

独立行政法人**科学技術振興機構**
創造科学技術推進事業
追跡評価用資料
(追跡調査報告書)

難波プロトニックナノマシンプロジェクト
(1997～2002)

総括責任者 難波 啓一

目次

1. はじめに	1
2. 研究の発展と展開図.....	3
3. プロジェクトの研究成果と継続・発展の状況.....	4
3.1. プロジェクト期間の研究のねらいと成果.....	4
3.1.1. プロジェクトのねらい.....	4
3.1.2. プロジェクト期間中の達成された成果.....	5
3.2. プロジェクト終了後の継続と発展の状況.....	9
3.2.1. プロジェクト後の研究のねらい.....	9
3.2.2. プロジェクト後の研究テーマおよび成果.....	10
4. 研究成果から生み出された科学技術的、社会的、経済的な効果・効用及び波及効果について	14
4.1. 科学技術の進歩に貢献する成果.....	14
4.1.1. 科学技術上の発見と発明.....	14
4.1.2. 研究成果の他分野への展開.....	15
4.1.3. 新しい概念の提唱と新潮流の創出.....	19
4.2. 社会的、経済的な効果・効用及び波及効果.....	21
4.2.1. プロジェクト成果から期待される技術革新・イノベーション.....	21
4.2.2. 企業等による社会的、経済的な効果効用に繋がる取り組み.....	22
4.3. 参加研究者の活動.....	23
4.3.1. 招待・基調講演.....	23
4.3.2. 主な受賞.....	23
4.3.3. 人材育成の面から見た参加研究者の動向.....	24
5. プロジェクトに関連して出願された特許.....	25
6. 参考論文	26

1. はじめに

蛋白質や核酸などの生体高分子から細胞小器官、細胞、個体まで様々なレベルで観察される生体の「動き」は生命活動の基本的機能である。その「動き」の素過程は、生体超分子により駆動されており、生体超分子は生体高分子が集合し形成する安定な、または準安定な複合体として機能している。細菌べん毛は約 30 種類の蛋白質がそれぞれ数個から数万個が自己構築する超分子ナノマシンで、自然がナノスケールで実現している様々な機械的動作の仕組みが凝縮されている分子機械である。その大きさは図 1 に示すように生体に比して、1/1000 の 3 乗の桁である。

ERATO「難波プロトニックナノマシンプロジェクト」(本プロジェクト)は生物を超分子ナノマシンである分子機械として捉えて、構造とダイナミクスを物理学的手法により究明するために計画された ERATO「宝谷超分子柔構造プロジェクト」(1986 年 10 月～1991 年 9 月)で実施したべん毛の研究を受け継いだ研究である。当時、難波総括責任者が所属していた松下電器産業(株)中央研究所で、5年間の研究を経た後、本プロジェクトは 1997 年 10 月～2002 年 9 月まで実施され、バクテリアの運動器官であるべん毛について、その構造と構造形成過程および動作機構の本質をできるだけ高い分解能で明らかにすることを目指した。具体的には X 線結晶解析と低温電子顕微鏡解析を駆使して、超分子複合体の構造を原子レベルの分解能で解明すると同時に、計測限界に近いプロトン流の計測と分子機械のエネルギーの変換システムおよびその裏に隠された未知の物理原理を解明することを目指した。この仕組みの解明は将来の人工ナノマシンやナノデバイスの製造に役立つと考えられる。また効率の良いエネルギー変換機構の解明はナノマシンの動作原理の設計にも寄与するものと考えられる。

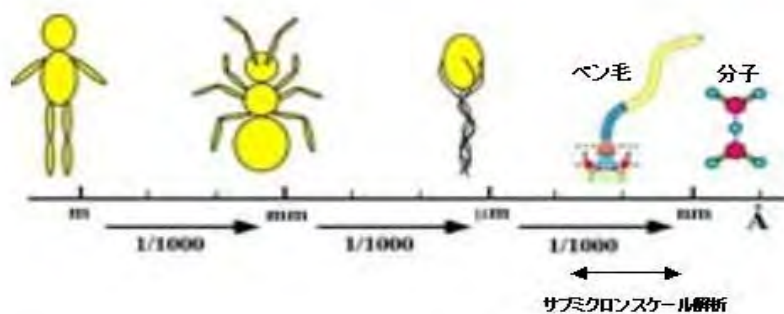


図 1 生物の大きさとべん毛の大きさの比較¹

難波総括責任者は、1986 年米国に留学中にタバコモザイクウイルス(TMV)の構造解析の研究²において、初めて繊維状分子の構造を明らかにした。この経験を基礎に、約30種類からなるサルモネラべん毛構成蛋白質のひとつひとつの遺伝子を大腸菌で発現させ、精製、結晶化の後、その構造を X 線解析で解いている。今日では X 線結晶解析技術はソフトウェアの進歩により、簡便

¹ 大阪大学難波研究室ホームページ掲載図より改変 (<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labo/09a.html>)

² Namba, K. Science, 227, 773-776(1985), Namba K. Science 231, 1401-1406(1986)

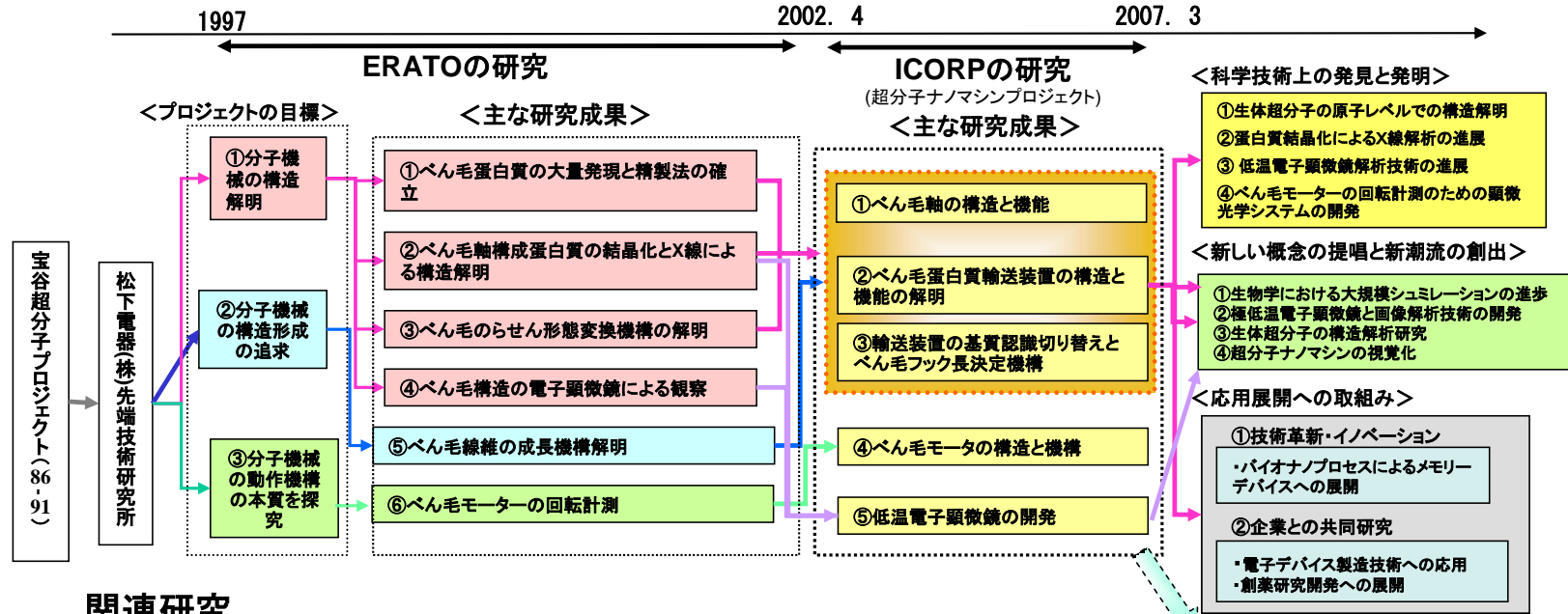
な技術として受け入れられつつあるが、プロジェクト発足当時は、繊維状の超分子構造の解析は、TMVおよびバクテリオファージなど比較的均一な構造を持つものに限られていた。べん毛は多くの構成蛋白質から成り、それぞれが協調して運動するという点で極めて難易度の高い生体超大分子であった。難波総括責任者はべん毛構成蛋白質の結晶化を巧みに行い³ 構造解析に成功している。さらに、電子顕微鏡技術による構造解析では、当時アクアポリンなどの蛋白質については原子レベルでの構造解析が行われていたが、解像度改善のためにフィラメント像を多数枚重ねて計算することで平均画像を得るなどして、プロペラ部分のべん毛フィラメントやキャップ蛋白質(HAP2)-べん毛フィラメント複合体の三次元像を獲得し、構造解析に成功した。また、コンピュータシミュレーション技術でも多くの原子を扱うプログラムを開発し、べん毛の生成過程を解明している。X線解析と低温電子顕微鏡の組合せによる高分解能の構造解析技術およびシミュレーション技術により、分子に比べ階層の高い器官である生体超分子べん毛の形態と機能を原子レベルで解明したことは国内外の専門家にも高く評価されている。

本資料はプロジェクトの成果の概要と本プロジェクトがICORP研究に引き継がれさらに発展した状況、および周辺領域に及ぼした影響と展開についてまとめたものである。

³ Yamashita I et al., J. Mol. Biol.278,609-615(1998)

難波プロトニックナノマシンプロジェクトの展開状況

2. 研究の発展と展開図

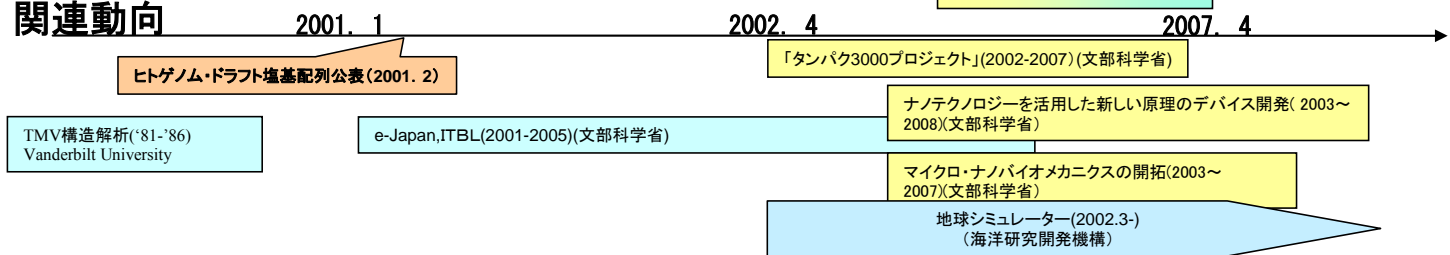


関連研究

細胞分子複合体構造解析用極低温電顕の開発(2003-2005) (文部科学省)

「ターゲットタンパク研究プログラム」(2007-2011) (文部科学省)
 テーマ:細菌のタンパク質分泌装置と輸送基質タンパク質群の構造・機能解析

関連動向



3. プロジェクトの研究成果と継続・発展の状況

3.1. プロジェクト期間の研究のねらいと成果

3.1.1. プロジェクトのねらい

分子機械のメカニズムを解明するためには、高分解能の立体構造を解析する必要があるが、生命活動を支える大半の超分子は、安定でない、均一でない、あるいは他の分子との相互作用に対して部分的アンフォールド構造を持つために結晶化を困難にしている。NMRによる構造解析は最大分子量の限界が30 kDa ないし40 kDa 前後であり、100 kDa にもおよぶ超分子の解析には適していない。超分子を解析する手法の開発を進めることにより、生命活動の仕組みを解明し、総合的理解を得るために、本プロジェクトでは、対象とする超分子としてサルモネラのべん毛を選び、その分子構造と動態を出来るだけ詳細に解明することを目標として、そのための方法論の開発も含めた研究体制を取り研究を進めた。

サルモネラ菌のべん毛は、約30種類の蛋白質で構成される超分子ナノマシンで、図2に示すように、細胞膜を貫通する基部体、細胞外に伸びるフックおよびべん毛繊維の3つの部分で構成されている。①基部体は回転モーターでべん毛を動かすエンジンとして働き、固定子はMotA/MotB複合体でプロトンチャネルでもある。②フックは直径18 nm長さ55 nmのユニバーサルジョイントとして、基部体とべん毛繊維をつないでモーターの回転を伝えている。③べん毛繊維は直径23 nm長、十数ミクロンのらせん状繊維で、プロペラのように回転して細菌の動きを推進している。べん毛繊維はFliC(フラジェリン)蛋白質の重合体である11本の素繊維(フィラメント)から成るチューブ構造である。

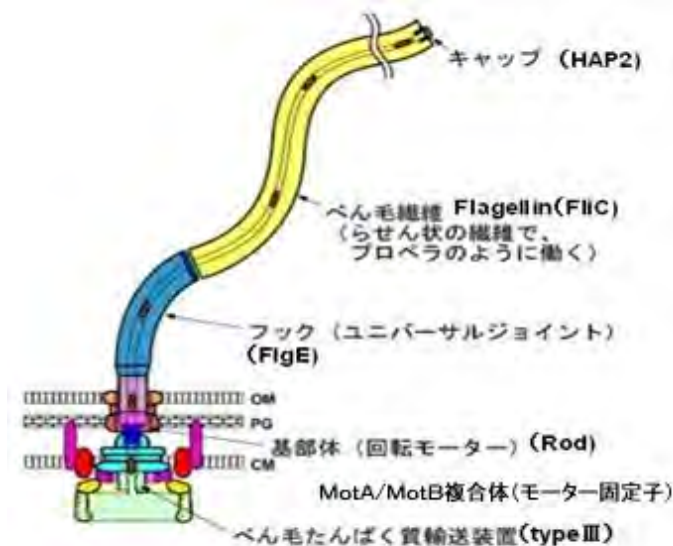


図 2 細菌べん毛の模式図⁴

⁴ 大阪大学難波研究室ホームページ掲載図より改変

本プロジェクトは細菌べん毛という分子機械の構造解析を目指して、X線結晶解析および電子顕微鏡解析を組み合わせた新しい方法を開発するとともに、各部品のナノスケール精度解析をもとに、

- (1) 分子機械の構造解明
- (2) 分子機械の構造形成メカニズムの追求
- (3) 分子機械の動作機構の本質を探究

を目標に実施された。

研究は下記(a),(b)および(c)の3つのグループの協力のもとに行われた。研究の目標を達成するために以下に述べる各グループが連携を持ち、(1)、(2)については(a)、(b)および(c)のグループが連携し、(3)については(c)が中心になって進める計画とした。(c)グループは、(a)、(b)グループの構造解析用蛋白質試料の大量発現系を提供した。

(a) 分子構築グループ

X線結晶解析法により、べん毛という超分子機械の立体構造を解析し、シミュレーションによりその構造形成過程を解明した。形態変換グループ、分子動態グループの協力で大量精製された軸構成蛋白質について結晶化し、X線解析を行った。また基部体構成蛋白質の大腸菌での大量発現と結晶化を行った。

(b) 形態変換グループ

極低温電子顕微鏡により、X線解析では解析困難なべん毛のフィラメントおよびキャップ蛋白質HAP2複合体の3次元構造と蛋白質分子間相互作用を解析することにより、べん毛の成長促進モデルを構築した。直線型べん毛フィラメントの画像と解析プログラムの工夫により高分解能の原子モデルを構築した。べん毛基部体についても電子顕微鏡観察を行った。べん毛関連蛋白質の発現系を構築し、大量発現を実現した。

(c) 分子動態グループ

光学的、電気化学的手法により、べん毛回転を正確に測定する装置と技術を開発し、べん毛モーターの回転を測定した。べん毛モーターの回転機構を解明するために、遺伝子操作による変異株を作成し、変異の運動に及ぼす影響を検討した。また固定子プロトンチャネル膜蛋白質(Mot)の大量発現と精製を試みた。

3.1.2. プロジェクト期間中の達成された成果

目標の(1)分子機械の構造解明については、① べん毛蛋白質の大量発現と精製法の確立、② べん毛軸構成蛋白質の結晶化とべん毛構造のX線による構造解析、③ べん毛のらせん形態変換機構の解明、④ べん毛構造の電子顕微鏡観察について初期の目標が達成された。目標の(2)分子機械の構造形成メカニズムの追求については、⑤べん毛線維の成長機構の解明が達成された。目標の(3)分子機械の動作機構の本質の探究については⑥ べん毛モーター

の回転計測法を確立し、回転特性が解明された。以下に詳細をのべる。

(1) 分子機械の構造解明

成果① べん毛蛋白質の大量発現と精製法の確立

べん毛繊維蛋白質フラジェリン (FliC 図 3 黄)に加えて、べん毛軸構成蛋白質として4種のロッド蛋白質 (FlgB 図 3 藍、FlgC 図 3 藍、FlgF 図 3 紅、FlgG 図 3 桃)、フック蛋白質 (FlgE 図 3 青)および2種のフック結合蛋白質 (HAP1 図 3 藍、HAP3 図 3 緑)などの大量発現系を確立し、構造と機能の解析に供した。菌体内からべん毛蛋白質を細いチャンネル内に送り出す働きをしているタイプ III 蛋白質輸送装置である蛋白質複合体へ蛋白質を受け渡すシャペロンである FlgN、FliT (図 3 最下部 黄)について HAP3-FlgN 複合体、HAP2-FliT 複合体の結晶を得た。

べん毛モーター回転子 FliF (図 3 緑青)のリングは 26 量体の細胞膜貫通複合体と考えられている。FliG は FliF と 1:1 の複合体としてMSリング形成し、プロトンチャンネルを形成するモーター固定子膜蛋白質 MotA/MotB 複合体 (図 3 緋/紅)と相互作用して回転トルクを発生している。べん毛モーター固定子である MotA/MotB 複合体の発現系の構築に成功し、数 mg/L 培地の高い収量で単離することが出来た。

FliF リングと FliF-FliG リング複合体の X 線や電子顕微鏡による構造解析を進めるために、FliF や、FliF-FliG フュージョン蛋白質の試料調製法を確立した。

成果② べん毛軸構成蛋白質の結晶化と X 線による構造解析

べん毛軸蛋白質から、NC両末端の重合構造安定化領域を除去することにより、6 種類のフラグメント蛋白質の結晶化に成功した。実験室系での X 線発生装置をはじめ、SPring-8 におけるビームライン BL41XU 等の測定においても X 線回折実験法の改良を行い、線維状蛋白質の X 線構造解析を可能にした。FliC、FlgE、HAP3 の各フラグメント (F41、H32、FL26)については 2 Å以上の分解能で構造解析に成功した⁵。そして、これらの構造からフックとフィラメントの結合する仕組みについて手がかりを得た。

成果③ べん毛のらせん形態変換機構の解明

べん毛フィラメントは 11 本の素繊維から成り、2 重の円筒構造を形成している。構造解析で得られた FliC (フラジェリン)の原子モデルに基づき、べん毛の超らせんの形態変換のスイッチ機構が解明された。すなわち、べん毛細菌は2-3秒ごとの直線運動と0.1秒の方向変換時間の繰り返し運動を行う。この方向転換は L 型と R 型のらせんのねじれの変化によって起こることが知られている。この型の変化を生じる仕組みはサブユニット間の 0.8 Åの周期長の変化が L 型らせん構造と R 型らせん構造を変化させ、内筒ドメインと外筒ドメイン間に相対配置を変え、スーパーコイルの方向を決定することにより起こることを、べん毛の内部構造の X 線構造解析から裏付

⁵ 参考論文1

けたものである⁶。

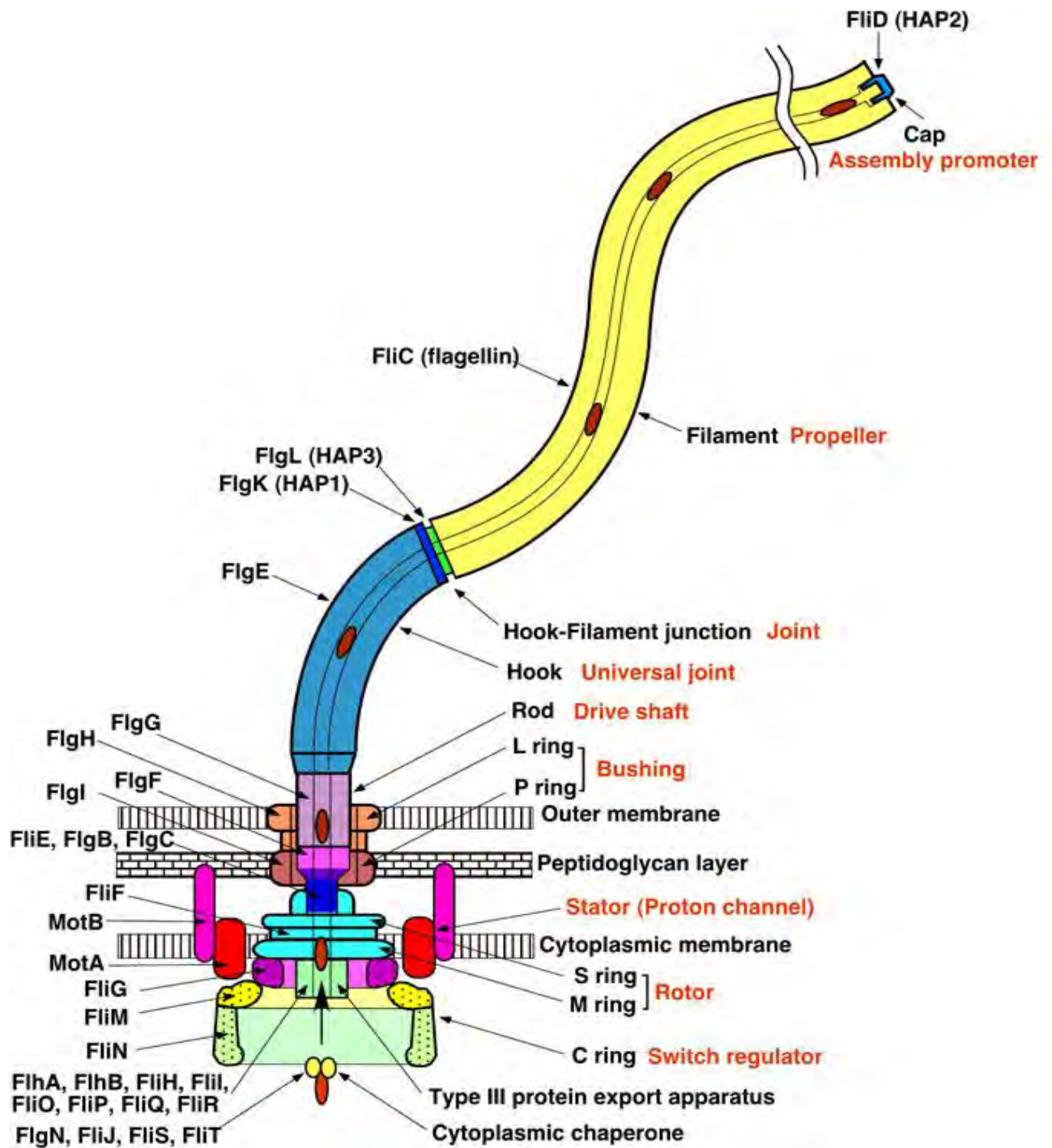


図 3 べん毛模式図と構成蛋白質

⁶ 参考論文 2

成果④ べん毛構造の電子顕微鏡による観察

低温電子顕微鏡法によるべん毛の構造を解明にあたり、機器の改造として、電子線の照射損傷を低下させて解像度を上げるために、エネルギーフィルターの効果の計測、ロータリーシャッターで間欠的に電子線照射を行う仕組みの構築、スロースキャン CCD カメラから像を取り込むソフトウェアを開発した。また、データの処理にあたり、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、4 Åの分解能でべん毛繊維構造の全容を明らかにした。結晶解析では除去したために解明出来なかったフラジェリンの両末端部の構造も明らかになった。キャップ蛋白質(HAP2)の構造解析とともに、べん毛フィラメントとキャップ蛋白質の5量体複合体の構造も電子顕微鏡から決定された。べん毛フィラメントとキャップ蛋白質複合体の構造には、フィラメントの先端に直径12 nm、厚さ2.5 nmの5角形のキャップ構造を認め、その直下に直径5 nm高さ7 nmの空洞が見られること、キャップ蛋白質に9 nmの足があることが観察された。また、フラジェリンとキャップ蛋白質の結合ドメインの構造も解明された⁷。

(2) 分子機械の構造形成メカニズムの追求

成果⑤ べん毛線維の成長機構解明

電子顕微鏡画像の新しい解析方法を開発し、べん毛先端の構造とその動作機構を明らかにした。すなわち、5量体のキャップがその5本足でべん毛先端のらせん階段を上がるように歩き、フラジェリン蛋白質が結合すると6.5度回転しながら持ち上がり、フィラメントは0.47 nm成長し、その度にキャップ蛋白質の足の配置が変わり、フラジェリンの自己集合を助けるダイナミックなフィラメントの成長のしくみが解明された⁸。これは、電子顕微鏡構造解析とX線構造解析の結果をうまく組み合わせ得られた画期的な成果である。

(3) 分子機械の動作機構の本質の探究

成果⑥ べん毛モーターの回転計測

べん毛モーターの高速回転を計測する蛍光ナノ顕微光学計測システムを開発し、技術的基盤を確立した。べん毛モーターの回転の動的性質を直接観察するため落射蛍光顕微鏡ピラミッド型ミラーおよび光電子増倍管を組み込んだセンサー測定システムを構築し、高い空間・時間分解能で回転を観察した⁹。その結果べん毛は200~300 Hzの速さで回転していること、ミリ秒程度の時間で回転数にゆらぎがあり、回転が止まることもあることが分かった。さらにpHの変化による回転への影響を見るために微小なpH環境の変化を起こす系をつくり、モーター回転の状態

⁷ 参考論文 3

⁸ 参考論文 3, 4, 5, 6

⁹ 南野他、第39回日本生物物理学会年会、S124、2001

を観察した¹⁰。ここではプロトン流の計測とモーターの回転との明確な関連づけを原子レベルで解明するには至らず、次のプロジェクトにおける課題となった。

表 1 ベン毛蛋白質の解析進行状況まとめ

べん毛 構成蛋 白質	FliC FlgE HAP3	HAP1 HAP2	FlgF FlgG FlgN FliS FliT	Flh-H AP1 複 合体 FliS-Fli C 複合 体	FliF FliG FliM FliH	FliI	FlgB FlgC FliE FlgH FlgI MotA MotB FlgJ	FlgD	FliN	FliJ	FlhAc (FlhA の 細胞質 ドメイン)	FliT- HAP2 複合 体、 FlgN- HAP3 複合 体
発現	◎	◎	◎	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	○	○
精製	◎	◎	◎	○	◎	◎	◎	◎		○	○	○
結晶化	◎	◎	◎	△ (微結 晶)	スクリー ニング 中	○	△	○		○	○	
X線解析	◎	◎	△			○		○		○	○	
終了	◎										○	

◎: ERATO 研究での進捗

○、△: ICORP 研究での進捗(○:終了、△:途中)

3.2. プロジェクト終了後の継続と発展の状況

3.2.1. プロジェクト後の研究のねらい

本プロジェクトの研究において、べん毛構成蛋白質の大量発現と精製法が確立され、それらを用いた蛋白質の結晶化とそれらの蛋白質の X 線による原子レベルでの解析が可能となった。また、極低温電子顕微鏡によりべん毛繊維構造が解明され、べん毛フィラメントとキャップ蛋白質複合体からなる成長機構も解明された。

これらの研究成果は、国際共同研究(ICORP)「超分子ナノマシンプロジェクト」(2002・12～2007・12)に引き継がれ、べん毛という超分子ナノマシンの立体構造を原子レベルで更に解明するとともに、動作機構の解明と、バイオナノテクノロジーの基盤作りを目指した。表1および図4は本プロジェクトで主に解明した構成蛋白質部分とその後のICORPで解明された構成蛋白質の概要を示している。

¹⁰ 参考論文 7

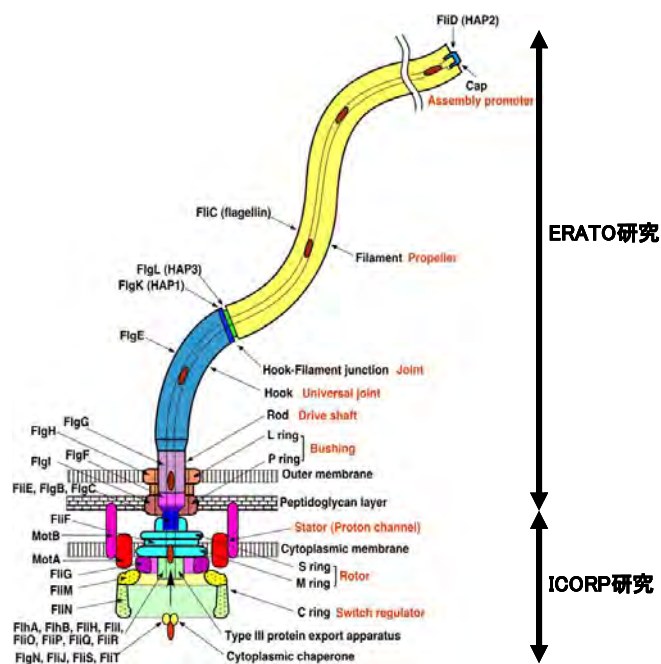


図 4 ベン毛の模式図と ERATO および ICORP プロジェクトの研究対象部位

3.2.2.プロジェクト後の研究テーマおよび成果

ICORP ではベン毛モーターと輸送装置の機能構造解析によりいっそう重点を置き、X 線、電子顕微鏡、光学顕微鏡計測それぞれについて、膜貫通部分を含むリング状超分子や不安定な相互作用をベースに機能する超分子の機能構造解析のための計測技術、装置、試料作成技術の開発を実施した。以下に主な成果を記載する。

(1) ベン毛軸の構造と機能

①フックの立体構造と動作機構の解明

図2に示したように、ベン毛ではフックと呼ばれる短いチューブ構造を介して、回転モーターとらせん型プロペラがつながれ、フックはユニバーサルジョイントとして働いている。ベン毛フックの構造蛋白質の単量体の、フレキシブルな N 末端および C 末端部分を除去した FlgE の 31 kDa フラグメント(FlgE31)の X 線結晶構造解析と、直線型フックの電子顕微鏡像解析より、フックの部分原子モデルを構築し¹¹、計算機シミュレーションにより、ナノスケールのユニバーサルジョイントを実現する分子機構が解明された。ねじれに強い構造はフック表面で右巻き6重らせんに沿って強い D2-D2相互作用を形成し、内側では様々な方向に弱く結合する D1ドメインが相互作用して2重円筒メッシュ構造をとること、また、曲げに対する柔軟性に関しては、D1ドメインのループ構造と D2ドメイン間に生ずる分子間滑りから生じる素繊維の大きな伸縮性によることを分子レベルで説明出来

¹¹ 参考論文 8

るようになった。

②フック・フィラメントの連結構造の解明

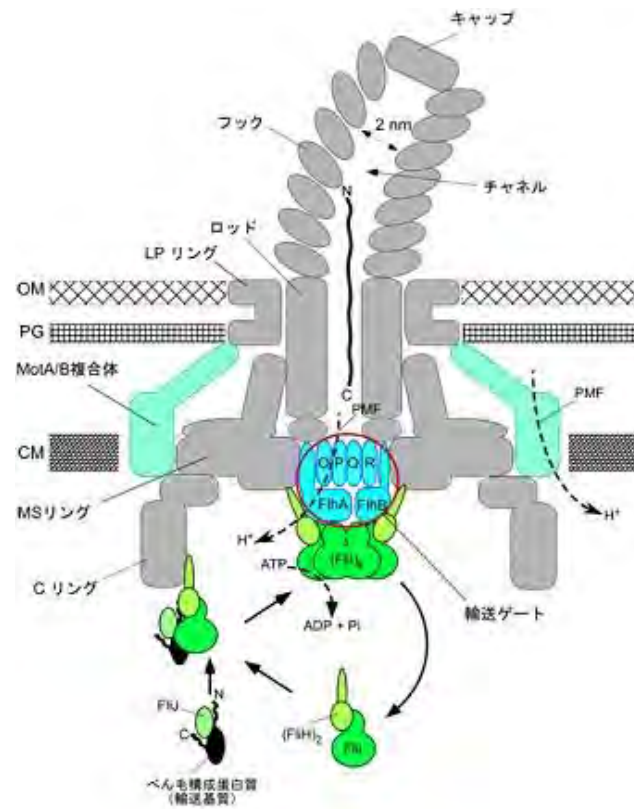
べん毛フィラメントとフックをつなぐ HAP1 と HAP3 は機械的性質が異なる両者をつなぎ留める働きをしている。フレキシブルな N 末端および C 末端領域を除去した HAP1 の 49 kDa フラグメント(FK49)の結晶構造が解明され、これまでの 41 kDa フラグメント(F41)、フック蛋白質 31 kDa フラグメント(H32)、HAP3 の 26 kDa フラグメント(FL26)の結晶構造解析結果と合わせて、フックからフィラメントに至るべん毛軸構造の内筒部を除く部分の全体構造を明らかにした。

さらに、べん毛フックの先端に存在し、フックの重合を促進する FlgD の精製と結晶化、X 線解析にも成功した。また、キャップ蛋白質 HAP2 複合体の結晶化、FlgN-HAP1 複合体 FliS-FliC 複合体の結晶化などにも成功した。ロッドの重合を促進する FlgJ の構造解析にも成功した。

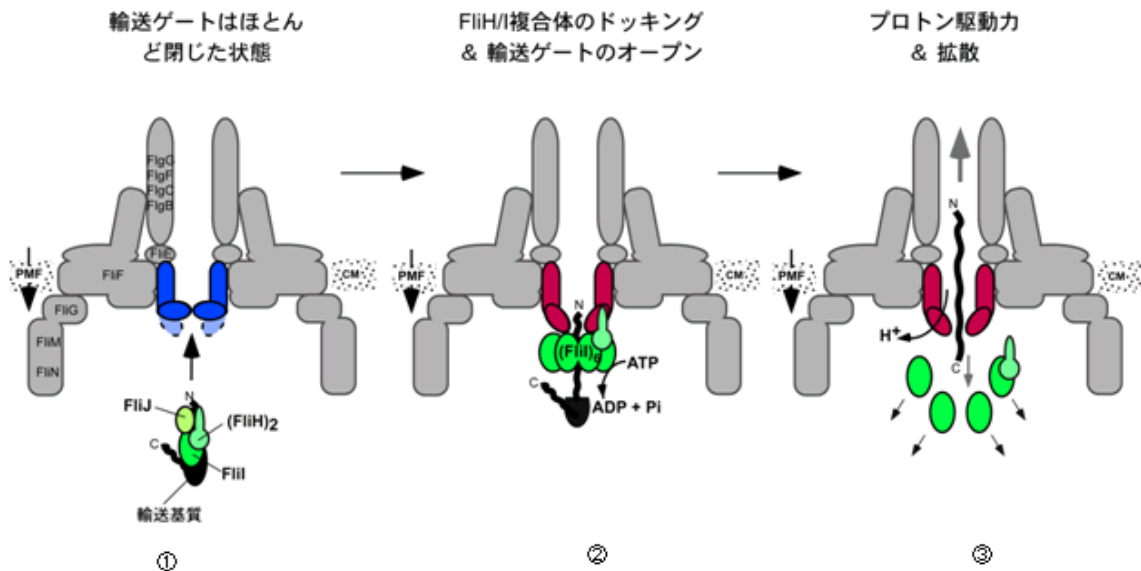
(2) べん毛蛋白質輸送装置の構造と機能の解明

べん毛軸構造の伸長は、その構成蛋白質がべん毛先端に順次重合することにより進行する。菌体内で合成された構成蛋白質および軸構造形成を補助するキャップ蛋白質等は、タイプIII蛋白質輸送装置によって選択的に輸送されている。この輸送装置は図5(a)のように6種類の膜貫通型蛋白質(FliA、FliB、FliO、FliP、FliQ、FliR)と3種類の細胞質蛋白質(FliH、FliI、FliJ)から成り、膜貫通蛋白質は複合体を形成して輸送ゲートとして機能している。

FliI は輸送装置を構成する細胞質蛋白質の一つで、ATP 加水分解(ATPase)活性を有し、FliH は FliI の ATPase 活性を制御するとともに FliI と輸送ゲートの結合を助け、FliJ は輸送基質のべん毛蛋白質の細胞質内での凝集を防いで輸送を促進することが明らかになった。図 5 (b) に示したように、①FliI と FliH の複合体は輸送されるべん毛蛋白質と FliJ を結合して、FliH/FliI/FliJ/輸送基質複合体を形成する。②この複合体が輸送ゲートに結合する際は、FliI は6分子のリング構造を形成して、輸送ゲート内に輸送基質であるべん毛蛋白質の N 末端を挿入する。③FliI の ATPase 活性により、FliH、FliI および FliJ は輸送ゲートから解離し、輸送ゲートはプロトン駆動力をエネルギー源としてポリペプチド鎖をほどこきながら送り込む、という3段階の仕組みが解明された。



(a)べん毛蛋白質輸送機構の模式図¹²



(b)べん毛蛋白質の輸送のメカニズム

図 5 べん毛基部の構造と構成蛋白質および蛋白質輸送機構の模式図

¹² JST・大阪大学共同発表 平成 20 年1月24日 (<http://www.ist.go.jp/pr/announce/20080124/index.html>)

(3) 輸送装置の基質認識切り替えとべん毛フック長決定機構

フックの長さは、べん毛蛋白質輸送装置を構成する FlhB による基質特異性がフックの完成時にロッド・フック型から繊維型に変換することで制御されるが、この過程にはフック形成中に輸送される制御蛋白質 FliK が関与している。FliK の N 末端側領域がフックの完成を感知し、C 末端部が輸送装置の基質認識切り替えに関与していることが示している。フックの長さが 55 nm 前後に成長すると FliK の C 末端 FlhB の C 末端細胞質ドメインの相互作用が可能になる。これにより、フックの成長が止まり繊維の成長へと基質特異性が切り替わることが判明した¹³。この知見に基づきフックの長さの制御機構モデルが構築された。

(4) べん毛モーターの構造と機能

①べん毛基部の構造

べん毛基部の回転子は、FliF(図3の緑青)から成る MS リング、FliM と FliN から成り反転スイッチ機能を持つ C リング、MS リングと C リングをつなぎトルク発生に関与する FliG から成っている。プロトンモーターの細胞膜領域ではプロトン透過する蛋白質複合体の MotA/MotB(図3緋/紅)が固定子を形成している。ナトリウムモーターでは PomA と PomB が固定子を形成している。PomA/PomB 複合体をリポソームに埋め込み、低温電子顕微鏡で観察することによって、リポソームの脂質膜から非対称的に突き出したドメイン構造を解析した。その結果、長く突き出したドメインは PomB の C 末端ドメインで、短い方は PomA の細胞質ドメインと想定され、MotA/MotB 複合体の構造解明に手がかりを得た¹⁴。

② ナノ光学計測装置の開発と回転計測

べん毛モーターのトルク発生やエネルギー変換の分子機構を解明するため、回転ステップが検出できるナノ光学計測装置とプロトン流を計測できる pH イメージング装置の開発を行った。その結果、プロトン駆動型べん毛モーターの回転ステップが検出できるようになった。また、pH 感受性の蛍光蛋白質 pHluorin を用い、細胞内 pH 蛍光イメージングが可能となり、MotA/MotB を流れるプロトン流を光学的に計測できるようになった。

(5) 低温電子顕微鏡の開発

生体超分子複合体の構造解析には、電子顕微鏡を用いた単粒子像解析法や電子線トモグラフィー法は有効な方法であるが、生体分子は電子線照射により損傷を受けやすいため、マイナス 270°C の極低温で、ある程度損傷を押さえる必要がある。それと同時に S/N 比の改善とその効果を定量的に評価することにより、最適な条件を検討した。その結果、①電子エネルギー分光法におけ

¹³ 参考論文 9, 10

¹⁴ 参考論文 11

る非弾性散乱電子の除去によって得られるゼロロス像が S/N 比の改善に寄与すること、②極低温下においては、通常では深刻な損傷が起こる $100e^-/\text{\AA}^2$ の電子線を照射しても、 17\AA 程度の分解能では問題ないこと、③単粒子像解析の分解能を向上するための撮影ステップの高速化を実現出来たこと、④膜蛋白質複合体の電子線トモグラフィーにより 3 次元再構成が可能となることが分かった。

これらの技術を駆使することにより、R 型とL型の直線べん毛繊維の高分解能構造解析を実現し、完全原子モデルの構築に成功し、べん毛繊維の自己構築やスイッチ機械の解明が大きく前進した。

4. 研究成果から生み出された科学技術的、社会的、経済的な効果・効用及び波及効果について

4.1. 科学技術の進歩に貢献する成果

4.1.1. 科学技術上の発見と発明

(1) 生体超分子の原子レベルでの構造解明

生体超分子の構造の解明には、数十種類にも及ぶ個々の構成蛋白質を解析すると同時に全体像を捉える必要があるが、難波総括責任者は構造研究のみにとらわれず、べん毛の動きを解明しようという目的意識のもとに、動的機能までも解明した。本プロジェクトの開始前、プロジェクト期間中、プロジェクト終了後と20年に及ぶ地道な研究は、べん毛という超分子ナノマシンの成り立ちとその機能ならびに生成過程の全貌を原子レベルで解明するという成功をもたらした。これまでに電子顕微鏡像の解析により生体分子が原子レベルで立体構造まで解明された例はなく、これは世界初で、今後の生命科学やバイオナノテクノロジーの基盤技術を確立し、生命科学ばかりでなく、先端医療やナノデバイス製造等の工学応用における極めて低消費エネルギーの情報処理システムの実現にも貢献するものと期待される。

(2) 蛋白質結晶化によるX線解析の進展

本プロジェクトの成果のひとつであるべん毛構成蛋白質の改変により結晶を調製する技術は¹⁵、結晶化の困難であった蛋白質を X 線結晶解析まで進める有効な手段となり、多くの構成蛋白質から成る超分子の構造解析へと展開された。例えば、HAP3 については特にアミロイド様繊維を形成しやすいため、そのままでは結晶化が不可能であった。そこで、トリプシン、Glu-C、CPY、アミノペプチダーゼを用い限定分解し、コアセグメントを作成し、その塩基配列の同定から 26 kDa のフラグメント(FL26)を大腸菌で発現させ、その蛋白質を精製した後、結晶化しX線回折に供している。ま

¹⁵ 参考論文 12, 13

た、フラジェリンFliCのF41フラグメントの結晶の放射光による測定時には、クライオ法の工夫による、シャープな回折点を得ることで分解能の向上をはかった。

(3) 電子顕微鏡解析技術の進展

1次元チューブ上結晶を用いた低温電子顕微鏡による巨大蛋白質複合体の構造観察法¹⁶は巨大分子の構造の直接的観察を可能にし、超分子構造体の構造形成¹⁷、機能発現¹⁸の仕組みを解明する一般的な手法となった。すなわち、個々の電子顕微鏡像の2次元像をx、y軸のそれぞれの方方向にそろえ、らせん対称性を利用する高分解能画像解析アルゴリズムを開発し¹⁹、世界最高の分解能を実現した。

(4) ベン毛モーターの回転計測のための顕微光学システムの開発

ベン毛モーターの回転動作を精密計測するための蛍光ナノ顕微光学システムを開発した。ベン毛が短い変異株のベン毛回転軸に蛍光ビーズを付着させ、蛍光ビーズの位置を高い時間分解能と空間分解能で計測することを可能にした²⁰。これによりベン毛の回転特性が正確に計測可能となった。

4.1.2.研究成果の他分野への展開

(1) 代表的論文と被引用件数の年次推移

表2に示した主要5論文の被引用件数は年次ごとに増加していることが図6から分かる。特にベン毛の構成蛋白質であるフラジェリンの構造をX線結晶解析で解明したCと低温電子顕微鏡で画像を捉えたDの被引用件数の増加が著しく、本プロジェクトの成果が、他の研究者にも引用され、研究が進展している様子が窺える。

¹⁶ 参考論文 14, 15, 16

¹⁷ 参考論文 17, 18

¹⁸ 参考論文 7, 19, 20, 21,

¹⁹ 参考論文 3

²⁰ 上池伸徳:Function measurement of bacteria flagellar motor. Optics nano measuring device for rotation measurement and measurement system of motor drive current. 難波プロトニックナノマシン研究報告書(15年度)pp158-173(2003)

表 2 主要論文一覧

主要論文.	書誌事項	内容
A	Yonekura K et al., Science, 290, 2148–2152, 2000	フラジェリンがキャップ蛋白質に制御されて自己構築する
B	Namba K, Genes Cells, 6, 1–12, 2001	フラジェリン蛋白質の相補的部分以外の部分が自己構築に重要である
C	Samatey FA et al., Nature, 410, 331–337, 2001	べん毛の構成蛋白質の結晶構造解析からのスイッチ機構予測
D	Yonekura K et al., Nature, 424, 643–650, 2003	低温電子顕微鏡によるべん毛の原子モデルの解明
E	Samatey FA et al., Nature, 431, 1062–1068, 2004	べん毛フックの構造とユニバーサルジョイントとしての分子メカニズム

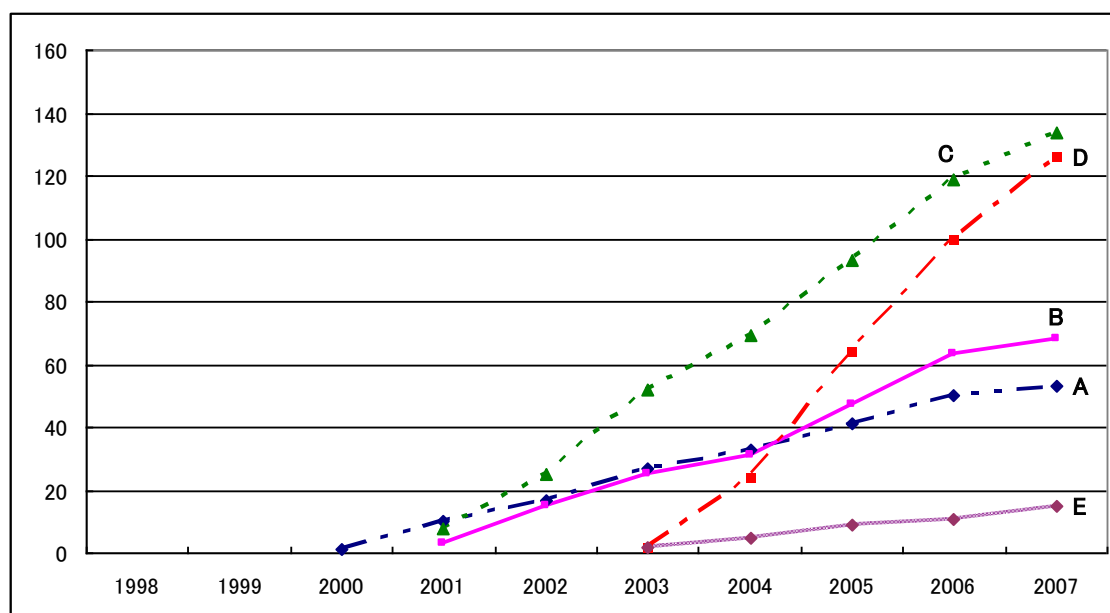


図 6 主要論文の被引用論分数の推移

(2) べん毛構造研究の他の研究領域への影響(論文の被引用件数から)

難波総括責任者の主要5論文を引用している学術雑誌の分野の分布を図7に示した。その割合は生化学、生物学、微生物学、医学の順となっている。また、年度毎の推移は図8に示したように、最近ではナノサイエンスや電気・工学の分野での引用が増加していることが分かる。これは本プロジェクト成果が他分野の研究に影響を与えていることを示唆している。その事例として、各分野の代表的な引用文献の内容を簡単に下記にまとめた。

①生物学、生化学分野では機能性蛋白質の構造上の主要構成部分ではないが、分子進化上保存されていて2次構造をとらない配列が、機能性の蛋白質の構築に重要であり、環境に従って機

能を柔軟に変化させ適応する仕組みを担っているとされている²¹。べん毛にも同様な構造が存在するという知見が注目され引用されている。

②医学分野では自然免疫の認識機構において、TLR-5(Toll-like Receptor-5)が、細菌のべん毛の構成蛋白質であるフラジェリンを認識することが、ヒトとマウスで明らかにされた²²。べん毛のフラジェリンモノマーが免疫を活性化し、炎症促進因子として作用し、TLR-5-核因子- κ B のシグナル伝達の基軸をなして、炎症が惹起される²³。フラジェリンの構造がサルモネラ菌のべん毛で初めてX線構造解析により明らかになったことから、その構造基盤の議論の土台として引用されている。

③微生物分野では病原性大腸菌のタイプ III 分泌機構の構造が解明され²⁴、その構造がべん毛蛋白質と類似していることから多く引用されている。

④ナノサイエンス分野では自己組織化能を持つ蛋白質をメモリーデバイス製造へ応用するなどの関連で引用され、電気・工学では4. 2. 1 に記したようにナノエレクトロニクスなどの研究で引用されている。

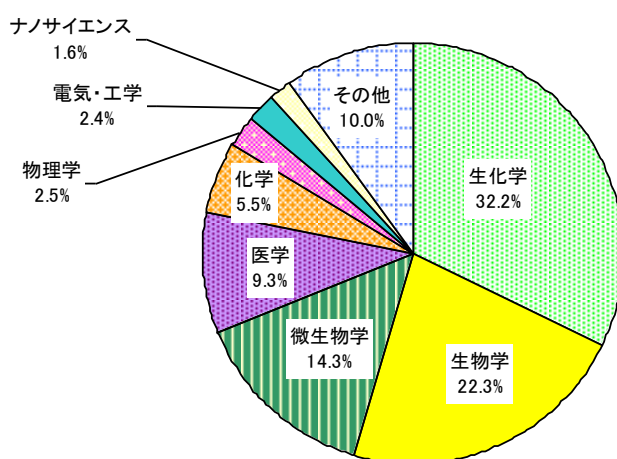


図 7 分野別主要論文被引用数の割合

²¹ Jinfeng Liu et al., Loopy Proteins Appear Conserved in Evolution J Mol Biol 322,53-64, 2002

²² Andersen-Nissen E et al., A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin, J Exp. Med, 204(2):393-403, 2007

²³ Neville LF et al., Antibodies Raised against N-terminal Pseudomonas aeruginosa flagellin prevented mortality in lethal murine model of infection, Intn'l J Mol Med, 16(1): 165-171, 2005

²⁴ Daniell SJ et al., 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic Escherichia Coli, Mol Microbiol, 49(2), 301-308, 2003

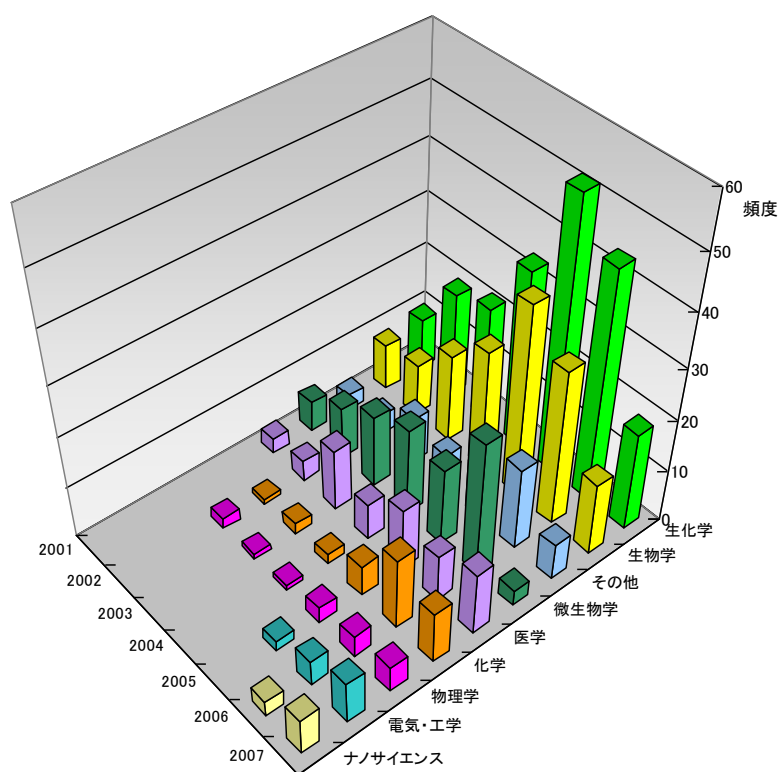


図 8 分野別主要論文被引用数の年次推移

(3) 新しいプロジェクトでの展開

①タンパク3000プロジェクト

文部科学省新世紀重点研究創生プラン「タンパク3000プロジェクト」(2002～2007年)において大阪大学蛋白質研究所中川敦史教授を代表とする個別解析プログラム(脳・神経系)に今田勝巳グループリーダーが所属し、「その他の蛋白質」として超分子複合体ナノ分子モーターであるべん毛回転機構を原子レベルで明らかにする研究を進めるとともに構造を明らかにし、4種のべん毛関連蛋白質をPDB(Protein Data Bank)に登録し、同プロジェクトの目的である蛋白質3000の構造解析の一翼を担った²⁵。

②ターゲットタンパク研究プログラム

本プロジェクトで分子構築グループの今田勝巳リーダーは2007年度から開始された、文部科学省の「ターゲットタンパク研究プログラム」の中の基本的な生命の解明を主題とする分野で「細菌の蛋白質分泌装置と輸送基質蛋白質群の構造・機能解析」という課題のもとに本プロジェクトおよびI CORP研究で残された研究を引き継いで研究している。この研究により、未解明のべん毛基部蛋白質の詳細な構造と機能が解明されることが期待される。

²⁵ 文部科学省:タンパク3000プロジェクト 事後評価報告書(平成19年7月) 5-8 成果概要 p425およびp440 (<http://mext-life.jp/protein/evaluate2007/5-8.pdf>)

4.1.3.新しい概念の提唱と新潮流の創出

(1) 生物学におけるシミュレーションの進歩

べん毛フィラメントモデルの構築に当たっては、X線繊維回折データと解析プログラムの開発、フラジェリン結晶解析、フィラメントの電子顕微鏡像解析によりフィラメントモデルを構築し、モーター反転に伴うべん毛の形態変化をもたらす分子内スイッチの機構²⁶、べん毛の構造形成過程のモデル²⁷等を動画により提唱した。

さらに、これらの研究から得られたフィラメントの原子座標データを基に、郷信弘教授(当時京都大学 理学部)のグループと共同で、スーパーコンピュータ「地球シミュレータ」を利用して、ヘテロの原子集団である200万原子の生体超分子のエネルギー状態が解明された。当時、超分子の3次元構造の動きを視覚化することは、計算機の能力の限界で難しい課題であったが、郷教授等は構造解析データを基に、目的に合わせて種々のアルゴリズムを開発し、エネルギー計算を可能にした(図9赤矢印が本研究の対象分子)。現在では「地球シミュレータ」上で240万原子まで扱うことができるが、本プロジェクト期間に100万原子以上を扱う計算を実行する分子動力学(Molecular Dynamics:MD)シミュレーションを行ったことは、世界の最先端をリードしていた。

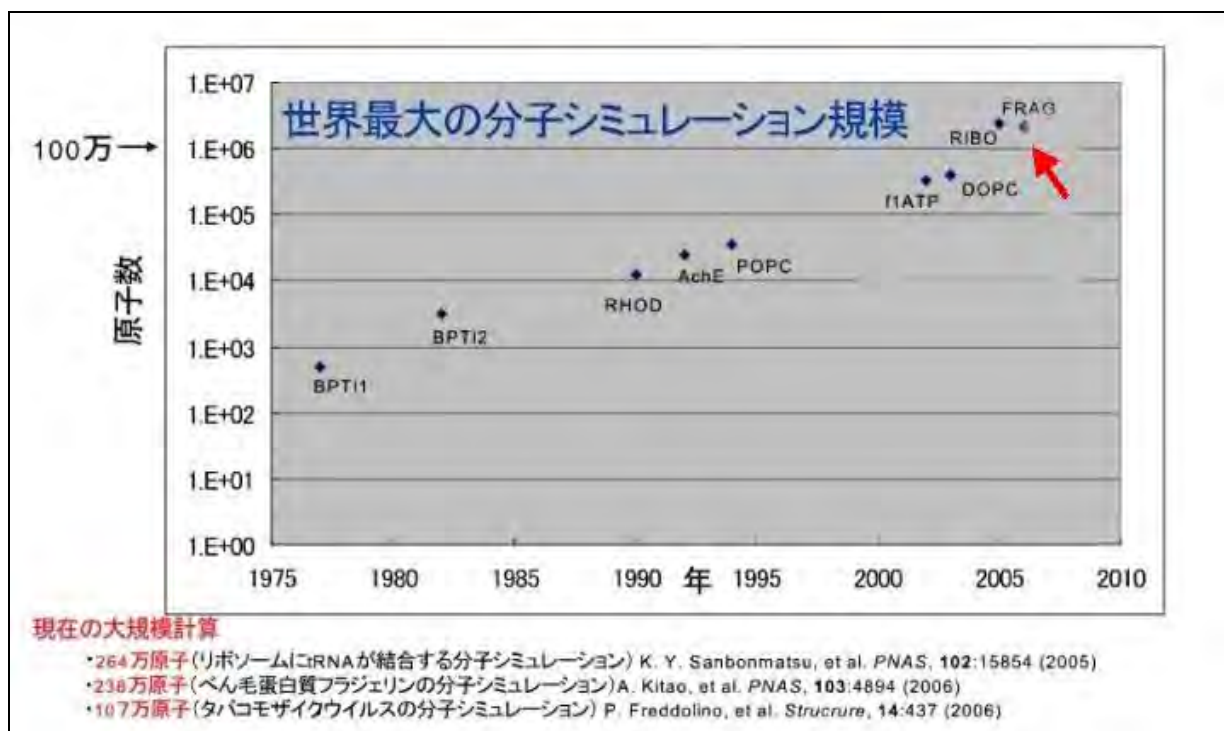


図 9 計算生物学におけるMDシミュレーションの規模 ²⁸

²⁶ 参考論文 17, 23

²⁷ 参考論文 5

²⁸ 松本淳ら: H19 年度地球シミュレータ利用報告書 より

これらの結果は**新しい生物理論の提唱**にも貢献している。郷教授のグループは生体の運動の生成について、大規模MD計算を用いて、3種類の分子間相互作用が重要な役割を果たしていることを示した。すなわち構造変化を可能とするためには、分子内相互作用と分子間相互作用の間にあるフラストレーションの状態(エネルギー項を極小にする最適解が存在しないため準安定な状態を複数持つ状態)が必要であるという仮説を提唱している^{29, 30}。この仮説は生体超分子が働くための条件、①超分子複合体構造を安定に保つこと、②機能発現に必要な構造変化を許容すること、③機能をコントロールすることの3つを満たすと考えられる。この考え方は従来の生命現象の説明をさらに大きく発展させる原理を示唆しており、生体超分子が機能を発揮する原理の解明に向けて大きく貢献するものと思われる。

(2) 極低温電子顕微鏡の開発

本プロジェクトで用いた極低温電子顕微鏡は、京都大学理学研究科の藤吉好則教授との共同研究により開発されたエネルギー分光型極低温電子顕微鏡であり、3 Åを越える高分解能で、S/N 比の良い画像を得られる装置である。その主要な機能である超分子の高分解能立体構造解析用画像解析プログラムや試料傾斜機構(SET システム)付き極低温電子顕微鏡は、難波総括責任者グループと共同で開発されたものである。欧米における同様な機器に比べ高い分解能を持っており世界最高水準の技術となっている。そのため、世界中の超分子の構造解析研究者から注目されている。

(3) 生体超分子の構造解析研究

本プロジェクトにおいて、細菌べん毛の構造がX線解析および低温電子顕微鏡の組み合わせで解明できることを示したことは、以後多くの超分子複合体蛋白質の原子レベルでの解明を促進させている。現実にはX線構造解析による結晶化可能な超分子複合体の解明は構造解析の大きな潮流となっている。また、電子顕微鏡で超分子複合体をマクロに捉え、原子レベルの視点で全体像を解明するという研究の潮流が生まれようとしている。文部科学省の特定領域研究「生体超分子構造」(平成16年度発足)の公開シンポジウム等では、この分野の活動が盛んになってきていることを示す演題が20%ほど見られる。また、生体高分子の構造研究に重きを置く新しい専門誌「*Acta Crystallographica, Section D., Structure, Nature Structural and Molecular Biology*」などが発刊されていることは、この分野の重要性と今後の発展を示唆している。

²⁹ Go N, Physics and biology of Protein, Progress of Theoretical Physics, 170, 198-213, 2007

³⁰ 北尾彰朗 他 生物物理, 48, 011-017, 2007

(4) 超分子ナノマシンの視覚化

①2005年のロンドンにおける「Gallery at Science Museum」のナノテクノロジーの展覧会ではバクテリアべん毛の画像が紹介された。

②米国の基礎エネルギー科学に関するプログラムである“*Directing Matter & Energy: Five Challenges for Science & the Imagination*”の“*Realizing the dream of nanoscience: energy and information at the nanoscale*”の章には「分子モーターの回転」のイラストレーションが使用され、本プロジェクトの成果がエネルギーの観点からも着目されている事が分かる。

③フィンランドのテレビ局TV-7は ERATO 成果ビデオに着目し、「回転するバクテリアモーター」が放映された。

④細胞の分子生物学の教科書である「Molecular Biology of the cell」の2007年の最新版(第5版)(Garland Science Publishing社)に添付のCDには、べん毛繊維の成長機構についてアニメーションビデオが掲載され、若手の研究者や学生に生物現象を分子レベルで解明するおもしろさを提供している。

⑤その他、Microbial Physiology(Wiley 出版社)、BIOCHEMISTRY(第3版、2005年)(Wiley & Sons社)、Microbial Life(Sinauer Associates社)Chemical Biology(Wiley & Sons社)等の教科書に本プロジェクトの成果ならびに派生した成果が記載されている。

このように、本プロジェクトは原子・分子レベルで生命現象を明らかにし、画像や映像を使って視覚に訴えることでインパクトを与える**斬新なサイエンスの潮流を創出した**。

4.2. 社会的、経済的な効果・効用及び波及効果

4.2.1. プロジェクト成果から期待される技術革新・イノベーション

(1) バイオナノプロセスによるメモリーデバイスへの展開

生体における蛋白質分子などの生体分子が分子間力と分子認識機構により秩序構造を構築する、自己組織化の仕組みを利用したデバイス作製のプロセス「バイオナノプロセス」の開発が試みられている。ナノエレクトロニクスの分野では、ナノ構造を安価に製造する技術がデバイスの性能の向上には不可欠である。しかし、ナノ構造を製造する手段である光リソグラフィを中心とした微細加工技術では、20 nm程度が限界であり、数 nmの機能構造体の作製は困難である。そこで、「バイオナノプロセス」により、①ナノ構造作製のテンプレートとなるナノ粒子やナノワイヤ等の生体超分子を設計し、②蛋白質と無機材料の接点である生体分子による無機材料析出法「バイオミネラライゼーション」を利用し、ナノデバイスの構築が検討されている。

実際には、シリコン基板上に自己組織化能を利用して調製した金属ナノ粒子を内包する蛋白質を規則的に配置させた後、蛋白質を熱処理により除去することで、所定の位置に金属粒子のみが配置される。この方法は低エネルギー、高効率なメモリー素子やナノドットを形成する方法の原理と

なっている^{31, 32}。

CRESTナノテクノロジー分野別バーチャルラボの一研究課題である「バイオのナノテクノロジーを用いたナノ集積プロセス」において、山下一郎氏は球殻状の鉄保存蛋白質であるフェリチンに着目して研究を展開した。ここでは、シリコン基板に従来のリソグラフィ技術でチタンのパターンを形成し、チタンに吸着する特性のある分子鎖を持つフェリチンに金属化合物(7 nm 以下)を内包させて塗布することにより、7 nm 以下の微細な構造物を形成することが可能となった。この方法によれば、従来の半導体プロセスでは困難とされた超微細(1 桁台のナノメートルレベル)構造の半導体が作製できるため、切手の大きさを1 テラバイトの記憶容量を持つ超大容量メモリー等を低コストで製造することも夢ではない時代が到来すると考えられる³³。

本プロジェクトから得られた実験的・理論的知見はナノ構造体を利用したナノサイズの物作りとして、新しい電子デバイス生産技術等、日本の製造業に大きなアドバンテージを提供する可能性がある。

4.2.2.企業等による社会的、経済的な効果効用に繋がる取り組み

(1) 電子デバイス製造技術への応用

べん毛の蛋白質のナノ中空構造の中に白金を充填しナノワイヤを形成し、燃料電池の電極とする試みが、シンガポールのローランド氏によりなされている(未公表)。

テキサス大学、サンジェ・バナジー氏はフラッシュメモリーの製造において、シャペロン蛋白質格子をテンプレートとして、金属ナノ結晶のPbSeが $9.5 \times 10^{11}/\text{cm}^2$ の高密度で規則正しく配置出来ることを実証している³⁴。大容量のメモリーでは金属ナノ結晶の配列の規則性が乏しいと電子のゆらぎも比較的大きく、セル間の閾値電圧のバラツキにつながり、メモリー製造上、閾値電圧のセル間のバラツキの極小化が極めて重要である。この手法によると、9 Vの電圧下で、メモリーウインドウサイズは0.5 V、書き換え回数は $>10^5$ 、データ保持時間は 10^5 秒の成績が得られることが分かり、実用的なメモリー製造への可能性が示された。

(2) 創薬研究開発への展開

大阪大学、オックスフォード大学およびスウェーデンのベンチャー企業の3者が共同で、医薬探索システムの構築を展開している。大阪大学はサルモネラ菌の変異菌株を提供し、ベンチャー企業はドラッグデザインを担当し、オックスフォード大学はべん毛の動きを指標に化合物のスクリーニ

³¹ Tsukamoto R et al., Synthesis of CoPt and FePt₃ Nanowires Using the Central Channel of Tobacco Mosaic Virus as a Biotemplate, Chem. Mater, 19, 2389-2391, 2007

³² Heddle J.G. et al., Using the ring-shaped pProtein TRAP to capture and confine gold nanodots on a surface, Small, 3, 1950-1956, 2007

³³ A. Miura et al., Bionanodot monolayer array fabrication for nonvolatile memory application, Surface Science, 601 L81-L85, 2007; Tsukamoto et al., Chem Mater 19(10), 2389-2391, 2007

³⁴ Joy Sarkar et al. Vertical flash memory with protein-mediated assembly of nanocrystal floating gate, Applied Physics Letters 90, 103512 (2007)

ングを実施し、オックスフォード大学と大阪大学は化合物に感受性を持つ遺伝子の解明を進めている。本プロジェクトから生み出された数々の変異菌株は薬剤の有効性を評価するための簡便なスクリーニング手段として有用であり、将来の創薬に貢献するものと期待される。

4.3. 参加研究者の活動

4.3.1. 招待・基調講演

難波総括責任者ならびに参加研究者は、国際学会、国際シンポジウム、国際ワークショップならびに海外の大学などで、プロジェクト期間中には 30 回、プロジェクト終了後にも 67 回の招待講演あるいは基調講演を行なっている。国内では日本蛋白工学会、日本生化学会、日本分子生物学会、日本生物物理学会等のシンポジウムや講演会に、プロジェクト中は 37 回、プロジェクト終了後は 53 回の招待・基調講演を行っている(詳しくは参考資料5. 4招待・基調講演リスト参照)。

4.3.2. 主な受賞

難波総括責任者ならびに参加研究員の受賞リストを表 3 に示す。本プロジェクトの成果がプロジェクト終了後にも、大きく進展している様子が窺える。

表 3 主な受賞リスト(2008/2/29 確認データ)

受賞年	受賞者	名称	授与機関
2001	難波啓一	第 19 回大阪科学賞受賞	大阪府 大阪市共催
2002	難波啓一	日経ビジュアルサイエンスフェスタ優秀賞	日本経済新聞社
2003	難波啓一	TEPIA ハイテク・ビデオ・コンクール最優秀作品賞・TEPIA グランプリ	財団法人 機械産業記念事業財団
2005	岩瀬亮 今田勝巳 林文夫 難波啓一 石浦正寛	日本遺伝学会第 76 回大会 Best Paper 賞	日本遺伝学会
2006	Samatey Fadel 今田勝巳	第3回ひょうご Spring8賞	兵庫県
2009	難波啓一	Founder's Award	Biophysical Society

4.3.3.人材育成の面から見た参加研究者の動向

(1) 参加研究者の現況

難波総括責任者のもとで、本プロジェクトに参画した国内研究員 15名の参加前の職位、参加終了時の職位ならびに現職を、参考資料 **5.3. プロジェクト研究者の動静表**に示した。表4は研究者の現職をまとめたもので、研究者 15名はプロジェクト終了後、大学あるいは研究機関に適職を得て、別プロジェクトに従事するかあるいは本プロジェクトの後継プロジェクトである ICORP に参画するなどして活躍している。現在は教授、准教授、助教に昇進した研究者が5名、ICORP 研究者 4名 特任研究員 1名、海外研究者2名と、全員が最先端の研究に従事している。このような活躍を見ると、本プロジェクトは人材育成上大きな役割を果たしたといえる。

表4. 参加研究者の活動状況

所属	人数	内訳
大学	6名	教授 2名、准教授 2名、助教 1名、特任研究員 1名
独立法人研究機関	3名	主席研究員 1名、副主幹研究員、主任研究員 1名
JST/ICORP(後継プロジェクト)	4名	研究員 3名、非常勤研究員 1名
海外留学	2名	リサーチフェロー1名、ポストドク 1名

5. プロジェクトに関連して出願された特許

通 し No.	パテントファミリ ーおよび枝番	発明の名称	出願国	出願番号	出願日	発明者	出願人
2	A	タンパク質精製方法(公開時の発明の名称:プロテアーゼ除去方法)	日本国特許庁	特願 2000-052528	2000/2/28	濱野 由見子 大澤 研二	独立行政法人科学技術 構
概要		<p>【課題】 目的タンパク質を分解させることなく、効果的かつ簡便に宿主のタンパク質大量発現系からプロテアーゼを除去する方法を提供する。</p> <p>【解決手段】 タンパク質を大量発現させた菌体を、尿素存在下で破碎した後、イオン交換クロマトグラフィーにより精製する</p>					
1	B	ナトリウム透過阻害剤とその使用方法	日本国特許庁	特願 2004-43818	2004/2/20	富沢 好太郎 渥美 龍男 吉村 文信 難波 啓一	独立行政法人科学技術 構
概要		<p>【要約】</p> <p>【課題】 既知のアミロライド化合物ファミリーのナトリウム透過阻害剤に比較して同程度以上の効果があり、フェナミル耐性微生物に対しても十分に有効な、新規ナトリウム透過阻害剤</p> <p>【解決手段】 アミロライド化合物誘導体であるナフトミル化合物を有効成分とするナトリウム透過阻害剤。ナトリウム透過の阻害又は調節を目的とする、その医療上の利用。ナトリウム透過阻害剤の利用。特に、フェナミル型ナトリウム透過阻害剤の効果が制約される微生物に対する利用。</p>					

6. 参考論文

1. Samatey FA, 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

2. Yamashita, I., Hasegawa, K., Suzuki, H., Vonderviszt, F. Mimori-Kiyosue, Y., Namba, K.

Structure and Switching of Bacterial Flagellar Filament, Studied by X-ray Fiber Diffraction

Nature Struct. Biol.,5,125-132(1998)

3. Yonekura K, Mak, S, Namba K

Structure analysis of the flagellar cap-filament complex by electron cryomicroscopy and single particle image analysis

J Struct Biol, 133, 246–253, 2001

4. Yonekura K, Maki S, Morgan DG, DeRosier DJ, Vonderviszt F, Imada K, Namba K

The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly

Science, 290, 2148–2152, 2000

5. Yonekura K, Maki S, Namba K

Growth mechanism of the bacterial flagellar filament

Res Microbiol, 153, 191–197, 2002

6. Maki-Yonekura S, Yonekura K, Namba K

Domain movements of HAP2 in the cap-filament complex formation and growth process of the bacterial flagellum

Proc Natl Acad Sci U S A, 100, 15528-15533, 2003

7. Minamino T, Imae Y, Oosawa F, Kobayashi Y, Oosawa K

Effect of intracellular pH on rotational speed of bacterial flagellar motors

J Bacteriol, 185, 1190-1194, 2003

8. Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K

Building the atomic model for the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy and image analysis
Structure, 13, 407-412, 2005

9. Furuta T, Samatey FA, Matsunami H, Imada K, Namba K, Kitao A

Gap compression/extension mechanism of bacterial flagellar hook as the molecular universal joint
J Struct Biol, 157, 481-490, 2007

10. Minamino T, Namba K

Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export.
Nature, 451, 485-488, 2008

11. Yonekura K, Yakushi T, Atsumi T, Maki-Yonekura S, Homma M, Namba K

Electron cryomicroscopic visualization of PomA/B stator units of the sodium-driven flagellar motor in liposomes
J Mol Biol, 357, 73-81 2006

12. Saijo Y, Namba K, Oosawa K

A new purification method for overproduced proteins sensitive to endogenous proteases
J Struct Biol, 132, 142–146, 2000

13. Samatey FA, 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

14. 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

15. Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K

Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy
Nature, 424, 643-650, 2003

16. Yonekura K, Toyoshima C, Maki-Yonekura S, Namba K

GUI programs for processing individual images in early stages of helical image reconstruction—for high-resolution structure analysis
J Struct Biol, 144, 184-194, 2003

17. Samatey FA, 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

18. Minamino T, González-Pedrajo B, Oosawa K, Namba K, Macnab RM

Structural properties of FliH, an ATPase inhibitory component of the Salmonella type III flagellar export apparatus
J Mol Biol, 322, 281–290, 2002

19. Atsumi T

An ultrasonic motor model for bacterial flagellar motors
J Theor Boil, 213, 31–51, 2001

20. Oda T, Makino K, Yamashita I, Namba K, Maeda Y

Distinct structural changes detected by X-ray fiber diffraction in stabilization of F-actin by lowering pH and increasing ionic strength
Biophys J, 80, 841–851, 2001

21. Ryuu H, Yamaguchi T, Namba K

A computational modeling of micro-fluid dynamics of undulatory locomotion,
Theoretical and Applied Mechanics, 50, 2001

22. Minamino T, Imae Y, Oosawa F, Kobayashi Y, Oosawa K

Effect of intracellular pH on rotational speed of bacterial flagellar motors

23. 難波啓一

細菌べん毛の分子構造から自己構築とサブÅ精度のスイッチ機構にせまる
蛋白質核酸酵素, 46, 1568-1576, 2001

