

難波プロトニックナノマシンプロジェクトの研究成果

目次

1. べん毛蛋白質の大量発現と精製法の確立	2
2. べん毛軸構成蛋白質の結晶化と X 線による構造解明	4
3. べん毛のらせん形態変換機構の解明	6
4. べん毛構造の電子顕微鏡による観察	8
5. べん毛繊維の成長機構解明	10
6. べん毛モーターの回転計測	12

1. べん毛蛋白質の大量発現と精製法の確立

べん毛繊維だけでなく、膜蛋白質である MotA/B 等多くのべん毛関連蛋白質の大量発現系の構築に成功し、さらに新しい精製法を開発することにより X 線や電子顕微鏡による解析への道を開いた。

研究成果の概要

細菌べん毛の自己構築、動作、エネルギー変換機構を原子レベルで解明するには、まず各構成蛋白質を高純度で大量に得る必要がある。べん毛構成蛋白質は、アミロイド様繊維を形成し易いもの（図 1-1）や膜蛋白質が多く、発現・精製が難しい。我々は、サルモネラ菌べん毛構成蛋白質 26 種類のうち、べん毛基部体中心部に位置すると考えられる 6 種類を除く 18 種類について発現、精製法を確立した（図 1-2）。さらに、べん毛の自己構築に必須なべん毛特異的シャペロン等のべん毛関連タンパク質 6 種類、Na イオン駆動モータの固定子で Na イオンチャネルの PomA、PomB の発現、精製法も確立した。また、この研究の過程で、大腸菌由来プロテアーゼの効率的な除去方法を開発した。

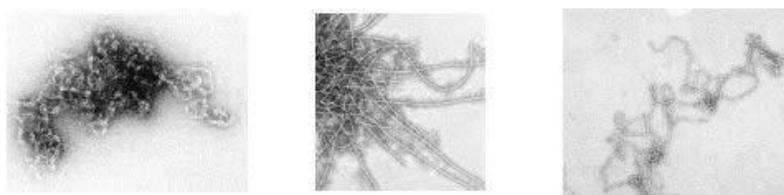
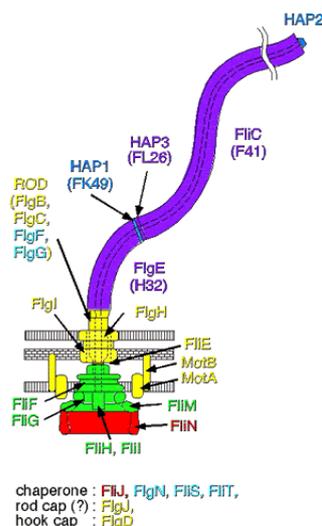


図 1-1 ロッド蛋白質によって形成されたアミロイド様繊維構造体

図 1-2 細菌べん毛の模式図と解析進行状況

本プロジェクトで構造解析を進めたべん毛蛋白質について、その場所と進行状況を示した。

紫：解析終了、青：解析中、水色：結晶化（微結晶あり）、
緑：結晶化スクリーニング中、黄：精製終了、赤：発現系構築終了。



将来への展望・応用の可能性

べん毛構成蛋白質の殆どが高純度で大量に得られるようになり、構造解析、機能解析への道が拓けた。また、開発された大腸菌由来プロテアーゼの除去法は、プロテアーゼ感受性の高い蛋白質の精製に広く応用できる方法である。

特許出願

1) 西條（濱野）由見子、大澤研二、難波啓一

プロテアーゼ分解を避けるタンパク質精製法

特願 2000-52528

報告書他

- 1) Saijo, Y.; Namba, K.; Oosawa, K. A new purification method for overproduced proteins sensitive to endogenous proteases. *J. Struct. Biol.* 132, 142-146 (2000).
- 2) Samatey, F.A.; Imada, K.; Vonderviszt, F.; Shirakihara, Y.; Namba, K. Crystallization of the F41 fragment of flagellin and data collection from extremely thin crystals. *J. Struct. Biol.* 132, 106-111 (2000)
- 3) Furukawa, Y.; Imada, K.; Vonderviszt, F.; Matsunami, H.; Sano, K.; Kutsukake, K.; Namba, K. Interactions between bacterial flagellar axial proteins in their monomeric state in solution. *J. Mol Biol.* 318, 889-900 (2002)

2. べん毛軸構成蛋白質の結晶化とX線による構造解明

べん毛軸構成蛋白質から、両末端の重合構造安定化領域を同定、除去することにより6種類の蛋白質の結晶化に成功し、内3種類のものについてX線による原子レベルでの構造解析に成功した。

研究成果の概要

繊維状重合体を形成するため結晶化がほぼ不可能に近いべん毛軸構成タンパク質から、両末端の重合構造安定化領域を同定し除去することによって結晶化に成功した。べん毛軸構造を構成する9種類のタンパク質のうち6種類の結晶化に成功し、FliC、FlgE、HAP3の各フラグメント（それぞれ、F41、H32、FL26）については、2Å以上の分解能での構造解析に成功した（図2-1）。そして、F41の構造からはべん毛の多型変換のスイッチング機構が、H32の構造からは柔軟なユニバーサル・ジョイントのしくみがおおよそ明らかになり、FL26の構造からは力学的性質の異なるフックとフィラメントを結合するしくみについて、手がかりが得られた。

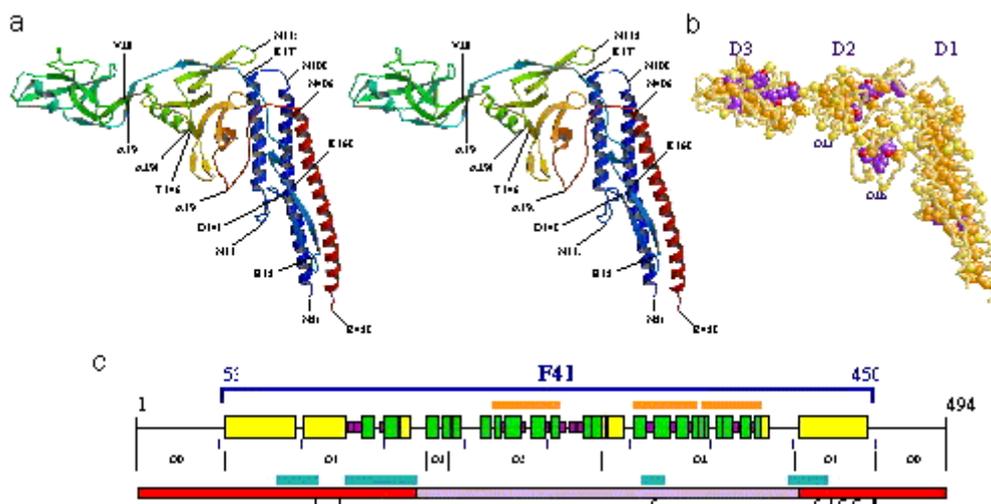


図2-1 F41の構造

a) F41 リボンモデルのステレオ図。

b) F41 のドメイン構造。D1、D2、D3 の3つのドメインから成る。

D2はさらに2つのサブドメインから成る。F41のバックボーンに疎水性残基の側鎖をCPKモデルで示した。

黄:Ala、橙:Leu、Ile、Val、紫:Phe、Tyrの炭素原子、赤:Phe、Tyrの酸素原子。

c) フラジェリンの一次構造上に様々な構造情報を付加して示す。

上から、F41の領域、2次構造（黄:αヘリックス、緑:βストランド、紫:βターン）、ドメイン構成、保存領域（赤:保存領域、薄紫:可変領域）、フィラメント形態に影響を及ぼすシングルミューテーション部位（L:L型直線、R:R型直線、C:カーリー型）。

将来への展望・応用の可能性

べん毛モータシステムを構成する各デバイスの構造が次々と明らかになり、近いうちに菌体外部のべん毛システムの構造が原子レベルで解明できると思われる。そこから明らかにされるトルク伝達機構、ジョイント機構、スイッチング機構は、将来のナノマシンの設計に応用され得るものと考えられる。

特許出願

なし

報告書他

- 1) Samatey, F.A.; Imada, K.; Vonderviszt, F.; Shirakihara, Y.; Namba, K. Crystallization of the F41 fragment of flagellin and data collection from extremely thin crystals. *J. Struct. Biol.* 132, 106-111 (2000).
- 2) Samatey, F.A.; Imada, K.; Nagashima, S.; Vonderviszt, F.; Kumasaka, T.; Yamamoto, M.; Namba, K. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch with sub-Å precision. *Nature.* 410, 331-337 (2001).
- 3) Imada, K; Matsunami, H; Yamane, M; Nagashima, S; Samatey, F.A.; Namba, K. Crystal structure of HAP3, a flagellar hook-filament junction protein and a junction model. The XIX Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, Geneva in Switzerland, Aug. 7-15, 2002.
- 4) Samatey, F.A.; Matsunami, H; Imada, K; Nagashima, S; Namba, K. Atomic structure of a core fragment of hook protein, FlgE. The XIX Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, Geneva in Switzerland, Aug. 7 -15, 2002.

3. べん毛のらせん形態変換機構の解明

構造解析で得られたフラジェリンの原子モデルに基づき、べん毛のらせん形態を変えるための高精度のスイッチ機構とその分子内での場所を解明した。蛋白質のしなやかで高精度なナノマシンの設計原理の一端を明らかにした。

研究成果の概要

サルモネラ菌のべん毛フィラメントは 11 本の素繊維から成り、2 重円筒構造を形成している。フィラメントは一種類の蛋白質 FliC (フラジェリン) の重合体で、同一サブユニットで構築されるにもかかわらず超らせんを形成し、モータの反転に伴い超らせんが左巻から右巻に変換し、べん毛束が瞬時にほぐれて向きを変える。超らせんの形態変換は、素繊維方向の長さで異なる 2 種類の素繊維 (素繊維が左傾斜の L 型、右傾斜の R 型) の混在比率が変化することで生じる。X 線繊維回折法と低温電子顕微鏡法による解析から、L 型が 52.7Å、R 型が 51.9Å のサブユニット間距離を持ち、2 重円筒の外筒に当たるフラジェリン D1 ドメイン部での素繊維間のすべりにより誘起される長さで異なる 2 つのスイッチにより形態変換が起こることが示されていた。フラジェリン 41kDa フラグメントの結晶構造解析から得られた素繊維構造とその引っ張りシミュレーションから、周期構造を 0.1Å 精度で 0.8Å だけ切り替える長さのスイッチ領域を D1 ドメイン中の β ヘアピンの小さな構造変化として同定することができた (図 3-1)。

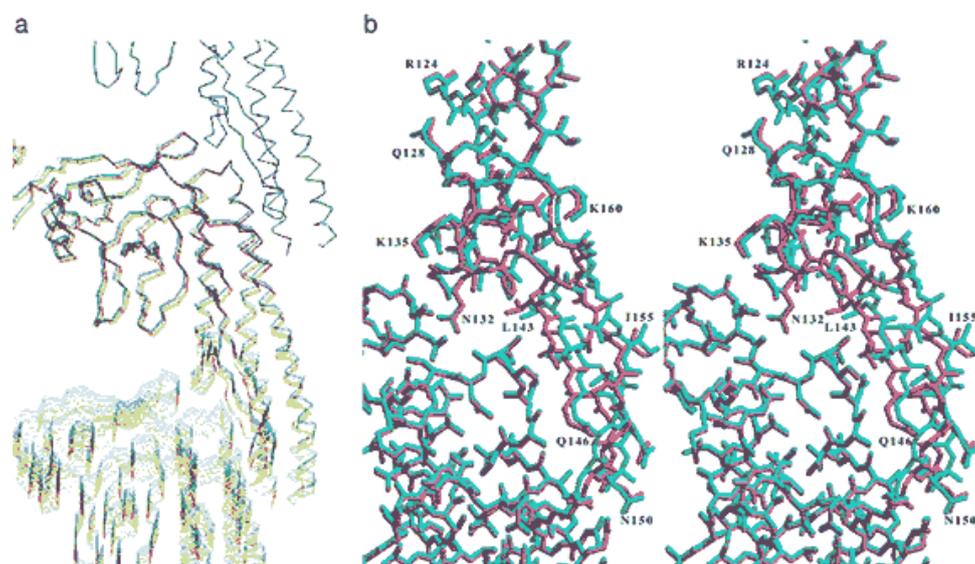


図 3-1 引伸ばしシミュレーションと構造変化

0.5Å ごとの引伸ばし結果を重ねて表示 b) 引伸ばしによる構造変化の前後をステレオで示した。

青：変化前 (4.5Å)、赤：変化後 (4.7Å)

将来への展望・応用の可能性

べん毛フィラメントの持つ 0.1Å 精度のスイッチング機構が明らかになった。熱ゆらぎの中でしかも構造的なゆらぎを持つ蛋白質がこのような高精度で高度に制御されたスイッチングメカニズムを持つことは、蛋白質ナノマシンの持つ計り知れない可能性を示している。生物学的な原理に基づく、柔らかい機械、新しい工学設計原理の確立につながるものである。

特許出願

なし

報告書他

- 1) Hasegawa, K.; Yamasita, I.; Suzuki, H.; Vonderviszt, F.; Mimori, Y.; Namba, K. The structure of the bacterial flagellar filament which explains the polymorphic supercoiling. 6th Biophysics and Synchrotron Radiation Conference, Argonne, IL, USA, Aug. 6, 1998. 82.
- 2) Namba, K.; Hasegawa, K.; Yamashita, I.; Kiyosue, Y.; Suzuki, H.; Vonderviszt, F. The mechanism of assembly and polymorphic switching of the bacterial flagellar filament. CCP13 News Lett. 7, 13-16 (1999).
- 3) Samatey, F.A.; Imada, K.; Nagashima, S.; Vonderviszt, F.; Kumasaka, T.; Yamamoto, M.; Namba, K. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch with sub-Å precision. Nature. 410, 331-337 (2001).
- 4) Imada, K.; Hasegawa, K.; Maki, S.; Yonekura, K.; Samatey, F.A.; Yamashita, I.; Namba, K. Comparison of R, L and Lt type filament of the bacterial flagellum based on the F41 atomic model. The 4th International Conference on Biological Physics, 国立京都国際会館, Jul. 30-Aug. 3, 2001.
- 5) Hasegawa, K.; Imada, K.; Maki, S.; Yonekura, K.; Samatey, F.A.; Yamashita, I.; Namba, K. Possible packing of terminal alpha-helices in the inner-core of the bacterial flagellar filament. The XIX Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, Geneva in Switzerland, Aug. 7-15, 2002.

4. 電子顕微鏡を用いた4 Å分解能でのべん毛繊維構造の解析

様々な画像解析アルゴリズムの開発により電子顕微鏡によって世界最高の4 Å分解能を達成し、べん毛繊維の構造解析を行い、X線構造解析では除去したために見ることのできなかつたフラジェリン両末端の構造安定化の機構を解明した。

研究成果の概要

低温電子顕微鏡法による蛋白質の構造解析から原子モデルが得られているのは、現在まで三種類の膜蛋白質と一種の細胞骨格蛋白質しかない。これらはいずれも、大きさ数ミクロンの良質な二次元結晶を形成するので、電子線回折データと電子顕微鏡像を組み合わせた解析により高分解能が達成された。しかし、大きな二次元結晶を得ることは、非常に難しいことが知られており、電子線回折像の得られない他形態の試料の実像から原子モデルを得られるような高分解能の構造解析を行うことは、電子顕微鏡法で蛋白質構造解析を行うすべての研究者にとっての悲願であり、大きな目標である。我々は、グラフィカルインターフェース(GUI)を備えた様々な高分解能画像解析アルゴリズムを開発し、低温電子顕微鏡を用いて4 Å分解能でべん毛繊維構造の解析を行い、結晶解析では除去したために見ることのできなかつたフラジェリン両末端部の構造から繊維構造安定化の機構を解明した。これは、電子顕微鏡画像だけからの解析結果としては世界最高の到達分解能である。

将来への展望・応用の可能性

極低温電子顕微鏡像の画像解析法は、超分子ナノマシンの立体構造を機能状態で観察できるといふ、X線結晶解析やNMR分光法が不得意とする特徴を持つ。本研究を通じて、この計測解析手法のユニークなポテンシャルを、現実にそれが達成可能な技術レベルにまで近づけることができた。今後、さらなる装置開発・画像解析法の開発と工夫を進め、電子顕微鏡画像だけから3 Åというタンパク質の原子座標が得られる臨界分解能を越える解析技術を達成できれば、細胞生物学やゲノム科学などの生命科学や医科学全般にわたって大きな変革をもたらすことは確実であろう。

特許出願 なし

報告書他

- 1) Maki, S.; Yonekura, K.; Namba, K. Structure of the R-type straight flagellar filament from *Salmonella* by electron cryomicroscopy. 7th Asia-Pacific Electron Microscopy Conference, Suntec, June 26, 2000, 210.
- 2) Maki, S.; Yonekura, K.; Namba, K. Structure analysis of the L-and R-type straight flagellar filaments from *Salmonella* by electron cryomicroscopy. Three dimensional electron microscopy, Gordon Research Conference, Bristol in USA, Jun. 24-29, 2001.

3) Yonekura, K.; Maki, S.; Namba, K. Visualization of Secondary-Structure in the EM Density of the Bacterial Flagellar Filament. Three dimensional electron microscopy, Gordon Research Conference, Bristol in USA, Jun. 24-29, 2001.

5. べん毛繊維の成長機構解明

電子顕微鏡の画像の新しい解析方法を開発し、べん毛先端の構造を解明した。5量体のキャップがその5本足でべん毛の螺旋階段を上がるようにして歩き、フラジェリンが重合しべん毛繊維が成長するのを助ける仕組みを明らかにした。

研究成果の概要

電子顕微鏡法によりべん毛先端の5量体キャップ構造を解明した(図5-1)。そして、キャップがその5本足でべん毛先端のらせん階段を上るように歩き、天板を回転させることで、べん毛繊維構成タンパク質フラジェリンの自己集合を助けるダイナミックなしくみを明らかにした(図5-2)。また、解析の過程で新しい画像解析法を開発した。

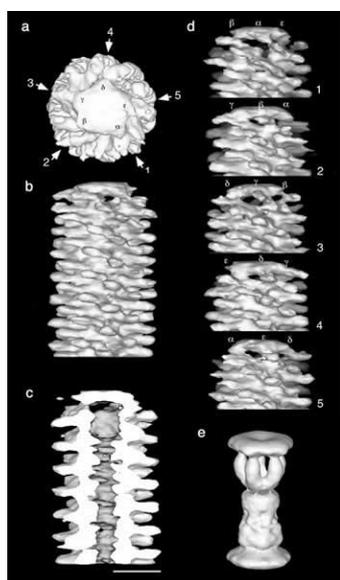


図5-1 べん毛フィラメント末端のキャップ構造。

- (a) フィラメント軸方向に上から見た構造
- (b) 横方向から見た構造、
- (c) 軸に沿って中央で分割した構造、
- (d) a示した5つの方向から見たもの。1の方向のみ見える縦長の大きな隙間が次に送られてくるフラジェリンの結合部位と考えられる。
- (e) キャップの双極性2量体構造。キャップどうしの結合部位がフレキシブルであるため、上側だけ位置と向きをそろえて立体像を導き出した。

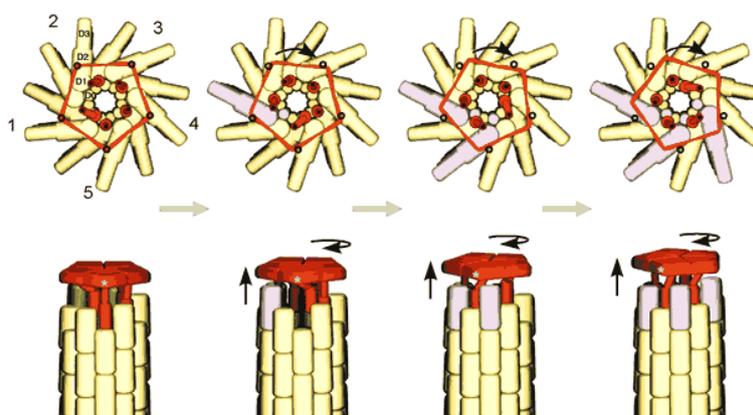


図5-2 キャップの回転によるべん毛フィラメント構築促進機構のモデル。

下側の図では、べん毛フィラメントの二重円筒構造の外筒部を作るドメイン D1 とキャップの足状ドメイン間の相互作用がよく見えるように、フラジェリンのドメイン D2 と D3 を取り除いてある。薄紫色のサブユニットは新たに重合したフラジェリン。

将来への展望・応用の可能性

ここで明らかにされた、構成蛋白質の生産現場である細胞内から離れたところで高度に制御されて進む自己構築やエネルギー伝達のしくみは、蛋白質ナノマシンの持つ高いポテンシャルを示すと共に、将来のナノマシンの設計に応用されていくものと考えられる。

特許出願

なし

報告書他

- 1) Yonekura, K.; Maki, S.; Morgan, D.G.; DeRosier, D. J.; Vonderviszt, F.; Imada, K.; Namba, K. The Structure of the Filament-HAP2 cap complex of the bacterial flagellum. 7th Asia-Pacific Electron Microscopy Conference, Suntec, June 26, 2000, 215.
- 2) Yonekura, K.; Maki, S.; Morgan, D.G.; DeRosier, D.J.; Vonderviszt, F.; Imada K; Namba, K. The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. Science. 290, 2148-2152 (2000).
- 3) Maki, S.; Yonekura, K.; Imada, K.; Namba, K. Analysis of interaction between the bacterial flagellar filament and its cap protein, HAP2 by electron cryomicroscopy. The 4th International Conference on Biological Physics, 国立京都国際会館, Jul. 30-Aug. 3, 2001.
- 4) Yonekura, K.; Maki, S.; Namba, K. Structure analysis of the fragellar cap-filament complex by electron cryomicroscopy and single particle image analysis. J. Struct. Biol. 133, 246-253 (2001).
- 5) Yonekura, K.; Maki, S.; Namba, K. Growth Mechanism of the Bacterial Flagellar Filament. Research in Microbiol. 153, 191-197 (2002).
- 6) Yonekura, K.; Maki, S.; Namba, K. Quantitative Comparison of Zero-Loss and Conventional Electron Diffractions from Two-Dimensional and Thin Three-Dimensional Protein Crystals. Biophysical J. 82, 2784-2797 (2002).
- 7) Maki, S.; Yonekura, K.; Namba, K. Domain movements of HAP2 in the cap-filament complex formation and growth process of the bacterial flagellum. Proceeding National Academy of Science. submitted.

6. べん毛モーターの回転計測

高い空間・時間分解能を持つ蛍光ナノ顕微光学システムを開発し、べん毛モーターの回転を計測し、回転角速度の速いゆらぎの幅が平均角速度の数十%にも達することを見出した。

研究成果の概要

動作を精密計測するため、落射蛍光顕微鏡にピラミッド型ミラーおよび4本の光電子増倍管から成る超高感度4分割センサーを組み込んだ、蛍光ナノ顕微光学計測システムを開発した(図 6-1)。この装置を用いて、繊維を持たない直線型べん毛フックに結合させた直径40ナノメートルの蛍光ビーズの時々刻々の位置を高い時間分解能と空間分解能で計測した結果(図 6-2)、べん毛モーターの回転ゆらぎは予想を遙か上回り、時々刻々の回転速度は平均速度の30%から250%程度と広い範囲で揺らぐことを解明し、分子モーター回転トルク発生機構に重要な手がかりを得た。

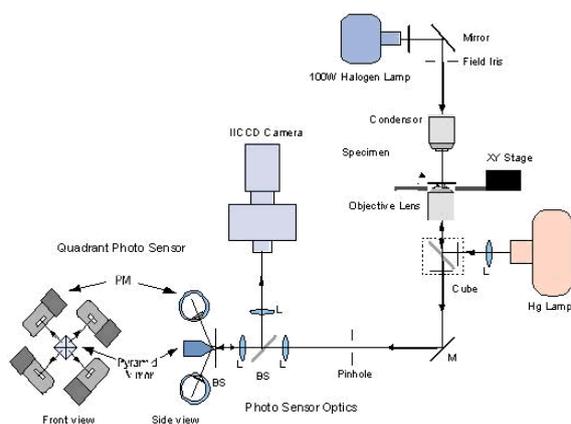


図 6-1 蛍光ナノ顕微光学計測システム

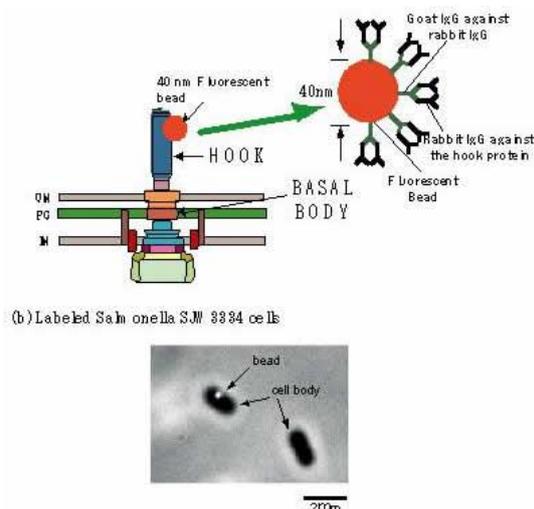


図 6-2

(a) 40nm 蛍光ビーズによる直線型フックのラベル

(b) ラベルされた菌体の位相差、落射蛍光像

将来への展望・応用の可能性

蛍光光学顕微ナノ計測法の開発により、個々の分子モーターの動態計測を可能にした。有限数サブユニットの回転子と固定子が構築するモーターの回転はステップ動作をすると予想されるが、そのステップと角速度ゆらぎがモーターのトルク発生機構の謎を解く鍵となるはずである。わずか10⁻¹⁶ワットという微小なエネルギーを、熱ゆらぎをうまく利用しながら100%に近い効率で変換するべん毛モーターの、プロトンやナトリウムイオンによる回転駆動機構の解明は、省エネルギー高効率デバイスやエネルギー変換装置への応用が見込まれる、バイオナノテクノロジーの最重要課題である。

特許出願

なし

報告書他

- 1) Atsumi, T. An Ultrasonic Motor Model for Bacterial Flagellar Motors. *J. Theor. Boil.* 213, 31-51 (2001).
- 2) Minamino, T.; Imae, Y.; Oosawa, F.; Kobayashi, Y.; Oosawa, K. Effect of intracellular pH on rotational speed of the bacterial proton-driven flagellar motors. *J. Bacteriology*. in press.
- 3) Minamino, T.; Kami-ike, N.; Oosawa, K.; Namba, K. Measurement of single flagellar motor rotation using a 40 nm fluorescent bead. The 4th International Conference on Biological Physics, 国立京都国際会館, Jul. 30-Aug. 3, 2001.
- 4) Minamino, T.; Kami-Ike, N.; Oosawa, K.; Namba, K. Observation of the dynamics of individual bacterial flagellar motors by newly developed optical microscopy. Gordon Research Conference on Sensory Transduction in Microorganisms, Ventura in USA, Jan. 13-18, 2002.