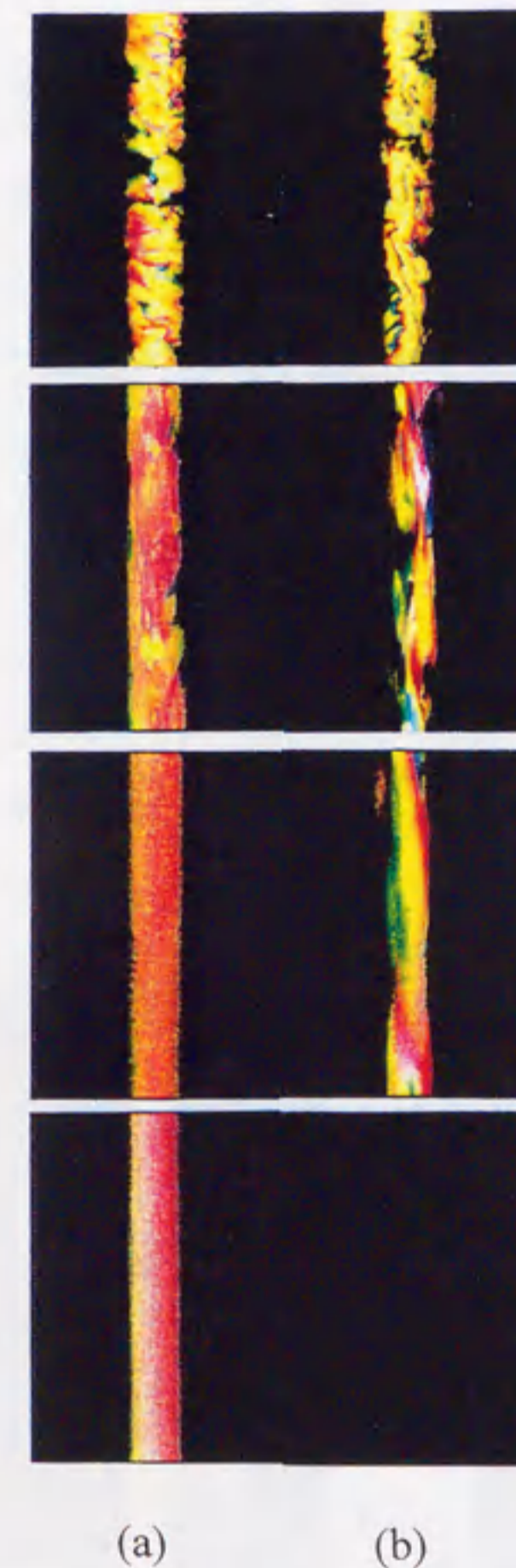


下で遠心方向に筋状の構造が観察される。しかしこの筋状の構造は遠心の数十分後には消失してゾル全体が一様となり色彩も一色となる。そして8時間後には完全な消光状態が観察された。この現象は加速度を 200g まで少なくとも観測された。

べん毛繊維軸が遠心加速度方向に揃う原因として、キャピラリー管壁からの

影響も考えられるため、アングルロータを用いて加速度方向を斜め方向にした実験も行った。この場合もべん毛繊維軸は遠心方向に揃う。ただしその後充分時間が経過し、ゾルが一様状態に達すると繊維軸は遠心方向に関係なくキャピラリー軸に平行に配向し、単一ドメインの液晶となった。

以上の実験結果は、遠心によってわずかな距離だがべん毛繊維が沈降したために、準安定になっている液晶状態が崩れ、ドメインが融合して均一でより安定な液晶状態に移行した現象と思われる。そして均一で単一の液晶ドメインとなった後は、ガラス壁とべん毛繊維の相互作用により繊維軸はキャピラリー壁に平行に配向したと考えられる。このことは、短時間遠心がべん毛繊維ゾルの液晶ドメインの融合に有効で、小さな液晶ドメインが集



遠心前

1 分間の  
遠心後

遠心後  
30 分間経過時

遠心後  
8 時間経過時

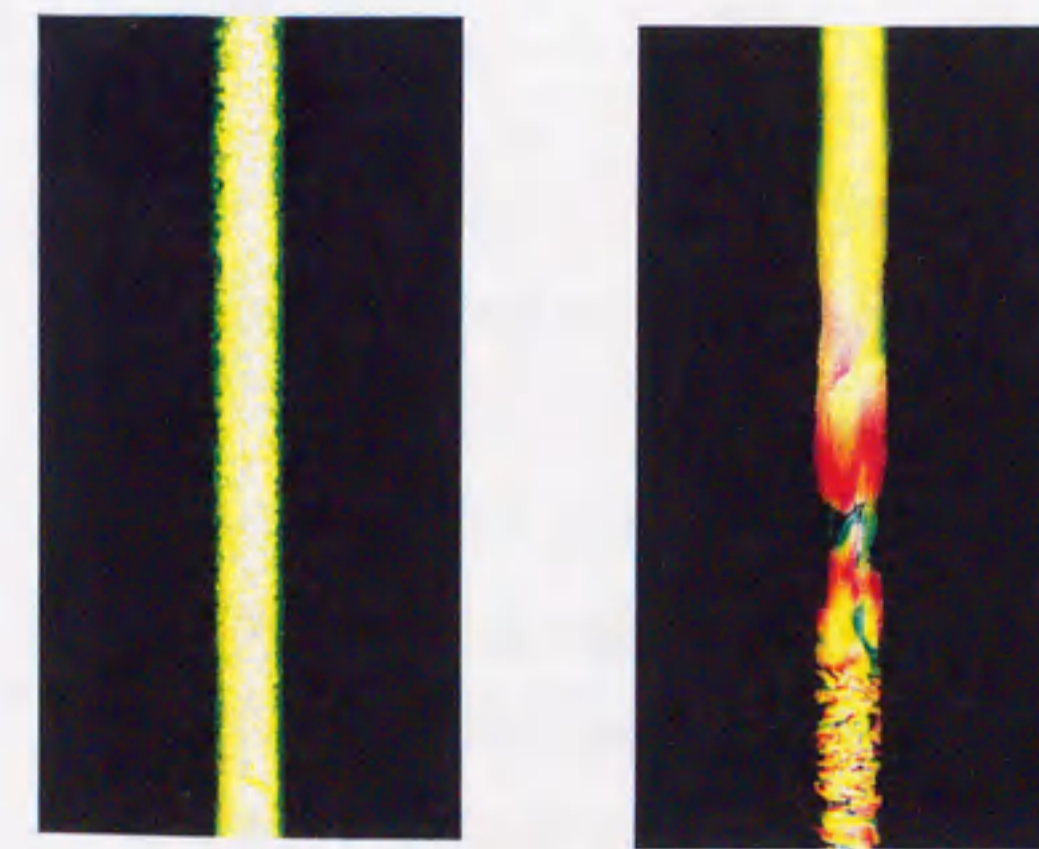
図 4.12 短時間遠心による液晶化と単一ドメインの形成  
べん毛繊維ゾルを 2000g で1分間遠心した後の偏光顕微鏡写真を示している。(a)は45度位、(b)は消光位での観察である。遠心前の乱れた液晶ドメインが1分の遠心で配向を始め約 8 時間後には単一のドメインとなり、消光位では完全に消光する。



まったべん毛繊維ゾルの場合でも単一ドメインにできることを示す。しかし同時に管壁の影響があることは、配向分布角1度以下の極めて高配向度の液晶を実現するためにはキャピラリー管壁の平行度も充分高くなければならないことを示している。

#### 4.3.4.2. 長時間遠心

さらに排除体積効果による高配向度化を得るため、上記のように短時間の遠心で液晶ドメインが融合し一様化したゾルを、加速度 2000g で長時間遠心濃縮した。この時のゾルの変化は次のようになった。まず数時間の遠心で底部の干渉色に変化し繊維の濃縮が観察される。そして 10 時間以上の遠心で底部にパックされた細かい約 0.1~0.2mm のドメインが出来始める。さらに遠心を続けると、これらの細かいドメインの層が成長し、最低部はドメインが圧縮されつぶされて、その上にややゆるくパックされたドメイン群、その上には濃縮された液晶層が形成される。このドメインがつぶされた最低部は強くパックされていて遠心後、放置してもドメインの融合や繊維軸の再配向は起こらない。図 4.13 は、長時間遠心の前後の代表的な偏向顕微鏡写真である。遠心後のゾル底部にある細かいドメイン内や濃縮された領域では排除体積効果により



遠心前

遠心後

図 4.13 長時間遠心前後のべん毛繊維ゾル  
2000g で 20 時間の遠心による代表的ゾルの変化  
を示している。偏光顕微鏡45度位観察である。

高配向度が期待できる。そこで図 4.14 に示すように、長時間遠心後のべん毛繊維ゾルの矢印部分(a)~(c)からのX線回折像を記録した。その結果、上部の希薄液晶 (a) からのものは層線分離が悪く、中間の濃い一様な液晶層 (b) からのものが最も層線分離が良くなり、底部 (c) では再び層線分離が悪くなった。こ



こで(b)での配向分布角は1.7度である。これは中間の様な液晶層では直径0.7mmのキャピラリー内の繊維ゾルが直径約0.1mmのX線ビームを回折するが、その回折を起こす領域全体が均一なドメインとなっているため繊維軸が揃っているのに対し、底部ではその回折を起こす領域内に繊維軸が揃っていない多数の細かいドメインが有るためと考えられる。すなわち底部では一つ一つのドメインからの層線分離は良いが、全体としてはドメインの配向が悪く層線分離が悪くなっていると考えられる。そこで高配向度が達成されていると考えられる底部のドメインの繊維軸をそろえることができれば層線分離の極めて良いX線回折像が得られると期待できる。

#### 4.3.5. 高濃度液晶ドメインの配向

高濃度液晶ドメインの配向手段として、ラビング法、電場あるいは磁場の印加が考えられる。この内ラビング法はPETを用いた強力な方法が最近報告されているが<sup>58)</sup>、べん毛繊維ゾルに対しては効果が無かった。これはべん毛繊維のサイズが大きすぎるためと考えられた。そこで、電場、磁場による配向を試みた。

##### 4.3.5.1. 電場による配向

まず電場による配向を試みた。白金電極をべん毛繊維液晶に挿入し、数kHz～数百kHzの交流電場を印加した。交流電場により水の電気分解による気泡の発生は無かったが、電圧を高くするに従って溶液に流れるわずかな電流により温度が上昇し、べん毛繊維ゾルは透明な溶液となった。これは温度の上昇によりべん毛繊維が脱重合したと思われる。温度上昇を抑制するためには、流れる電流を抑制すればよいので、ゾル作製の溶媒を純水に置換すればさらに印加電場を強められる可能性がある。しかしそのような条件ではべん毛繊維ゾルは液晶状態にならず繊維は凝集体を形成し、高濃度液晶ドメインが形成できない。このような基本的な問題のため、電場によるべん毛繊維ゾル配向は有効でないと判断された。



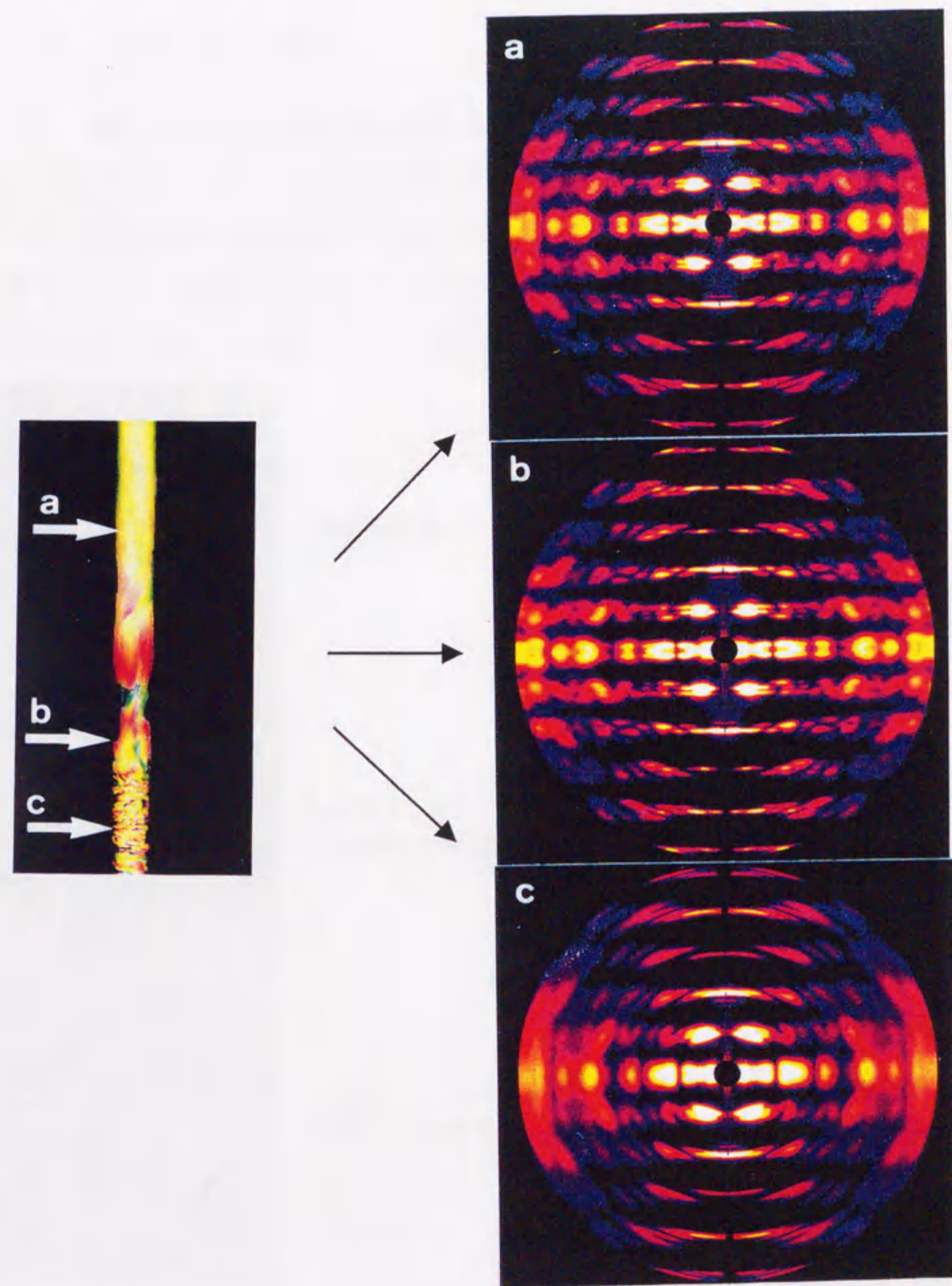
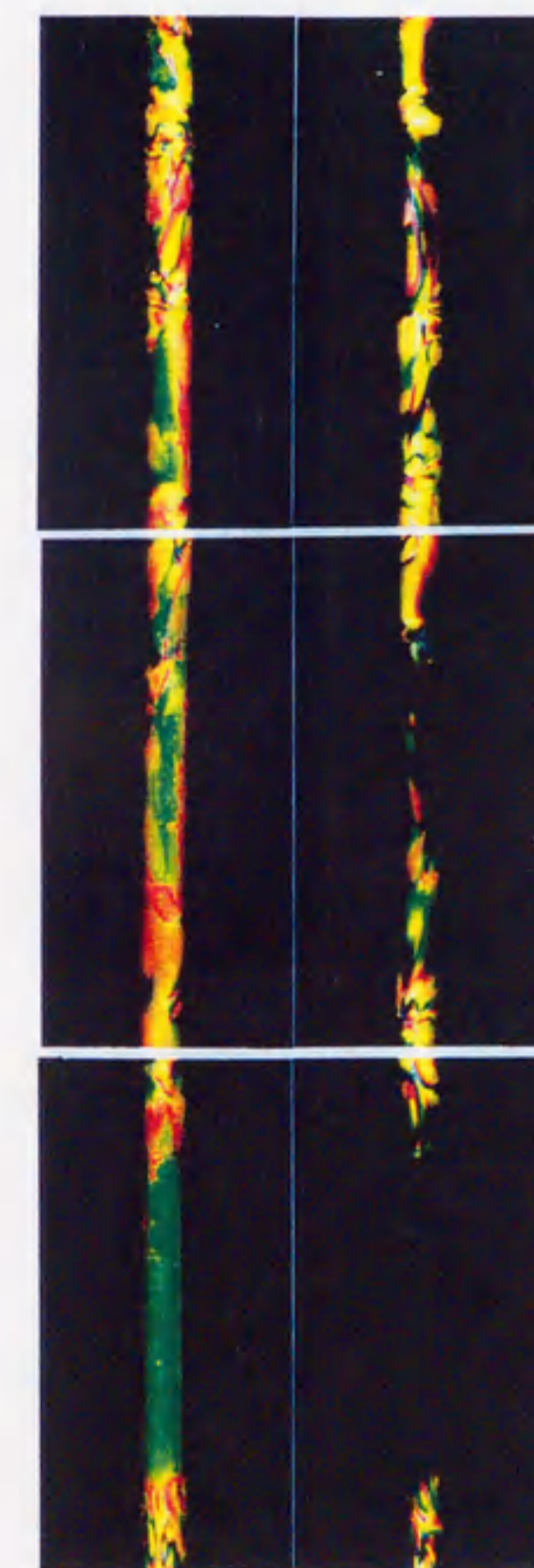


図 4.14 長時間遠心後のキャピラリー中ペン毛繊維ゾルと各部からのX線繊維回折像  
 偏光顕微鏡像においてキャピラリー方向は偏光子に対し45度位である。またX  
 線回折像はペン毛繊維軸が垂直で、分解能は 10 Å までを示している。  
 最も回折像の層線分離がよい(b)の領域での配向分布角は1.7度であった。



#### 4.3.5.2. 磁場による配向

磁場による配向はべん毛繊維ゾルの 1 テスラの磁場中処理実験でその有効性が示された<sup>34)</sup>。図 4.15 は液晶状態のキャピラリー中べん毛繊維ゾルを磁気回路に入れ、中心部分だけをキャピラリー軸に平行な 1 テスラ磁場に数時間置いた時の変化を示している。磁場印加された中心部は各ドメインの繊維軸が揃って融合し、2 時間後にほぼ均一になった。図 4.16 は、この磁場印加部分と、その外の部分からの X 線回折像で、垂直方向が磁場方向である。磁場印加部分の回折像は水平方向に層線が分離し、べん毛繊維軸が磁場方向に配向したことを示している。これはべん毛繊維の反磁性に起因する磁氣的異方性により液晶ドメインの繊維軸がそろえられた結果と考えられる。



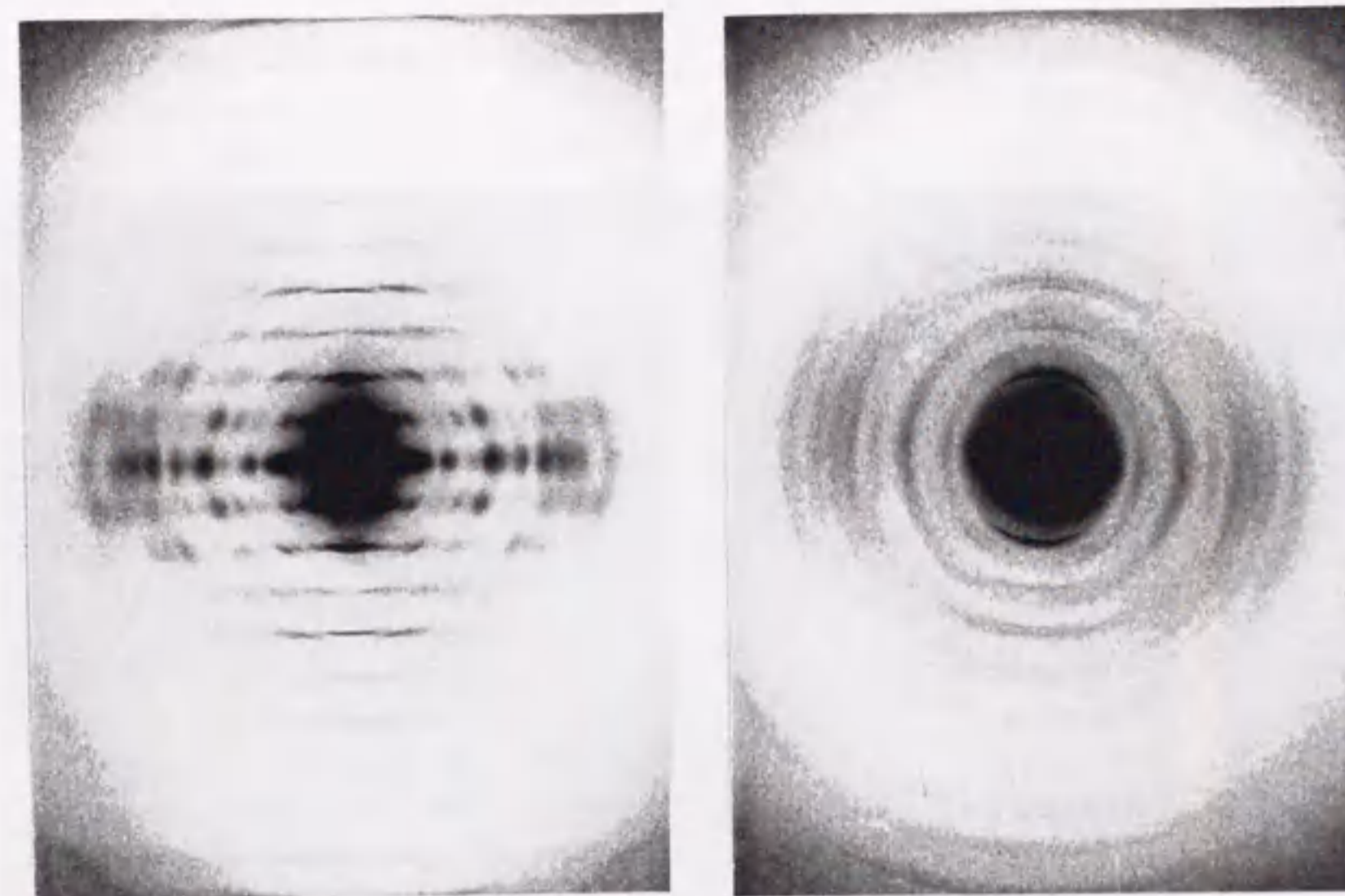
(a) (b)

図 4.15 1T 磁場によるべん毛繊維液晶の配向  
キャピラリー中べん毛繊維ゾルの中心部に 1T 磁場を印加した場合の変化を示す。(a)45 度位、(b)消光位での観察結果を示す。

一般にタンパク質はペプチド結合や芳香環による反磁性を持つが、1 分子の磁氣異方性と印加磁場によって発生するトルクは、たとえ 10 テスラの磁場を印加しても熱エネルギーによる回転拡散トルクに比べて極めて小さい。そのため実際に磁場配向の効果が現れるには、多数のべん毛繊維が物理的に相互作用しているドメイン形成と回転を許す流動性が必要である。液晶化されたべん毛繊維ゾルはこの 2 つの条件を満たしており、その結

晶化されたべん毛繊維ゾルはこの 2 つの条件を満たしており、その結





(a) 1T 磁場中処理

(b) 磁場中処理無し

図 4.16 1 テスラ磁場配向効果

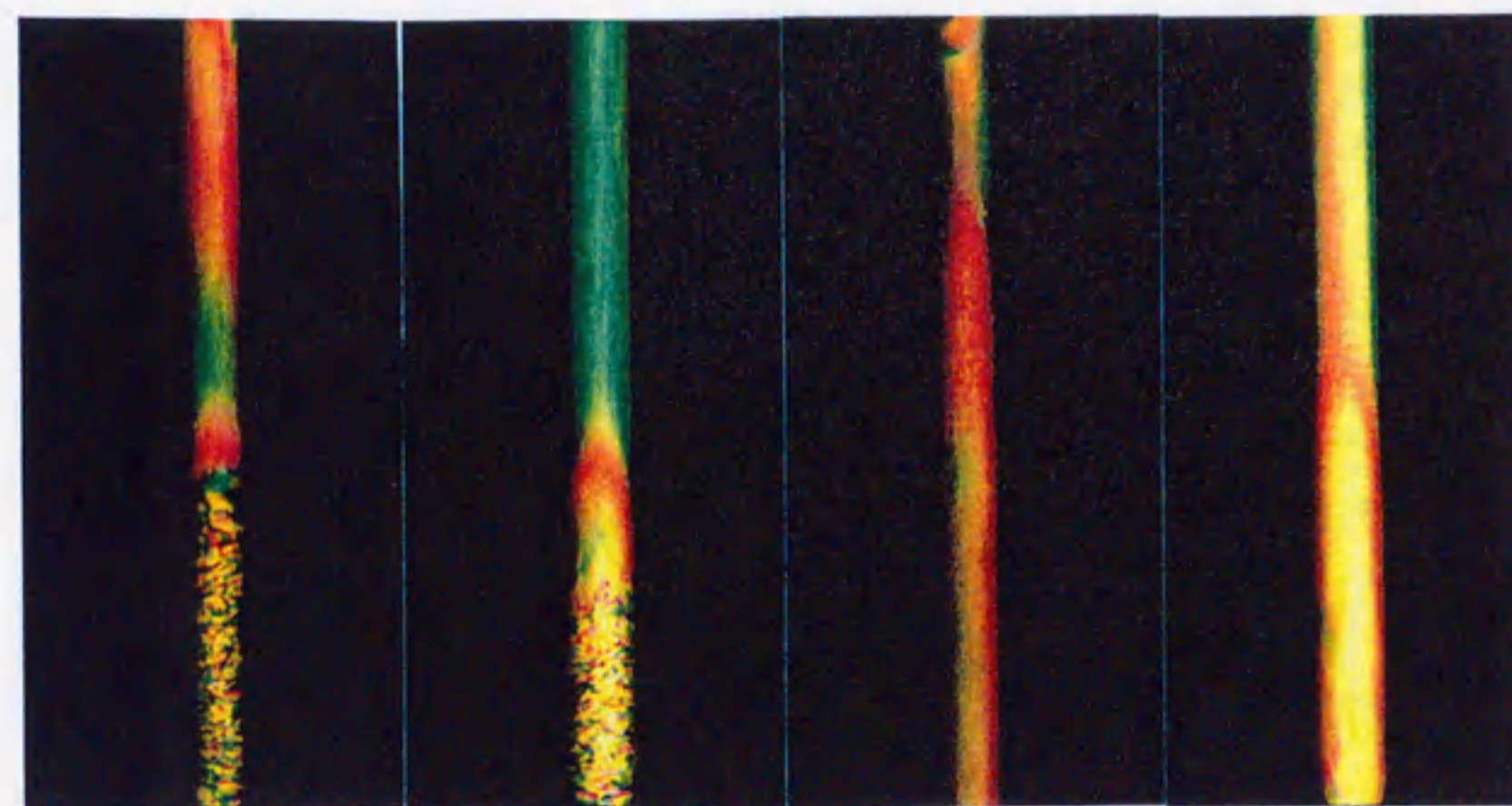
同一キャピラリーで、(a)は磁場中に置かれた部分、(b)はその外側の部分からのX線繊維回折像を示す。べん毛繊維はL型べん毛繊維を使用している。磁場とキャピラリー軸方向は平行で、回折像中では垂直方向である。回折像よりべん毛繊維軸は垂直方向、すなわち磁場方向に配向することが分かる。

果、磁場中の繊維は磁場配向して一様なドメインを形成したと考えられる。

磁場配向のトルクは磁場強度に比例するので、超伝導マグネットの 13.5 テスラの強磁場でキャピラリー底部の強くパックされた細かいドメインを配向させるを試みた。図 4.17 は、13.5 テスラ磁場中に置いたゾルの変化を観察した結果である。遠心直後は、底部の細かいドメイン部と上部液晶との境がはっきりと見える。2 日間の処理後にこの境が不明確になり、8 日後には底部の細かいドメインが消えて無くなる。そして 13 日後には細かいドメインの痕跡も見られなくなる。この最終状態のべん毛繊維ゾルのX線繊維回折像はきわめて良好な層線分離を見せる。図 4.18 はこの最終段階のR型べん毛繊維ゾルの X 線繊維回折像である。べん毛繊維の配向が極めて高いため層線間隔は約  $(1/425) \text{ \AA}^{-1}$  と極めて小さいにも関わらず、赤道方向で  $5 \text{ \AA}$  分解能付近まで各層線が分離して観察できる。解析の結果、配向分布角は  $0.6$  度であった。

なおここまで記述してきた一連のR型べん毛繊維高配向度化処理の各ステップでの様子を、図 4.19 にまとめて示しおいた。





磁場処理前      2日後      8日後      13日後

図 4.17 長時間遠心後のゾルの 13.5 テスラ磁場によるドメインの配向  
2000g で 20 時間遠心濃縮したペン毛繊維ゾルを、13.5 テスラの磁場中に置き磁場配向をさせた時の変化の様子を示した偏光顕微鏡写真。13日後には全体が単一のドメインとなった。

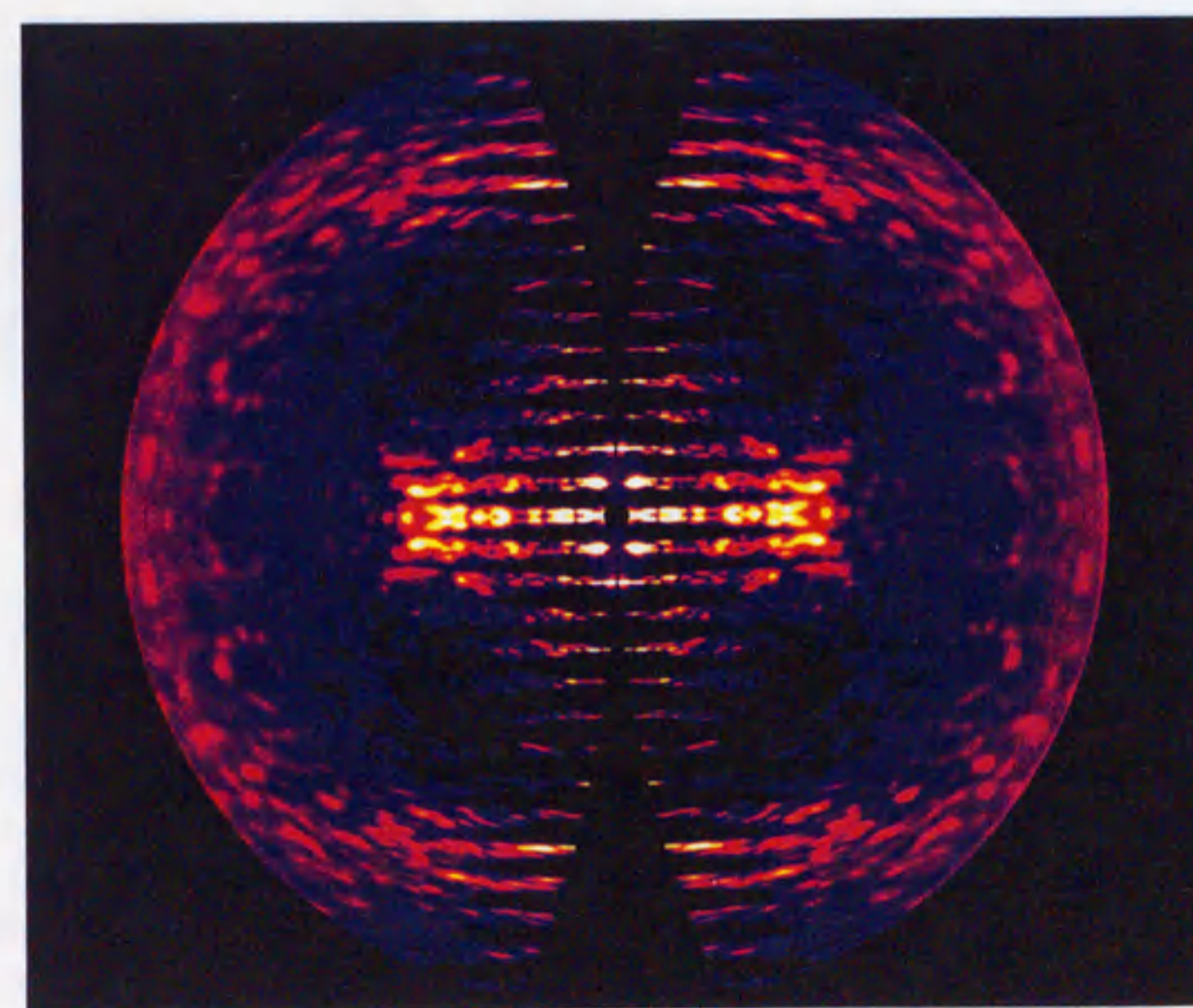


図 4.18 高度に配向したR型ペン毛繊維液晶ゾルからのX線繊維回折像  
高配向液晶ゾルのX線回折像から円対称バックグラウンドを差し引いたもので、ペン毛繊維軸は垂直方向である。分解能は 3.5 Å までを示している。



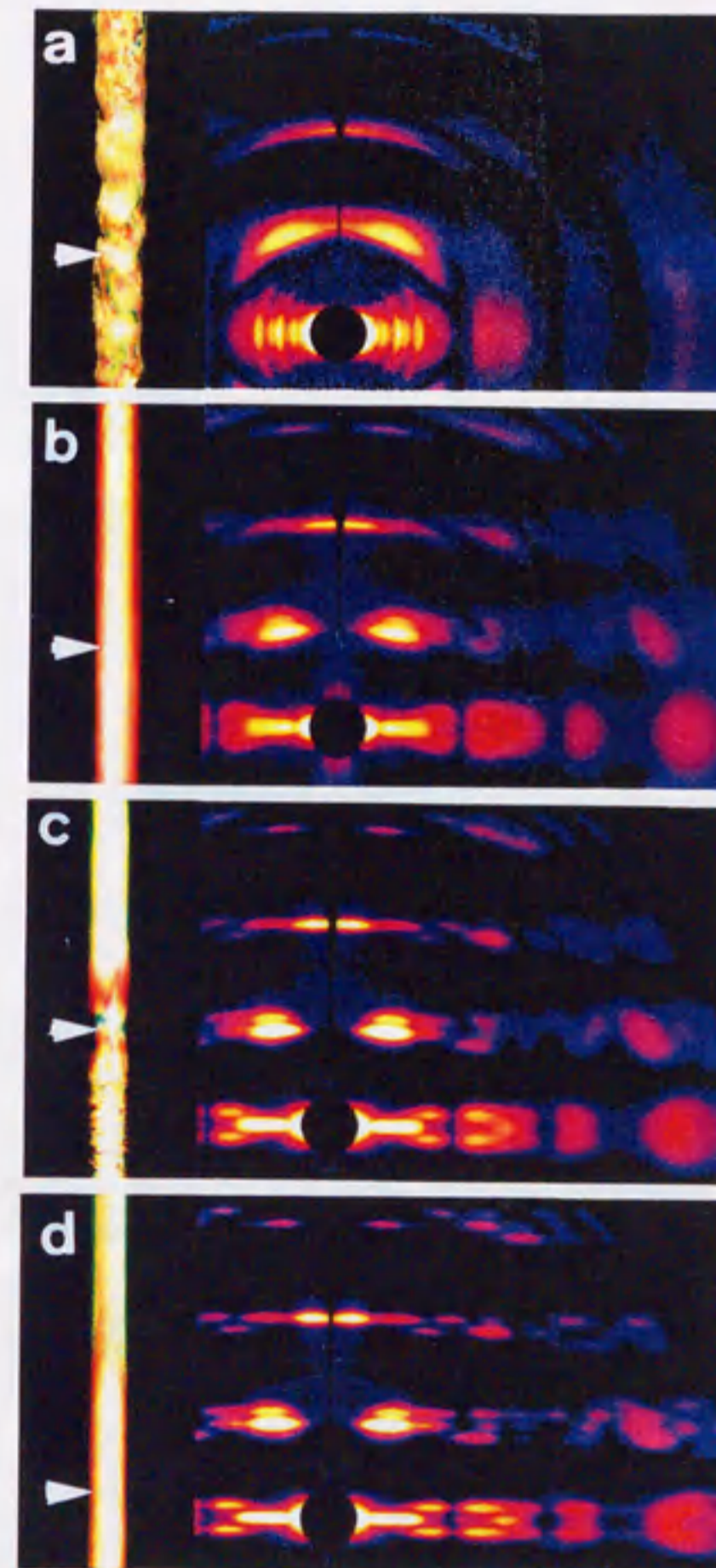


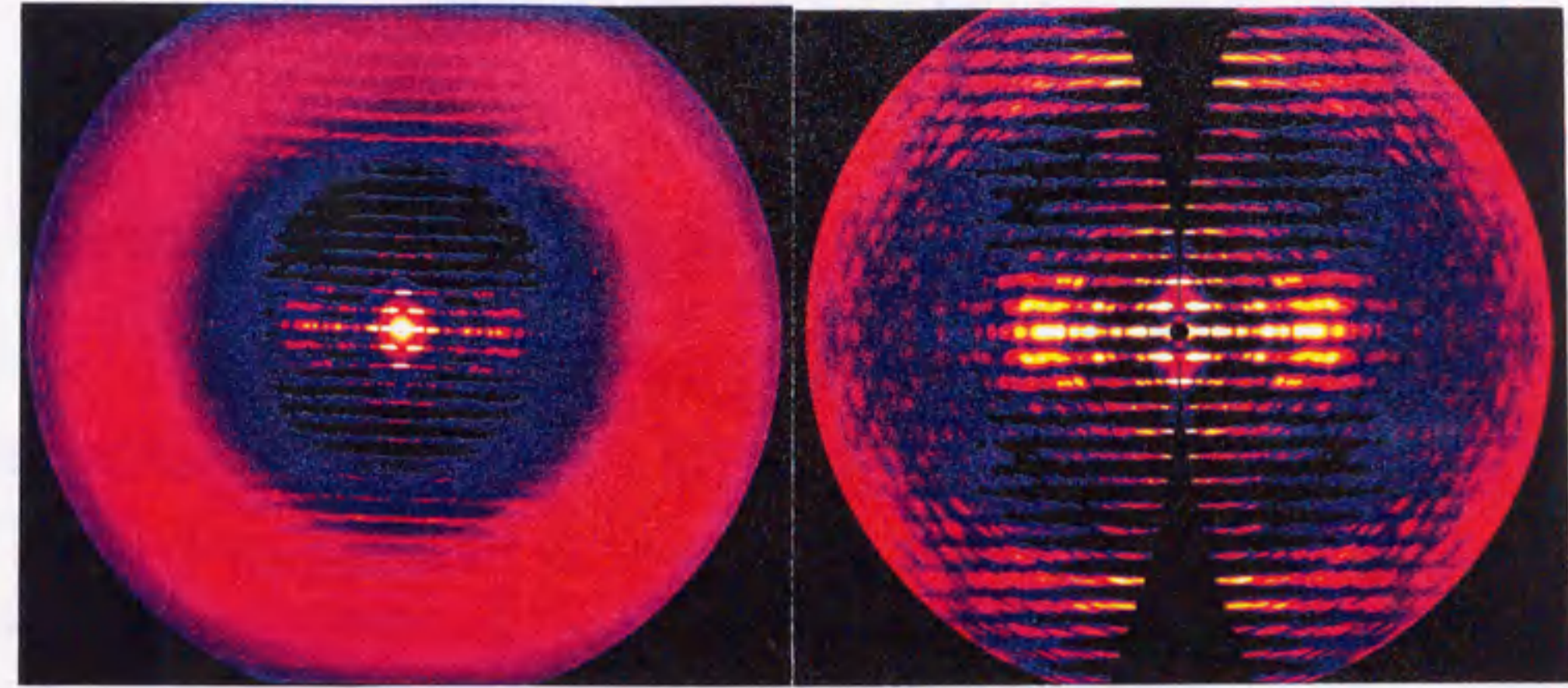
図 4.19 高配向度べん毛繊維液晶作製各ステップのべん毛繊維ゾル

左はゾルの偏向顕微鏡像で、右はその矢印部分からの12.5 Å分解能の X 線回折像である。それぞれ、(a) 塩を含まない場合で凝集体となったもの、(b) (a)に30mMNaCl を加え液晶となった状態、(c) 2000g で20時間遠心直後の状態、ただしX線繊維回折は、パックしたドメインの直上の濃縮された液晶からのもの、(d) 13.5 テスラ磁場配向後の最終状態のゾルとそれからの回折像を示している。配向分布角はそれぞれ、(a) 3 度、(b) 1.7 度、(c) 0.6 度である。

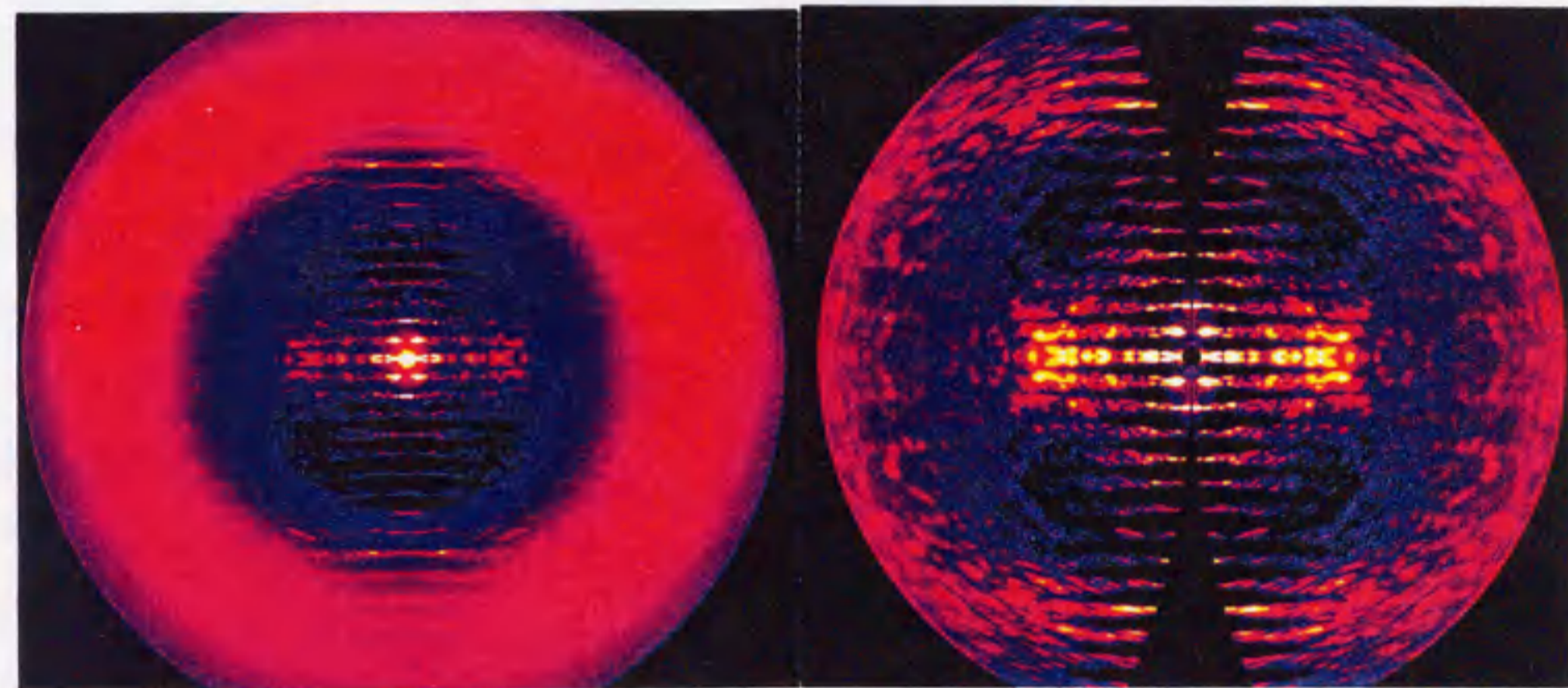
以上R型のべん毛繊維について記述してきたが、L型、Lt型のべん毛繊維でもこの手法を応用して良好な配向度のべん毛繊維が得られた。図4.20はこのようにして得られたL、R、Lt型の高配向度べん毛繊維ゾルのIPに記録された回折像と円対称バックグラウンドを差し引いたX線回折像である。3種類のべん毛繊維回折像とも層線が明確になり、べん毛繊維の配向度が高いことがわかる。なお Lt型べん毛繊維の場合は、素繊維の傾きが大きいため層線間隔が大きい。この結果から今回考案した配向試料製方法は、高配向度のべん毛繊維ゾルの作製に極めて有効であることが明らかになった。



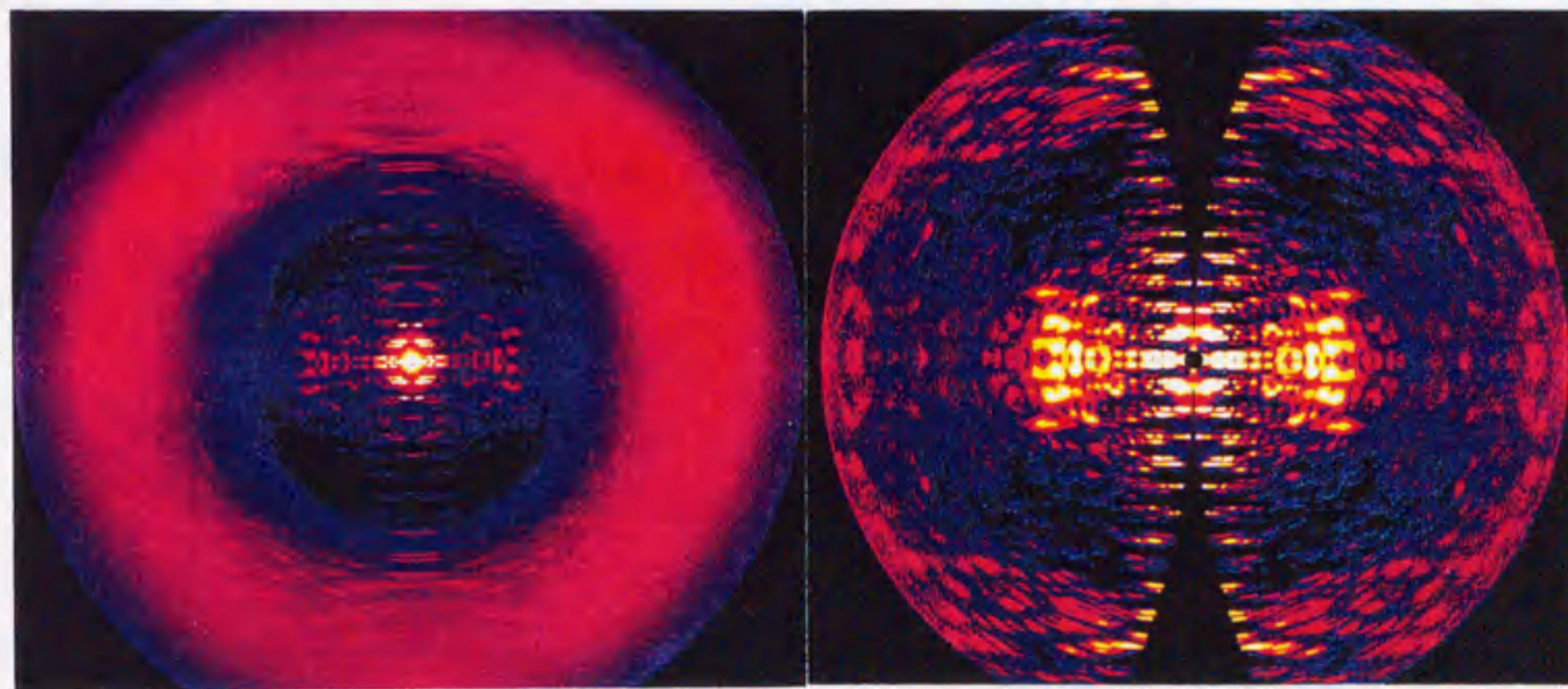
L-type



R-type



Lt-type



(a)

(b)

図 4.20 新しい方法で作製したL、R、Lt型べん毛繊維からのX線回折像  
今回開発した手法で作製した、L、R、Lt型べん毛繊維の高配向液晶ゾルからの  
(a) IP に記録されたX線繊維回折像と、(b) 円対称バックグラウンドを差し引いた回  
折像を示し、べん毛繊維軸は垂直方向である。分解能は3.5 Åまでを示している



#### 4.4. 他の繊維状タンパク質超分子への応用

これまで述べた高配向度べん毛繊維液晶ゾルの作製方法は、繊維長さと液晶化溶媒条件についてべん毛繊維ゾル特有の条件探索が必要であった。しかしそれ以外は一般的なものであり、基本的に他の繊維状タンパク質超分子にも応用できる。L型や Lt 型のべん毛繊維について応用可能であるのは当然のこと、他の繊維状超分子の高配向度な配向ゾルを得る事にも応用できると考えられる。

そこでこの手法をアクチン繊維と TMV に適用し、配向ゾルを作製してX線回折像を記録した。図 4.21 はアクチン繊維配向ゾルからのX線回折像である。アクチン繊維はゲルソリンを核として利用し、KCl を含む緩衝液で再構成し長さのコントロールを行った。緩衝液は 10mM Tris-酢酸 pH 8 + 15mM KCl を用いた。繊維の配向度は 1.5 度で、これまでに発表されているどのアクチン繊維配向ゾルからのものより配向度は高い<sup>35), 36)</sup>。このアクチン繊維はべん毛繊維に比べ液晶化自体は容易であった。液晶化の観点から見ると表面に同じ符号の電荷を多く持ち反発力の大きい繊維は液晶化が容易なので、正味電荷の多いアクチン繊維ゾルが液晶化しやすい理由はこちらにあると考えられる。

図 4.22 は TMV からのX線回折像で、緩衝液は 50mM Glycine pH5.0 + 30mM NaCl を用いた。配向分布角は 1.1 度である。TMV は自発的に液晶状態になる性質を持つが、高配向度の試料を得るには時間がかかっていた<sup>37)</sup>。実際良い回折像を得るものは20年もかかっている。しかしながら新しい方法では1~2週間で高配向度のゾルが得られた。

生物の機能において重要な繊維状超分子は多く、それらの構造を解くことはその動作機構を理解する上で重要である。今回考案した配向ゾル作製法は、比較的短時間であることや条件の探索が簡単であることから多くの繊維状超分子に応用が可能であり、繊維状超分子のX線繊維回折法による構造解析に役立つものと思われる。



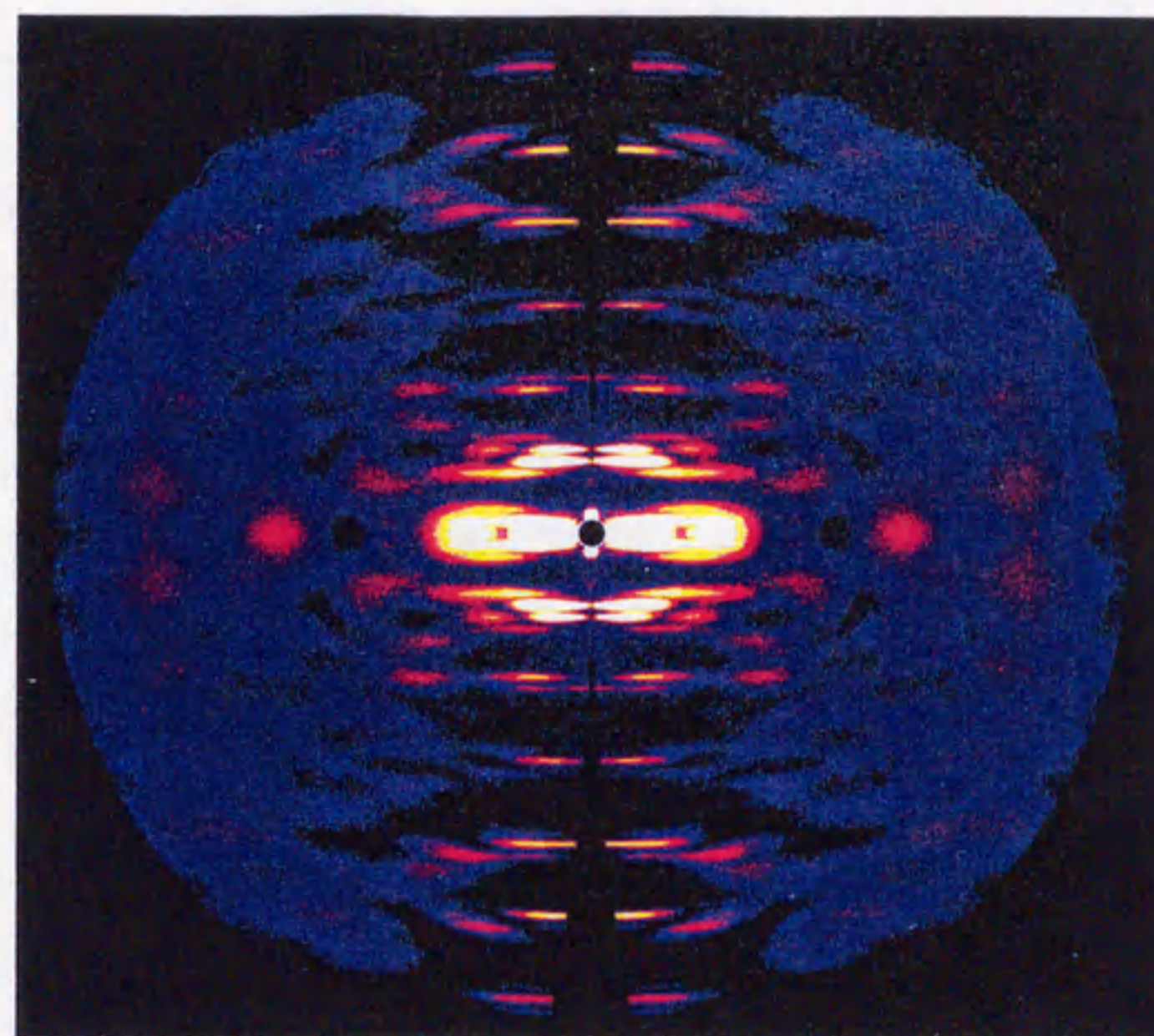


図 4.21 アクチン繊維からのX線繊維回折像  
新しく開発した高配向度ゾル作製方法により得られたアクチン繊維ゾル試料からのX線回折像を示す。配向分布角は 1.5 度である。

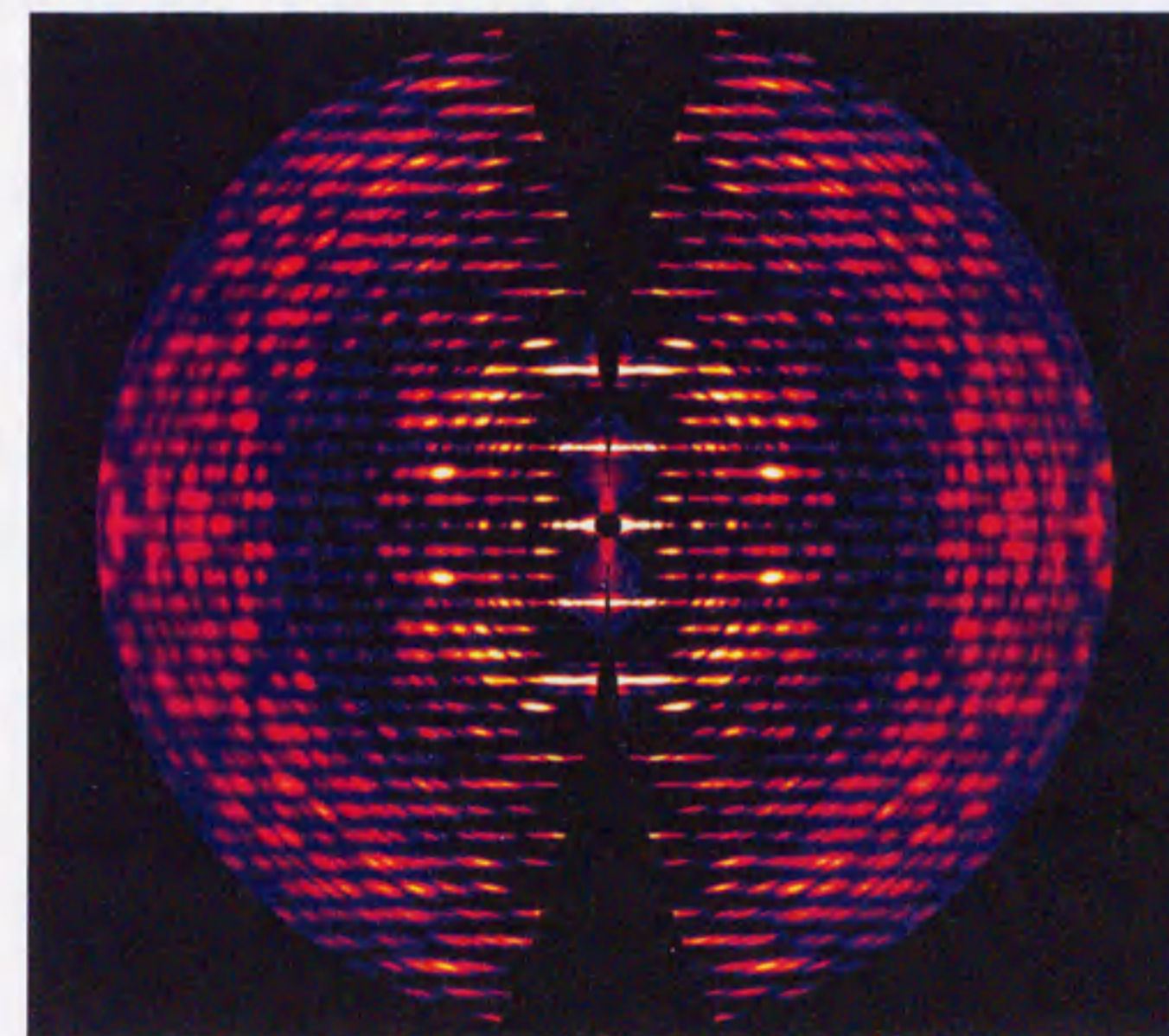


図 4.22 TMV 液晶から得られたX線繊維回折像  
新しく開発した高配向度ゾル作製方法により得られた TMV 配向ゾル試料からのX線繊維回折像を示す。配向分布角は 1.1 度である。



#### 4.5. まとめ

高配向度べん毛繊維ゾルを作製するためには以下の四点を満たすことが重要であることが明らかになった。

1. 適度な長さのべん毛繊維の作製(300~500nm)
2. 溶媒条件の選択による、繊維間反発力の制御と引力の除去
3. 遠心による液晶化の促進と高濃度化
4. 磁場による液晶ドメインの磁場配向

第1項は、繊維ゾルの高配向度処理を現実的な時間で行うため流動性を確保する観点から重要で、高配向化のためにはできるだけ長い方がよいが、同時に流動性を確保できるように繊維の長さをコントロールする必要がある。べん毛繊維の場合、適当な平均長は300~500nm、軸比15~25あった。

第2項は繊維ゾルの液晶化に重要である。繊維間引力は液晶化の妨げになる。べん毛繊維の場合は50mM glycine-酢酸 pH5.0 に約30mMのNaCl等を加えるのが最適であった。この繊維の液晶化は、後の遠心濃縮や磁場配向による高配向度化処理に必要不可欠である。

第3, 4項は繊維ゾルの高配向度化を進めるために重要な処理である。遠心することで排除体積効果によりべん毛繊維の配向度は向上するが、同時に繊維軸の揃わない細かいドメインができる。これを配向させるため磁場配向を行う。ただしタンパク質の反磁性を利用しているためトルクが小さく、過度の遠心による強いパッキングはドメインの配向を妨げる結果となるため、遠心条件を実験的に決定する必要がある。300~500nm長さのべん毛繊維の場合で2000g、20時間で遠心し、13.5テスラ中で2週間程度の磁場配向が適当と判断された。さらに配向度を向上させるためには、できるだけ遠心力を強くし、より強い磁場中で可能な限り長時間処理する必要がある。

なおこの高配向度べん毛繊維ゾルを作製する方法は、他の繊維状超分子の高配向ゾルを作製することに応用できることが明らかになった。