

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

電子顕微鏡によるべん毛繊維の構造解析は、高分解能は望めないが構造因子の振幅及び位相が同時に得られ、立体構造が得られる。そこで極低温電子顕微鏡を用いて構造解析を行っており、形態的なドメインD0~D3があることや、L型、R型、Lt型べん毛繊維の構造の特徴が明らかになってきた^{42), 47, 48)}。一方べん毛繊維ゾルの新しい高配向化手法により、層線分離の良いX線回折像が得られるようになった。この回折像からは二次元プロファイルフィッティング法により層線強度を高分解能まで精度良く抽出することが可能である。そこで電子顕微鏡の位相情報とX線繊維回折法による信頼性の高い振幅とを組み合わせれば、高分解能の立体構造解析が可能となる。この時赤道構造因子は特殊で、8 Å分解能以下では位相が0 または π しかとらないため、赤道構造因子はX線回折像の情報だけで精度よく決定できる。

X線回折像から得られた赤道構造因子からは、逆フーリエ変換してべん毛繊維の円周方向及び軸方向に平均化された半径方向の電子密度や動径質量分布を精密に求めることができ⁴¹⁾、ドメインD0~D3の質量を精度よく求めることができる。一方生化学的な実験などから、フラジェリンのアミノ酸配列の両末端部分がモノマーの時にしっかりとした構造をとらず、べん毛繊維に重合すると α ヘリックスの束が形成されることや^{49), 53)}、熱量計測定からも種々の構造情報が明らかになってきた⁵⁰⁾。そこでこれらの情報をあわせて考察することでフラジェリンのアミノ酸配列とべん毛繊維のドメイン構造との対応付けが可能となる。これによりべん毛繊維の重合や多型変換に重要な部位とアミノ酸配列の理解を深めることができる。

またX線回折像からの構造解析のためには、多くの重原子同型置換体が必要となる。そのために遺伝子工学を用いてべん毛繊維のサブユニットにシステインを導入し水銀原子を結合させることも試みた。この同型置換体の種類を増やすことは、高分解能領域で層線が重なる場合に位相をきめる時に役立つ。

5.2. 材料と方法

5.2.1. 使用したべん毛繊維とX線繊維回折用試料作製

9 Å分解能構造解析、極低温電子顕微鏡構造解析、動径電子密度分布及びシステイン導入に使用したべん毛繊維の種類とその特徴を表 5.1 にまとめて書いた。

表 5.1 使用したL、R、Lt型の直線型べん毛繊維とシステインを導入したべん毛繊維

べん毛繊維名称	R型	L型	Lt型
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	フラジェリンのN、C末端残基を限定酵素分解したもの*
べん毛繊維の形状	直線型	直線型	直線型
素繊維の傾き	右巻き	左巻き	L型よりさらに傾いた左巻き
使用した実験	・極低温電子顕微鏡構造解析 ・重原子同型置換体 ・動径質量分布決定	・極低温電子顕微鏡構造解析	・極低温電子顕微鏡構造解析

システイン導入べん毛繊維名称	S200C	S343C	S356C	G365C	G377C
突然変異導入フラジェリン	SJW1655	SJW1655	SJW1655	SJW1655	SJW1655
システイン置換アミノ酸残基	200 Ser	343 Ser	356 Ser	365 Gly	377 Gly
べん毛繊維の形状	直線型	直線型	直線型	直線型	直線型
素繊維の傾き	右巻き	右巻き	右巻き	右巻き	右巻き
使用した実験	・重原子同型置換体	・重原子同型置換体	・重原子同型置換体 ・動径質量分布決定	・重原子同型置換体	・重原子同型置換体

ここで使用した*Lt型フラジェリンはもとの菌株とアミノ酸配列番号で表して以下のものである。 SJW1103(1-486)、SJW1655(1-486)、SJW1660(1-486)、SJW1655(20-494)、SIW1655(30-452)

Lt 型のべん毛繊維は種々の酵素により SJW1103、1655、1660 のモノマーを極めてマイルドな条件下で限定酵素分解して得たものである⁴²⁾。ゆっくり進む酵素分解の進行状態は、分解の進む溶液を少量とり FPLC、陰イオン交換カラム (monoQ:ファルマシア) にかけてモニターした。NaCl 濃度を 75mM から 150mM に 5 分間で直線的に増加して溶出すると、元のフラジェリンのピークと酵素分解されたもののピークは溶出パターンで容易に分離できる。所定のフラジェリンフラグメントができた時点で酵素分解を停止させ、溶液全体を陰イオン交換カラムにて精製した。ここで使用した Lt 型のべん毛繊維は菌株とそのアミノ酸配列番号で表して SJW1103(1-486)、SJW1655(1-486)、SJW1660(1-486)、SJW1655(20-494)、SIW1655(30-452) である。このほか Lt 型としては SJW1655(1-461)、SJW1655(30-461)からのものがある。これらすべて同じらせん対称性を持っていることが示されている。^{42)、48)}

X線繊維回折用試料の作製は4章で記述した方法を用いた。また重原子同型置換体を作製する場合は 5.2.4 の方法に従った。

5.2.2. 溶媒領域平滑化法による位相改善

図 5.1 に溶媒領域平滑化法による位相改善の流れ図を示す。はじめに単純に所定の分解能までX線繊維回折像から得られた振幅と、電子顕微鏡から得られた位相を組み合わせて構造因子を合成する。ここでは9Å分解能までのデータを用いた。この時、赤道構造因子については動径質量分布の計算で用いた方法で複数の重原子置換体を利用して正しい赤道構造因子を求め、これに差し替える。(5.2.5 及び 5.3.4 参照) 次にこの得られたべん毛繊維の構造因子から電子密度像を再構成する。得られる電子密度像は位相にノイズを含むため、所々に離れた島状の電子密度が多数あるものとなる。この電子密度から、その外側の電子密度を除去するためのべん毛繊維を内部に含む包絡面を作製する。この包絡面には細かい情報は不要なので 20 Å 分解能のべん毛繊維電子密度像から計算する。すなわち 20 Å 分解能の電子密度像の外側に、包絡面が本来の電子密度を横切って必要な電子密度を平滑化しないよう、

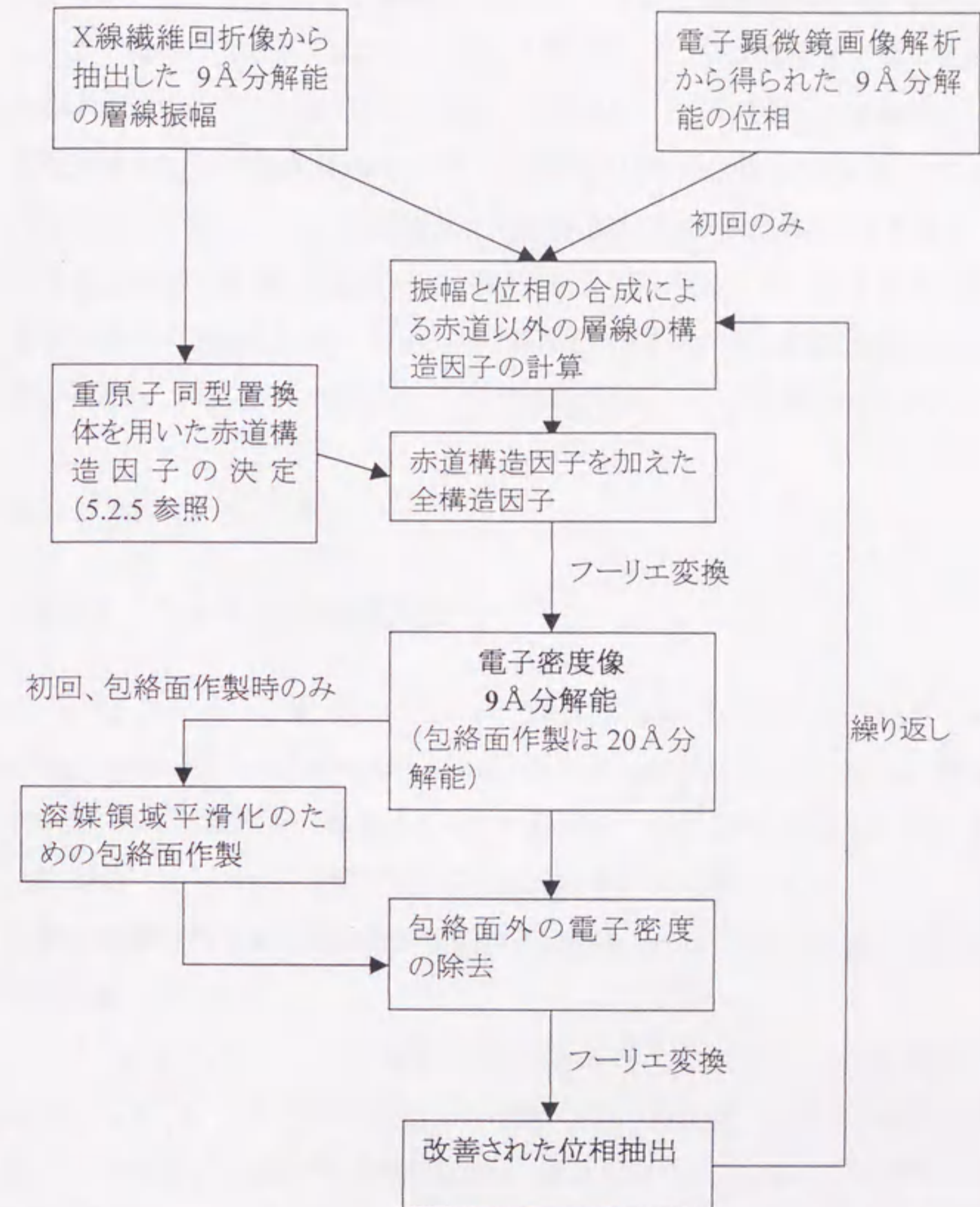


図 5.1 溶媒領域平滑化法の操作の流れ図

電子顕微鏡画像解析からの位相の使用と包絡面の作製は初回にだけ行い、約20回の位相改善の繰り返しでは行わない。また赤道構造因子は動径質量分布の計算に用いた方法で決定したものを使用した。(5.2.5 参照)

できるだけ余裕を持たせて包絡面を作成する。この包絡面の作成は初めに行い以降の作業では同じ包絡面を用いる。この包絡面を用いて、合成電子密度像の包絡面外の電子密度を除去した後、得られた電子密度像をフーリエ変換して各層線の位相情報を計算する。この位相情報はノイズ成分が除去されて改善されている。この位相を再びX線回折像から得られた層線振幅と組み合わせ、赤道構造因子を先述の正しい赤道構造因子に置換した後電子密度像を計算する。そして再び包絡面外の電子密度を平滑化する作業を行う。この一連の操作を繰り返すことにより各層線の位相の改善が行われ、20回以上の繰り返しにより位相は収束し、位相改善が完了する。

5.2.3. システイン導入

5.2.3.1. システイン導入方法

システインの導入には United State Biochemical 社の T-GEN *In vitro* mutagenesis kit と Amercham Life Science 社の Sculptor *in vitro* mutagenesis system を用いた。部位特異的アミノ酸置換のために必要な、フラジェリンの遺伝子 *fliC* を導入した M13 ファージは大沢研二氏(名古屋大学理学部)より提供していただいた。行った部位特異的アミノ酸置換の遺伝子操作の概要を、*In vitro* mutagenesis kit の場合を用いて図 5.2 に示す。

あらかじめフラジェリン遺伝子 *fliC* を組み込んだ M13 ファージを培養し、このファージよりフェノール抽出とエタノール沈殿により、1重鎖の DNA (ssDNA) を用意する。部位特異的アミノ酸置換に用いるオリゴ DNA は表 5.2 の右に、もとの *fliC* の DNA 配列とともに示した。それぞれ上段がもとの SJW1655 の変異導入付近における *fliC* 塩基配列で下線が引かれた部分が標的となるアミノ酸コドンである。その下に書いた塩基配列は、アミノ酸置換を行うための変異導入用フラグメント塩基配列(オリゴ DNA)である。下線を引いた標的コドンに対応する塩基トリプレット中で斜字で表した塩基が本来の対合する塩基から置換してある。この置換により下線部塩基配列は 3'ACA5'または 3'ACG5' となり、システインのコドンである 5'TGT3'、5'TGC3' の相補的塩基となっている。この DNA フラグメントを1重鎖 DNA とアニールし相補対を形

成させる。この時アミノ酸置換を起こさせる塩基の部分では相補対ができず、この部分でエネルギー的に不利となるが、周りの塩基相補対により補償される。ミューテーション導入用 DNA フラグメントは、このアニールでできる複合体をできるだけ安定にしてミューテーションを確実にするために、20塩基以上の長さのもので、DNA 塩基の置換を1箇所だけに限定したものをを用いた。ここで20塩基程度としたのは、理論的にはミューテーション用の DNA フラグメントは長いほど良いが、実際には合成が困難なためである。図 5.2(a)では x 印がつけられた部分がアミノ酸置換を起こすために変えられた塩基を示している。DNA フラグメントがアニールされた後に、T7 ポリメラーゼにより1本鎖 DNA は全体が2重鎖になるように DNA 合成がなされる。この時、塩基のアナログである dCTP α S を使用する。図中この dCTP α S を含むストランドは太い線で描かれている。この2重鎖 DNA (dsDNA) となった DNA を制限酵素 *Nci*I で処理すると、dCTP α S を取り込んだストランドは切断されず、もとの1重鎖 DNA にだけニックが入る。そこでエクソヌクレアーゼ III 処理を行うと、このニックからもとのストランドは分解され、最後に約 800bp ssDNA だけが残る。これによりミューテーションを導入したストランドと 800bp のフラグメントの複合体が得られる。この生成物に DNA ポリメラーゼ I とリガーゼを作用させると、800bp の DNA をプライマーとして図中 x 印で表された突然変異を持った ssDNA と相補的な DNA 塩基対が合成され完全な2重鎖となる。これによりシステインを導入した *fliC* 遺伝子を持った dsDNA を作る事ができる。この dsDNA は感染力のあるファージの遺伝子であるから、これで宿主の大腸菌 JM101 をトランスフォームすると、この変異導入された DNA を多量に得ることができる。なおトランスフォーム用の大腸菌コンピテントセルはカルシウム法で作製した。

fliC への突然変異導入の確認はシーケンサー (A.L.F DNA シーケンサー:ファルマシア)を用いて行った。変異を導入した ssDNA の、変異部位の上流塩基配列と相補的な塩基配列のフラグメントに蛍光ラベルを施しておき、Sanger 法にて塩基配列を決定し、システインコドンの導入を確認した。

遺伝子発現をさせるベクターは、環状ベクター pHSG368 を用いた。システインを導入したフラジェリンの遺伝子 *fliC* は M13 の dsDNA から制限酵素 *Eco*RI と *Hind*III を用いて切り出した。pHSG368 ベクターも同じ制限酵素を用いて切った後、

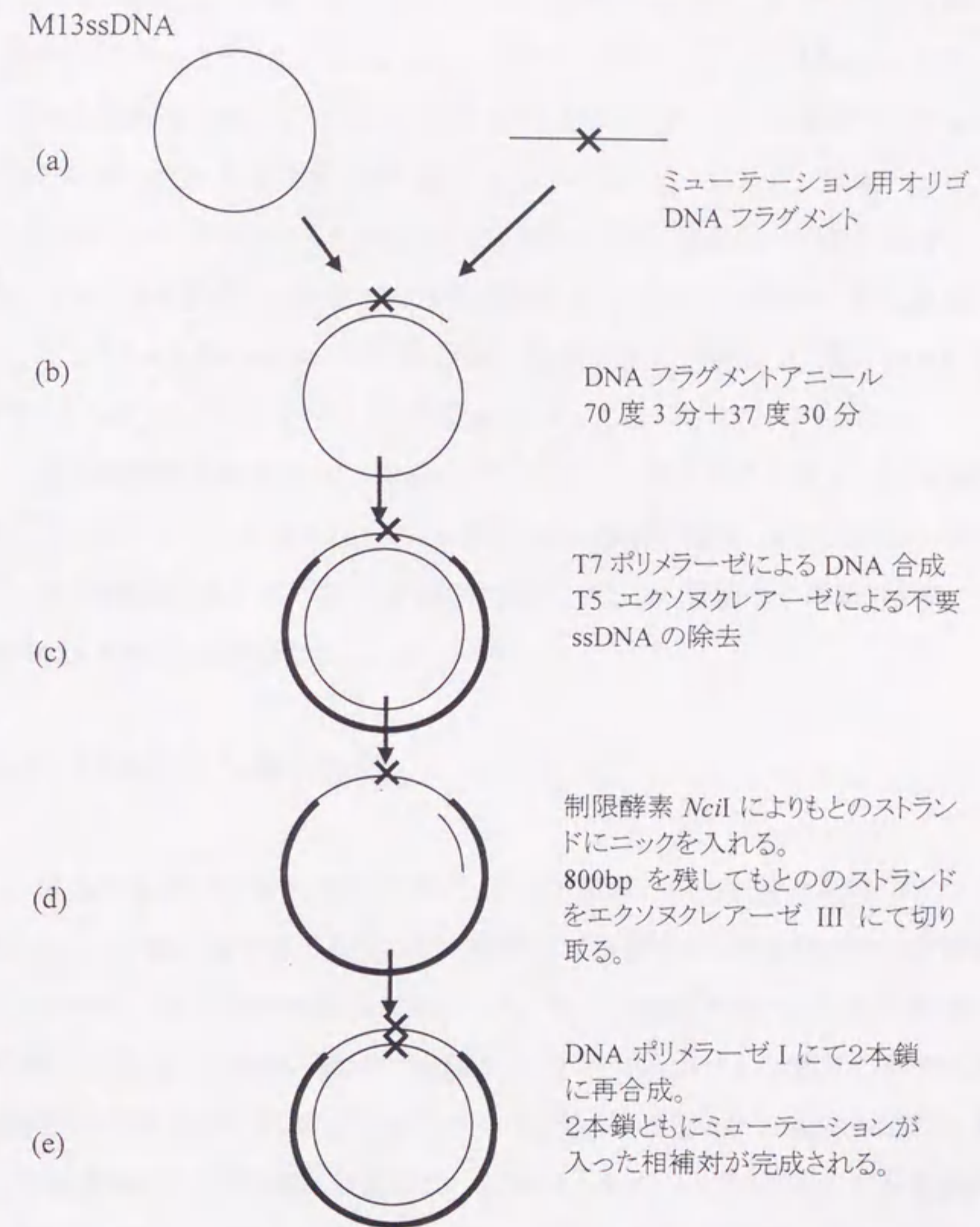


図 5.2 部位特異的アミノ酸置換を行いシステインを導入する DNA 操作の流れ図
fliC が組み込まれた M13ssDNA をあらかじめ用意し、これにミューテーション導入用の DNA フラグメントを用いて、酵素分解と合成を繰り返すことで、2本鎖ともにミューテーションが導入された M13dsDNA を作製する。

先のシステイン導入 fliC 遺伝子とライゲーションを行った。これによりシステイン導入 fliC を持った環状ベクター pHSG368-mutated-fliC が得られた。この得られたベクターをいったん大腸菌 LB5000 にトランスフォームし、その後このベクターをフラジェリン合成能を持たないサルモネラ菌 SJW2536 にトランスフォームした。環状ベクター pHSG368 はクロラムフェニコール耐性を SJW2536 菌体に与える。またトランスフォームされた SJW2536 菌体は、37 度では生育が悪く、少し低温の30度が生育により適していた。そこでクロラムフェニコールを含む寒天培地に菌体を撒き、30 度で一晩培養してできたシングルコロニーをとり、これを数ml培養して -80 度でストックした。

暗視野顕微鏡観察により、培養されたシステイン導入 fliC を持った SJW2654 の菌体はもとのフラジェリン遺伝子を持つ SJW1655 菌体と本数・長さともにほぼ同じ状態のべん毛繊維が生えていることが確認できた。またべん毛繊維の単離・精製は菌株 SJW1655 と同じ方法で行った。

5.2.3.2. システイン導入位置

導入するシステイン残基の位置は、べん毛繊維の構造に変化を起さないと同時に、タンパク質表面やその近傍など水銀原子が到達できる可能性の高い位置を選ぶ必要がある。これまでの研究からフラジェリンのアミノ酸配列の内、N、C両末端はべん毛繊維の重合に重要であり、アミノ酸配列の中心付近がべん毛繊維の外側にあって抗原性決定部位となっていることが分かっている。そのため両末端以外のアミノ酸配列の中央部がシステイン導入に適していると考えられた。一方これまでべん毛繊維の一部のリジン残基はメチル化を受けていることが明らかになっており、その近傍は表面に露出している可能性が高い。これらのことから、アミノ酸配列の中央部でメチル化されているリジン残基の近傍にシステインを導入することとした。表 5.2 に選定した6カ所の SJW1655 フラジェリンのアミノ酸導入位置を示す。

表 5.2 部位特異的アミノ酸置換の位置と用意した DNA フラグメント

SJW1655 におけるシステイン導入位置	部位特異的アミノ酸置換近傍の SJW1655-niC の塩基配列と部位特異的アミノ酸置換に用いたフラグメント配列
200 Ser	5' TTTAGACAATAGTACTTTTA 3' 3' AAATCTGTTA <u>ACATGAAAAT</u> 5'
343 Ser	5' TGGTTCCATAAGTATTAATA 3' 3' ACCAAGGTAT <u>ACATAATTAT</u> 5'
356 Ser	5' TGACGGTACATCCAAAACCTGCAC 3' 3' ACTGCCATGT <u>ACGTTTTGACGTG</u> 5'
365 Gly	5' ACAAACTGGGTGGCGCAGACG 3' 3' TGTTTGACCCA <u>ACGCGTCTGC</u> 5'
377 Gly	5' TTCTATTGGTGGTAAACTTACG 3' 3' AAGATAACCA <u>ACATTTTGAATGC</u> 5'
390 Phe	5' GGTCACTTTTAAAGCACA 3' 3' CCAGTGTG <u>ACATTTTCGTGT</u> 5'

上部下線はアミノ酸置換を起こす標的コドンを示す。下部下線中の斜字体がアミノ酸置換のため導入された DNA の変異部位である。

5.2.4. 重原子置換体作製方法

べん毛繊維の重原子置換体を得る方法として Soaking 法と同じ手法を用いた。すなわちタンパク質を重金属溶液中に浸すことにより重原子が特定位置に結合する方法を用いた。Soaking の方法としては、次の2つの方法を行った。一つは数 mg/ml 濃度のべん毛繊維の緩衝液中に重原子化合物を加え、これをそのまま1万gで15時間以上遠心してペレットを作製し、これをキャピラリーに吸収して得る方法である。もう一つはキャピラリー中にべん毛繊維ノルを先に吸入し、その後 1/10 体積の高濃度の重原子化合物溶液を吸入してキャピラリー中で前後に流動させて混合した後1日以上放置して得る方法である。用いた重原子化合物は、 $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 、 $\text{Sm}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Dy}(\text{NO}_3)_3$ 、 K_2HgI_4 、 K_2PtCl_4 、 K_2PdCl_4 、 K_2PdBr_4 、 $\text{K}_2\text{Pt}(\text{CN})_4$ 、 KAuCl_4 、 HgCl_2 で、システイン導入のべん毛繊維では HgCl_2 だけを用いた。

5.2.5. 動径質量分布の計算理論

X線繊維回折像は2章で述べたようにべん毛繊維のフーリエ変換を行ったものを記録したものであり (2.1)~(2.5)式で表される。この一般式からR型のべん毛繊維の赤道構造因子を導く。6章でR型のらせん対称性について厳密に決定するが、ここでは簡単のため、らせん対称性を 93 サブユニット/17 ターン、結晶学的周期長(右巻き 1-startらせん 17ターン:c) を 437.1 Å とする。これより (2.5) 式は次のようになる。

$$l = 17 \cdot n + 93 \cdot m \quad \dots (5.1)$$

このらせん対称性からくる制限 $l = 17n + 93m$ により、赤道 ($l=0$) のベッセル関数の次数は、 $n = -93k$ (k は任意の整数) を満たさなくてはならない。すなわち n は、0、±93、±186、±279...の値しかとれない。よって R 型直線べん毛繊維回折像の赤道構造因子 ($l=0$) は (2.2)、(2.3)式より次式となる。

$$\begin{aligned} F_0(R, \Psi, 0) &= F_{0,0}(R) + F_{93,0}(R) \exp(i93\Psi) + F_{-93,0}(R) \exp(-i93\Psi) \\ &\quad + F_{186,0}(R) \exp(i186\Psi) + \dots \\ &= \int_0^\infty \rho_{0,0}(r) J_0(2\pi r) 2\pi r dr + \exp(i93 \frac{\pi}{2}) \int_0^\infty \rho_{93,0}(r) J_{93}(2\pi r) 2\pi r dr \cdot \exp(i93\Psi) \\ &\quad + \exp(-i93 \frac{\pi}{2}) \int_0^\infty \rho_{-93,0}(r) J_{-93}(2\pi r) 2\pi r dr \cdot \exp(-i93\Psi) \\ &\quad + \exp(i186 \frac{\pi}{2}) \int_0^\infty \rho_{186,0}(r) J_{186}(2\pi r) 2\pi r dr \cdot \exp(i186\Psi) + \dots \quad \dots (5.2) \end{aligned}$$

一方ベッセル関数の性質として、 $|J_n(x)|$ は $x < |n| - 4$ ではほぼ0で近似できるので、 $R < (93 - 4)/2 \pi r$ の範囲では $J_{\pm 93}(x)$ 、 $J_{\pm 186}(x)$ 、 $J_{\pm 279}(x) \dots$ を無視して $J_0(x)$ だけを考慮すればよい。この範囲は、べん毛繊維の半径 r がおよそ 115 Å なので $R < 89/2 \pi r \approx 0.123 \text{ \AA}^{-1}$ すなわち分解能 8 Å 以下である。このことは 8 Å 分解能以下ではべん毛繊維の赤道構造因子(5.2)式は、次式の(5.3)式で表わされる。

$$F_0(R) = \int_0^\infty \rho_{0,0}(r) J_0(2\pi r) 2\pi r dr \quad \dots (5.3)$$

(5.3)式の示すように赤道構造因子には複素成分は無くなり、位相は0か π だけとなって、+、-の実数だけとなる。よって 8Å 分解能以下の範囲では、X線繊維回折像から得た赤道振幅のピークを+、-に符号付けした組み合わせの中に正しい赤道構造因子があることになる。また構造因子が連続な実数関数で表されることから、その符号を変える時にゼロを横切る。そのため赤道振幅の谷がゼロ点の可能性が高いので符号付けの組み合わせは比較的少ない。

次に $R < 0.123 \text{ \AA}^{-1}$ の範囲で、重原子同型置換体ともとの繊維の赤道構造因子の差異を考えると、赤道構造因子の差 $\Delta F_{0,0}(R)$ は次式のようにあらわされる。

$$\Delta F_{0,0}(R) = F_{HDO}(R) - F_{PO}(R) \quad \text{----- (5.4)}$$

$$= \int_0^\infty [\rho_{0,0}(r) + \sum_i a_i \delta(r - r_i)] J_0(2\pi r R) 2\pi r dr - \int_0^\infty \rho_{0,0}(r) J_0(2\pi r R) 2\pi r dr \quad \text{----- (5.5)}$$

$$= \sum_i a_i J_0(2\pi r_i R) 2\pi r_i \quad \text{----- (5.6)}$$

ここで F_{HDO} : 重原子置換体の赤道構造因子、 F_{PO} : もとの繊維の赤道構造因子

i : 結合重原子の番号、 a_i : i 番目重原子の重み係数、

$\rho_{0,0}(r)$: べん毛繊維の動径電子密度分布

(5.6) 式から、 F_{HDO} と F_{PO} の差 $\Delta F_{0,0}(R)$ は、もとのべん毛繊維の動径電子密度分布とは無関係になり、結合重原子の赤道構造因子、すなわち結合位置だけに依存した0次ベッセル関数 J_0 の組み合わせだけとなる。

以上のことより、 $R < 0.123 \text{ \AA}^{-1}$ 、8Å 分解能以下の範囲では $\Delta F_{0,0}(R)$ が0次ベッセル関数 J_0 の組み合わせになるように、抽出した回折像の赤道振幅 $|F_0(R)|$ を 0、 π に位相付けすれば、真の赤道構造因子が得られる。一般に重原子同型置換体の重原子の結合個数は多くないのでこのような類推が可能である。この作業を流れ図で図示すると図 5.3 のようになる。

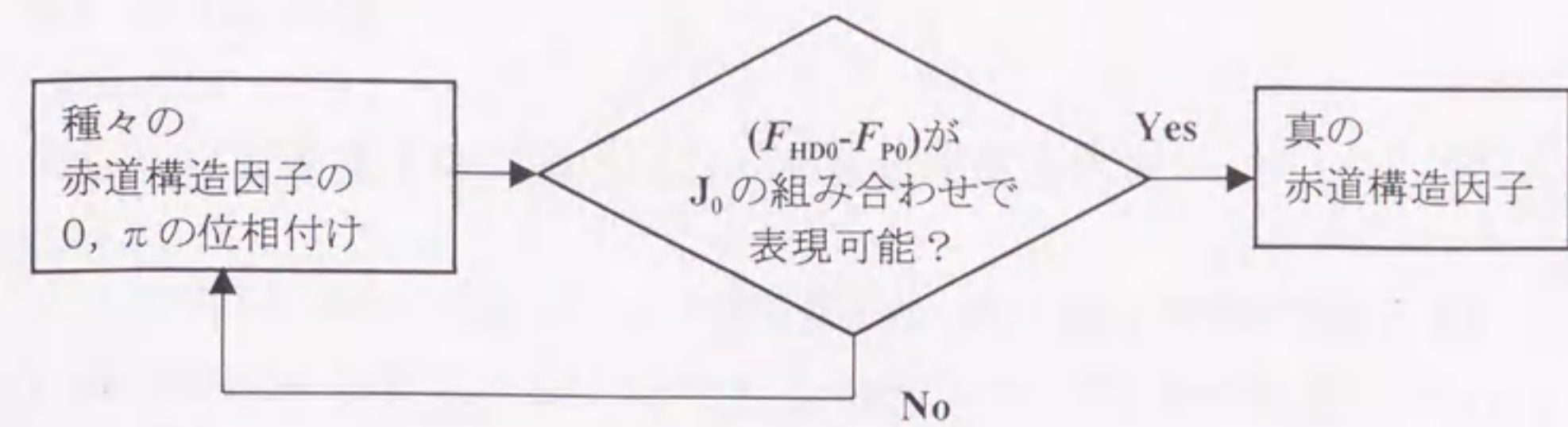


図 5.3 赤道構造因子の位相付けの流れ図
ただし分解能は 8 \AA まで ($R < 0.123 \text{ \AA}^{-1}$) に限定される。

以上の理論的考察から、 8 \AA までの分解能のべん毛繊維の赤道構造因子が重原子同型置換体もとの赤道振幅から得られることが示された。そしてこの赤道構造因子を逆フーリエ変換するとべん毛繊維の円周方向及び軸方向に平均化された動径電子密度が得られ、これをもとに動径質量分布を計算することができる。以上をまとめると、動径質量分布を得るためには、

1. 重原子同型置換体の作製
2. もとの繊維と重原子同型置換体からの精密な赤道振幅の抽出
3. 赤道振幅から赤道構造因子の導出とその逆フーリエ変換

の3つのことを行えばよいことがわかる。

5.2.6. X線繊維回折法像の記録

X線繊維回折像の記録方法は 3.2 に記述した方法を用いた。

5.3. 結果と考察

5.3.1. 極低温電子顕微鏡によるべん毛繊維構造解析

電子顕微鏡の画像処理による構造解析は、高分解能の情報を得るのは難しいが位相情報を直接得られる利点があり、これまでもべん毛繊維の構造解析が行われてきた^{43), 44), 45), 46), 47), 48)}。さらに藤吉らが最近開発した、超流動ヘリウム利用の極低温ステージを装備した電子顕微鏡では電子線照射量を増やすことが可能で、高分解能の情報も得ることができるようになった。そこでまず最近の電子顕微鏡画像解析により再構成された電子密度像の特徴と得られた情報について記述する。

電子顕微鏡による構造解析では染色を行うと構造が正確に観察できない。そこで溶液中に分散されたべん毛繊維を急速凍結してアモルファス氷中に包埋した試料を調整した。試料は極低温に保たれたまま極低温電子顕微鏡ステージに装着し写真撮影した。試料は電子線照射によるダメージが少なくなるよう、超流動ヘリウムにより1.5Kまで冷却され、構造解析用の写真撮影を行った。これにより高分解能での構造解析が可能な質の良いべん毛繊維の画像が撮影可能となった。得られた画像は光学ディフракトメータにてその画像の質を判定した後、デジタイザーにてデジタル画像化し、以降の画像処理はコンピュータ上で行った。このデジタル画像はべん毛繊維の透過像を記録したものであるため、画像をフーリエ変換することにより、べん毛繊維の逆空間Z軸を含む面での構造因子を直接得る事が出来る。

三森らはこの極低温電子顕微鏡を用いてL型、R型、Lt型べん毛繊維の構造解析を行った^{42), 47), 48)}。図5.4は得られた3種類のべん毛繊維電子顕微鏡像のフーリエ変換後の層線を示す。代表的な層線に対応するベッセル関数の次数を書き入れた。らせん対称性の差を反映して層線間隔が変化し、L型がねじれ率がもっとも少ないため層線の間隔がつかまっており、ついでR型、そしてねじれ率が大きいLt型で最も層線が離れている。ここで示した4種類のLt型は全く同じらせん対称性を示す。これまでN、C末端を除去して得られるLt型べん毛繊維すべてでらせん対称性が同じであることが観察されている。図5.4では、素繊維の捻れ方向がL型で左、R型で右

方向であるため 11 次のベッセルの次数符号が変わり、-5、6 次のベッセルの層線位置が上下に入れ替わっている。また Lt 型はらせん対称性が全く異なっているため、11 次を除いてベッセル関数の次数は L、R 型とは異なり、3、-4、7 次が現れている。なお参考のため Lt 型べん毛繊維の X 線繊維回折像も示しておく。電子顕微鏡像のフーリエ変換像は、コントラストトランスファーファンクション(CTF)による電子顕微鏡の性能からくる原因で分解能が高い領域で層線の減衰が生じている。

得られた電子顕微鏡像から、各層線の構造因子の振幅と位相情報を取り出し、S/N を高めるため十数枚のデータを平均化した。その結果べん毛繊維の構造因子が 9~12 Å 分解能で決定でき、べん毛繊維の電子密度像が再構成できた。再構成し

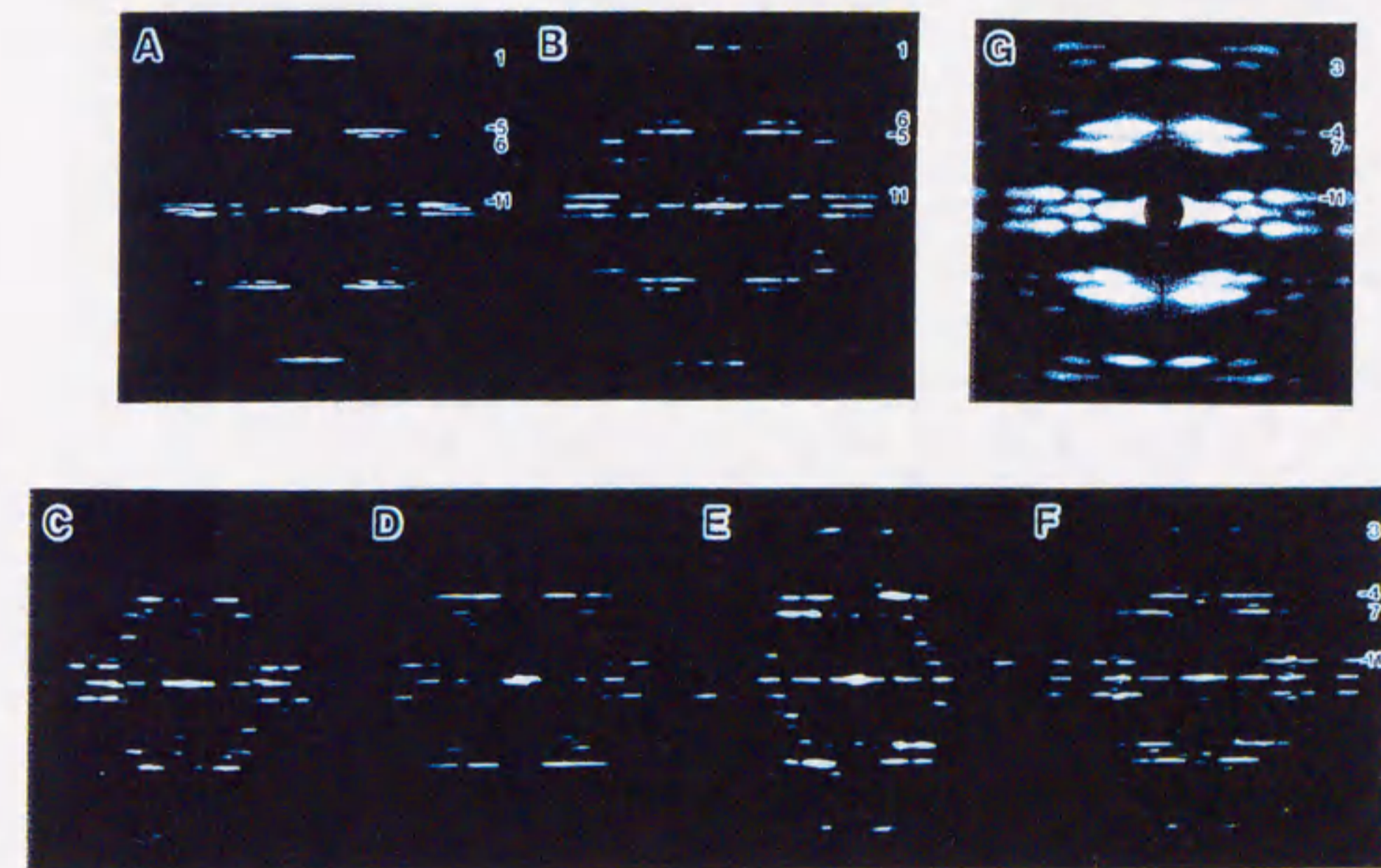


図 5.4 L、R、Lt 型べん毛繊維の、電子顕微鏡像のフーリエ変換像
 (A) は L 型べん毛繊維、(B) は R 型べん毛繊維、(C)、(D)、(E)、(F) は種々の Lt 型べん毛繊維からの電子顕微鏡像のフーリエ変換像を示す。(G) は Lt 型べん毛繊維の X 線繊維回折像である。数字は主な層線のベッセルの次数である。Lt 型べん毛繊維はそれぞれ菌株とアミノ酸配列番号で表して、(C) SJW1103(1-486)、(D) SJW1660(1-486)、(E) SJW1655(1-486)、(F) SJW1655(20-494)、(G) SJW1655(1-486)である。

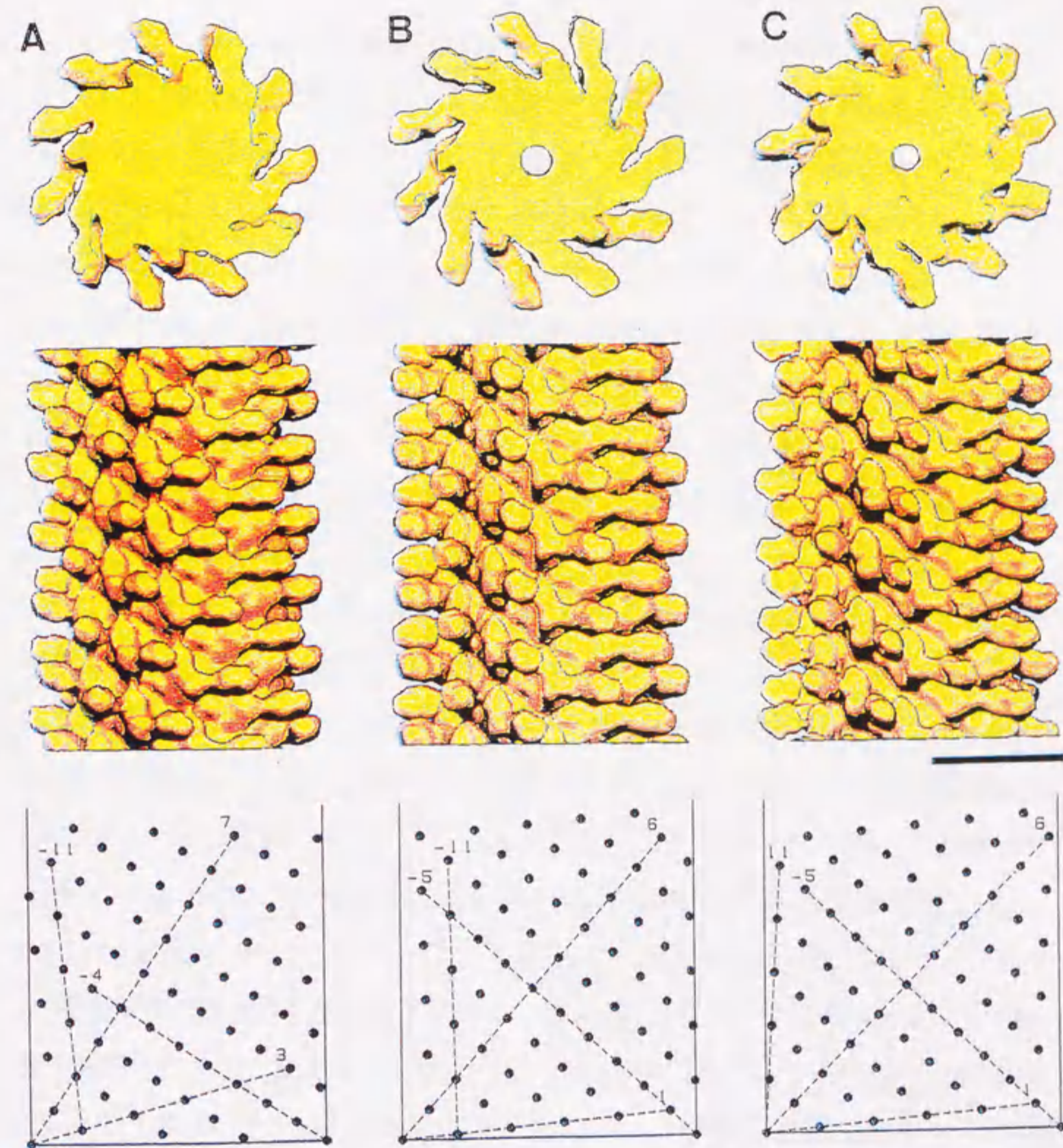


図 5.5 Lt, L, R型べん毛繊維の 12 Å 分解能でのべん毛繊維のモデル
 左から、(a)Lt 型、(b)L 型、(c)R 型のべん毛繊維を表している。上段は 50 Å 厚の切断面を、中段は 300 Å の長さに切り出した繊維を側面から見たもので、上が菌体側で下方に伸張端である。Lt 型では中心部の孔が無くなっているが、その他は大きな変化は無い。下段は半径 45 Å におけるサブユニットのヘリカルネットを示す。各点はサブユニットの位置を示している。この図からそれぞれの 11 本の素繊維の傾きが Lt 型L 型で左に、R 型で右に傾いていることが良く分かる。また書き込まれた数字は図 5.4 の主な層線のベッセル関数に対応するらせん方向を示している。なおここで示した Lt 型は SJW1103(1-486) である。

した 12Å 分解能での L、R、Lt 型べん毛繊維のモデルを図 5.5 に示す。左からそれぞれ Lt 型、L型、R型のべん毛繊維を示し、上段は 50Å 厚の切断面を、下段は 300Å の長さで切り出した側面を示す。L、R型べん毛繊維のおおよその構造はよく似ている。中心部に直径約 20Å のチャンネルが存在し、その周りに電子密度の高い太い円筒状構造が存在する。さらにその外側には素繊維に平行なカラム構造が見られ、そのカラム構造の下端から外に向かってロッド状の構造がやや斜め方向に突き出ている。これらの形状は 11 重らせんに沿った素繊維が右巻きと左巻きになっていること以外には目立った変化はない。このことは L、R型べん毛繊維のサブユニットのコンフォメーション変化が大きくないことを示唆している。Lt 型の場合は、切断面からすぐにわかるように中心部のチャンネルが消失し、そして素繊維が大きく左に傾いている。その他の特徴は L、R型べん毛繊維とよく似ている。

Lt 型の中心部の変化は、高い電子密度の分布を見ることでさらにはっきりと変化が見える。図 5.6 は R型べん毛繊維と、図 5.5 の Lt 型及び SJW1655(30-452) から再構成された Lt 型べん毛繊維の切断面を比較したものである。中央の Lt 型は、C 末端を 8 残基除去したもの、右のものは N 末端を 29 残基、C 末端を 42 残基除去したものである。そして図中下段に 20Å 分解能動径電子密度を示す。R型べん毛繊維ではチャンネルの周りの太い円筒状構造が半径の異なる 2 つのチューブ状構造、Inner-tube、Outer-tube からできていることが分かる。そしてそれらの間を繋ぐ細いスポークのような電子密度が見られる。これらのチューブ構造はその高い電子密度からべん毛繊維の構造を保つのに重要な役割を果たしていると考えられる。一方 C 末端を 8 残基除去した中央の Lt 型べん毛繊維では、2 つあったチューブ構造のうち Inner-tube が消失し、繊維の中心部のチャンネルが埋まっている。すなわち Inner-tube が崩れて中心孔を埋めているように思われる。さらに右端のフラジェリンの N 末端を 29 残基、C 末端を 42 残基除去した Lt 型のべん毛繊維では Inner-tube が完全に無くなっている。この Inner-tube の変化は下段の 20Å 分解能動径電子密度分布でも明らかで、中央 F(1-486) の Lt 型を示す破線は中心孔を埋めており、右端 F(30-452) の Lt 型を示す一点鎖線では Inner-tube に相当する部分に電子密度が無くなっている。以上のことからフラジェリン C 末端の 8 残基は Inner-tube を安定化させるために重要な働きをしており、

そしてこのC末端が Inner-tube に存在すること示している。さらに Inner-tube の大部分はN末端の29残基とC末端の 42 残基から構成されていることも示している。

なお図 5.5 の下段に、べん毛繊維のサブユニットの位置関係がよく分かるようにべん毛繊維の半径 45 Å 円筒上でのサブユニットの位置を点で代表させ、これを切り開いて平面にした図を描いた。さらに図中の数字は図 5.4 の層線ごとのベッセル関数の次数に対応するらせん方向を示す。

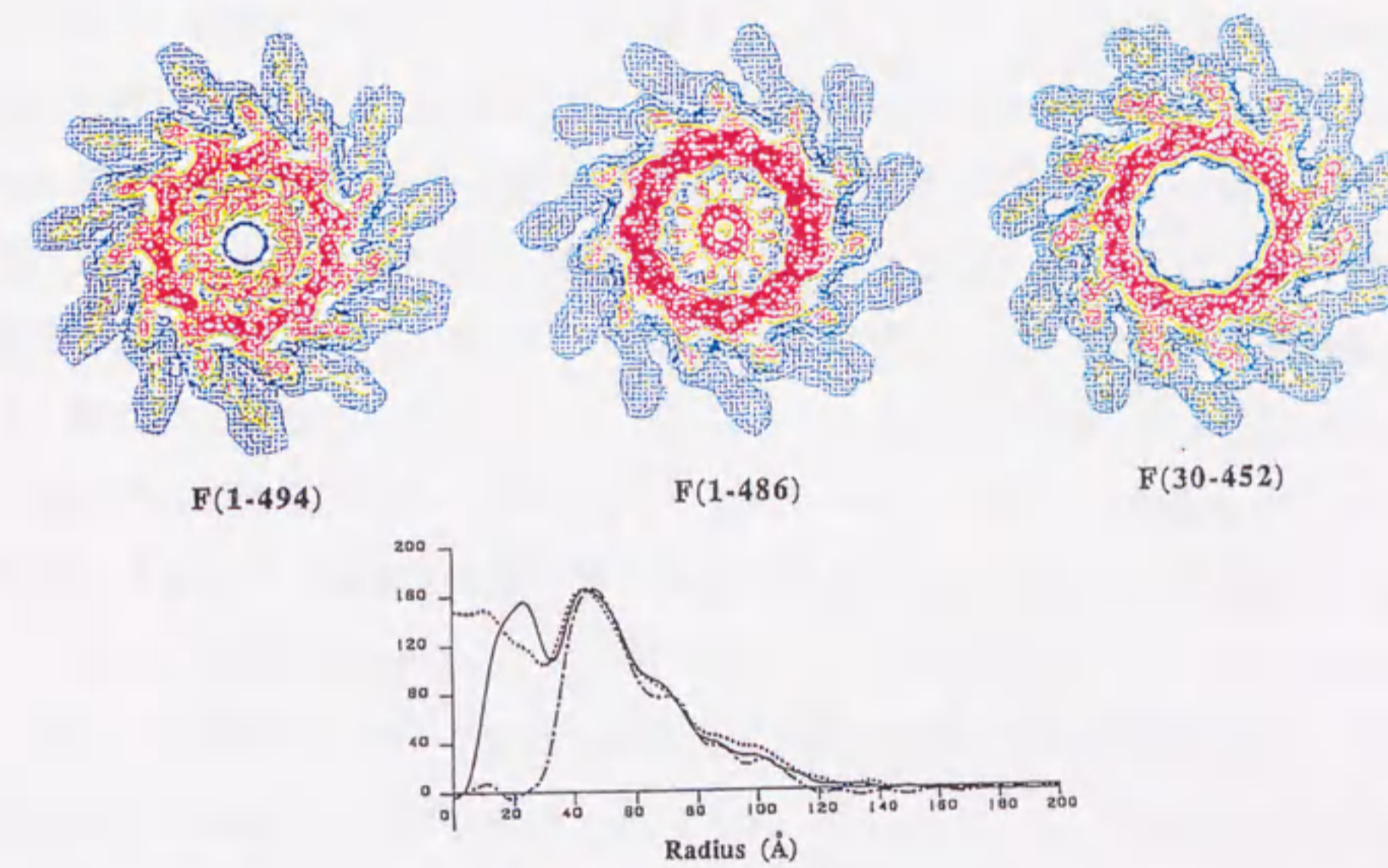


図 5.6 N, C末端除去フラジェリンにより再構成されたべん毛繊維の断面図
左端はR型べん毛繊維、中央はC末端を8残基除去した Lt 型繊維、右端はN末端29残基、C末端 42 残基を除去した Lt 型べん毛繊維を示す。記入された数字はフラジェリンアミノ酸配列の番号を示す。下は低分解能での同型電子密度分布を示す。実線がR型、破線が中央の Lt 型、一点鎖線が右端の Lt 型を示す。右端の Lt 型繊維では Inner-tube が完全になくなっている⁴²⁾。

5.3.2. X線繊維回折法の振幅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

電子顕微鏡画像解析では層線強度が分解能が高くなるにつれて様々な理由により急激に振幅が減衰している。そこで振幅の減衰がないX線繊維回折像から得られる構造因子の振幅値と電子顕微鏡画像解析から得られる位相成分を組み合わせ、9 Å分解能での電子密度像を再構成してべん毛繊維構造をさらに詳しく考察した。

はじめに、単純にX線繊維回折法像から得られた振幅と、電子顕微鏡から得られた位相を組み合わせ電子密度像を再構成したが、得られた電子密度像はノイズが多く不明瞭で、所々に島状の電子密度が散在していた。そこで溶媒領域平滑化法にて位相改善を行った。これはべん毛繊維を緩く包む包絡面を作成し、この包絡面外の電子密度を平滑化後した後フーリエ変換して、層線の位相情報を計算することを繰り返すことで位相改善を行う方法である。図 5.7、5.8 に得られたべん毛繊維の構造を示す。図 5.7(a)は 50 Åの厚さのべん毛繊維の断面図で、(b)はその中心部の厚さ 30 Åを軸に沿って切り出して示したものである。外側のなめらかな水色の等高線はべん毛繊維全体が把握しやすいように 20 Å分解能でのべん毛繊維全体構造を示し、他の緑、黄、白は 9 Å分解能での高い電子密度の構造を示している。べん毛繊維の形状は外側の突き出た部分を含めて直径約 230 Åで、中心部の孔は小さくらせんを描いておりその直径は約 20 Åである。図中の高い電子密度はべん毛繊維の中心部の Inner-tube、Outer-tube に集中しており、このチューブ構造がべん毛繊維の構造に重要であることを示唆している。図 5.8 の(a)は Inner-tube を、(b)は Outer-tube の立体電子密度像をそれぞれ示している。べん毛繊維の2重のチューブ構造が、ほぼ繊維軸に平行な α ヘリックスで構成されていることがわかる。そしてこれらの α ヘリックス構造が束になってサブユニット間で相互作用をしている。この様な構造は多型変換に α ヘリックス間の相互作用が重要な役割を果たしていることを類推させる。

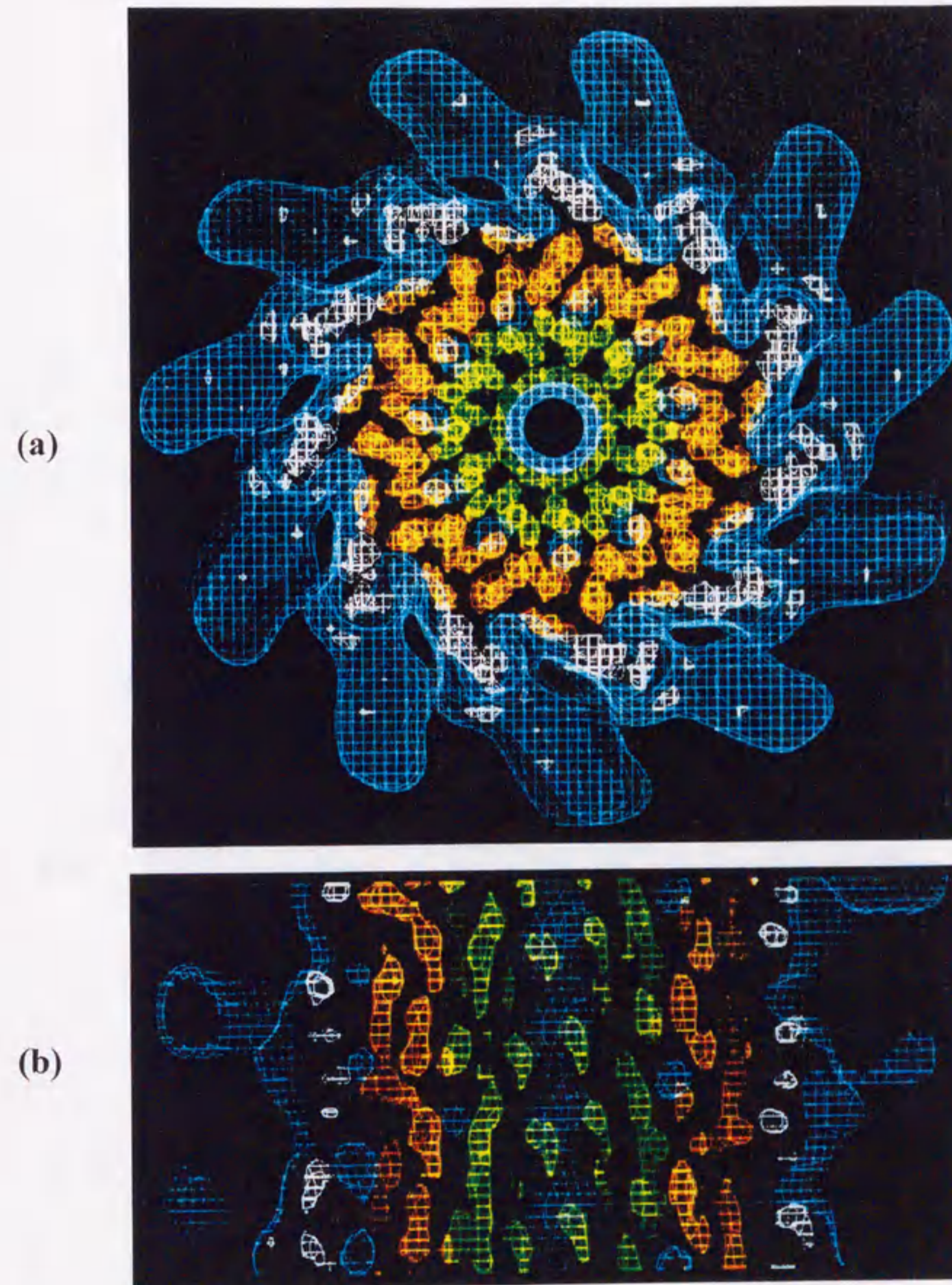


図 5.7 R型べん毛繊維の 9 Å 分解能電子密度像
 電子顕微鏡の位相とX線回折の振幅とを組み合わせ溶媒領域平滑化法により位相改善を行って得たべん毛繊維電子密度像。(a); 軸方向 50 Å の厚さで切り出した断面図と、(b); 横方向から見た 30 Å 厚さの断面図。べん毛繊維全体は水色で、Inner-tube は緑、Outer-tube は黄で描いてある。グリッドは 3 Å である。

(a)

(b)



図 5.8 R型べん毛繊維の Inner-tube(緑)、Outer-tube(黄)の9 Å分解能の立体電子密度像
べん毛繊維の中心部分の高い電子密度部分だけを描いてあり、(a)の緑線は Inner-tube、(b)の青線は Outer-tube の立体電子密度像である。両 tube 構造ともに α ヘリックスが密に存在する。特に Outer-tube には長い α ヘリックスが存在している。グリッドは 3 Å で、スケールバーは 50 Å を示す。

5.3.3. 重原子同型置換体作製結果

5.3.3.1. Soaking 法による重原子同型置換体の作製結果

5.2.4 で記述した重原子同型置換体の作製方法として用いた2つの Soaking 方法は同じ実験結果を与えた。そのため両方法ともに重原子特異的結合実験手法として利用できると判断された。ただし少量のべん毛繊維タンパク質から多種類の試料を作製する事が出来るキャピラリー中混合法が、実験的には有利であり重原子置換体の作製はほとんどこの方法で行った。

表 5.3 は重原子置換体作製の実験に使用した重原子化合物と Soaking 時の濃度、及び重原子化合物処理試料からの回折像における層線強度変化の有無とその重原子置換体の同型性を示したものである。

層線強度変化はX線繊維回折像を直接比較することと、2次元強度プロフィールフィッティングプログラム(RAD2D)で抽出した層線振幅を比較して判定を行った。図 5.9 は $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ の特異的結合によるX線繊維回折像の層線強度変化の例である。左半分がもとの繊維からのもので、右半分が重原子同型置換体からのものである。重原子の特異的結合により矢印で示された位置の回折強度に変化が観察できた。これらの変化はRAD2Dで抽出した層線振幅でも確認できる。表 5.3 に示したように数mM濃度の重原子化合物への Soaking 法により、特徴的な層線強度変化が生じ重原子の特異的結合が生じたと思われるものが4種類得られた。次にこれら4種類の重原子置換体の同型性について判定した。まず回折像の層線位置をもとの繊維のものと比較した結果、それらは一致した。そしてもとのR型繊維の 20 Å 分解能の位相付きデータを用いて差フーリエ像を描いたところ、4種類ともにピーク状の重原子位置に相当すると思われる電子密度が見られた。これらの結果から、得られた4種類の重原子置換体は同型性を保っていると判断された。

表 5.3 使用重原子化合物の種類と濃度及びX線繊維回折像の層線強度変化

重原子化合物	濃度	層線強度変化	同型性
$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	1mM, 5mM, 10mM	有り	○
$\text{Sm}(\text{NO}_3)_3$	5mM, 10mM	有り	○
$\text{Dy}(\text{NO}_3)_3$	5mM, 10mM	有り	○
$2\text{KI} \cdot \text{HgI}_2$	1mM, 5mM, 10mM	有り	○
K_2PtCl_4	1mM, 5mM	無	—
K_2PdCl_4	1mM, 5mM	無	—
K_2PdBr_4	1mM, 5mM	無	—
$\text{K}_2\text{Pt}(\text{CN})_4$	1mM, 5mM	無	—
KAuCl	1mM, 5mM	無	—

上から4つの重原子化合物において層線強度の変化が見られ、しかも同型性を保っていると判断された。

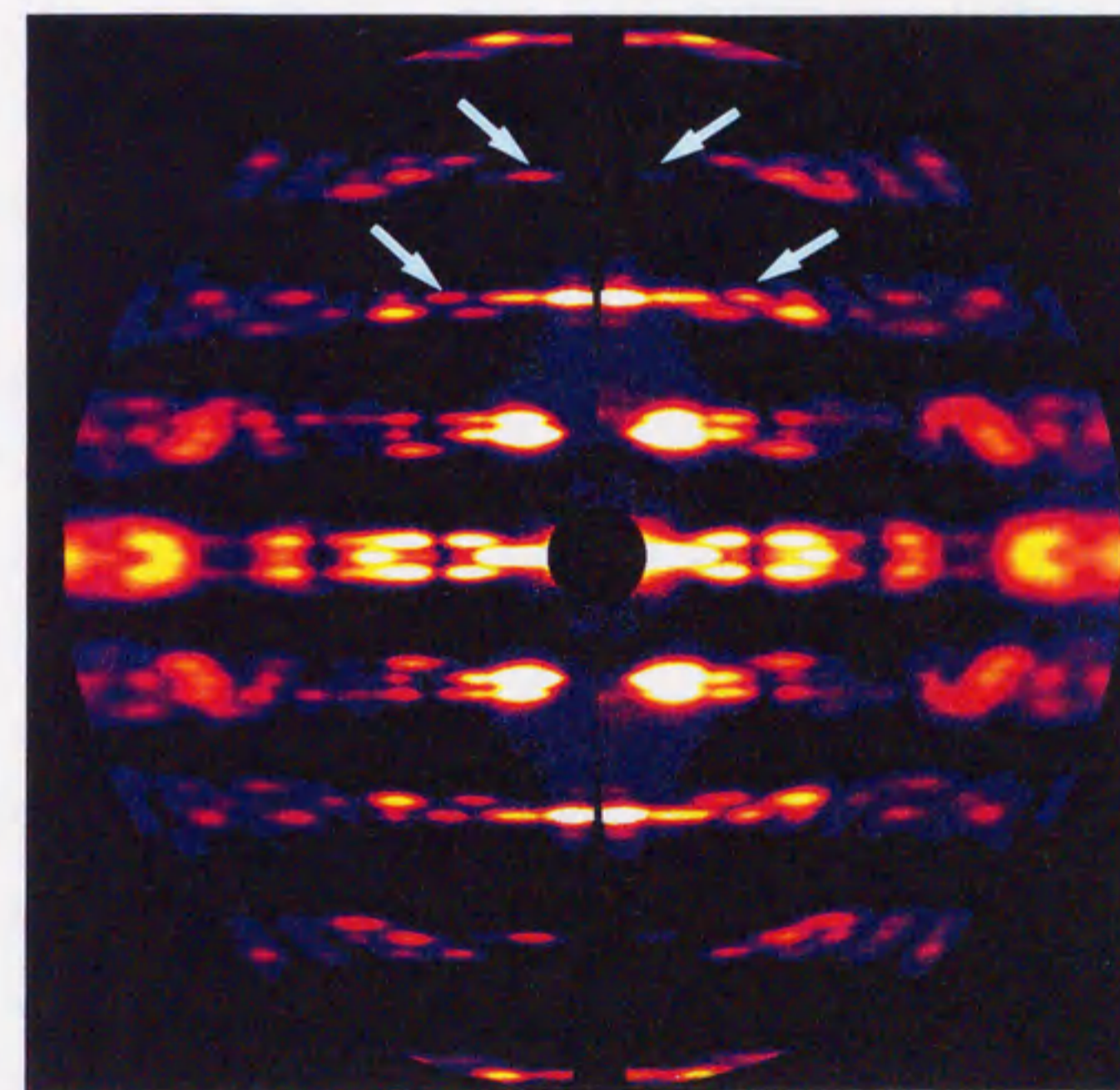


図 5.9 X線繊維回折像の特異的重原子結合による層線強度変化
左半分はもとの繊維からのもので右半分は $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ を用いて Pb を結合させた試料からのもの。矢印は層線強度の変化している部分を示す。分解能は 12.5 Å まで示している。

しかしこの4種類の重原子置換体のうち $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 、 $\text{Sm}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Dy}(\text{NO}_3)_3$ の3種類においてはX線回折像の層線強度変化はほぼ同じであり、そのため独立した重原子同型置換体として取り扱えるかを調べる必要があった。層線振幅の変化の定量的比較、差フーリエによる電子密度のピーク位置の確認を行ったところ、ほぼ同じ層線振幅の変化及び同じ位置に電子密度のピークが見られた。よってこれら3つは独立した重原子同型置換体として扱えず同じ種類のものであると判断された。

以上の実験結果から、Soaking法により4種類の重原子同型置換体が得られ、そのうち2種類が独立した重原子同型置換体であった。

また重原子置換体作製の実験中に次のようなことが明らかになった。二価もしくは三価のイオンの Pb 、 Dy 、 Sm が特異的に結合した重原子置換体において、べん毛繊維の安定性が大きくなり、フラジェリンの脱重合が起こりにくくなる。通常べん毛繊維を低塩強度の緩衝溶液で懸濁し遠心を行うと、上澄みにフラジェリンモノマーが生じる。しかし、これら3種の重原子置換体では上澄みのモノマーが少なく、懸濁と遠心を繰り返してもペレットの減少が少ない。特に三価の Sm 、 Dy を結合させた試料では、べん毛繊維ペレットを10倍体積の純水で懸濁と遠心を数回繰り返してもモノマー化、ペレットの減少は見られなかった。このことは、二価、三価のプラスイオンの特異的結合はべん毛繊維のサブユニット間相互作用を安定化すると考えられる。このような現象は Ca 、 Mg などの二価イオンでも確認されている。

5.3.3.2 システイン導入べん毛繊維の水銀原子置換体

システイン導入べん毛繊維の水銀原子置換体の作製実験を行ったが、意図したシステイン導入が行えたか、また重原子同型置換体を得られたかは、以下のような可能性を考慮して判断した。

1. システインを導入したことにより、R型べん毛繊維との同型性が崩れている可能性。
2. システイン導入遺伝子操作中の DNA シーケンサーによる変異確認後に、最終宿主である SJW2536 菌体をトランスフォームするまでに変異が偶発的に欠

失している可能性。

3. 導入したシステイン残基が、べん毛繊維のなかで水銀化合物がアクセスできる位置にない可能性。
4. 得られたシステイン導入べん毛繊維の水銀原子置換体の同型性が崩れている可能性。

はじめに第1項目のシステイン導入べん毛繊維と、もとのR型べん毛繊維との同型性が崩れている可能性を調べた。そこでこれら5種類のシステイン導入べん毛繊維ゾルの試料を作製してそのX線繊維回折像を記録し、層線強度と層線位置がR型べん毛繊維のものと同じであることを確認した。その結果、5種類のうち Ser 356、Gly 365、及び Gly 377 をシステインに置換した3種類のものは、回折像の層線強度と層線位置ともに変化は認められず、同型性が保たれていると思われた。さらにこの3種類のべん毛繊維のX線回折像から得た層線振幅と、もとのR型繊維の 20 Å 分解能位相付きデータを用いて差フーリエ像を描いたところ、ピーク状の電子密度は認められなかった。よってこれら3種類の S356C、G365C、G377C についてはシステイン導入による同型性の崩れはなかったと判断できる。一方 Ser200 を置換したものは層線強度に変化が認められ同型性が崩れていると判断された。また 343Serを置換したものは良い配向度のゾルが得られなかったが、やはり層線強度に変化が認められ、同型性の崩れている可能性が高い。

次に第2、3項目を確認するために S356C、G365C、G377C の3種類のべん毛繊維について次のような実験を行った。異なるシングルコロニーから培養された菌体のべん毛繊維を、10mM HgCl₂を含む緩衝液を用いて配向べん毛繊維ゾルを作製した。つぎにこの試料からX線繊維回折像を記録して層線強度変化の有無を観察した。3種類のシステイン導入べん毛繊維は、異なるシングルコロニーから培養された菌体のべん毛繊維を用いた複数回の実験すべてでX線回折像の層線強度変化がみられた。この結果から S356C、G365C、G377C についてはシステインが確実に導入され水銀原子の特異的結合が生じていると考えられた。

最後に第4項目の、これら3種類のべん毛繊維の水銀原子置換体の同型性

チェックを行った。水銀原子置換体からの回折像の層線位置はもとのR型繊維と一致し、さらに差フーリエによってもただ1カ所のピーク状の電子密度が得られた。これらの結果からこの3種類の水銀原子置換体は同型であると判断された。

以上の実験の結果から、R型繊維と同型で、水銀原子が特異的に結合したシステイン導入べん毛繊維の試料を3種類得ることができたと判断された。これらの実験結果を表5.4にまとめて示す。

表 5.4 システイン導入べん毛繊維の水銀原子置換体

システイン 導入残基	突然変異体 記号	使用した 重原子化合物	同型性	重原子置換体 層線強度変化	水銀原子置換 体の同型性
Ser 200	S200C	HgCl ₂ 2 mM	×	有り	—
Ser 343	S343C	HgCl ₂ 2 mM	△	有り△	—
Ser 356	S356C	HgCl ₂ 10 mM	○	有り	○
Gly 365	G365C	HgCl ₂ 10 mM	○	有り	○
Gly 377	G377C	HgCl ₂ 10 mM	○	有り	○

システイン導入の水銀原子同型置換体として、3種類のものが得られた。

5.3.3.3. 重原子同型置換体の重原子位置

以上述べたように重原子同型置換体が2種類、システイン導入の水銀原子置換体が3種類得られた。これらの重原子結合位置を見るため差フーリエ像を描いて観察した。図5.10はそれら結果を示したものである。(a)はPb(CH₃COO)₂を用いた場合の結果で2カ所に結合が見られる。(b)は2KI·HgI₂の場合で繊維の中心部分に結合が見られる。(c)はシステインが導入されたG365CにHgCl₂を用いた場合で、システイン残基の位置と思われる部位に結合が1カ所見られる。システインを導入したものはこのほかに2種類有るがこれも(c)の差フーリエ像同様に1カ所だけにピークが見られる。ここで得られた重原子結合位置の情報はべん毛繊維の赤道構造因子の位相付けに利用した。

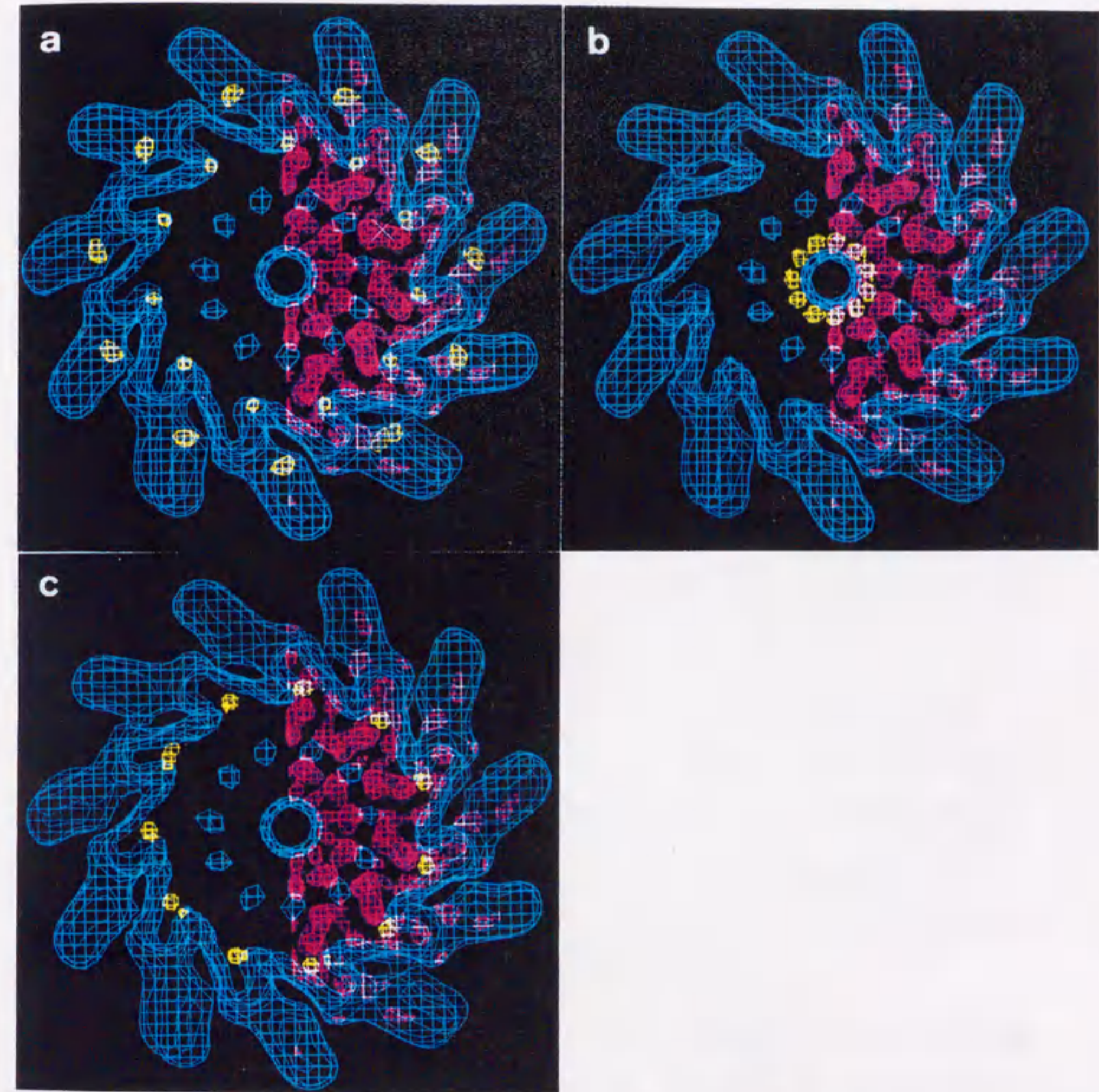


図 5.10 差フーリエ像によって示されたべん毛繊維上の重原子結合位置。
 べん毛繊維の 20 Å 分解能電子密度の断面を青色で示し、右半分には高分解能
 電子密度像で α-ヘリックスの束が分かるように高電子密度の部分赤色で描いた。
 重原子結合部位と思われるピークは黄色で表している。それぞれ、R型べん毛繊維に
 (a) $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ を、(b) $2\text{KI}\cdot\text{HgI}_2$ を用いた場合の重原子位置を示し、(c)
 は G365C に HgCl_2 を用いた場合の水銀原子位置を示す。重原子結合位置は、
 それぞれのサブユニットに (a)2カ所、(b)、(c)で1カ所であることが示されている。

5.3.4. べん毛繊維の動径質量分布

5.3.4.1. 赤道回折振幅と位相付け

5.2.5 で述べたように、もとの繊維と重原子同型置換体のX線繊維回折像から抽出された赤道振幅から、 $R < 0.123 \text{ \AA}^{-1}$ の領域では赤道構造因子の位相付けを行う事ができる。そこでもとの繊維と3種類の重原子同型置換体のX線繊維回折像から2次元強度プロファイルフィッティングプログラム(RAD2D)を用いて赤道振幅を抽出した。図 5.11 は得られた赤道振幅である。図中実線はもとのべん毛繊維から得られた赤道振幅を、1点鎖線はそれぞれ、(a) 2KIHgI_2 、(b) $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 、(c) HgCl_2 (システイン導入株 G365C 使用) を用いて得た重原子同型置換体からの赤道振幅を示している。 0.008 \AA^{-1} 以下の原点付近は、ビームストップのため回折データが記録されていないためにデータがない。X線繊維回折像の層線分離が良いこととRAD2Dの使用により、この赤道振幅のデータは極めて再現性良く得られる。また図中(a)、(b)、(c)それぞれで重原子の結合位置により赤道振幅が異なっている。赤道構造因子は、その位相が0または π で、正または負の実数であるから、赤道構造因子はその符号を変化させる時に振幅0を横切る。赤道振幅を見るとそのような0点や、十分に深い谷の部分が見られる。そのため赤道振幅の符号反転を0点の位置を手がかりに行えば、可能性の高い赤道振幅の位相付けの組み合わせは比較的少数となる。

この可能の高い位相付けの組み合わせで得た赤道構造因子のうち、もとの繊維と重原子同型置換体の赤道構造因子の差が0次ベッセル関数またはその組み合わせで現すことができるものを探索した結果、ただ1つの組み合わせがこの条件を満たした。この時の、もとの繊維と重原子同型置換体の赤道構造因子、及びそれらの差を図 5.12 に示す。(a)は 2KIHgI_2 を用いて得られた重原子同型置換体の場合を示している。細かい実線がもとの繊維から、一点鎖線が重原子同型置換体からの構造因子である。それらの構造因子の差は 0.001 \AA^{-1} ごとに+で示してある。この2つの構造因子の差は、図中に書き入れられた太い実線の0次のベッセル関数とよく一致する。このベッセル関数は、重原子が半径 17 \AA の1カ所に特異的に結合しているとして (5.6) 式で計算されたものである。(b)は $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ を用いて得られた重原子置換体の場合であ

る。構造因子の差が単純な増減を繰り返さないことから、この Pb は1カ所以上結合していると思われた。そこで結合位置を2カ所とし、その重原子の重み付けを変えながら、最もよく一致する0次ベッセル関数の組み合わせを探索した。その結果、Pb 原子が半径 60 Å、82 Åの2カ所に特異結合しているとして計算すると構造因子の差にベッセル関数の計算値が良く一致した。ベッセル関数の計算結果は図中太い実線で示した。この時 Pb 原子の結合位置と重み付けは、先の (a) 2KIHgI_2 の重みを 1.0 としたとき、半径 60 Å で 0.9、82 Å で 1.5 であった。(c) は、システイン導入株 G365C から得られたべん毛繊維の HgCl_2 を用いて得られた重原子同型置換体の場合を示している。システインを導入していないべん毛繊維では、これまでの実験から HgCl_2 による水銀原子の特異結合は起こらないことが分かっているので、水銀原子は導入した一カ所のシステイン残基にだけ結合しているはずである。そのため構造因子の差は一つの 0 次ベッセル関数で表されるはずである。実際半径 61 Å の位置に重み着け 0.8 で水銀原子が結合したとして計算したものが良く一致した。

以上述べたように、図 5.12 に示したR型べん毛繊維の赤道構造因子の位相付けにおいて、3つの重原子同型置換体すべてで、その構造因子の差に良好なフィッティングを示す 0 次ベッセル関数またはその組み合わせを見いだすことができた。これは図 5.12 に示したR型べん毛繊維の赤道構造因子の位相付けが正しいことを示している。すなわち図 5.12 に示した実線の赤道構造因子をフーリエ変換すれば、R型べん毛繊維の動径電子密度分布が計算できる。

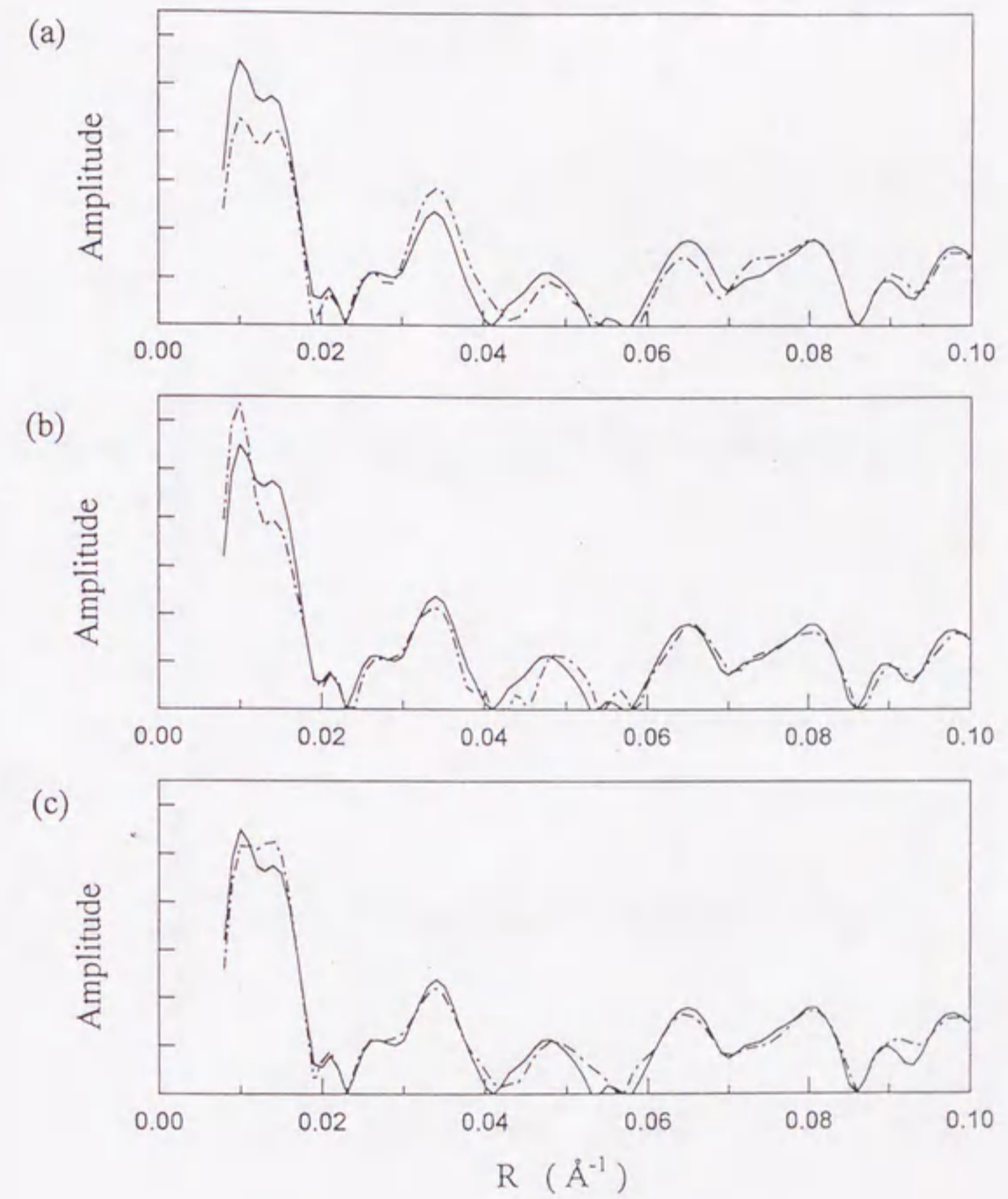


図 5.11 各X線繊維回折像から抽出された赤道振幅
 それぞれの図中実線はもとの繊維から得られた赤道振幅、一点鎖線はそれぞれ、
 (a) 2KIHgI_2 、(b) $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 、(c) HgCl_2 (システイン導入突然変異体 G365C を
 使用)を用いて得た重原子同型置換体から抽出した赤道振幅である

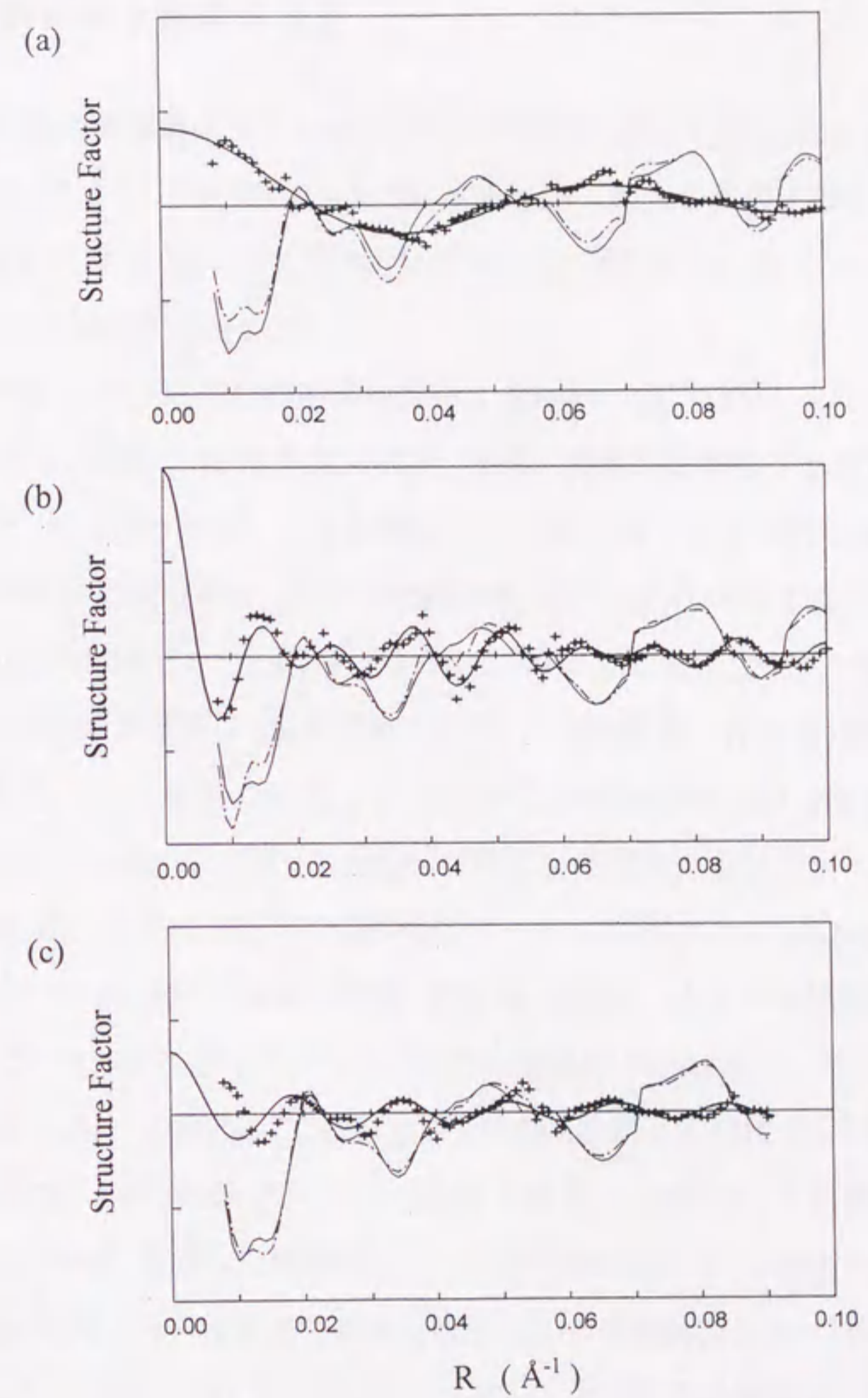


図 5.12 位相付けをした赤道構造因子

可能な組み合わせの位相付けを行い、最も良い結果を得られた赤道構造因子を示す。実線はもとの繊維からの、一点鎖線は重原子置換体からの赤道構造因子を示している。+はその差を2倍に強調して示しており、太い実線はこの差にフィットするように選んだ0次ベッセル関数またはその組み合わせである。この結果から、(a)では半径 17 Å (重み 1.0)、(b)では半径 60 Å (重み 0.9) と 82 Å (重み 1.5) に、(c)では半径 61 Å (重み 0.8) に、それぞれの重原子が結合していることが明らかになった。

5.3.4.2. 動径電子密度の決定

得られた赤道構造因子から動径電子密度を求める手順を、図 5.13 に示した。(a)の図中で、図 5.12 で決定したもとの赤道構造因子は太い実線で描かれている。この赤道構造因子は 0.008\AA^{-1} 以下の部分のデータが得られていない。そこでまずこの部分のデータの補正が必要となる。

まず 0.054\AA^{-1} 以下の赤道構造因子を 0.008\AA^{-1} 以下のデータの無いままフーリエ逆変換する。結果は (b)図中太い実線であらわされた動径電子密度となり、 0.008\AA^{-1} 以下のデータが無いと、べん毛繊維の中心部の電子密度が負の値になっている。この動径電子密度分布に (b)図の破線のような適当なガウス曲線を加えて図中一点鎖線になるように補正を行った。このようなガウス曲線の補正を行った理由は、一般に原点付近の回折強度をフーリエ変換して得られる動径電子密度分布はガウス曲線となるためである。ガウス関数の形は、べん毛の中心部が中空すなわち電子密度が0でかつ半径 115\AA の周辺部で電子密度が0であることを満たすようにとった。このように補正を行った電子密度分布を再び逆空間にフーリエ変換したものが (a)図中一点鎖線の構造因子である。ガウス曲線で補正したため 0.008\AA^{-1} 以下の構造因子は非常に大きな原点ピークとなり、同じスケールではその全体像が描けない。そこで (a)図中に縦軸のスケールを $1/16$ にしてこの原点ピークの構造因子を破線でも示しておいた。この $0\sim 0.008\text{\AA}^{-1}$ の原点ピークが、ガウス曲線で補正した結果得られた構造因子である。この構造因子を、観測した赤道構造因子に付け加えることで、R型べん毛繊維の逆空間原点から所定の分解能までの赤道構造因子が得られる。この一連の操作が問題のないことを確認するため、得られた $0\sim 0.054\text{\AA}^{-1}$ までの赤道構造因子をもう一度フーリエ逆変換した。その結果は (b)図中細い実線であり、ガウス関数を加えて補正を行った一点鎖線とほとんど同じである。この確認により、 $0\sim 0.008\text{\AA}^{-1}$ の補正が問題とならないことを確認できた。

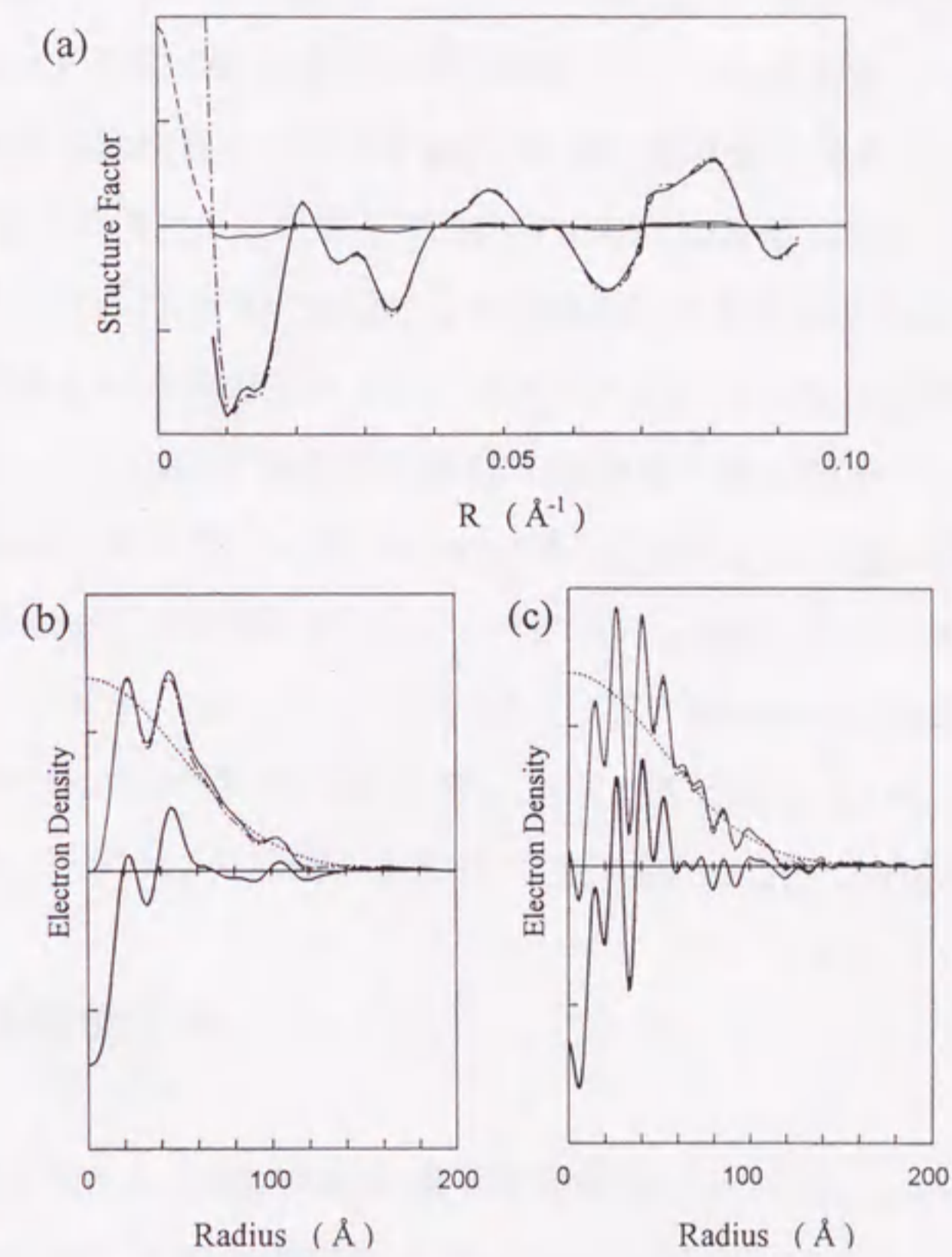


図 5.13 得られた赤道構造因子から動径電子密度を求める手順
 (a) X線回折像から得られた赤道構造因子と逆空間原点付近の補正を示す。
 (b) 20 Å 分解能でのガウス関数による補正前後の動径電子密度分布を示す。
 (c) 11 Å 分解能での動径電子密度分布とガウス関数補正を示す。

以上のように補正された (a) 図の赤道構造因子を用い、 $0 \sim 0.093 \text{ \AA}^{-1}$ すなわち 11 Å 分解能までのデータをフーリエ変換して動径電子密度を計算したのが (c) 図中細い線で描かれたものである。細い実線の動径電子密度は中心付近で電子密度 0 をとり、べん毛繊維の周辺でスムーズに電子密度 0 に収束している。このことは今回の補正が妥当なものであることを示している。ここで分解能を 0.093 \AA^{-1} で区切ったのは、打ち切りによるピークが出ないように選んだためである。(c) 図中太い実線は構造因子の

原点ピークを含まない 0.093\AA^{-1} までの赤道構造因子をフーリエした動径電子密度分布を示し、破線は (b) でべん毛繊維の全体の形を補正したガウス曲線を示す。一点鎖線は、これらの太い実線の動径電子密度に破線のガウス曲線を加えたものを表している。この一点鎖線の動径電子密度は計算された細い動径電子密度と良く一致しており、このことから逆空間原点付近の赤道構造因子の補正が妥当であることが示される。

得られた 11\AA 分解能のR型べん毛繊維の動径電子密度分布からすぐに判るように、半径 25\AA と 45\AA 部分に2つの大きなピークが見られ、それらの間の半径 33\AA に深い溝がある。これらの部分は極低温電子顕微鏡の構造解析で見られた Inner-tube と Outer-tube、及びそれらの間のギャップとそこで両 tube を結ぶスポーク部分に相当すると考えられる。またそれぞれのピークが2つに分離してさらに細かい構造があることを示唆しているが、これらは 5.3.2 で示したように Inner-tube、Outer-tube が多数の α ヘリックスがからできていることを反映していると思われる。しかしこのピークの分離がほぼ 11\AA となるのは、分解能を 0.093\AA^{-1} で打ち切ったことによると思われる。

5.3.4.3. 動径質量分布

前節でR型べん毛繊維の動径電子密度が得られたので、これをもとに動径質量分布を計算し、べん毛繊維の質量がどのように分布しているかをグラフ化した。図 5.14 は得られた動径電子密度よりべん毛繊維の動径質量分布を計算した結果を示している。グラフには図 5.15 に示した4つのドメイン D0、D1、D2、D3 の境界部分に一点鎖線を描き、それぞれの全質量に対する質量分布も小数で表示しておいた。D0、D1、D2、D3 ドメインの境界の半径は、それぞれ、8、33、58、80、 118\AA とした。この動径質量分布の結果からこれらのドメインの質量を数値化し、全体に対する質量比とドメインの分子量を計算し表 5.5 に示した。これに加え、 20\AA 電子顕微鏡像解析で得られた各ドメインの全体に対する容積比と、それから計算されるドメインの分子量も併せてまとめておいた。この電子顕微鏡像解析で得られたデータとX線繊維回折法から得られたデータは、それぞれ独立に得られたものでありながら良く一致している。これは2つのデータがともに信頼性が高いことを裏付けている。

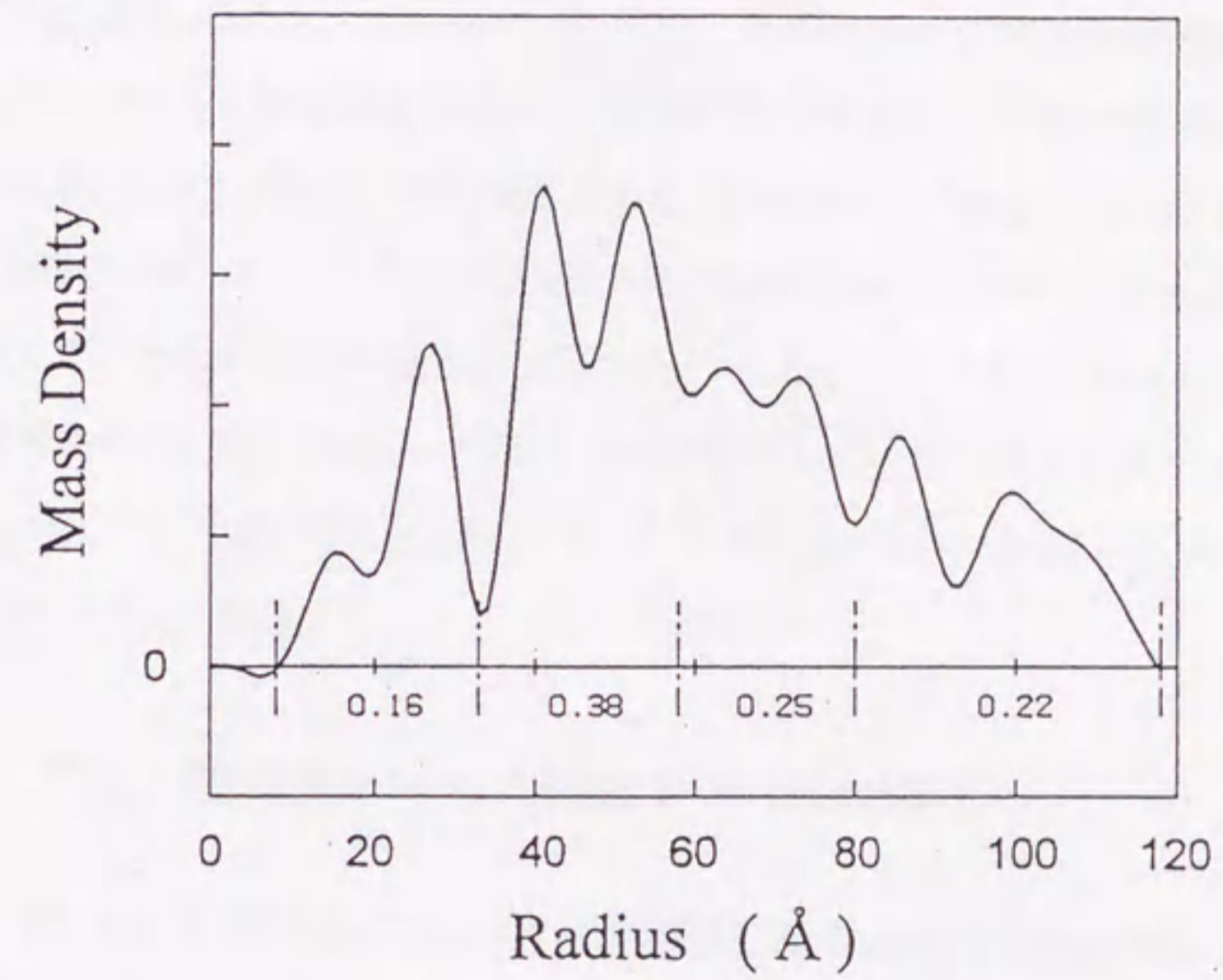


図 5.14 R型べん毛繊維の動径質量分布

図 5.13 の赤道構造因子より得られた動径電子密度分布をもとに動径質量分布を計算した

表 5.5 R型べん毛繊維の動径質量分布

X-ray	Radial Range (Å)	0-33	33-58	58-80	80-118
	Mass Fraction	0.16	0.38	0.25	0.22
	Molecular Mass (kDa)	8.2	19.6	12.9	11.3
E.M.	Radial Range (Å)	0-33	33-54	54-78	80-117
	Volume Fraction	0.16	0.33	0.32	0.19
	Molecular Mass (kDa)	8.2	17.0	16.5	9.8

X線繊維回折法で得られたものと電子顕微鏡画像解析から得られたものを比較して示す。半径方向はサブユニットドメインの取り方と同じ位置で切り分けてある。

動径質量分布のグラフの特徴は、電子密度分布でも述べたように、半径 33Å 付近にある谷で、これは Inner-tube (8-33Å)、Outer-tube (33-58Å) の間にあり、そこにはこの2つの円筒構造を結ぶスポークと呼ばれる構造が存在する。Inner-tube は質量が比較的小さく全体の 16%程度である。それに対し Outer-Tube は大きな質量を持ち、全体の 38%がこのドメインにある。この Outer-tube の構造は電子密度が高く、良くパックしているためべん毛繊維の構造を保つために重要であると考えられる。さらに構造解析からこの部分には α ヘリックス多数存在し、 α ヘリックスの束があることが分かっているので、半径 45 Å 付近の2つのピークはこれら α ヘリックスの束の構造を反映していると考えられる。

5.3.5. アミノ酸配列とべん毛繊維ドメインの対応

図 5.15 に電子顕微鏡による構造解析で得た 20 Å 分解能のR型べん毛繊維の 50 Å 厚さのセグメントを再度示し、この断面図に、これまでのR型べん毛繊維の電子密度像の形状から決めたドメイン D0~D3 を描く。内側から Inner-tube、Outer-tube に相当するチューブ状構造を作る D0、D1、そしてカラム状になった D2、その先に突き出た部分 D3 である。D2、D3 ははっきりと分離しているが、分解能が低いので D0、D1 は分離できず放射状に単純に分割してある。表 5.5 に示したように正確な動径質量分布が得られ、各ドメインの質量も求められたので、これまでに明らかになった事実と合わせ考慮することで、D0~D3 のドメインとフラジェリンアミノ酸配列との対応を行うことができる。

Vonderviszt は 494 個のアミノ酸から成るフラジェリンは大きく2つの部分から成ることを示した。1つは Ala1 から Arg65 及び Ser451 から Arg494 までの部分で、この部分はモノマー状態ではしっかりとした立体構造を持っていない⁴⁹⁾。残りの部分は F40 と呼ぶコンパクトな部分からなっている⁵⁰⁾。この F40 中で、Tyr178 から Arg422 までの 24.9kDa の部分は F27 と呼び、タンパク質消化酵素に対して極めて安定である。さらに、F27 のメルティング状態を熱量計にて測定することにより、この F27 は2つのコンパクトなドメインから構成されることが示された⁵⁰⁾。これらのことから F40 は

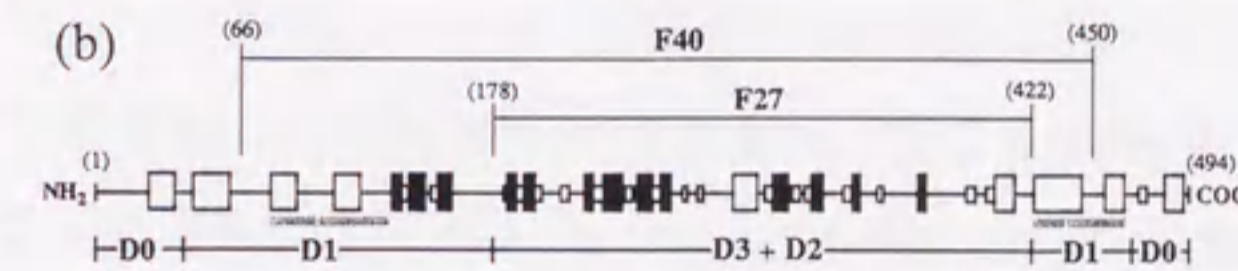
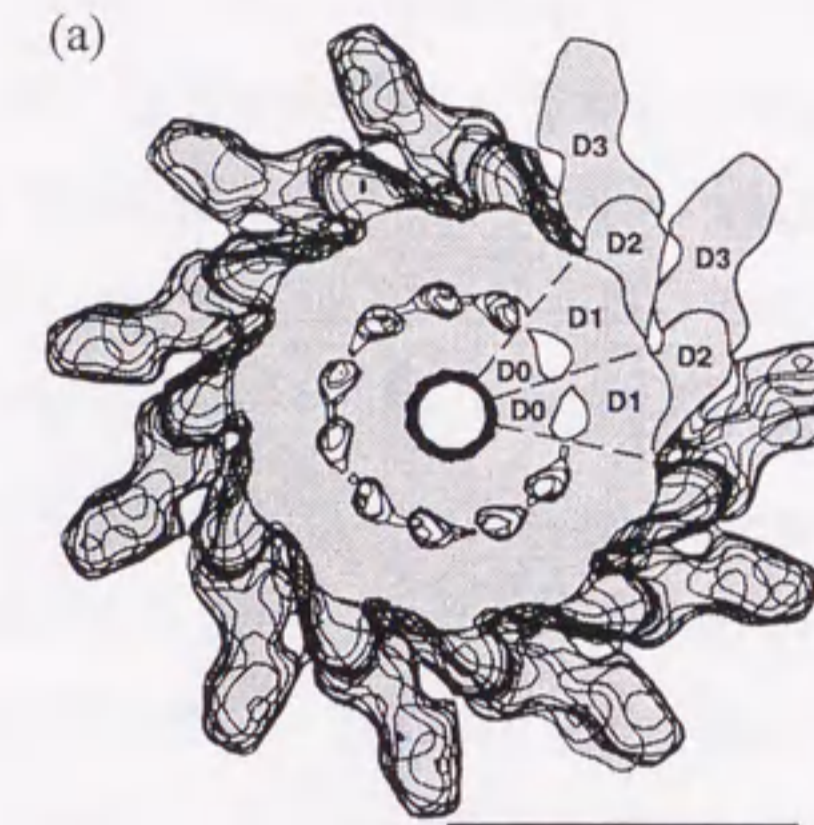


図 5.15 R型べん毛繊維の切断面のサブユニットドメインとアミノ酸配列
 (a)サブユニットは D0, D1, D2, D3 の4つの領域に分けられている。D0, D1 はそれぞれ Inner, Outer-tube と呼ばれている。(b) D0~D3 の各ドメインとアミノ酸配列との対応を示す

3つのドメインから構成されていることが分かった。これら F27, F40 とその残りの部分の位置を、図 5.15(b)のアミノ酸配列の上書き入れておいた。またアミノ酸配列には予測される2次構造も書き入れた。白い箱は α ヘリックスを、黒い箱は β シート、小さい箱はターンを表し、灰色の太い線の部分は α ヘリックスの coiled-coil の予測を表している。

F27 はフィラメント表面にでているアミノ酸配列を含み^{51), 52)}、抗原性決定のアミノ酸配列を含んでいることから、べん毛繊維では外側の構造を作っていると考えられる。一方 D2, D3 部分の総質量は今回の結果から 24.2kDa であり、この値は F27 の 24.9kDa に極めて近い。しかも F27 が前述のように2つの部分から成ることから、F27 が D2, D3 の2つのドメインを構成していると考えられる。F27 以外の F40 の部分(F40-

F27)は分子量として 15.3kDa である。この部分は、F27 が D2、D3 を構成していると考えられるので隣接した D1 領域を構成していると考えられる。しかしながらこの D1、Outer-tube の分子量は 19.6kDa であり、(F40-F27)の 15.3kDa だけで Outer-tube のすべてを構成できない。次に D0、Inner-tube であるが、この部分の分子量は 8kDa である。前述のしっかりとした立体構造を持たない両末端の Ala1 から Arg65 及び Ser451 から Arg494 まで部分の質量が 11.5kDa であるから、Inner-tube はその約 2/3 に相当する。またこの両末端部分のそれぞれ30アミノ酸残基を同時に欠失すると、べん毛繊維は負染色電子顕微鏡用試料で中心孔がはっきりと染色される。つまりこの両末端は Inner-tube に同等な寄与をしている⁵³⁾。さらにN端から29残基及びC端から42残基欠失したフラジェリンから再構成したべん毛繊維は Inner-tube が全くなくなっている⁴²⁾。これらを統合して考えると、この 11.5kDa の両末端の一部が 8kDa の Inner-tube、D0 全体を構成していると思われる。そして Inner-tube を構成した残りの両末端部分が先に不足していた D1 ドメインを構成すると考えられる。

これらの予測をまとめると、アミノ酸配列は、Inner-tube にあるアミノ末端から始まり、約30残基ほどが Inner-tube、D0 の一部を構成した後、スポークを作って Outer-tube、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 を構成していると思われる。以上のアミノ酸配列とべん毛繊維ドメイン D0~D3 の対応付けはまとめて図 5.15(b)に示しておいた。

5.4. まとめ

各種べん毛繊維の極低温電子顕微鏡の画像解析により、R型、L型、Lt型べん毛繊維の特徴が明らかになった。特にLt型では Inner-tube が崩れていることが明らかになり、フラジェリンの N,C 末端部分がこの Inner-tube を構成していることが示された。次にX線繊維回折法の振幅と電子顕微鏡の位相情報を用いて 9Å分解能のべん毛繊維の構造を明らかにし、構造維持や多型変換に重要な Inner-tube、Outer-tube が密な α ヘリックスの束から構成されていることを示した。

重原子同型置換体としては、R型べん毛繊維で 2 種類、またR型のシステイ

ン導入べん毛繊維で 3 種類の水銀原子同型置換体を得ることができた。これらの重原子同型置換体とよとのべん毛繊維の回折像から赤道層線振幅を、2次元強度プロフィールフィティング法を用いて精密に抽出する事ができた。これらの赤道振幅情報から、赤道構造因子の位相が $0, \pi$ であることを利用して、べん毛繊維の赤道構造因子を決定した。得られた赤道構造因子の 0.008 \AA^{-1} 以下情報を補正して、 $0 \sim 0.093 \text{ \AA}^{-1}$ の範囲での赤道構造因子を決定した。この構造因子をフーリエ変換して、R型べん毛繊維の 11 \AA 分解能の動径電子密度分布と動径質量分布を決定した。この動径質量分布はX線繊維回折像からのデータだけを用いて得たものであるが、その結果は極低温電子顕微鏡で得られたものと良く一致し、これら両方の結果が信頼性の高いものであった。

動径質量分布は半径 25 \AA と、 45 \AA に高密度部分を示し、これらはそれぞれ Inner-tube、Outer-tube に相当した。半径 33 \AA には電子密度の深い谷があり、この部分でスポークと呼ばれる構造が二つの tube 構造をつないでいる。この精密な動径質量分布、生化学的情報と極低温電子顕微鏡の構造解析情報とを合わせて考慮することで、べん毛繊維の D0~D3 のドメインを構成しているアミノ酸配列領域を決定することができた。その概略は以下の通りである。アミノ末端約30残基が Inner-tube の D0 の一部を構成した後、スポークを作って Outer-tube の 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。

なおべん毛繊維にシステインを導入する方法を確立したことは、重原子同型置換体の種類を増やすことに役立ち、将来高分解能でのべん毛繊維の構造解析を行うときに役立つと考えられる。

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

べん毛繊維の多型変換メカニズムの仮説として Bi-stable モデルを説明した。この Bi-stable モデルはすでに2種類の直線型べん毛繊維が存在することや、これら2種類のフラジェリンの混合によりらせん形べん毛繊維が再構成できることから、定性的には正しいと思われる。しかしこの仮説をさらに定量的に検証することが必要である。そこで検証のため次のことを行う。まず Bi-stable モデルを計算するのに必要なパラメータを実験的に求める。すなわちL、R型べん毛繊維のサブユニットのらせん対称性を精密に決定し、サブユニット結合に重要な半径でのサブユニット位置を決めて必要なパラメータを得る。次にこのデータをもとに Bi-stable モデルに沿って予想されるらせん形を計算する。このらせん形がこれまで観測されたべん毛繊維のらせん形状と良く一致すれば Bi-stable モデルが検証できたことになる。

また Bi-stable モデルの検証の結果や5章で得られた9 Å分解能のべん毛繊維の構造情報をもとにすれば、多型変換の素過程であるサブユニット間相互作用を考察できる。そしてこの考察により考えられる多型変換のメカニズムを提案できる。

次にフラジェリンのN、C両末端を限定酵素分解したものは、Inner-tube 構造の無い Lt 型の繊維を再構成する。この Lt 型べん毛繊維は、多型変換能の消失やらせん対称性が異なるなどの性質を持つ。そこで Lt 型べん毛繊維のサブユニット配置を決定して、L、R型のべん毛繊維のものと比較考察すれば、Inner-tube が多型変換のメカニズムにおいて果たす役割を明らかにできる。

6.2. 材料と方法

6.2.1. 使用したべん毛繊維と X線繊維回折用試料作製

本研究に使用したべん毛繊維およびその特徴を表 6.1 にまとめて書いた。

表 6.1 本研究で用いたL、R、Lt型の直線型べん毛繊維

べん毛繊維名称	R型	L型	Lt型
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	フラジェリンの N,C 末端残基を限定酵 素分解したもの*
べん毛繊維の形状	直線型	直線型	直線型
素繊維の傾き	右巻き	左巻き	L型よりさらに傾い た左巻き
使用した実験	・サブユニットらせん対 称性の決定 ・9 Å 分解能べん毛織 維構造	・サブユニットらせん対 称性の決定	・サブユニットらせん 対称性の決定

ここで*Lt型は SJW1655 のC末端8残基を欠失したものである。SJW1655(1-486)

X線繊維回折用試料の作製は、L型、R型べん毛繊維では4章で記述した方法を用いた。

Lt型べん毛繊維でも基本的に4章で記述した方法を用いたが、一部以下のような操作を加えた。Lt型べん毛繊維は脱重合しやすく低塩濃度下ではモノマー化が甚だしいため、精製後は0.1M程度の硫酸アンモニウムが緩衝液中に必須である。しかし0.1M硫酸アンモニウムはべん毛繊維の液晶化を完全に阻害する。そこで硫酸アンモニウムの濃度を下げるため、まず0.1M硫酸アンモニウムを含む緩衝液中のLt型べん毛繊維約10mgを数mlの50mM glycine pH5.0緩衝液で素早く懸濁して高速遠心しペレットとした。次にこのペレットをもう一度1mlの50mM glycine pH5.0緩衝液で素早く懸濁した後、冷却遠心機 MRX-150(TOMY)にて1万g、15時間以上遠心を行った。この操作中に多くのLt型べん毛繊維がモノマー化するが、最終段階で硫酸アンモニウムの濃度が小さい液晶状態のLt型べん毛繊維ゾルが得られた。ただしこの液晶状態はやや状態が悪く、高配向度化に最適な状態ではなかった。

6.2.2. X線繊維回折像の記録とデータ処理

X線繊維回折像の記録は、3.2 に記述した方法を用いた。特にべん毛繊維のらせん対称性を決定するものはカメラ距離を精密に求め4~5桁の精度を確保した。

らせん対称性を決めるために3章で記述した2次元強度プロファイルフィティングプログラム(RAD2D)を用いてデータ処理を行った。ただし1重らせんのピッチや1ターン中のサブユニットの数を精度良く決めるために、それぞれのパラメータに感受性の高い領域に限って、シミュレートされた回折像と実験で得たX線回折像との残差を計算した。ここで残差 Res は次の量である。

$$\text{Res} = \frac{\sum |I_{\text{obs}} - I_{\text{calc}}|}{\sum I_{\text{obs}}} \quad \text{----- (6.1)}$$

ここで 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。

Σ は目的とする領域内での加算を表す。

6.3. 結果と考察

6.3.1. らせん対称性の決定

6.3.1.1. L、R、Lt 型べん毛繊維のらせん対称性の違い

L型、R型、Lt 型べん毛繊維のらせん対称性の違いは低分解能の X 線回折像ではっきりと見られる。図 6.1 は 20 Å 分解能での X 線回折像で、(a)が L 型(左半分)と R 型(右半分)を、(b)が Lt 型(左半分)と R 型(右半分)のべん毛繊維の回折像を比較している。図中には主な層線のベッセル関数の次数も示した。素繊維からくる層線は、R 型では素繊維が右巻きのため +11 のベッセル関数の次数を持ち、L、Lt 型では左巻きのため -11 となっている。この層線と赤道の距離は L 型で $1/1016 \text{ \AA}^{-1}$ 、R 型で $1/425 \text{ \AA}^{-1}$ 、Lt 型で $1/247 \text{ \AA}^{-1}$ である。この距離が短いほど素繊維の傾きが小さく、素繊維の傾きは Lt、R、L 型の順に小さくなっている。この様子は図 5.5 の円筒表面格子からも良く理解できる。

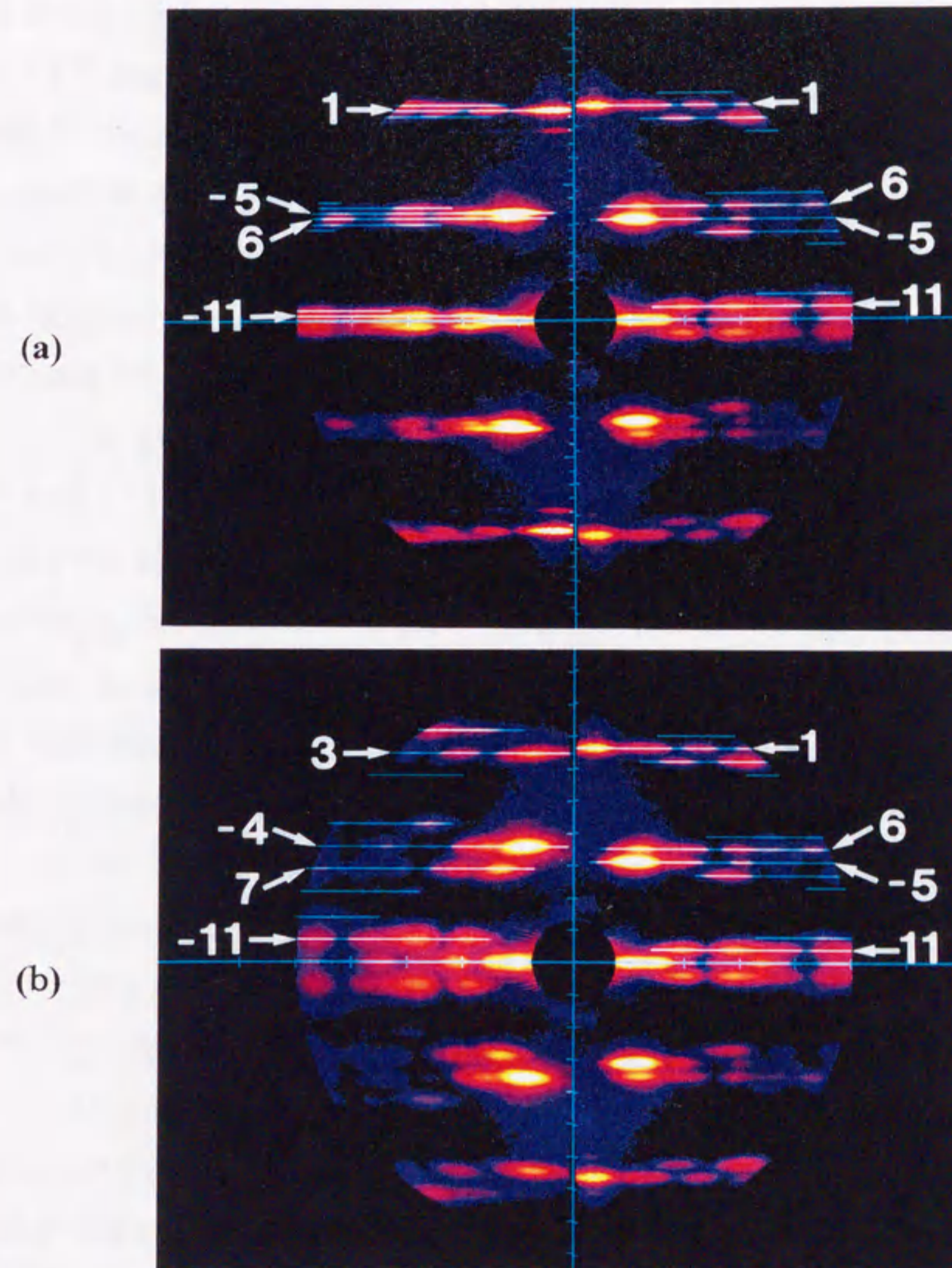


図 6.1 低分解能領域でのL、R、Lt型べん毛繊維からのX線回折像
 (a)はL型(左半分)、R型(右半分)べん毛繊維の回折像を示し、(b)は Lt 型(左半分)、R型(右半分)のべん毛繊維の回折像を示す。分解能は端部で20Åである。主な層線にはベッセル関数の次数を書き入れた。正は右巻きを、負は左巻きを意味する。

6.3.1.2. べん毛繊維1及び3重らせんのピッチ

3章で述べたように、得られたX線繊維回折像を逆空間に変換し、4象限の回

折像を平均化し、S/N の改善された第1象限だけのデータを得た。この変換に使用するべん毛繊維ゾルとIPとの距離(カメラ距離)は、後のすべての長さデータの精度に影響を与えるため、可能な限り精度よく測定を行った。距離の校正に用いた $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の格子定数は Si の格子定数を用いてキャリブレーションを行った。また試料のキャピラリー直径も同じものを用いた。これらを慎重に考慮すると、カメラ距離の精度は4~5桁と見積もられた。このことから以下の議論では長さに関する精度はすべて4~5桁以内の精度である。

図 6.1 の第1象限の回折像を極座標系に変換したものを図 6.2 に示す。横軸は 0.008 \AA^{-1} から 0.05 \AA^{-1} の逆空間原点からの距離に相当し、縦軸は赤道から子午線へ向けての $0 \sim 90$ 度の角度方向に相当する。(a)はL型の、(b)はR型の、(c)はLt型のものである。この極座標データを用い、2次元強度フィッティングプログラム(RAD2D)を使用して、まず $0.038 \text{ \AA}^{-1} (=1/26 \text{ \AA}^{-1})$ 近傍の層線、すなわちL、R型では1重らせんからくる層線位置、Lt型では3重らせんからくる層線位置を正確に求めた。層線位置の絶対値を決定するためには、できるだけS/Nの良い部分で決定する必要がある。そこで、強いピークを含みS/Nが良好な図 6.2 中に描かれた領域1を用いて層線の位置決定を行った。

図 6.3 は、RAD2Dで、あらかじめX線ビームやべん毛繊維の配向度などのパラメータを最適した後に、層線位置を変えながら領域1での計算値と観測値の残差をプロットしたものである。L、R、Lt型のそれぞれの残差のグラフは、単一の最小値をもち、しかもその前後でスムーズな変化を見せている。このことはこの単一最小点の位置が、1重または3重らせんからくる層線位置を示すと同時に、この位置が極めて精度よく得られることを意味している。これらの残差のデータより、それぞれの位置はエラーを含めてL型で $0.037898 \pm 0.000002 \text{ \AA}^{-1} = 1/(26.387 \pm 0.002 \text{ \AA})$ 、R型で $0.038850 \pm 0.000002 \text{ \AA}^{-1} = 1/(25.740 \pm 0.002 \text{ \AA})$ 、Lt型で $0.037633 \pm 0.000002 \text{ \AA}^{-1} = 1/(26.572 \pm 0.002 \text{ \AA})$ と決定できた。この値は表 6.2 にまとめておいた。

6.3.1.3. 1ターン中のサブユニット数の決定

次に1重らせん1ターン中にあるサブユニット数を前と同様にRAD2Dを用いて決定した。前述の最適なX線ビームやべん毛繊維配向度などのパラメータを使用し、大まかに決めたらせん対称性の近傍で、L、R型では右巻き1重らせんの、Lt型では左巻き1重らせんの1ターン中のフラジェリン数を変えながら、図6.2に示した領域2、3での残差を計算した。この領域2、3の位置はそれぞれのX線回折像でS/Nが良好で、らせん対称性の変化に敏感な位置を選んだものである。図6.4にその結果を示した。

(a) はL型べん毛繊維の結果を示している、残差の最小位置は領域2、3でわずかに異なるがほぼ同じ位置となり、 5.5130 ± 0.0002 個/ターンであった。ここでの数値の精度は前の1重らせんからくる層線位置の決定と異なり、絶対値の計測ではなく観察されたデータによって決定される。図6.4のグラフの最小点から判断すると、このらせん対称性の場合も前述のらせんのピッチと同様に4桁～5桁の精度が確保できる。この得られた結果と前の1重らせんピッチの結果を合わせると、L型べん毛繊維の結晶学的な周期長が得られる。すなわち結晶学的単位はべん毛繊維軸方向に 4063.5 \AA の周期長で、右巻き1重らせん154ターン中に849個のフラジェリンサブユニットがある。この精密に決めたらせん対称性からサブユニットの配置を精度良く求めることができる。さらに11重らせんの素繊維のねじれ率も計算でき、 $-5.62 \text{ radian}/\mu\text{m}$ となる。ねじれ率の符号は右巻きを正とし、左巻きを負としている。このねじれ率は後のBi-stableモデル計算に重要となる。

(b) はR型べん毛繊維のもので、領域2、3の残差の最小位置はほぼ一致しており、 5.4697 ± 0.0002 個/ターンである。L型と同じように結晶学的な単位が求められ、べん毛繊維軸方向 1698.8 \AA の長さで、361個のフラジェリンサブユニットが右巻き1重らせん66ターン中にある。L型と同じく素繊維のねじれが計算でき、 $13.45 \text{ radian}/\mu\text{m}$ となる。この値はL型の場合の2倍以上で、このねじれの大きさが図6.1などに示されるようにL型に比べてX線繊維回折像の層線の間隔が大きくなる理由である。

(c) はLt型のべん毛繊維の場合で、Box2、3の残差の最小位置はややずれるがほぼ同じで、 3.6436 ± 0.0003 個/ターンと決定された。この試料で残差の最小値

の谷が浅く精度がやや悪いのは、べん毛繊維安定のための 0.1M 硫酸アンモニウムが完全に除去できず、高配向度を得る緩衝液条件を満足できないためである。しかし図 6.4 (c)の残差のグラフから判断してらせん対称性の精度として4桁程度は確保できている。この結果からLt型の結晶学的単位は、べん毛繊維軸方向1727.2 Åの長さで、368 個のフラジェリンサブユニットが左巻き1重らせん 101 ターン中にある。素繊維のねじれは-23.14 radian/ μ m で、Lt型べん毛繊維の11重らせんは、R型べん毛繊維の2倍程度大きく左巻きに傾いている。

これら、L、R、Lt型べん毛繊維のらせん対称性、結晶学的単位の軸方向周期長、ねじれなども表 6.2 にまとめて示した。表には素繊維に添ったサブユニット間距離や素繊維からくる層線位置もあわせて示した。

表 6.2 3種類の直線型べん毛繊維のらせん対称性のパラメータ

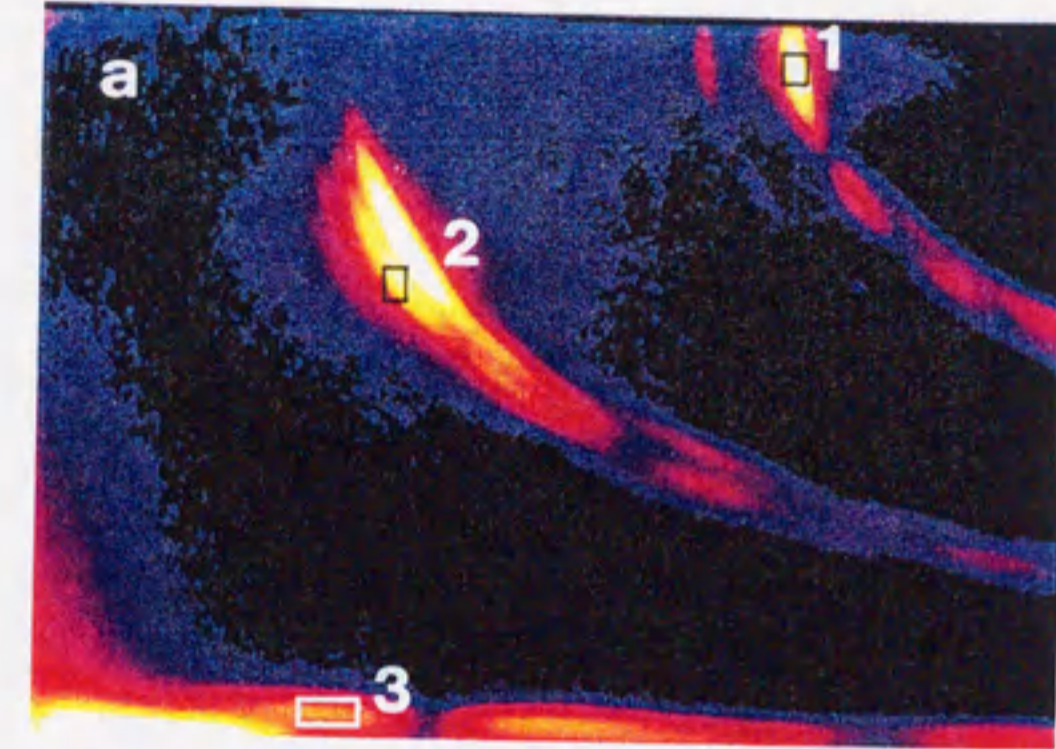
繊維型	1重らせん層線(L,R) 3重らせん層線(Lt)位置	1重らせん層線(L,R) 3重らせん層線(Lt)ピッチ	1重らせん中の サブユニット数
L型	$0.037898 \pm 0.000002 \text{ \AA}^{-1}$	$26.387 \pm 0.002 \text{ \AA}$	5.5130 ± 0.0002
R型	$0.038850 \pm 0.000002 \text{ \AA}^{-1}$	$25.740 \pm 0.002 \text{ \AA}$	5.4697 ± 0.0002
Lt型	$0.037633 \pm 0.000002 \text{ \AA}^{-1}$	$26.572 \pm 0.002 \text{ \AA}$	3.6436 ± 0.0003

繊維型	素繊維のねじれ	素繊維に沿ったサブユニット間距離	結晶学的単位 Subunits/ターン
L型	-5.62 radian/ μ m	52.67 Å	849/154
R型	13.45 radian/ μ m	51.86 Å	361/66
Lt型	-23.14 radian/ μ m	51.91 Å	368/101

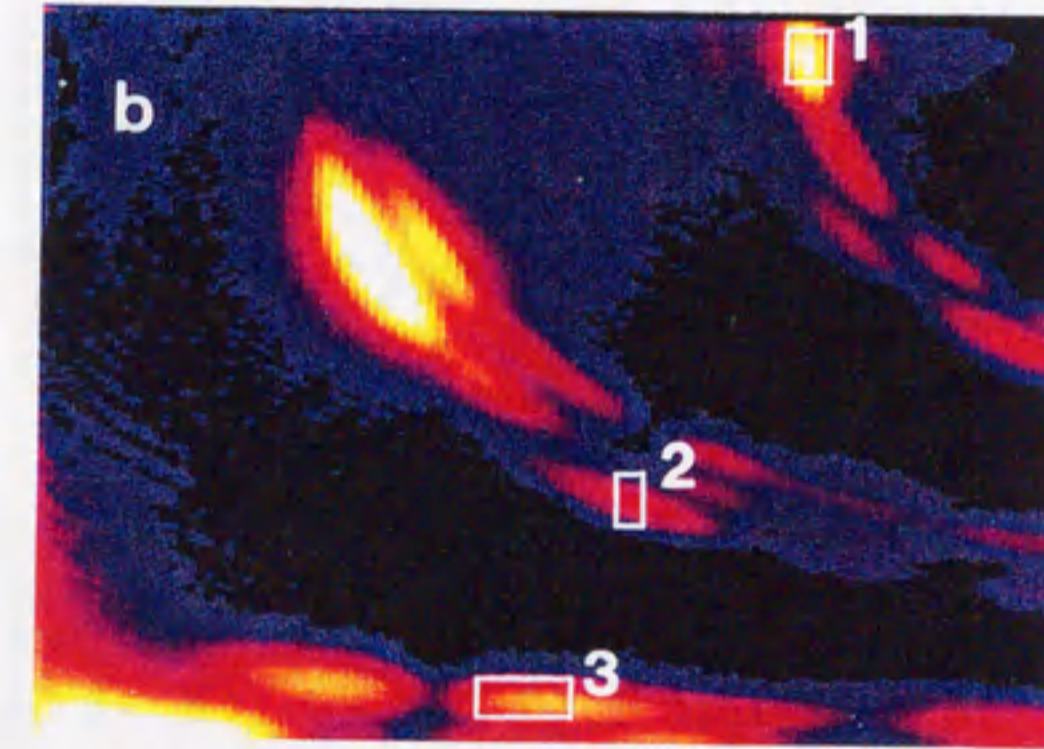
繊維型	結晶学的軸方向周期	素繊維層線位置
L型	4063.5 Å	1/1015.9 Å
R型	1698.8 Å	1/424.7 Å
Lt型	1727.2 Å	1/246.7 Å

L、R型については右巻き1重らせんについて、その層線位置や1ピッチ中のサブユニット数を決定し、Lt型については、右巻き3重らせんについてピッチを、左巻き1重らせんについて1ピッチ中のサブユニット数を決定した。これらの結果から素繊維のねじれや、それに沿ったサブユニット間距離を求めた。さらに結晶学的な単位を求めて素繊維からくる層線位置を計算した。

(a) L-type



(b) R-type



(c) Lt-type

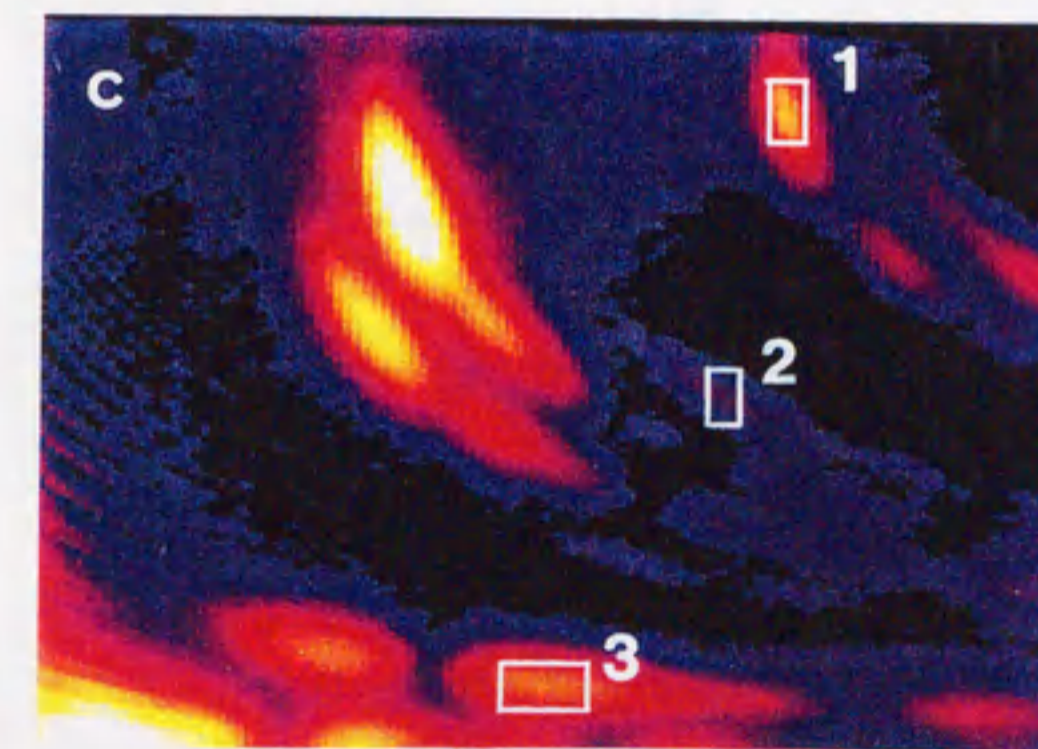


図 6.2 極座標でのX線繊維回折像とらせん対称性決定に使用した領域
(a)はL型べん毛繊維、(b)はR型べん毛繊維、(c)は Lt 型べん毛繊維の場合を示す。記録された回折像の絶対的な逆空間での位置精度はカメラ距離と、IP の読みとり位置精度で決まる。これらは4~5桁の精度が確保されている。1~3 の領域は、それぞれ S/N が良い回折強度が強いピーク近傍領域である。

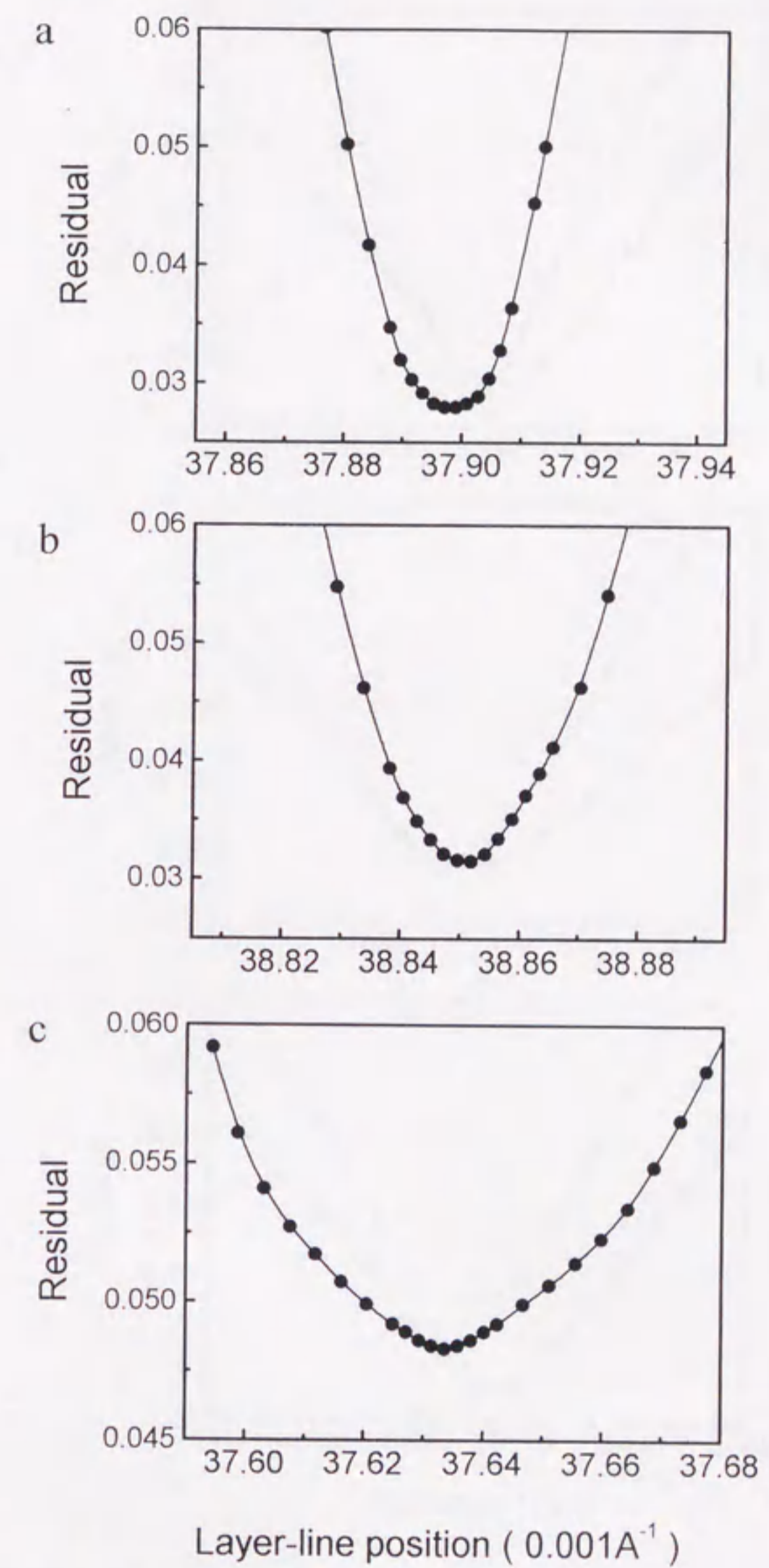


図 6.3 X線繊維回折像の 0.038\AA^{-1} 近傍層線位置の決定
 (a)はL型べん毛繊維、(b)はR型べん毛繊維、(c)は Lt 型べん毛繊維の図 6.2 領域1での残差の変化を示す。L、R型では1重らせん、Lt型では3重らせんに対応する層線位置を、あらかじめ得られているおおよその位置近傍で変化させて2次元強度プロファイルフィッティング法でシミュレーションし、得られた回折像と観測値との残差をプロットした。最小点がそれぞれのらせんに対するピッチを与える。

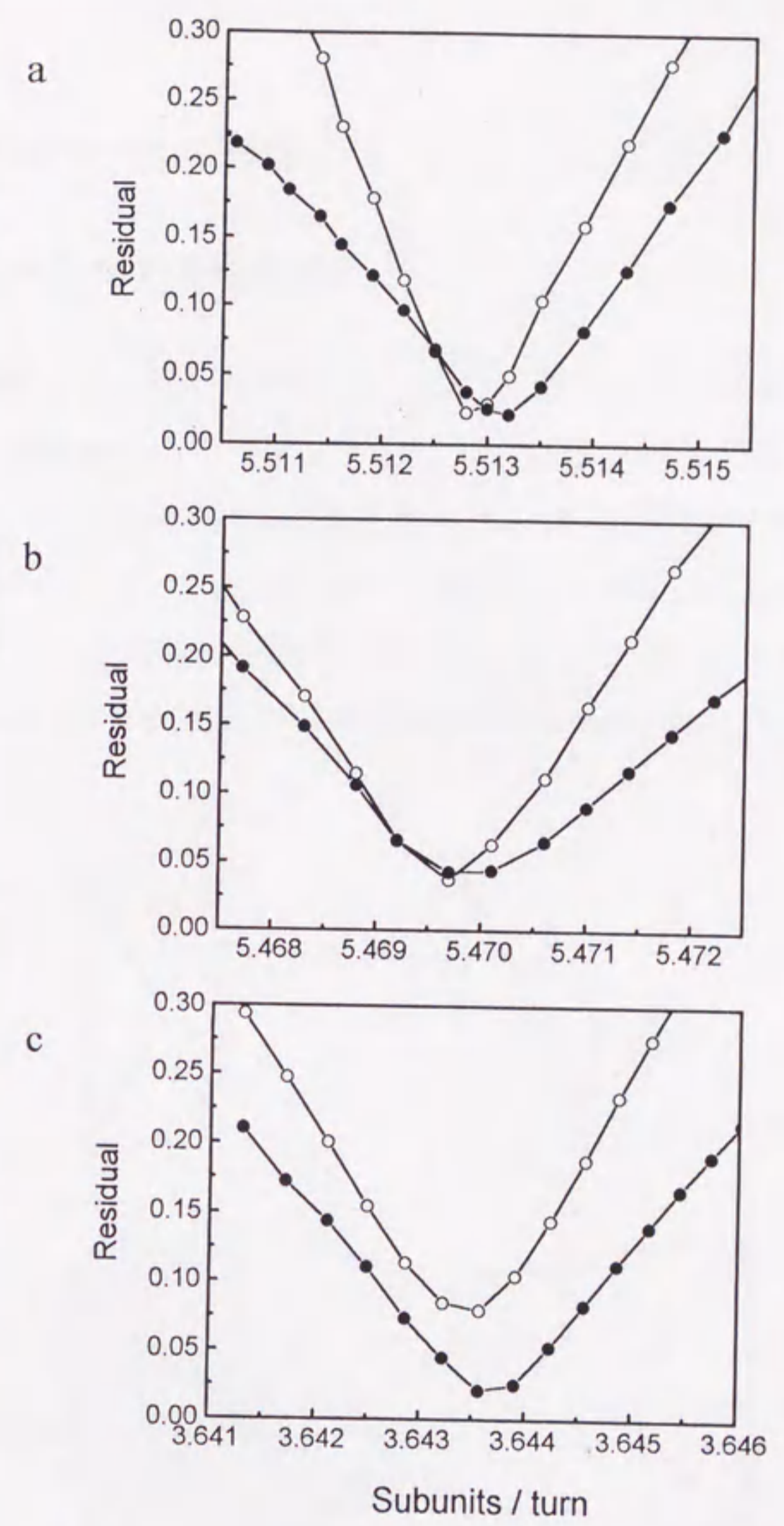
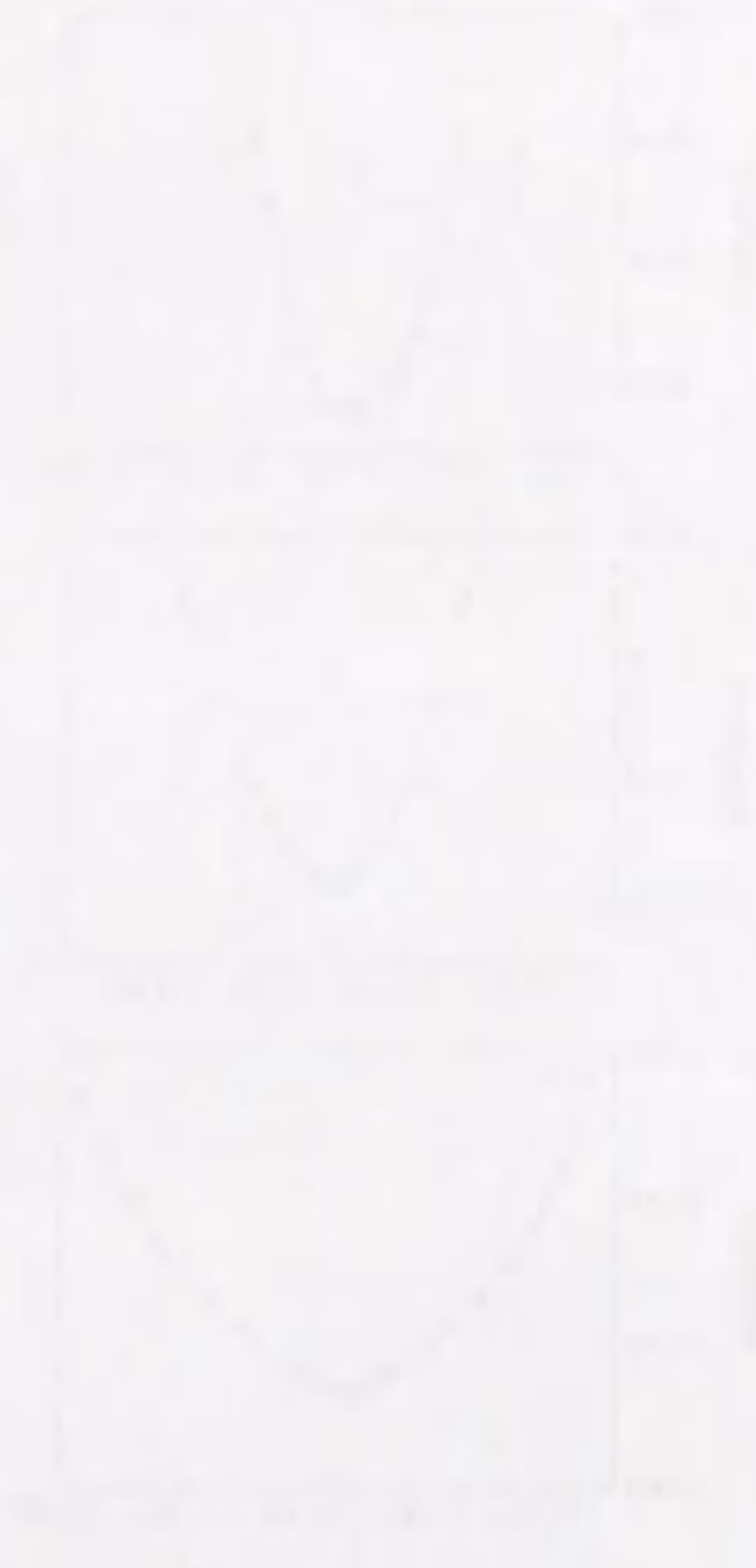


図 6.4 1重らせん1ターン中にあるサブユニットの数の決定
 (a)はL型べん毛繊維、(b)はR型べん毛繊維、(c)はLt型べん毛繊維の図6.2領域2、3での残差の変化を示す。図6.3で決定したらせんのピッチを用い、L、R型では右巻き1重らせん、Lt型では左巻き1重らせんに沿って1ターン中に有るサブユニットの数をあらかじめ得られているおおよその数近傍で変化させながら2次元強度プロファイルフィッティング法でシミュレーションし、得られた回折像と観測値とのをプロットした。最小点がそれぞれの1ターン中のサブユニット数を示す。
 ○;領域2 ●;領域3

6.3.2. Bi-stable モデルの検証

6.3.2.1. サブユニットの作る格子

前節で得られたらせん対称性とその軸方向の繰り返し周期を用いることにより、各直線型べん毛繊維において、そのフラジェリンサブユニット間の距離と位置関係が求められ、サブユニットの作る格子を正確に描くことができる。図 6.5 は決定したらせん対称性から計算された、L, R, Lt型のべん毛繊維の、半径25 Å(上段)と45 Å(下段)におけるサブユニットの格子を描いたものである。すなわち図 5.5 の円筒表面格子の一部を切り出したもので各頂点と中心交差点にサブユニットがある。25 Å、45 Åの半

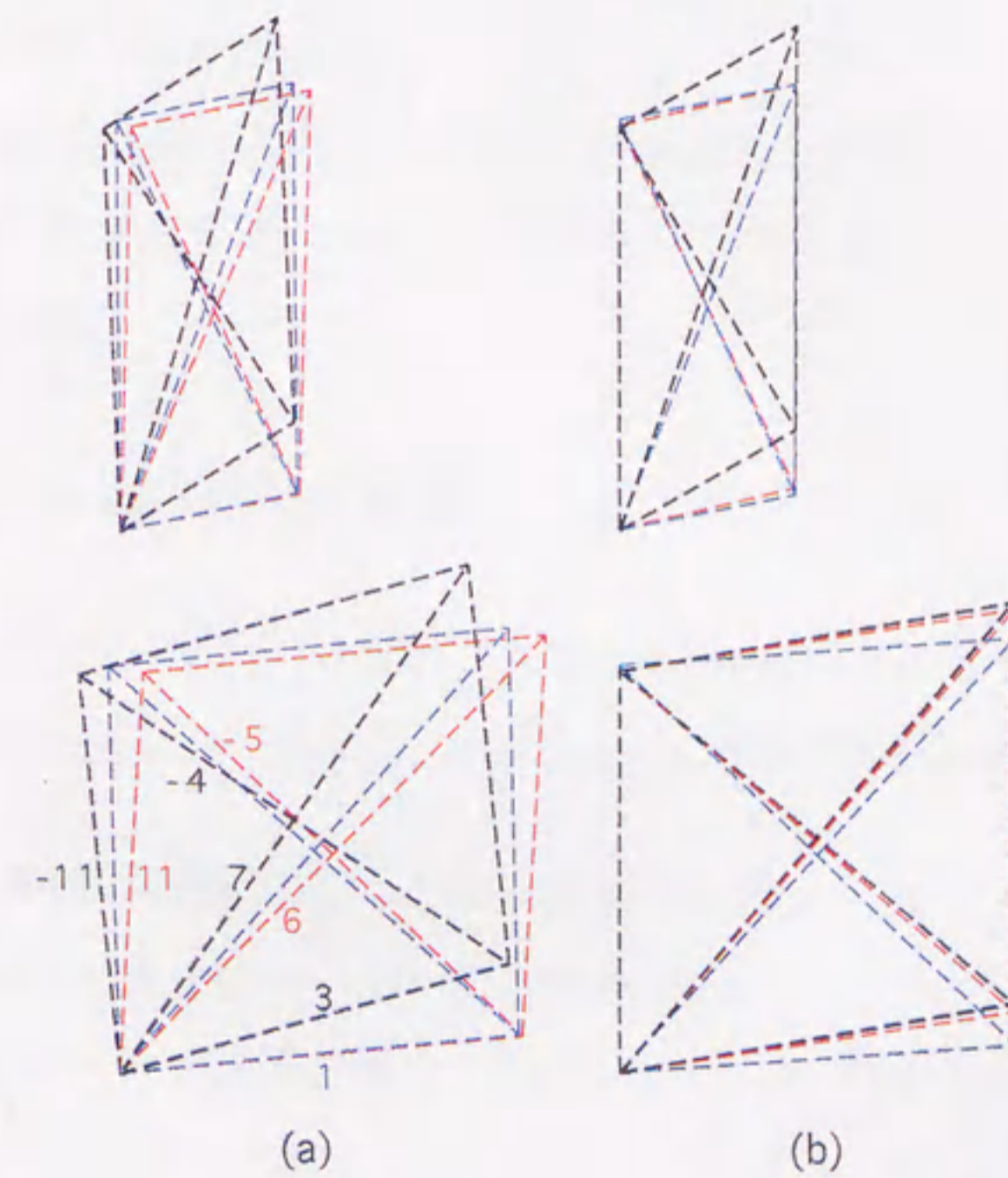


図 6.5 L, R, Lt型のべん毛繊維の、半径 25 Åと 45 Åにおけるサブユニットの格子
赤:R型、青:L型、黒:Lt型を示す。数字は辺に対応するらせんの多重数を、符号は左右の巻き方向を示している。例えば6は右巻き6重らせんの方向を示す。上は半径25 Å、下は45 Åのものを示す。左の2つはべん毛繊維軸を垂直にして、右2つは11重らせんの辺を一致させて重ねて描いている。

径を選んだ理由は動径電子密度分布からもわかるように、これらが Inner-tube、Outer-tube と呼ばれるべん毛繊維の構造に重要な半径だからである^{47), 54), 55)}。左側 (a) はべん毛繊維軸を垂直方向にしたときのそれぞれの格子を、右側 (b) は11重らせんに沿った辺を、すなわち素繊維方向の辺を一致させるように回転させた格子を描いてあり、それぞれの格子が直接的に比較されてその差がよくわかる。特徴的なのは半径45 Åの(b)で、R型と Lt 型の格子がほぼ一致しており、L型は異なっていることである。この特徴は格子の角度の違いだけでなく素繊維に沿った長さでも同じでR、Lt 型はほぼ同じ長さでL型とは 0.8 Åの違いがある。この素繊維に沿ったサブユニット間の差は Bi-stable モデルの重要なパラメータでモデル計算に使用される。これら3つの格子の比較から、Outer-tube でのサブユニットの相互作用はL型、R型の2つの状態だけでそのほかの状態が無いことを強く示唆している。

また図6.5の上段半径25 Åでの格子は全く異なるサブユニット配置を見せる。R型、L型の格子はよく似ており Lt 型だけが際違った違いを示している。これについては後で考察を加える。

6.3.2.2. Bi-stable モデルの計算

らせん対称性が正確に決定されたので Bi-stable モデルで予想されるべん毛繊維のらせん形を計算してみる。考察にあたって次の妥当と思われる仮定を行う。

1. べん毛繊維の断面は変形のない円盤平面である。
2. 変形量は応力に比例する弾性限界内である。
3. 複数本のストランドが短い場合については重ね合わせの原理が使える。

まず簡単化のため素繊維が繊維軸に平行な場合を考察する。図 6.6 (a)に示したように、べん毛繊維軸に垂直な2つの切断面を想定する。つまりこの繊維の構造保持に重要なサブユニット間相互作用を行う半径と同じ半径の2つの円形切断面を想定する。切断面はその縁でストランドジョイントと呼ぶ素繊維間相互作用により形成されるストランドでつながっている。11本のストランドは長さが同じならば切断面は平行でべん毛繊維は直線となる。すなわち

L型やR型の直線型べん毛繊維に相当する。このストランドの長さが1つでも異なると、図 6.6 (b)のように曲がりが発生する。図 6.6 (b)では1本のストランドが他より δ 短い場合を描いてあり、これはL型のストランドにR型のストランドが1本入ったことを想定している。この曲りは図 6.6 (c)に描かれた相似性を用いて解析的に考察でき、6.3.1 で得られたらせん対称性のデータを用いて計算できる。考察のため、図中のそれぞれの変形量、長さ、座標を次のようにとる。

1. 長短のストランド長の差を δ とする。
2. もとの切断円盤間の距離を d_0 、変形後の切断円盤中心間距離を d とする。
3. 切断面の直径を D とする。
4. 円筒座標系を採用し、切断面の中央を通る軸を Z 軸、1本のストランドが短い場合に、最も切断面円盤が近づいた方向を $\theta = 0$ とする。

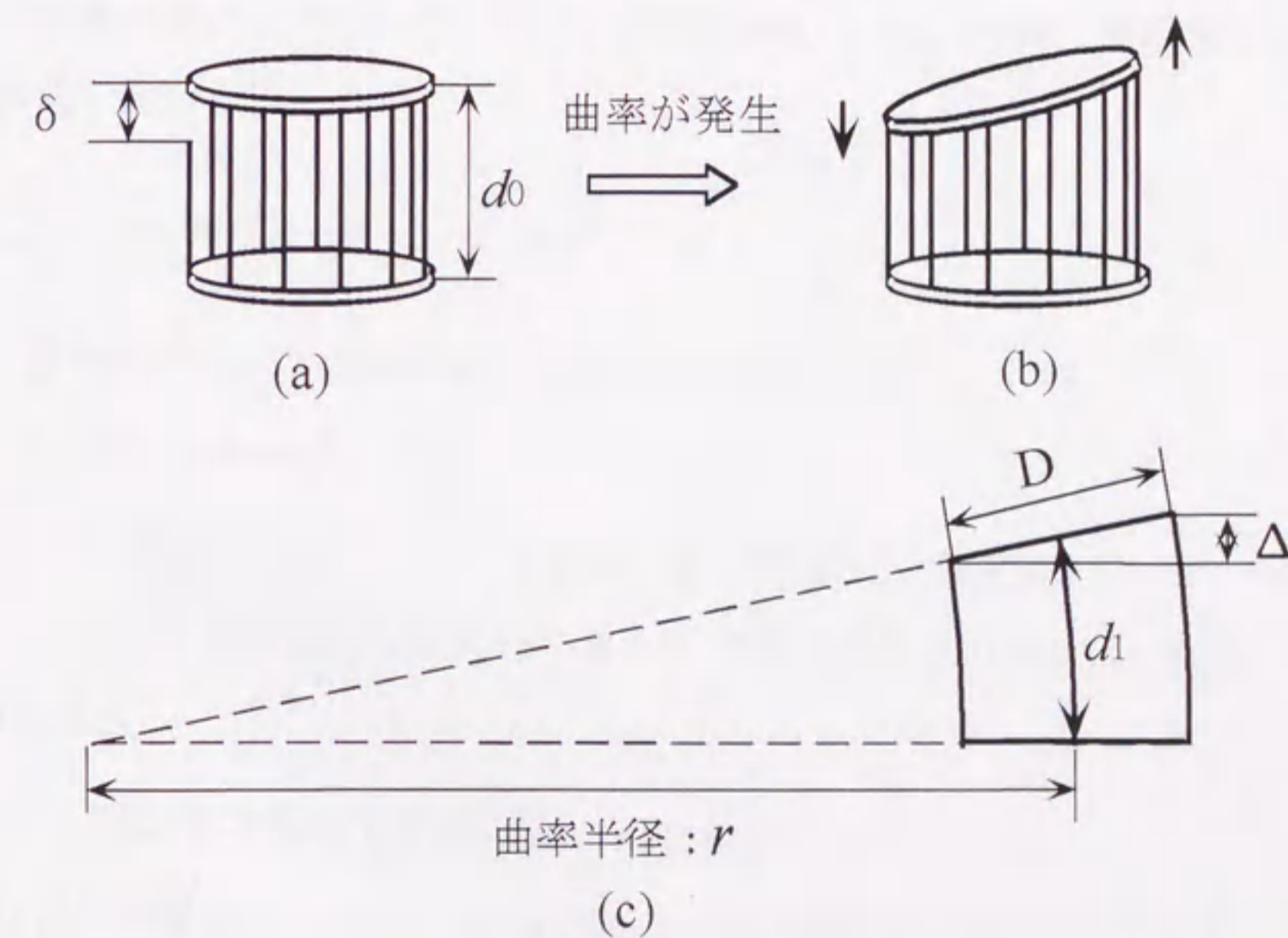


図 6.6 べん毛繊維の Bi-stable モデルによる曲率の計算

(a)べん毛繊維内で距離 d_0 離れた直径 D の仮想断面と、これらを結ぶ11本のストランドのうち1本が δ 短い状態を示した図。(b)1本の短いストランドを2つの仮想断面に接続した図。他のストランドにも変形が起こり仮想断面は傾き、距離も d_0 から d_1 に縮まる。(c)仮想断面の傾きを示した図。仮想断面は変形により周辺部で Δ だけ傾き、三角形の相似から、 $(d_1/r) = (\Delta/D)$ の関係がえられる。これにより曲率 $\kappa = 1/r$ が計算できる

この2つの切断面で挟まれた微小体積について、次の2つの力学的釣り合いが満足されなくてはならない。

1. 力が釣り合わなくてはならない。
2. モーメントが釣り合わなくてはならない。

まず力の釣り合いは、図 6.6 から明らかのように力の加わっている方向はZ軸方向だけなので次の様な式が成立すればよい。

$$\sum_i^{11} T_i = 0 \quad \text{----- (6.2)}$$

ここで T_i は i 番目のストランドに加わっている力を表す

モーメント釣り合いは、加わっている力の対称性から、 $\theta = 0, \pi$ 方向に対称軸ができるので次式で表される。

$$\sum_i^{11} T_i \cos(2\pi i / 11) = 0 \quad \text{----- (6.3)}$$

次に i 番目のストランドの長さ l_i は、仮定より次式で表される。

$$l_i = d_0 + \xi + \eta \cos(2\pi i / 11) \quad \text{----- (6.4)}$$

ここで ξ, η は変形を表すパラメータであり、後で決定する。仮定によりストランドに発生している力 T_i と(6.2)式のストランドの長さは、弾性定数により1次式にて関連づけられ次式となる。

$$T_i = C(\xi + \eta \cos(2\pi i / 11)) + [C\delta] \quad \text{----- (6.5)}$$

ここで C は弾性定数である。また $[C\delta]$ は $i = 11$ の場合のみ加える項であるこの (6.5)式を、(6.2)、(6.3)式に代入することで ξ, η を決めることができる。すなわち

$$11\xi + \delta = 0, \quad (11/2)\eta + \delta = 0 \quad \text{----- (6.6)}$$

$$\xi = -\delta/11, \quad \eta = -2\delta/11 \quad \text{----- (6.7)}$$

途中、次の公式を用いた。

$$\sum_i^{11} \cos(2\pi i/11) = 0 \quad \text{----- (6.8)}$$

$$\sum_i^{11} \cos^2(2\pi i/11) = 11/2 \quad \text{----- (6.9)}$$

これにより変形後の切断円盤中心間距離 d_i 、及び i 番目のストランド長 l_i は次のように表される。

$$d_i = d_0 - \delta/11 \quad \text{----- (6.10)}$$

$$l_i = d_0 - \delta/11 - 2\delta/11 \cdot \cos(2\pi i/11) \quad \text{----- (6.11)}$$

この (6.10)、(6.11) 式と、図 6.6 (C) 中の3角形の相似からべん毛繊維の曲率 κ が計算できる。図中から明らかなように、曲率半径と変形後の切断面間距離 d_i 、切断面円周の最短距離と最長距離の差 Δ 及び切断面半径 D には次の関係がある。

$$d_i/r = \Delta/D \quad \text{----- (6.12)}$$

そこで曲率 κ は $1/r$ で現されるので (6.12) 式を変形して次式で得られる。

$$\kappa = 1/r = \Delta/(Dd_i) = 4\delta/(11Dd_i) \quad \text{----- (6.13)}$$

ここで (6.11) 式から $\Delta = (4\delta/11)$ であることを用いた。これにより曲率 κ はストランドの長さ d_0 あたりの差 δ と、構造を保持するのに重要なべん毛繊維の直径 D 、及び切断面間距離 d_i で計算されることが解析的に求められた。この直径 D は、これまでの動径質量分布や構造解析の結果から Outer-tube の直径 90 \AA を用いるのが妥当と判断される。

次に $\theta=0$ 方向のストランドに加え、2本目の $\theta=2\pi/11$ 方向のストランドが短くなった場合を、重ね合わせの原理を用いて考察する。すなわち2本目のストランドが短くなくても独立して同じ変形が生じ、その変形を加算して全体の変形量が得られるとする。そこで (6.10)、(6.11) 式を用いると切断円盤中心間距離 d_2 、及び i 番目のストランド長 l_i は次式で表すことができる

$$d_2 = d_0 - 2\delta/11 \quad \text{----- (6.14)}$$

$$l_i = d_0 - 2\delta/11 - 2\delta/11 \cos(2\pi i/11) - 2\delta/11 \cos(2\pi(i-1)/11) \quad \text{----- (6.15)}$$

同様にして n 本のストランドが短い場合は次式で表すことができる

$$d_n = d_0 - \frac{n\delta}{11} \quad \text{-----(6.16)}$$

$$l_i = d_0 - \frac{n\delta}{11} - \frac{2\delta \sin(n\pi/11)}{11 \sin(\pi/11)} \cos((2i-n)\pi/11) \quad \text{-----(6.17)}$$

この (6.16)、(6.17) 式を用いれば、(6.13)式で曲率求めたと同様にして n 本のストランドが短い場合の曲率 κ_n が次式で求められる。

$$\kappa_n = \frac{4\delta \sin(n\pi/11)}{11 \sin(\pi/11) \cdot D d_n} \quad \text{-----(6.18)}$$

以上、素繊維がべん毛繊維軸と平行な場合を考察してきた。しかしながらこれまでで明らかになったように素繊維はL、R型でべん毛繊維軸に対してわずかに傾いている。その傾きは、表 6.2 で表されるねじれ率 τ によって表される。具体的な傾きとして、これまでの考察からべん毛繊維の多型変換を担っていると考えられる半径 45 Å の Outer-tube を考えて、L型で -1.45 度、R型で 3.46 度傾いている。この傾きは 11 本の素繊維が 1 本ずつ L型から、R型に変するにつれて、均等にねじれが変化すると近似して良い。(Bi-stable モデルによる。) すなわち n 本の R型素繊維が混合された時のねじれ率 τ_n 、傾き θ_n は次式で表される。

$$\tau_n = -5.62 \cdot (1 - n/11) + 13.45 \cdot n/11 \quad \text{-----(6.19)}$$

$$\theta_n = -1.45 \cdot (1 - n/11) + 3.46 \cdot n/11 \quad \text{-----(6.20)}$$

このねじれ率の変化を考慮して(6.18)式の曲率を厳密化する。すなわち(6.18)式中にある d_n, δ を厳密に表す。

この厳密化のためこれまで切断面間距離 d_0 を適当にとっていたが、これをL型べん毛繊維のある素繊維に沿って隣接するサブユニットの中心を含む面にとる。これにより d_0 はL型べん毛繊維の素繊維に沿ったサブユニット間距離 d_{11L} を用いて

$$d_0 = d_{11L} \cos \theta_n \quad \text{-----(6.21)}$$

と表される。L型とR型のストランド長の差 δ はR型べん毛繊維の素繊維に沿ったサブ

ユニット距離 d_{11R} を同時に用いて、

$$\delta = (d_{11L} - d_{11R}) \cos \theta_n \quad \text{----- (6.22)}$$

となる。そして切断面間距離 d_n はこれを用いて次式で表される。

$$d_n = d_{11L} \cos \theta_n - n\delta / 11 \quad \text{----- (6.23)}$$

これら (6.19)~(6.23)式を用いることにより、(6.18)式中の d_n, δ を、表 6.2 にまとめられた実験値を用いて厳密に求めることができ、Bi-stable モデルで予測される曲率が正確に計算できる。

図 6.7 は以上の考察によって得られた、Bi-stable モデルの予測する10種類のらせん形のねじれ率 τ_n ・曲率 κ_n と、実際に観察されたべん毛繊維の曲率・ねじれ率とを同時に示したものである。○が Bi-stable モデルから予測される点で、これらの計算のもとになったL型とR型べん毛繊維(■)も含めて実線で結んである。Bi-stable モデルから予測される点に対して、観察された種々のべん毛繊維のねじれ率・曲率を現す点(▲●▼▽◇)は良く一致しているといえる。特に曲率が小さい部分では一致度が高い。しかしながら曲率が大きく変形量が大い領域、ねじれ率3~6rad/ μ m では、実測値の曲率が、予測値より大きくなり一致しない。この理由はよく分からないが、一つの可能性として、このような大きな変形領域では、初めに仮定した変形が応力に直線的に比例するとする弾性限界の仮定が成り立たないためと考えられる。

6.3.2.3. Bi-stable モデル検証の意味するもの

図 6.7 に示した Bi-stable モデルをもとにした10種類のらせん形の曲率・ねじれ率の計算は、べん毛繊維の Outer-tube の半径 45 Å や、L型、R型べん毛繊維の精密ならせん対称性の計測結果を用いており、自由に変えることのできるパラメータは無い。そのような制限にもかかわらず、図 6.7 に示したように計算値と測定値とが良く一致するのは Bi-stable モデルが多型変換の極めてよいモデルであることを示唆している。特に、動径質量分布などから明らかになった半径 45 Å の Outer-tube がべん毛繊維の構造維持に重要であり、かつ多型変換に極めて大きな役割を果たしていることを

強く示唆している。すなわち多型変換のメカニズムは Outer-tube で起こるスイッチングにあることを示している。このことは、Outer-tube だけで、Inner-tube が無くてもべん毛繊維を構築でき^{42), 48)}、さらに種繊維に重合することでらせん形をとることや、外部条件でらせん形をとることができる実験事実とも良く合う⁵³⁾。

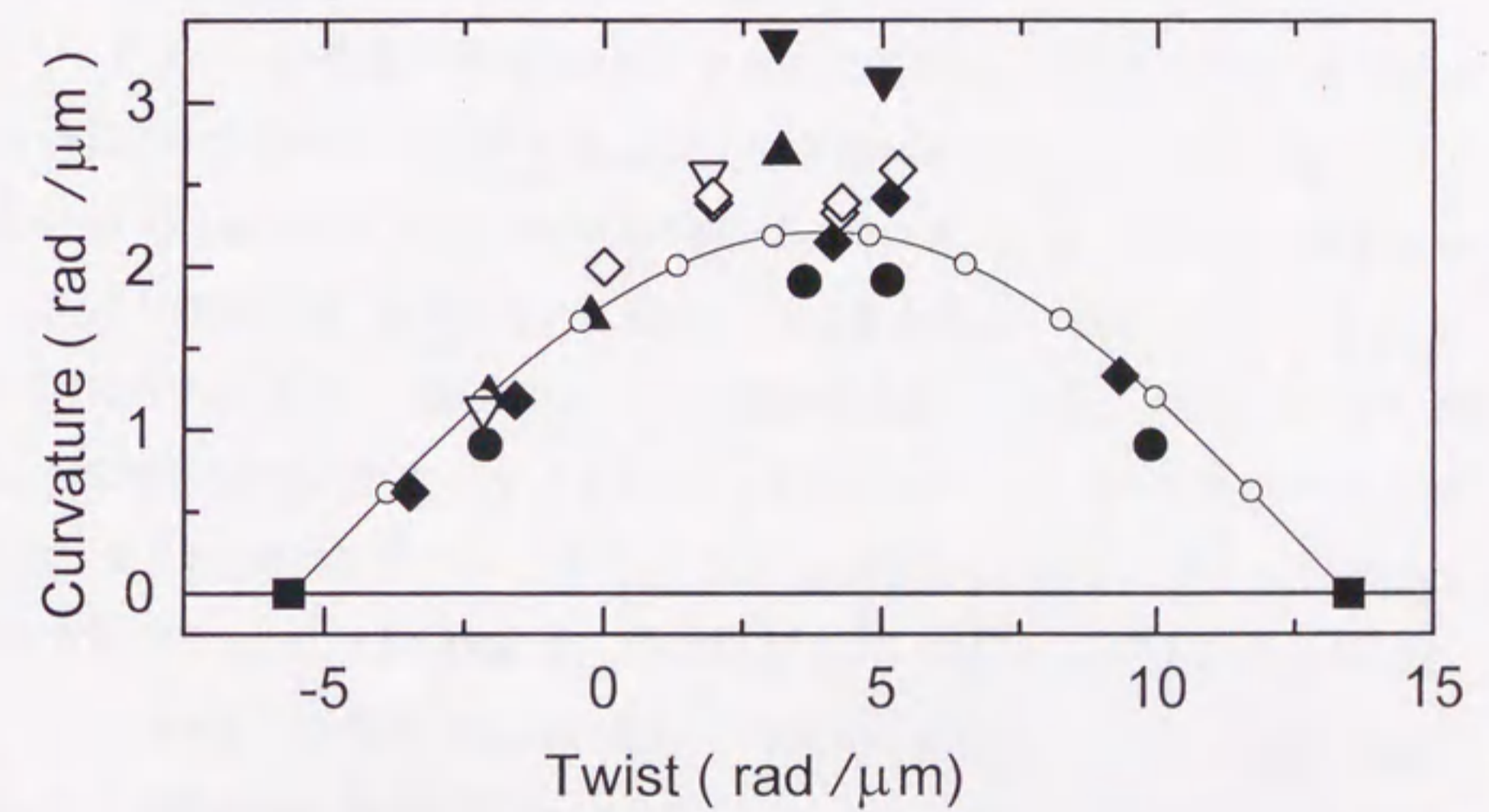


図 6.7 Bi-stable モデルで得られた曲率、ねじれ率と実測値
 ○は Bi-stable モデルにて計算されたもので、■は今回実測された SJW1655、SJW1660 の曲率とねじれ率を示す。実測されたべん毛繊維の曲率とねじれ率は以下の記号で示されている。 ▲: SJ670 ●: SJ670, SJ814 の共重合体 ▼: SJ30 ▽: SJ25 ◆: SJW1655, SJW1660 の共重合体 ◇: SJW1655、SJW1658 の共重合体

6.3.3. べん毛繊維の多型変換スイッチング

5章の 9 Å 高分解能の電子密度像から多型変換を担っている Outer-tube は α ヘリックスの束から構成されていることがわかっている。そのため多型変換のメカニズムには Outer-tube の α ヘリックス間の相互作用が何らかの関係を持っていると思われる。この構造上の特徴と Bi-stable モデル検証で示唆された Outer-tube でのスイッチングからべん毛繊維の多型変換能のメカニズムが類推できる。すなわち Outer-tube で隣り合う素繊維間で何らかのストランドジョイントの変化があり、その結果ストランド長が変化していると思われる。そこでR型とL型のサブユニット配置の変化について構造上可能性の高いメカニズムを図 6.8 に描いた。

サブユニット配置の変化はそれぞれ図中に描かれたサブユニット1~6のサブユニット0に対する相対的な動きで現される。図中描かれたブロックはそれぞれのサブユニットの Outer-tube での α ヘリックスの束を示している。A、B で書かれた領域はサブユニットが相互作用、結合している部分で、赤と青は灰色の部分結合することができる2つのサイトを示し、赤と青のサイトの距離はA領域で 1.8 Å、B領域で 2.6 Å である。今L型からR型に変化することを考える。サブユニット 0、2 はその結合サイトを青から赤に変えると同時にサブユニット 2 は上に 2.6 Å 移動し、サブユニット 3 はサブユニット 0 に対して上に 1.8 Å 移動する。他のサブユニットも同じように移動する。その結果サブユニット 0、1 の間は 0.8 Å 短くなる。この変化は素繊維に沿っての結合がもともと強いため素繊維内で協調的に生じるとと思われる。なお A、B の結合サイトは必ずしも正確に図のようになっている必要はなく、不連続にこの様な変化を起こせばどのような配置でも良い。

ここでスイッチングの起こる時、サブユニットの形が変わるのではなく、素繊維間の結合、ストランドジョイントの状態が変化することに注意をする必要がある。この不連続なサブユニットの配置の変化、すなわち A、B の結合サイトの変化が分子構造によりどのように実現されているのかが興味深い。一つの可能性として、Outer-tube を構成する α ヘリックスの相互作用点のスイッチングがあげられる。すなわち α ヘリックスのピッチは 5.4 Å であるから、側鎖のコンフォメーション変化を含めればB領域の 2.6 Å

の変化が生じる可能性があり、これが結合の変化、スイッチングとなっている可能性がある。そしてA領域での1.8Åの変化はαヘリックスのアミノ酸側鎖のコンフォメーション変化だけで実現されていると考えられる。

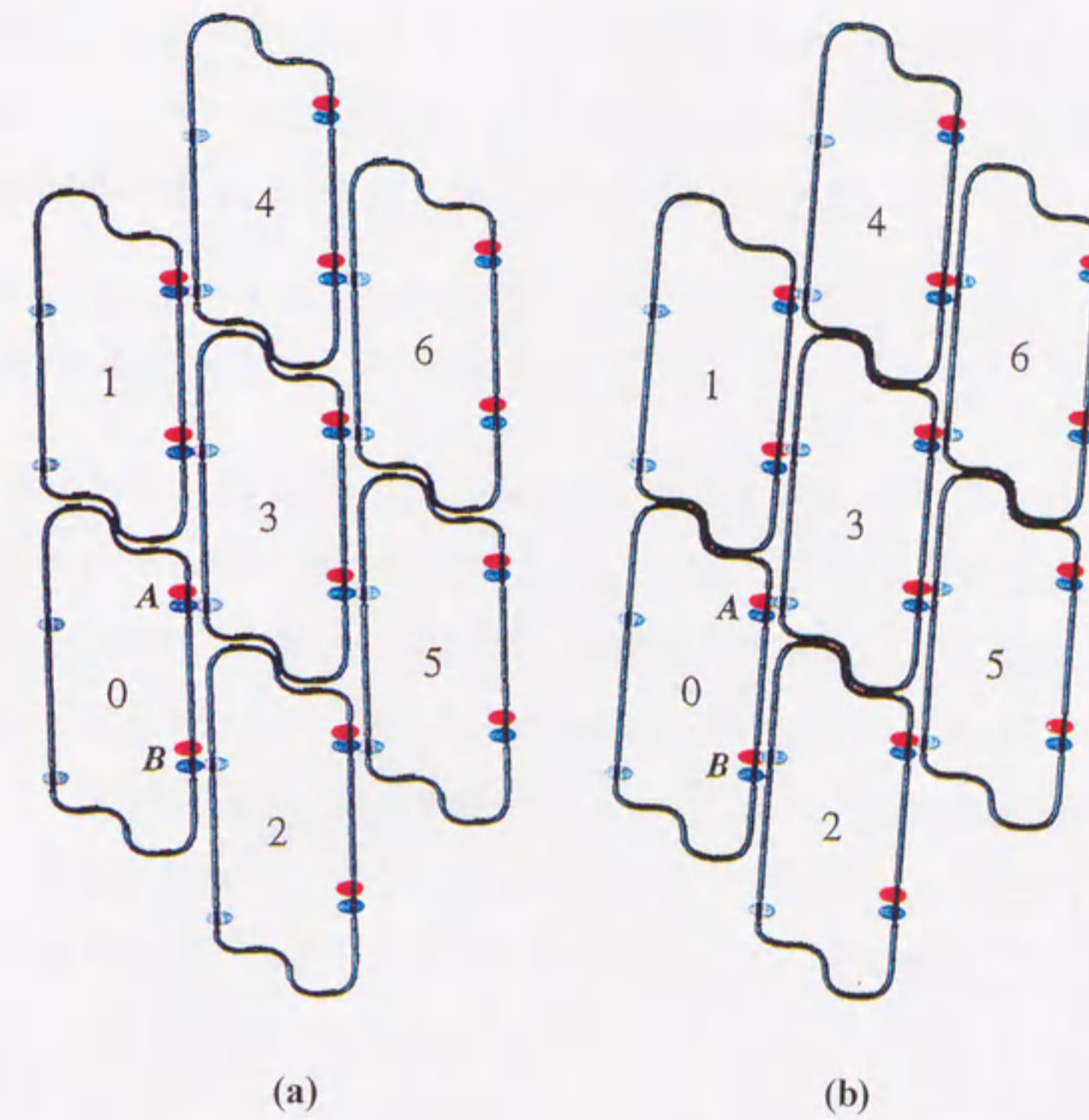


図 6.8 可能性の高い多型変換のメカニズム

(a)L型、(b)R型べん毛繊維の Outer-tube におけるサブユニットの位置関係を示す。それぞれのブロックは軸にほぼ平行なαヘリックスの束を示している。ここで赤と青のサイトの距離はA領域で1.8Å、B領域で2.6Åである。このスイッチングで素繊維に沿って0.8Åの長さの差ができる。

6.3.4. Bi-stable モデルによるべん毛繊維 Outer-tube モデル

Outer-tube が多型変換のメカニズムを担うことが明らかになった。そこでこの半径 45 Å の Outer-tube でのサブユニットを 50x25 Å のパネルであらわして、べん毛繊維の形をシミュレーションした⁵⁹⁾。必要な11種類のそれぞれのらせん形の曲率 κ 、ねじれ率 τ は(6.16)~(6.21)式を用いて正確に求めることができる。またらせんのピッチ P や振幅 R も曲率 κ 、ねじれ率 τ を用いて次式で現される。

$$P = 2\pi\tau / (\tau^2 + \kappa^2) \quad \text{----- (6.22)}$$

$$R = \kappa / (\tau^2 + \kappa^2) \quad \text{----- (6.23)}$$

図 6.9 はそのシミュレーション結果である。ここで描かれたパネルは Outer-tube に存在する α ヘリックスの束をあらわしている。上段は各パネルが見えるように下段は全体の形が分かるように描いた。サブユニット間相互作用をしているストランド部分は、L型を青でR型を赤で示してある。図中の数字はR型のストランドの数を示しており、0 がL型を 11 がR型の直線べん毛繊維を示している。1~10 ではべん毛繊維はストランド長の短いR型を内側にしらせん形をとっている。全体の形は当然だが、観測したものと良く一致する。また上段のパネルでは、各らせんごと、各素繊維ごとにパネルの位置関係が少しずつ異なることが見られる。

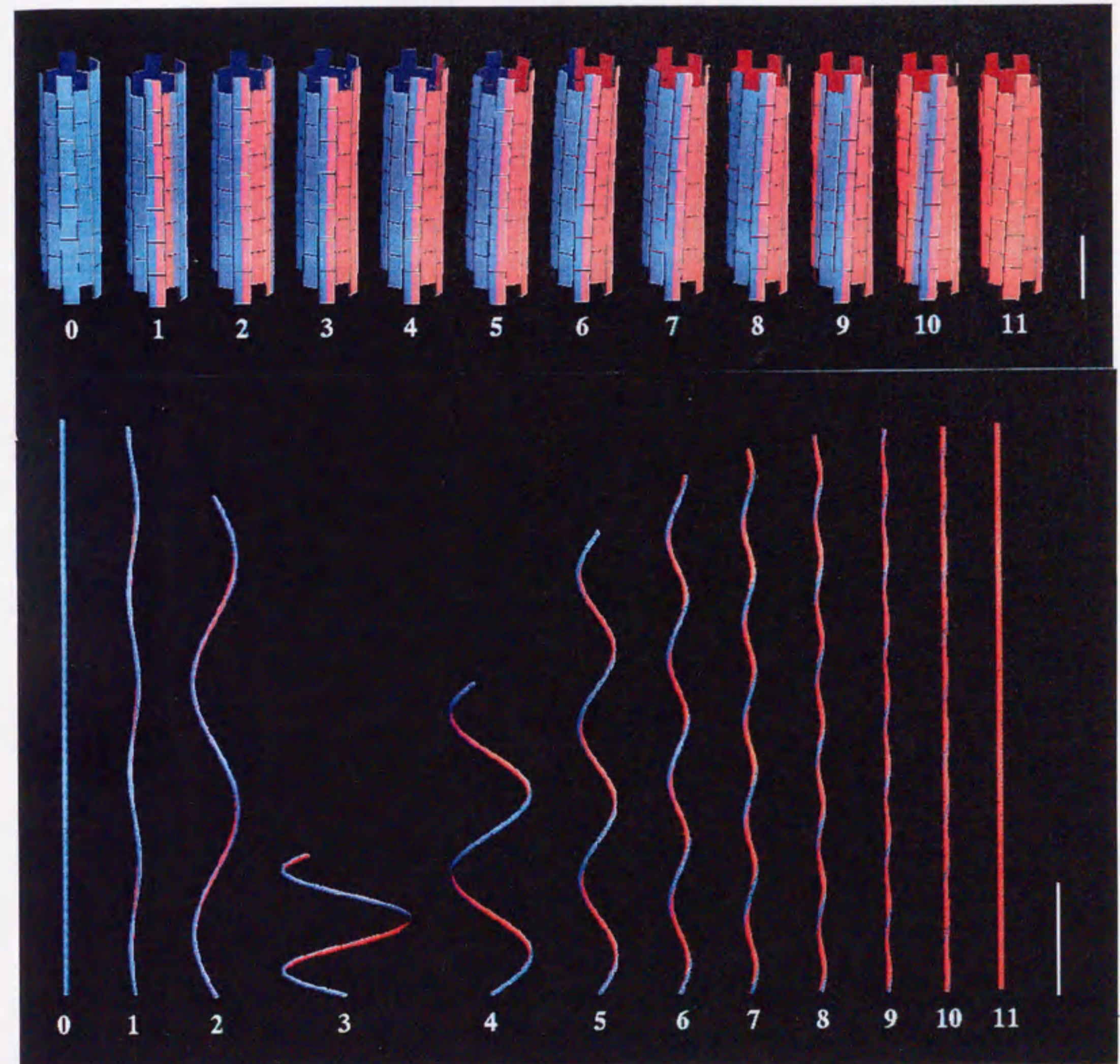


図 6.9 Bi-stable モデルで得られた曲率、ねじれ率を持つべん毛繊維⁵⁹⁾
 Bi-stable モデルによって得られたパラメータをもとに、L型のストランドを青で、R型のストランド赤で表して、繊維のらせん形をシュミレートしたもの。数字はR型ストランドの数を示し、上段は 70 枚のパネル、下段は 10680 枚のパネルを描いている。スケールバーはそれぞれ 100 Å、1 μm である。

6.3.5. サブユニットタンパク質の準等価性と非等価性

べん毛繊維にはL型とR型の2つのサブユニットパッキングがあり、差は小さいが明らかに異なったサブユニット間相互作用をしている。今回の図 6.9 での Outer-tube モデルのシミュレーションから、半径 45 Å において同じサブユニット間相互作用をしても、周りのサブユニットとの位置関係が異なっている場合があることが示された⁵⁹⁾。すなわち同じL型やR型のサブユニット間相互作用でも、その置かれた環境でサブユニットの位置関係すなわち配置が異なり、その結果ストランドの長さも異なっている。これは、らせん形のべん毛繊維のなかで、素繊維ごとに力学的環境が異なり弾性変形が生じて、それぞれのL型、R型のサブユニット配置がもとのL型、R型直線型繊維のものとは異なっているためと考えられる。これらはそれぞれのサブユニットがもとのL、R型のサブユニット間相互作用を保ちつつサブユニット間の位置関係がわずかに異なっていると言う意味で準等価な状態であると言える。

そこで10種類のらせん形べん毛繊維中の準等価なサブユニットにおいて、ストランドに沿ったサブユニット間距離(ストランド周期長)がどの程度変化しているかを求めた。すでに先のシミュレーションでそれぞれのサブユニットの位置関係は正確に求められており、ストランド周期長は図 6.10 に示す様になる。横軸はR型のストランドの本数を示しており、0 がL型の、11 がR型の直線型べん毛繊維に相当し、1~10 がらせん形のべん毛繊維の種類に相当する。縦軸はストランド周期長を示しており、プロットされた点は、青がL型の、赤がR型のストランド周期長を示している。例えば n=1 の場合は、赤の1点がR型のストランド周期長を示し、残り青5点がL型のストランド周期長を示している。ここで点数の合計が11にならないのは、対称性よりストランド周期長の同じものが生じるためである。またL、R型のストランドは弾性変形に伴うエネルギーを最小にするために隣接する素繊維にかたまっているため、同じべん毛繊維内では各ストランドの長さは異なっているが、R型のストランド周期長は常にL型ストランド周期長より短い。しかし、応力のバランスのため、L型のストランドでは n=1~6 で直線型の場合より長く、R型のストランドでは n=5~10 で直線型の場合より短くなるストラン

ド長が存在する。そして同じ種類のストランドであっても、その弾性変形による周期長の変形量は最大で 0.8 \AA を示し、本来のL型、R型のストランド周期長からの変形量も 0.6 \AA を示す。これはL型とR型のストランド周期長の差異 0.8 \AA の $2/3$ 以上である。このことはべん毛繊維を構築しているフラジェリンが柔軟性に富むことを示している。さらに準等価の状態は素繊維のねじれにおいても認められる。すなわち、すでに図 6.10 のシミュレーションで明らかのように、10種類のらせん形べん毛繊維のそれぞれの素繊維はL、R型直線繊維でのねじれとは異なったねじれ率を持っている。このことはL、R型のストランド、サブユニットがこのような異なったねじれに対しても適応できることを示している。甚だしい場合として Lt 型の場合にはさらに大きなねじれ率を持つものにも関わらず、図 6.5 に示したようにR型のサブユニットの格子すなわちR型のストランドを保持しており、このような大きなねじれに対しても適応できることを示している。

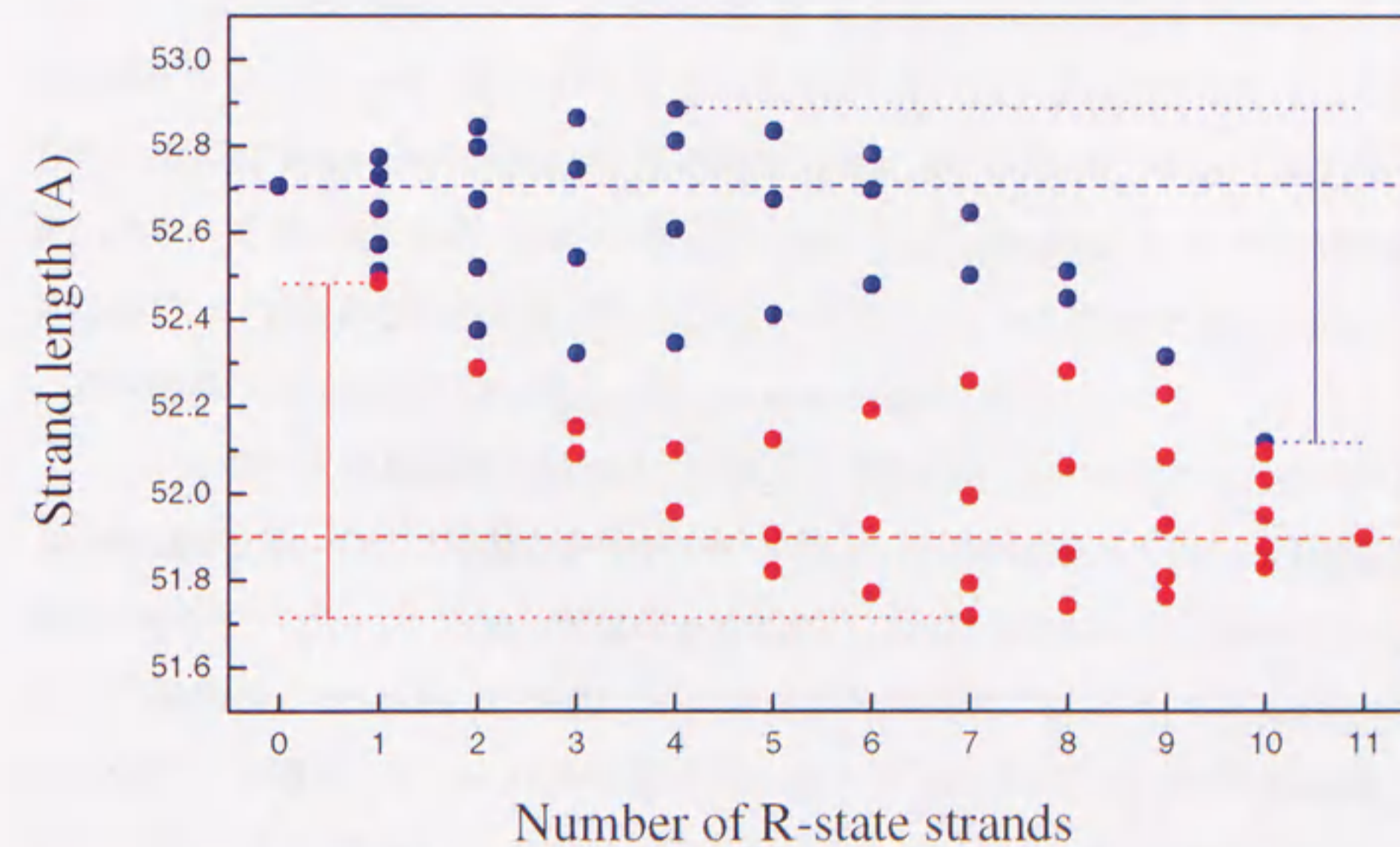


図 6.10 10種類のらせん形と2種類の直線型べん毛繊維のストランド周期長
横軸はR型ストランドの本数すなわちべん毛繊維のらせん形の種類を示し、縦軸はストランド周期長で、青色はL型の、赤色はR型のものを示す。それぞれのらせん形で、点数が11点無いのは対称性から同じ長さのものがあるためである。

6.3.6. Lt型べん毛繊維について

Lt型べん毛繊維では Inner-tube の構造が崩れ、Outer-tube だけで繊維の構造を保っている。すなわち Inner-tube はフラジェリンの重合再構成に不可欠ではない。そして Inner-tube の拘束を受けることなく最もリラックスした Outer-tube の状態は Lt 型のらせん対称性をもつ tube であることを示している。すなわち Outer-tube でのサブユニット間結合はこの Lt 型のらせん対称性を好むと思われる。

Lt 型のらせん対称性は、R型のらせん対称性を左方向にねじるだけでは実現できない。Lt型を作るためには、R型繊維のある1つのストランドを一旦切り開き、それに沿って1サブユニット分ずらさなくてはならない。このことは Inner-tube が、Lt 型になろうとする Outer-tube をL型やR型のらせん対称性の近傍に制限する役割を持っていることを示唆している。これは Inner-tube でのサブユニットの格子からも類推される。図 6.5 (b)からも分かるようにL、R型の半径 25 Å Inner-tube におけるサブユニットの作る格子は Lt 型と大きく異なった形となり、8 Åものずれが格子点で生じている。そのためL、R型の Inner-tube が仮に Lt 型繊維の Inner-tube を作ったとすると、極めて大きな応力が発生しエネルギー的に不利となる。そのため Outer-tube は Lt 型の対称性になれず、L、R型の対称性の範囲にとどまると考えられる。その意味で Inner-tube はべん毛繊維の多型変換に直接関わらないが重要な役割を果たしている。

Lt 型べん毛繊維はそれだけでは多型変換を行うことができない。しかし野生株の種繊維を用いて、Lt型繊維を作るフラジェリンの末端領域除去フラグメントを重合伸張させると、コイル型のらせん形繊維ができる⁵³⁾。このことは次のように説明できる。Lt 型の繊維の Outer-tube は、Lt 型サブユニット配置で非常に安定で、らせん形をとる時の様にL、R型のサブユニット間相互作用の混在が実現できない。そのため繊維はらせん形をとることができず、多型変換能がないと考えられる。しかしらせん形繊維の種の上に Lt 型のサブユニットが重合した場合は、種繊維の Outer-tube のサブユニット配置の制限をうけてLt型のサブユニット配置になれず、ねじれによって交換可能なL、R型のらせん対称性の範囲内にとどめられる。これにより Lt 型サブユニットのフラジェリンフラグメントの作る Outer-tube ではL、R型の2種類のサブユニット間相互作用を取

ることができコイル形のらせん繊維が形成できると思われる。

6.4. まとめ

良く配向したべん毛繊維ゾルのX線繊維回折像から、L、R型直線型べん毛繊維のらせん対称性を精密に決定し、L、R型のべん毛繊維のサブユニット配置を明らかにした。その結果L、R型べん毛繊維の素繊維の精密なねじれ率や Outer-tube 部分で素繊維に沿ったサブユニット間距離がL型の方がR型より 0.8 \AA 短くなることが分かった。この精密なサブユニット配置のデータを用い、Outer-tube で多型変換が生じるとして Bi-stable モデルに添ってべん毛繊維のらせん形を計算予測したところ、計算結果と観察されたべん毛繊維のらせん形とは極めて良い一致を示した。この結果から Bi-stable モデルが定量的に検証され、Outer-tube が構造の維持に重要で多型変換のメカニズムを担っていることが明らかになった。また前章の 9 \AA 分解能べん毛繊維の構造から明らかになった Outer-tube が密な α ヘリックスの束から構成されていることと、この章で明らかになった Outer-tube でのL、R型の変化に伴うサブユニット間の 2.6 \AA のずれと 1.8 \AA ずれから、Outer-tube での多型変換に伴うサブユニット間相互作用点のスイッチングは、 α ヘリックスの1ピッチ分のずれと側鎖のコンフォメーション変化によると推測された。

多型変換を可能にするL、R型のサブユニットの配置は明らかに異なったものであり、例えば素繊維方向のストランド周期長で 0.8 \AA 異なっている。しかしながら同じL型やR型のサブユニット間相互作用をしても、サブユニット配置はらせん形の繊維内で素繊維ごとにわずかつ異なる、素繊維方向の長さで最大 0.6 \AA 異なることが明らかになった。このことからべん毛繊維サブユニットが柔軟性に富んでいることが示された。さらにLt型べん毛繊維のらせん対称性と Inner-tube の特徴の考察から、Inner-tube が Outer-tube でのサブユニット配置を、多型変換を起こすL、R型間のサブユニット配置に固定する役割をしていることも明らかになった。

7. 結論と展望

細菌べん毛繊維の多型変換、自己集合能のメカニズムを理解するためX線繊維回折法を用いて構造解析を行った。はじめにX線繊維回折のための良く配向した試料の作製方法について検討し、一般的な繊維状超分子の高度配向方法を開発した。この方法を用いることでべん毛繊維だけでなくアクチン繊維や TMV の高配向試料も比較的簡単に作製できた。

べん毛繊維の 9 Å 分解能の電子密度像を計算し、2重のチューブ構造を明らかにし、これらが α ヘリックスの束から構成されていることを明らかにした。次に重原子置換体を用いて動径質量分布を精密に求めた。この結果と生化学的情報や電子顕微鏡画像解析からの情報とを合わせて考察することで、フラジェリンのアミノ酸配列とべん毛繊維の4つの形態的ドメインD0~D3との対応を明らかにした。

さらにL型とR型のべん毛繊維のらせん対称性を精密に測定してL型とR型のべん毛繊維内のサブユニット配置の変化を明らかにし、これをもとに Bi-stable モデルを検証した。その結果、Outer-tube に多型変換を起こす重要なサブユニット間相互作用があることが明らかになった。また Inner-tube は多型変換を起こすために Outer-tube のらせん対称性をある決められた範囲内にとどめる働きをすることも明らかとなった。

べん毛繊維の多型変換のメカニズムは Bi-stable モデルを考察することでほぼそのメカニズムを明らかにできたと考えられる。しかし自己集合能に関してはまだそのメカニズムは明らかでない。その解明のためには本研究で到達した 9 Å 以上にべん毛繊維構造の分解能を高める必要があると考えられる。そしてこれを実現するにはべん毛繊維ゾルのさらなる高配向度化手法を開発する必要がある。またべん毛繊維の原子レベルでの構造解析に重要な寄与をされると考えられるフラジェリンモノマーもしくはそのフラグメントの三次元結晶構造解析も進める必要がある。これらがうまく実現できれば、近い将来さらに高分解能でべん毛繊維構造が解け、より深く多型変換能や自己集合能が理解できると期待できる。

べん毛繊維は、序論でも述べたが機械的に極めて硬い⁸⁾。共有結合を持た

ないタンパク質超分子がどのようなメカニズムでこのような硬い繊維を構築できるのかも極めて興味深い。べん毛繊維の他に微小管や、アクチン繊維の弾性的性質も計測されており^{56), 57)}、同じナノメートルサイズの繊維でも硬さが異なっている。これらの異なる弾性的性質を繊維の構造とあわせて考察することで、超分子の機械的性質の一般的な設計基準を見いだすことが可能になるとと思われる。

ナノメートルサイズの繊維の構造解析が、ようやく我々の開発した高配向度繊維ゾル作製法により、X線繊維回折法を用いて行えるようになってきた。今後この手法により多くのナノメートルサイズの繊維の構造が解かれ、重要な情報が得られるものと期待している。

8. 謝辞

本研究は、新技術事業団(現科学技術振興事業団)及び松下電器産業株式会社中央研究所にて行われたものです。本研究を始める機会を与えて下さいました松下電器取締役 新田恒治博士に心より感謝し、実際の研究の場を提供して下さいました名古屋大学大学院理学研究科 宝谷紘一教授に深く感謝いたします。また松下電器中央研究所での研究を始めるにあたっては、中央研究所企画室長 近村隆夫博士(現在松下電子工業)、同企画室高尾正敏博士に大変なご協力を賜り、順調に中央研究所先端科学研究グループを立ち上げる事ができ、この研究の場が確保できました。心より感謝いたします。また、X線繊維回折をその初歩から詳しくご教示いただき、研究のまとめを懇切丁寧にご指導をいただきました難波啓一博士に深く感謝の意を表します。研究の推進に当たりましては、新技術事業団超分子柔構造プロジェクトのメンバー、松下電器中央研究所先端科学研究グループの方に種々の有益な議論を賜りました。感謝いたします。とりわけ生化学的見地から種々の有意義な情報をいただきましたフォンダビスト博士(現在ベスパレム大学准教授)、相沢慎一博士(現在帝京大学助教授)べん毛繊維試料の調製に協力をいただきました鈴木博文さん、アクチンゾル、細いフィラメントの液晶化、配向ゾルの作製を試み成功させさらに有意義な議論をしていただきました、小田俊郎博士と名古屋大学大学院理学研究科博士課程学生、牧野浩司さんに感謝いたします。さらに実験の遂行にあたり良く協力をしていただきました、大阪大学大学院理学研究科博士課程学生長谷川和也さん、眞木さおりさんに感謝いたします。研究の大極的なご指導とご鞭撻を賜りました愛知工業大学大澤文夫教授に深く感謝いたします。

最後に、本研究は多くの方々のご指導とご協力により達成されたものでありそのすべてのの方々のお名前を紙面の都合上あげることはできませんが、そのすべての方々に心よりお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Berg, H.C. & Anderson, R.A. (1973). Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature (London)* **245**, 380-382.
- 2) Silverman, M. & Simon, M. (1974). Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature (London)* **249**, 73-74.
- 3) Larsen, S.H., Reader, R.W., Kort, E.N., Tso, W.W. & Adler, J. (1974). Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in *Escherichia coli*. *Nature (London)* **249**, 74-77.
- 4) Y. Magariyama, S. Sugiyama, K. Muramoto, Y. Maekawa, I. Kawagishi, Y. Imae & S. Kudo Very fast flagellar rotation *Nature*, 371, 752 (1994)
- 5) Macnab, R.M. & Ornston, M.K. (1977). Normal-to-curly flagellar transitions and their role in bacterial tumbling. stabilization of an alternative quaternary structure by mechanical force. *J. Mol. Biol.* **112**, 1-30.
- 6) Blair, D.F. (1995). How bacteria sense and swim. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 489-522.
- 7) Francis, N.R., Sosinsky, G.E., Thomas, D. & DeRosier, D.J. (1994). Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J. Mol. Biol.* **235**, 1261-1270.
- 8) Fujime, S., Maruyama, M. & Asakura, S. Flexural rigidity of bacterial flagella study by quasielastic scattering of laser light. *J.Mol.Biol.* **68**, 347-359 (1972)
- 9) Kubori, T., Shimamoto, N., Yamaguchi, S., Namba, K. & Aizawa, S.-I. (1992). Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **226**, 433-446.
- 10) Namba, K., Yamashita, I. & Vonderviszt, F. (1989). Structure of the core and central channel of bacterial flagella. *Nature (London)* **342**, 648-654.
- 11) Blair, D.F. & Berg, H.C. (1990). The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell* **60**, 439-449.
- 12) Matsuura, S., Shioi, J. & Imae, Y. (1977). Motility in *Bacillus subtilis* driven by an artificial protonmotive force. *FEBS Lett.* **82**, 187-190.
- 13) Manson, M.D., Tedesco, P., Berg, H.C., Harold, F.M. & Van der Drift, C. (1977). A protonmotive force drives bacterial flagella. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3060-3064.

- 14) Meister, M., Lowe, G. & Berg, H.C. (1987). The proton flux through the bacterial flagellar motor. *Cell*, **49**, 643-650.
- 15) Oosawa, F. & Hayashi, S. (1986). The loose coupling mechanism in molecular machines of living cells. *Adv. Biophys.* **22**, 151-183.
- 16) Hotani, H. (1982). Micro-video study of moving bacterial flagellar filaments III. Cyclic transformation induced by mechanical force. *J. Mol. Biol.* **156**, 791-806.
- 17) Kamiya, R., Hotani, H. & Asakura, S. (1982). Polymorphic transition in bacterial flagella. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **35**, 53-76.
- 18) Asakura, S. (1970). Polymerization of flagellin and polymorphism of flagella. *Advan. Biophys.* (Japan) **1**, 99-155.
- 19) Kamiya, R. & Asakura, S. (1976). Helical transformations of *Salmonella* flagella *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **106**, 167-186.
- 20) Kamiya, R. & Asakura, S. (1977). Flagellar transformations at alkaline pH. *J. Mol. Biol.* **108**, 513-518.
- 21) Leifson, E. (1960). *Atlas of bacterial flagellation*, Academic Press, New York and London
- 22) Iino, T. & Mitani, M. (1966). Flagella-shape mutants in *Salmonella*. *J. Gen. Microbiol.* **44**, 27-40.
- 23) Martinez, R.J., Ichiki, A.T., Lundh, N.P. & Tronick, S.R. (1968). Single amino acid substitution responsible for altered flagellar morphology. *J. Mol. Biol.* **34**, 559-564.
- 24) Asakura, S. & Iino, T. (1972). Polymorphism of *Salmonella* flagella as investigated by means of *in vitro* copolymerization of flagellins derived from various strains. *J. Mol. Biol.* **4**, 251-268.
- 25) Iino, T., Oguchi, T. & Kuroiwa, T. (1974). Polymerization in flagellar-shape mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **81**, 37-45
- 26) Kanto, S., Okino, H., Aizawa, S.-I. & Yamaguchi, S. (1991). Amino acids responsible for flagellar shape are distributed in terminal regions of flagellin. *J. Mol. Biol.* **219**, 471-480
- 27) Asakura, S., Eguchi, G. & Iino, T. (1964). Reconstitution of bacterial flagella *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **10**, 42-56.
- 28) Calladine, C.R. (1975). Construction of bacterial flagella. *Nature (London)* **225**, 121-124.

- 29) Calladine, C.R. (1976). Design requirements for the construction of bacterial flagella. *J. Theoret. Biol.* **57**, 469-489.
- 30) Calladine, C.R. (1978). Change of waveform in bacterial flagella: The role of mechanics at the molecular level. *J. Mol. Biol.* **118**, 457-479.
- 31) Kamiya, R., Asakura, S. & Yamaguchi, S. (1980). Formation of helical filaments by copolymerization of two types of 'straight' flagellins. *Nature (London)* **286**, 628-630.
- 32) Namba, K. & Stubbs, G. (1986). Structure of tobacco mosaic virus at 3.6 Å resolution; implication for assembly. *Science* **231**, 1401-1406.
- 33) Namba, K., Pattanayak, R. & Stubbs, G. (1989) Visualization of protein-nucleic acid interaction in a virus. Refined structure of intact tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution by X-ray fiber diffraction. *J. Mol. Biol.* **208**, 307-325.
- 34) Yamashita, I., Vonderviszt, F., Noguchi, T. & Namba, K. (1991) Preparing well-oriented sols of straight flagellar filaments for X-ray fiber diffraction. *J. Mol. Biol.* **217**, 293-302.
- 35) Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W. & Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44-49.
- 36) 小田俊郎、牧野浩司、山下一郎、難波啓一、前田雄一郎:生物物理36、第34回年会講演予稿集S-13(1996)
- 37) Gregory, J. & Holmes, K.C. (1965). Methods of preparing oriented tobacco mosaic virus sols for X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* **13**, 796-801.
- 38) Makowski, L. (1978). Processing of X-ray diffraction data from partially oriented specimens. *J. Appl. Cryst.* **11**, 273-283.
- 39) Namba, K. & Stubbs, G. (1985). Solving the phase problem in fiber diffraction. Application to tobacco mosaic virus at 3.6 Å resolution. *Acta Cryst.* **A41**, 252-262.
- 40) Tibbitts, T.T. & Caspar, D.L.D. (1993). Deconvolution of disoriented fiber diffraction data using iterative convolution and local regression. *Acta Crystallog. sect. A*, **49**, 532-545.
- 41) Cochran, W., Crick, F.H.C. & Vand, V. (1952). The structure of synthetic polypeptides. I. The transform of atoms on a helix. *Acta Crystallog. sect. A*, **5**, 581-586

- 42) Mimori-Kiyosue, Y., Vonderviszt, F. & Namba, K. (1997) Location of terminal segments of flagellin in the filament structure and their role in polymerization and polymorphism. *J.Mol.Biol.* **270**, 222-237
- 43) Shirakihara, Y. & Wakabayashi, T. (1979). Three-dimensional image reconstruction of straight flagella from a mutant *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **131**, 485-507
- 44) Trachtenberg, S. & DeRosier, D.J. (1987). Three-dimensional reconstruction of the flagellar filament of *Caulobacter crescentus*. A flagellin lacking the outer domain and its amino acid sequence lacking an internal segment. *J. Mol. Biol.* **202**, 787-808.
- 45) Ruiz, T., Francis, N., Morgan, D.G., & DeRosier, D.J. (1993). Size of the export channel in the flagellar filament of *Salmonella typhimurium*. *Ultramicroscopy* **48**, 417-425.
- 46) Morgan, D.G., Owen, C., Melanson, L.A., DeRosier, D.J. (1995). Structure of bacterial flagellar filaments at 11 Å resolution: packing of the α -helices. *J. Mol. Biol.* **249**, 88-110.
- 47) Mimori, Y., Yamashita, I., Murata, K., Fujiyoshi, Y., Yonekura, K., Toyoshima, C. & Namba, K. (1995). The structure of the R-type straight flagellar filament of *Salmonella* at 9 Å resolution by electron cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.* **249**, 69-87.
- 48) Mimori-Kiyosue, Y., Vonderviszt, F., Yamashita, I., Fujiyoshi, Y. & Namba, K. (1996). Direct interaction of flagellin termini essential for polymorphic ability of flagellar filament. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15108-15133
- 49) Vonderviszt, F., Kanto, S., Aizawa, S.-I. & Namba, K. (1989). Terminal region of flagellin are disordered in solution. *J. Mol. Biol.* **209**, 127-133.
- 50) Vonderviszt, F., Uedaira, H., Kidokoro, S. & Namba, K. (1990). Structural organization of flagellin. *J. Mol. Biol.* **214**, 97-104.
- 51) Fedorov, O.V., Kostyukova, A.S. & Pyatibratov, M.G. (1988). Architectonics of a bacterial flagellin filament subunit. *FEBS Lett.* **241**, 145-158.
- 52) Trachtenberg, S. & DeRosier, D.J. (1988). Three-dimensional structure of the frozen hydrated flagellar filament. The left-handed filament of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **195**, 581-601.

- 53) Vonderviszt, F., Aizawa, S.-I. & Namba, K. (1991). Role of the disordered terminal regions of flagellin in filament formation and stability. *J. Mol. Biol.* **221**, 1461-1474.
- 54) Yamashita, I., Vonderviszt, F., Mimori, Y., Suzuki, H., Oosawa, K. & Namba, K. (1995). Radial mass analysis of the flagellar filament of *Salmonella*: implications for subunit folding. *J. Mol. Biol.* **253**, 547-558.
- 55) Morgan, D.G., Owen, C., Melanson, L.A., DeRosier, D.J. (1995). Structure of bacterial flagellar filaments at 11 Å resolution: packing of the α -helices. *J. Mol. Biol.* **249**, 88-110.
- 56) Mizushima-Sugano, J., Maeda, T., & Miki-Noumura, T. (1983) Flexural rigidity of singlet microtubules estimated from statistical analysis of their contour length and end-to-end distances. *Biochimica et Biophysica Acta*, **755**, 257-262
- 57) Tsuda, Y., Yasutake, H., Ishijima, A. & Yanagida, T. (1996) Torsional rigidity of single actin filaments and actin-actin bond breaking force under torsion measured directly by *in vitro* micro manipulation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **93**, 12937-12942
- 58) Wittmann, J. C. & Smith, P. (1991) Highly oriented thin films of poly(tetrafluoroethylene) as a substrate for oriented growth of materials. *Nature*. **352**, 414-416
- 59) Hasegawa, K., Yamashita, I. & Namba, K. (1998) Quasi-equivalence and non-equivalence in the structure of bacterial filament. *Biophys. J.* in press