宝谷超分子柔構造プロジェクトの研究成果

目次

1.　べん毛のＸ線繊維回折法による構造解析・・・・・・・・・・・・・・・・・　２

2.　べん毛の重合制御機能・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　4

3.　細菌のべん毛成長の制御因子・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　6

4.　べん毛モーターの回転計測・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　8

5.　ガラス表面とテザードセルの回転方向・・・・・・・・・・・・・・・・・　１１

6.　スイッチ突然変異株の解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　１３

7.　外部電圧によるべん毛モーターの回転制御・・・・・・・・・・・・・・・　１４

8.　細菌べん毛モーターLP リングの単離精製と二次元結晶化・・・・・・・・　１６

9.　べん毛モーターの構築順序の決定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　１７

10.　べん毛構成タンパク質大量産生用プラスミドの作成・・・・・・・・・・　１９

11.　ぺん毛モーターの再構成－FliF リングとそのドメイン構造－・・・・・・・　２１

12.　リボソームと自己組織性タンパク質を利用したモデル人工細胞の構築・・　２３

13.　膜小胞と細胞骨格によるモデル細胞の創製・・・・・・・・・・・・・・・　２５

14.　微小管動態の MAP2 による制御・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　２６

15.　微小管の脱重合開始機構・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　２８

1.　べん毛のX線繊維回折法による構造解析

直線型べん毛の高配向ゾルを作製し、X 線繊維回折法によりその 2mm 分解能の電子密度像を得た

研究成果の概要

X 線繊維回折法により、高分解能構造解析を行うため、配向分布角 3 度以下の液晶状態のべん毛ゾルを作製した。本手法により作製したべん毛ゾルの X 線回折像において、0.5nm 分解能の層線反射を得ることができた。

X 線繊維回折法で得られた回折強度と電子顕微鏡の位相を用い、位相改普を行って 2nm 分解能のべん毛電子密度像を得た。(図 1、2) この結果、べん毛サブユニットの結合部位が中心部分にあることと、中心に直径 6nm の穴が貫通していることが判った。これはべん毛サブユニットの分泌経路と見られる。

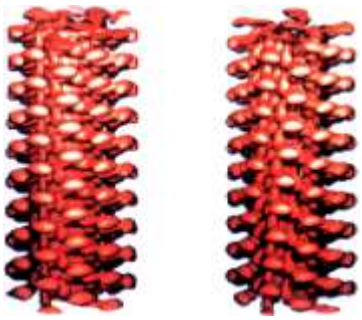


図 1　L 型(左)と R 型(右)のべん毛の 2nm 分解能での立体像

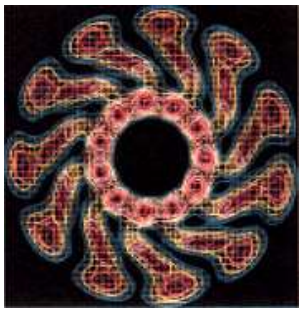


図 2　べん毛の断面図

成果展開可能なシーズ、用途等

1) 超分子の自己集合のメカニズムの解明
2) ナノメートルサイズの分子機械構築
3) 自己集合の時間的・空間的自動制御

特許出願

1) 極微小ピッチ 1 次元伝導体

特　　願：平 2-409457 (平 2.12.28) 特開平 4-249808 (平 4.9.4)

出　願　人：新技術事業団、山下一郎

請求の概要：サルモネラ菌等の原核垂物のべん毛の末端に伝導性金属や半導体原子を配置させ磁場中で一方向に配向させた極微小被覆伝導体とこれを支える基盤とから形成される極微小ピッチ 1 次元伝導体。

2) 不揮発性磁場センサ

特　　願：平 2-409458 (平 2.12.28)

出　願　人：新技術事業団、山下一郎

請求の概要：生体に影響を及ぼす強磁場を記録、検出する細菌べん毛ゾルを用いた不揮発性磁場センサ。

3）極細線構造の形成方法

特　　願：平 3-293092 (平 3.11.8)

出　願　人：新技術事業団、山下一郎

請求の概要：末端および近傍に原子または分子を結合配置した原核生物のべん毛の構成単位を重合する極細線構造の形成方法。更に必要に応じてこれら原子、分子を和互結合もしくは架橋させる。

報告書他

1) K.Namba,D.L.D.Casper and G.Stubbs
Enhanccment and Simplification of Macromolecularlmages.
Blophys.J.,53,p.469(1988)

2) K.Namba,I.Yamashita and F.Vonderviszt
Structure of the Core and Central Channal of BacteriaI FIagella.
Nature Vol.342,p.648-654(1989〕

3) I.Yamashita,F.Vonderviszt,T.Noguchi and K.Namba
Preparing Well-oriented Sols of Straight Bacterial Flagellar Filaments for X-ray Fiber Diffraction
J.Mo1.Biol,VoL.217,p.293-302(1991)

4）宝谷紘一
映像化された超分子の動的挙動
ELAN2 月号,p.16-21(1988)

5）山下一郎,難波啓一，バクテリアべん毛の構造とその重合,
パリティ 5 月号、p.60-63(1990)

6）山下一郎・難波啓一，多型性べん毛の再構成，細胞,Vol.24,No.13,P.4-9(1992)

7）難波啓一，生体超分子の構造と自己集合の機構,
丸善アドバンテストテクノロジーシリーズ第 4 巻タンパク質工学,p.1-22(1989)
他

〔研究者名〕山下一郎、フォンダヴィスト・フェレンツ、難波啓一

2.　べん毛の重合制御機能

べん毛のサブユニットタンパク質であるフラジェリンの重合制御機構を解明

研究成果の概要

フラジェリンをモノマーの状態にし、タンパク質分解酵素により処理して得られるフラグメントの生成パターンと、フラグメントの物理化学的性質から、フラジェリンのドメイン構造を解析。(図 1)

フラジェリンの重合能力は、両末端のアミノ酸残基を取り除くとともに低下し、べん毛フィラメントの通常の形態であるらせん形は、わずか数残基を取り除いただけで直線形となることを解明。

フラジェリンの両末端ドメインの構造変化がべん毛の自動的な重合制御や形態形成に非常に重要な働きをしていることを解明。

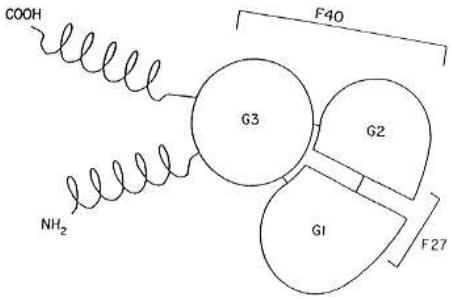


図 1

成果展開可能なシーズ、用途等

1) 超分子機械の自己構築機能や形態制御機能の分子的解析

2) 人工の超分子機械の構造設計

特許出願

なし

報告書他

1) F.Vonderviszt,S.Kanto,S.Aizawa and K.Namba
Terminal Regions of Flagellin are Disorderd in Solution.
J.Mol.Biol.,Vol.209,No.1,p.127-133(1989)

2) F.Vnderviszt,H.Uedaira,S.Kidokoro and K.Namba
Structural Organization of Flagellin.
J.Mol.Boil.,Vol.214,p.97-104(1990)

3) S.-I.Aizawa,F.Vonderviszt,R.Ishima and K.Akasaka
Termini of Salmonella Flagellin are Disordered and Become Organized upon Polymerization into Flagellar Filament.
J.Mol.Boil.,Vol.211,p.673-677(1990)

4) S.Kantoh,H.Okino,S.I.Aizawa and S.Yamaguchi
Amino Acids Responsible for Flagellar Shape Are Distributed in Terminal Regions of

Flagellin.
J.Mol.Biol,Vol.219,p.471-480(1991)
5) F.Vonderviszt,S.I.Aizawa and K.Nanba
Role of the Disordered Terminal Regions of Flagellin in Filament Foramation and Stability.
J.Mol.Biol.Vol.221,p.1461-1474(1991)
6) Mobility of the Terminal Regions of Flagellin in Solution:
R.Ishima,K.Akasaka,S.-I.Aizawa & F.Vonderviszt,(1991)
J.Biol.Chem.,266,23682-23688.
7) Terminal disorder, a common structural feature of hook protein and flagellin:F.Vonderviszt,
R.Ishima,K.Akasaka & S.-I.Aizawa(1992)J.Mol.Biol.,226,575-579.
8) Conformational adaptability of the terminal regions of flagellin
Biophysical J.(1992)in press
Ferenc Vonderviszt,Masashi Sonoyama,Mitsuo Tasummi,and Keiichi Namba
9) 宝谷紘一，生体の超分子構造と機能，高分子 VoL.38 6 月号 p.412-415(1989)
10) 難波啓一、山下一郎、F.Vonderviszt,
細菌べん毛の分子構造とべん毛形成に伴うフランジェリンの構造変化,
生物物理,VoL30,No.4,p.29-31(1990)
他

〔研究者名〕フォンダヴィスト・フェレンツ、沖野　廣、相沢慎一、難波啓一

3.　細菌のべん毛成長の制御因子

細菌べん毛繊維の構成因子（制御因子でもある）とべん毛繊維の形成過程を生菌および人工的再構成の両面において確立

研究成果の概要

べん毛繊維の全構造を試験管内で再構成し、フック付随タンパク質、フッター繊維部、繊維部等の形成機構を解明した。(図 1)

キャップタンパク質（HAP2）を欠損してべん毛繊維を持たずに泳げなくなった突然変異株に、精製 HAP2 を加えることにより、べん毛繊維の成長を観察した。(図 2、3)

キャップタンパク質（HAP2）の構造遺伝子（filD）を大量発現ベクターにクローンし、大腸菌により大量合成を行った。更に生産された HAP2 を精製し試験管内で自己集合し、べん毛先端のキャップ構造が再構築されることを発見した。

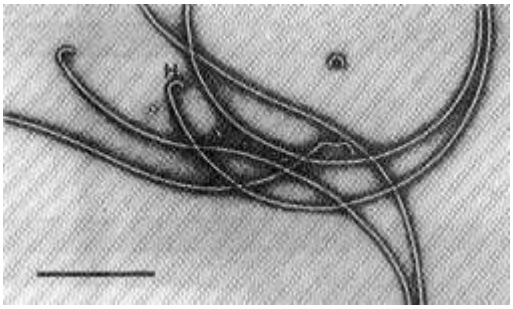


図 1　精製されたポリフック、フック付随タンパク質およびフラジェリンより作られた細菌べん毛の電子顕微鏡写真

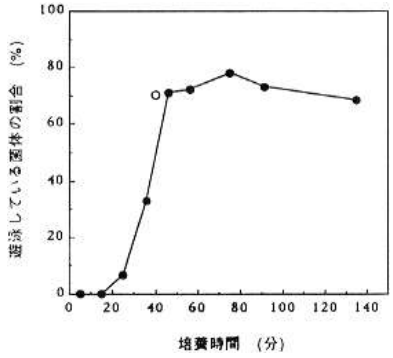


図 2　精製 HAP2 を添加後に泳ぎだす HAP2 欠損菌の割合の時間変化

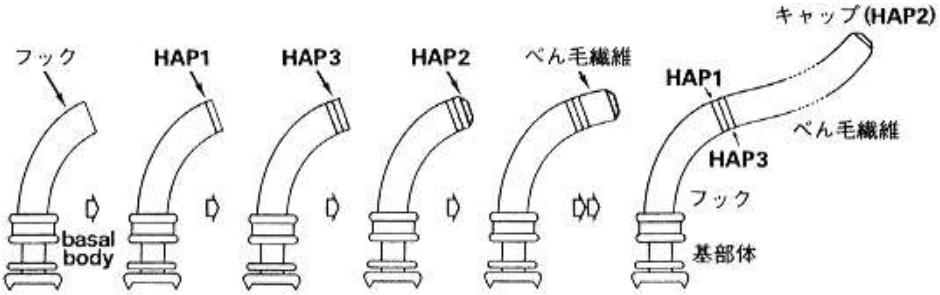


図 3　細菌のべん毛成長の模式図

成果展開可能なシーズ、用途等

1）超分子を応用する際のモデルとしての利用

2）物性の大きく異なる部分より成る分子機械の構築

特許出願

なし

報告書他

1) T.Ikeda,M.Ho mm a,T.Iino,S.Asakura and R.Kamiya
Localization and Stoichiometry of Hook-Associated Proteins within Salmonella typhimurium Flagella.
J.Bacteriol.,169,p.1168(1987)

2) T.Ikeda,S.Asakura and R.Kamiya
Total Reconstitution of Salmonella Flagellar Filaments from Hook and Purified Flagellin and Hook-Associated Proteins in Vitro.
J.Mo1.Biol.,Vo1.209,p.109-114(1989)

3) Scanning tunneling microscopy of bacterial flagella:N.Nakagiri,H.Fujisaki & S.-I.Aizawa(1991)
J.Vac.Sci.Technol,B9,1202-1205.

4) 宝谷紘一
インテリジェント材料としての生体高分子集合体（生体超分子）
インテリジェント材料,Vol.1,No.2,p.23-26(1991)

5) 池田健，べん毛構築の制御機構，細胞,Vol,24,No.13,p.10-15(1992)

6) 宝谷紘一、大沢文夫、難波啓一、中山治人
生命の精密機械,（読売読書）読売新聞社（1987）

7) H.Hotani,H.Miyamoto and T.Ikeda
Dynamic Biomolecular Assemblies as Intelligent Materials.
Proc.Intnatl.Workshop on Intelligent Materials,p.197-202(1989)

8) H.Hotani and T.Ikeda
Dymamic Biomolecular Assemblies as Molecular Devices.
Proc.of The 11th Intnatl.Congress ofIEEE,p.1348(1989)

9) H.Hotani
Dynamic Strcture of Biomolecular Assemblies.
Proc.of Joint Forum/ERATO Symposium“Nanotechnology”.p.57-60(1990〕

10) Hotani,H.,Aizawa,S.,Ikeda,T.and Namba,K.
Flagellar Formation beyond Self-assembly.
Proc.Bionic Design International Workshop.,pp.76-77(1992).
他

〔研究者名〕池田　健、大澤研二、山口　滋

4.　べん毛モーターの回転計測

べん毛 1 本ずつの回転の計測技術。べん毛回転の特色がミリ秒の時間分解能で見えるようになり、機能の一端が明らかになりはじめた

研究成果の概要

暗視野頸微鏡でべん毛を一方向のみから照射して、像を不連続にした。(図 1)これと測光技術を組み合わせて、べん毛回転に対応する信号を得ることが可能になった。

レーザー暗視野顕微鏡の開発により、信号強度の増大と S/N 比の向上を図り、べん毛の像の観察やべん毛の回転の直接観察を実現した。(図 2、3)

高速で回転しているべん毛の極めて短時間（1 ミリ秒以内）での逆転や一時停止を確認し、べん毛モーターの回転特性を解析した。

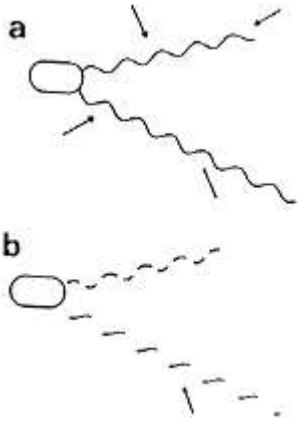


図 1 べん毛の暗視野像の概念図
(a)通常照明による像
(b)一方向照明による像

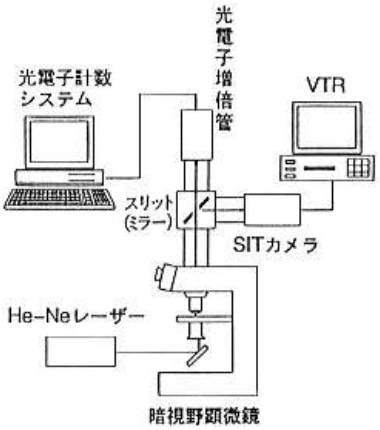


図 2 レーザー暗視野顕微鏡の概略図

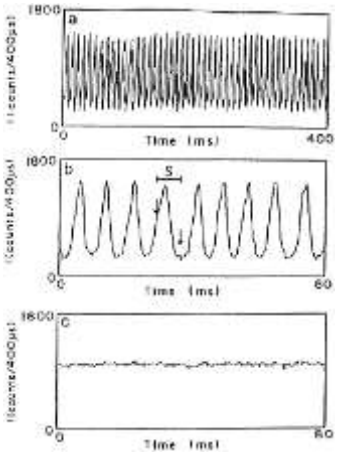


図 3 野生型モーターを持つサルモネラ菌（SJW3076:che deletion)での回転計測
(a)と(b)では時間スケールを変えて表示してある。
(c)は測定系のノイズレベル。

成果展開可能なシーズ、用途等

1）生物が持つ運動の分子機械の機能的側面からの研究

2）生物がもつ運動のメカニズムの解明

特許出願

1）微小回転体の回転計測装置

特　　願：昭 63-175894 (昭 63.7.14) 特開平 2-25706 (平 2.1.29)

出　願　人：新技術事業団、曲山幸生

請求の概要：光ファイバーからなる光検知部と位相差顕微鏡により、テザードセル状態のバクテリア等の微小回転体の位置計測を行う回転計測装置。

2）微小回転体の回転計測装置

特　　願：平 1-8231（平 1.1.17）特開平 2-187613（平 2.7.23）

出　願　人：新技術事業団、曲山幸生

請求の概要：顕微鏡によるテザードセル状態のバクテリア等の微小回転体の拡大像を光検出器により検出し、回転運動を空間分解能および時間分解能よく測定し記録する微小回転体の回転計測装置。

3）暗視野顕微鏡の照明方法とその装置

特　　願：平 1-54220（平 1.3.6）特開平 2-232614（平 2.9.14）

出　願　人：新技術事業団、工藤成史

請求の概要：照明光線としてレーザー光を使用し、簡便に暗視野照明を行えるようにした暗視野顕微鏡の照明方法および暗視野顕微鏡装置。

4）顕微鏡視野の部分的遮光・減光方法とその顕微鏡

特　　願：平 1-227807（平 1.9.2）特開平 3-91711（平 3.4.17）

出　願　人：新技術事業団、工藤成史

請求の概要：顕微鏡視野を部分的に遮光または減光し不必要に明るい部分を除去することにより鮮明な顕微鏡像が得られる顕微鏡および顕微鏡視野の部分的遮光・減光方法。

5）レーザー暗視野斜光顕微鏡装置と運動計測方法

特　　願：平 2-56281（平 2.3.7）特開平 3-257349（平 3.11.15）

出　願　人：新技術事業団、工藤成史、曲山幸生、相沢慎一、難波啓一、中山治人

請求の概要：バクテリアのべん毛等の微細高速運動を高精度・高時間分解能で観測できるレーザー暗視野斜光顕微鏡装置およびこの斜光レーザー光を照射しての微細高速運動体の回転計測方法。

報告書他

1) S.Kudo,Y.Magariyama and S.-I.Aizawa
Abrupt Changes in Flagellar Rotation Observed by Laser Dark-Field Microscopy.
Nature Vol.346,p.677-680(1990)

2) M.Washizu,Y.Kurahashi,H.Iochi,S.Aizawa,S.Kudo,Y.Magariyama and H.Hotani
Dielectrophoretie Measurement of Bacterial Motor Characteristics.
IEEE Trans.Indust.Appl.in press.

3）柑澤慎一、細井 茂，バクテリアの生命を計る，
電気化学協会誌「電気化学および工業物理化学」Vol.57,No.2,p.108-113(1989)

4）工藤成史、宝谷紘一，レーザー斜光暗視野顕微鏡，
細胞 6 月号臨時増刊号、Vol.22,No,7,p.267-270(1990)

5）相沢慎一，べん毛モータは揺らいでいるか?，

日本機械学会「Robotics & Mechatronics」No.4,p.5-6(1989)
6) C.Jones and S.I.Aizawa
The Bacterial Flagella and Flagellar Motor:Structure,Assembly and Function.
Advances in Microbiol Physiology,Vol.32,p.109-172(1991)
7) 相沢慎一, 分子機械とべん毛モーター,
日本機械学会誌 7 月号,VoL.94,No.872,p.566-570(1991)
8) 「分子機械べん毛モーターの回転原則」相沢慎一(1990)
応用物理学会、有機分子・バイオエレクトロニクス分科会誌,Vol.1,No.1.pp15-22.
9) 「イオンモータ」柑沢慎一、曲山幸生(1990)
日本生物物理学会編 生命科学の基礎 6「生体膜の分子素子・分子機械」,pp143-154,学会出版センター
10) Kami-ike,N.,Kubo,S.,Magariyama,Y.,Aizawa,S.snd Hotani,H.,
A Rotary Biomotor.Structure,Characteristics and Regulation.
Proc.Internal.Confer.IEEE Enginer.Med.Biol.Soc.,13,1788-1789(1991).
11) Hotani,H.,Kami-ike,N.,Kubo,S.,Magariyama,Y.,Ueno,T.and Aizawa,S.,
Structure and Characteristics of an Ultra-small Biomotor.
Proc.1st International Conference on Intelligent Materials.,pp86(1992).
他

〔研究者名〕工藤成史、曲山幸生、相沢慎一

5.　ガラス表面とテザードセルの回転方向

べん毛１本をガラスに固定して菌体の回転を観察する「テザードセル法」において、ガラス表面の安定化により表面電位とテザードセルの回転方向の相関を解明

研究成果の概要

1）シランカップリング剤処理により安定化したガラス表面の電位を流動電位法、電気浸透法を用いて測定し、表面電位とテザードセルの回転方向との関係を求めた(図 1)。

2）溶液の塩濃度がテザードセルの異常回転現象に及ぼす影響を調べた。(図 2)

3）べん毛やフックの違いがテザードセルの異常回転現象に及ぼす影響を調べた。(図 3)

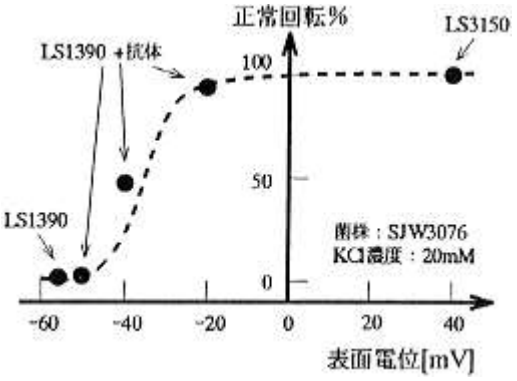


図 1　ガラスの表面電位とテザードセルの回転方向の関係

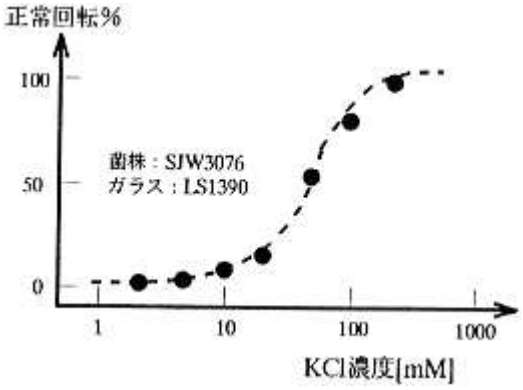


図 2　溶液の塩濃度とテザードセルの回転方向の関係

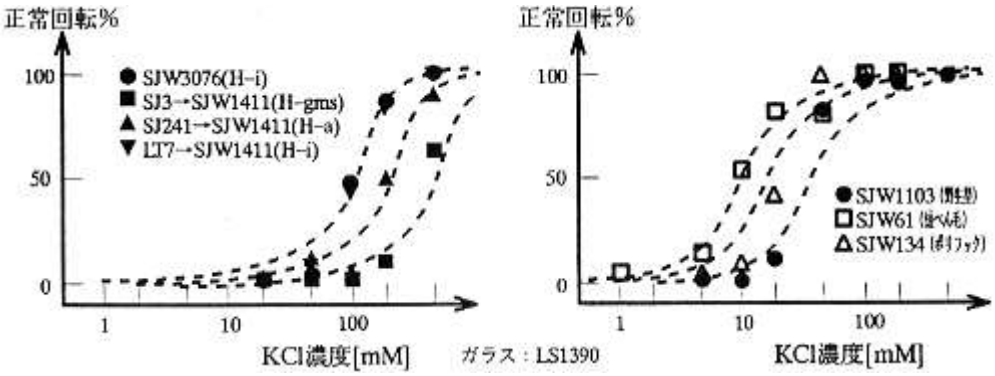


図 3　溶液の塩濃度とテザードセルの回転方向の関係
（べん毛、フックの異なる細菌株の間の比較）

成果展開可能なシーズ、用途等

1）べん毛モーターの動作メカニズムの解明

2）電気的要因によるべん毛モーターの回転方向スイッチング

特許出願

なし

報告書他

1) M.Washizu,M.Shikida,S.Aizawa and H.Hotani
Orientation and Transformation of Flagella in Electrostatic Field.
IEEE Trans.Indust.AppL28.#5,inpress(1992).

2) 相沢慎一，極微の生物モーター，先端科学、技術開発年鑑 p.74-77(1989)

3) 曲山幸生、工藤成史、大澤研二、相沢慎一，ガラスの表面電位とテザードセルの回転方向，日本生物物理学会 28 回年会予稿集,p.293(1990)

4) 曲山幸生、工藤成史、大澤研二、相沢慎一、山口滋，ガラスの表面電位とテザードセルの回転方向 II，日本生物物理学会第 29 回年会予稿集,p.116(1991)

他

〔研究者名〕曲山幸生、大澤研二、工藤成史、相沢慎一

6.　スイッチ突然変異株の解析

べん毛モーターの回転方向を制御するスイッチコンプレックスの突然変異株を遺伝学的な手法を用いて解析した

研究成果の概要

1）欠陥を持つスイッチ遺伝子を 500 種類集め、それぞれに対してバックグランドの異なる 3 種の突然変異株を作製した。(図 1)

2）500 種の突然変異株の運動パターンを解析し、進行方向の転換頻度に応じて 5 種類に分類した。(図 2)

3）スイッチコンプレックスの突然変異は、べん毛モーターの回転方向の切替え頻度を変えることや、またある変異では che 遺伝子を欠いているバックグランドでも回転方向を切り替える能力があることが判明した。

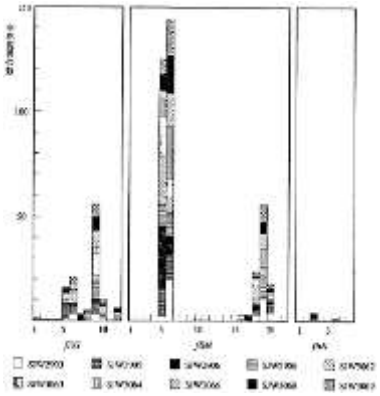


図 1　スイッチ変異株の復帰突然変異部位別ヒストグラム

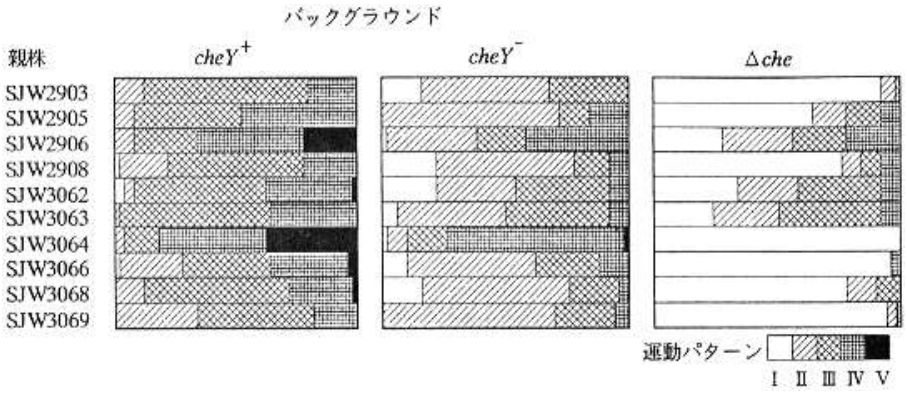


図 2　スイッチ突然変異株の運動パターンのヒストグラム

成果展開可能なシーズ、用途等

1）べん毛モーターの情報変換機能の解明

2）入力が一定でも出力がゆらいでいる新しい概念での機械の作製

特許出願

なし

報告書他

1) Y.Magariyama,S.Yamaguchi and S.-I.Aizawa, Genetic and Behavioral Analysis of Flagellar Switch Mutants of Salmonella typhimurium. J.Bacteriol.Vol.172,No.8,p.4359-4369(1990)

2) S.I.Aizawa, Bacterial Flagellar Motor, Proc,of 3rd China Japan Bilateral Symposium on Biophysics.p.203(1991)

〔研究者名〕曲山幸生、相沢慎一、山口　滋

7.　外部電圧によるべん毛モーターの回転制御

マイクロピペット先端に単一のバクテリアを固定して自由に外部環境を変えることができるシステムを開発

研究成果の概要

1）マイクロピペット先端に遊泳しているバクテリアを吸いつけ、レーザー暗視野瀬微鏡でべん毛の回転を高時間分解能で計測した。(図 1)

2）バクテリアを捕捉しているマイクロピペットに負パルスを印加すると回転数が減少する。またパルス終了とともに回転数はもとの値に戻る。このことより、電圧パルスによるべん毛モーターの回転制御が実現された。

3）パルス電圧に対してのべん毛モーターの回転数特性を解析した。その結果、正の電圧を印加するとモーターが減速し、過分極パルスの場合は加速していることが観察された。(図 2)

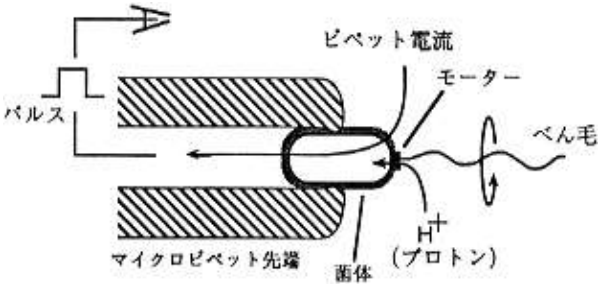


図 1　マイクロピペット先端と捕捉されたバクテリアの模式図

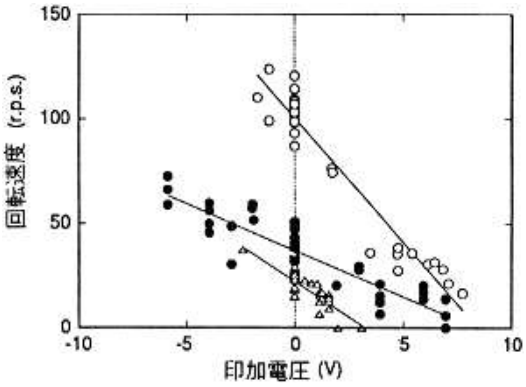


図 2　印加電圧一べん毛回転数特性図

成果展開可能なシーズ、用途等

1）単一運動超分子の機能の膜電位依存の動力学としての解析

2）新しい種類の生体高分子相互作用の可能性

特許出願

なし

報告書他

1) N.Kamiike,S.Kudo and H.Hotani
Rapid Changes in Flagellar Rotation induced by External Electric Pulses
Biophys.J.,Vol.60,p.1350-1355(1991)

2）宝谷紘一、上池伸徳
極微細バイオモータの構造と特性
応用機械工学 6 月号,p.132-135(1991)
3）宝谷紘一、上池伸徳
自在に変形する細菌べん毛と極微小バイオモーター
日本の科学と技術、(1991)32.#262.66-71.
4）上池伸徳、宝谷紘一
バクテリアべん毛運動の可視化ーべん毛モーターの電位依存性回転ー
可視化情報、(1992)12.20-25.
5）宝谷紘一、上池伸徳
極微細バイオモーターの構造と特性
Micro Machine,(1992)5.65-68.
6）宝谷紘一、相沢慎一、上池神徳
ナノマシンアクチュエーターとしてのべん毛モーター
最新医学、(1992)47.801-806.
7）宝谷紘一、江刺正善
マイクロマイン
読売科学選書（読売新聞社）、(1991)46.1-227.
8) H.Hotani
Dynamic Structure of Biomolecular Assemblies
Proc.Joint Forum/ERATO Symposium "Nanotechnology".p.57-60(1990)
9) H.Hotani,N.Kamiike,S.Kudo,Y.Magariyama and S.I.Aizawa
Characteristics of an Ultra-small Biomotor.
Proc of IEEE Micro Electro Mechanical Systems Work Shop.p.245-246(1991)
他

〔研究者名〕上池伸徳

8.　細菌べん毛モーターLP リングの単離精製と二次元結晶化

サルモネラ菌から、べん毛モーターの軸受けである LP リングを高純度で単離し、その二次元結晶を調製

研究成果の概要

1) LP リングの高純度単離精製法を開発し、培養液 1L あたり 1myu g 程度の収率で LP リングを精製した。
2) LP リングの二次元結晶化法を開発し、結晶性が高くしかも 10myu m 近い大きさをもった二次元結晶を得た。(図 1)
3) LP リングの二次元結晶試料を電子顕微鏡観察し、電子顕微鏡写真を数値化し電子計算機により回折パターンを計算することにより、結晶性の非常に高いことが確認された。

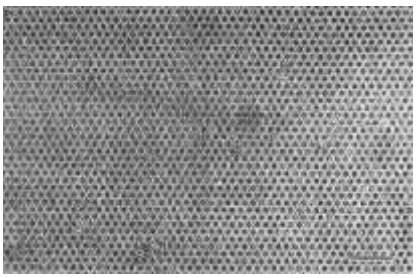


図 1　LP リングニ次元結晶の電子顕微鏡像(スケール:0.1myu m)

成果展開可能なシーズ、用途等

1) べん毛モーターの軸受けである LP リング微細構造の解析
2) ナノメートルサイズの分子素子の二次元的集積技術

特許出願

なし

報告書他

1) T.Akiba,H.Yoshimura and K.Namba Monolayer Crystallization of Flagellar L-P Rings by Sequential Addition and Depletion of Lipid. Science Vol.252,p.1544-1546(1991)
2) 相沢慎一, べん毛モーターの軸受, 潤滑,Vol.33,No.7,p.531-532(1988)
3) 相沢慎一、秋葉俊彦, 分子機械とべん毛モーター, 機械学会誌,Vol.94,p.1202-1205(1991)
4) 相沢慎一, 分子機械とべん毛モーター, 機械学会誌,Vol.94,p.1202-1205(1991)
5) Genetic control of the bacterial flagellar regulon:C.J.Jones & S.-I.Aizawa(1991)Current Opinion in Genetics and Devdopment,1,319-323.
6) 「分子機械べん毛モーター一材料開発と展望一」相沢慎一、秋葉俊彦(1990)『マイクロマシンと材料』,183-192,シーエムーシー

他

〔研究者名〕秋葉俊彦、難波啓一

9.　べん毛モーターの構築順序の決定

べん毛モーター変異株の産物と構造体を構成するタンパク質成分との関係から、べん毛モーターの構築経路を詳しく決定した

研究成果の概要

1)各種のべん毛遺伝子変異株よりべん毛形成の中間体を単離・精製し、電子顕微鏡でその構造を調べ、構造体に含まれるタンパク質成分を二次元電気泳動法により同定した。

2）べん毛構築経路についての新たなモデルを提唱した。(主な概要は以下の通り)（図 1）

1. 回転子である MS リングが、それより細胞内に位置するスイッチ複合体やタンパク質輸送器官の形成に先行して一番始めに形成される。
2. MS リング形成後、ロッドを構成する 4 種のタンパク質と FliE と呼ばれる位置が未同定であったタンパク質と協同的に集合して安定な構造体を形成する。
3. ロッドに続くフックの初期形成とロッドの周りの軸受けリングの形成は独立に起こり、構築の流れは一時的に分枝する。軸受けリングの完成により、構築経路は再び合流し、フックは伸張する。
4. フックと軸受けリングの両方の形成に必須であると考えられていた flgD という遺伝子は軸受けリングの形成には必要ない。

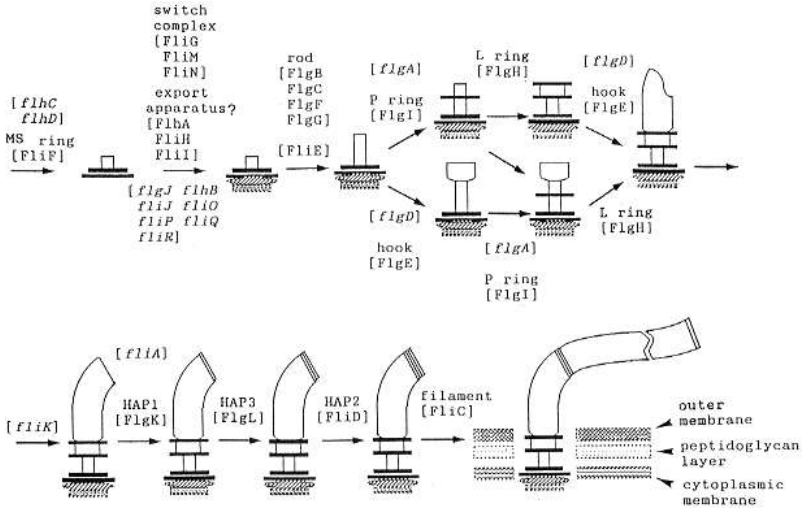


図 1　細菌におけるべん毛構築経路

成果展開可能なシーズ、用途等

1）生体内器官の形態形成の分子レベルでの追跡

2）器官の分子構築過程の解明

特許出願

1）タンパク質分子重マーカー

特　　願：特　願:昭 63-175893 (昭 63.7.14) 特開平 2-25745 (平 2.1.29)
出　願　人：新技術事業団、沖野 廣
請求の概要：タンパク質試料を化学的または酵素的に切断して得られる断片化反応生成物からなる、調整の容易なタンパク質分子量マーカー、およびその調整法。

2) 植菌用具と植菌方法
特　　願：昭 63-175892 (昭 63.7.14) 特開平 2-27975 (平 2.1.30)
出　願　人：新技術事業団、沖野 廣
請求の概要：繊維を支持体先端部に装着し、培地表面を損傷することなく、コロニー数の多い植菌を可能とする新しい植菌用具および植菌方法。

3) タンパク質の回収方法
特　　願：昭 63-232068 (昭 63.9.16) 特開平 2-83397 (平 2.3.23)
出　願　人：新技術事業団、沖野 廣
請求の概要：電気泳動ゲルのタンパク質バンドをアルコール系溶媒により洗浄し、次いでタンパク質回収操作を行う、タンパク質の高純度・高効率回収方法。

4) べん毛の採取方法
特　　願：昭 63-256402 (昭 63.10.12) 特開平 2-104280 (平 2.4.17)
出　願　人：新技術事業団、沖野 廣
請求の概要：ポリエチレングリコール等タンパク質と複合体を形成する添加剤を含む液体陪地中でサルモネラ菌や大腸菌などの細菌を培養し、菌体に過剰な物理的力を加えることなく、高純度のべん毛を高効率で採取する技術。

報告書他

1) C.J.Jones,M.Homma and R.M.Macnab, L-,P-,and M-Ring Proteins of the FiageHar Basal Body of Salmonella typhimurium:Gene Sequences and Deduced Pretein Sequence., J.Bacteriol.Vol.171,p.3890-3900(1989)
2) C.J.Jonos,R.M.Machab,H.Okino and S,-I.Aizawa, Stoichiometric AnaIysls of Flagellar Hook-Basal Body Complex of Salmonella typhimurium., J.Mol.Biol.,Vol.212,p.377-387(1989)
3) Morphological Pathway of Flagellar Assembly in Salmonella typhimurium:T.kubori, N.Shimamoto,S.Yamaguchi,K.Namba & S.-I.Aizawa(1992)J.Mol.Biol.,226,433-446.
4) 「べん毛モータの菌体内構造形成」久堀智子、相沢慎一(1992)月刊「細胞」,Vo1.24,No.13, pp16-21.ニュー・サイエンス社
5) H.Hotani,T.Ikeda,S.Kudo,I.Yamashita and K.Namba
Dynamic Structure of Bacterial Motility System-A Biomotor and Flagella-
Proc.US-Japan Workshop on Smart/Intelligent Materials & Systems.p21(1990)

〔研究者名〕 久堀智子、沖野　廣、ジョーンズ・クリス、相沢慎一、難波啓一

10. べん毛構成タンパク質大量産生用プラスミドの作成

量的な問題から精製が困難であったべん毛の構成タンパク質の大量産生系を確立

研究成果の概要

1)T7RNA ポリメラーゼを用いた系で M リングを構成する FliF タンパク質の大量産生系を確立した。(図 1) また、大量産生された Fli F は細胞内膜内でリング構造を形成し、更に複雑な構造をも形成することを確認した。

2) T7RNA ポリメラーゼを用いた系でスイッチタンパク質(FliG,FliM,FliN)の大量産生系を確立した。(図 2)

3) べん毛の伸張に関与する HAP2 タンパク質を大量産生系を用いて濃縮することで五角形の構造を形成させた。(図 3)

4) FliF リングとフックを連結するロッドタンパク質の大量産生系を確立した。(図 4)

5) 大量産生系を用いることで精製の困難であった各種べん毛タンパク質についても精製が可能になった。

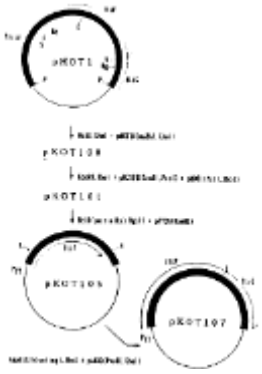


図 1　FliF 大量産生用プラスミドの作成

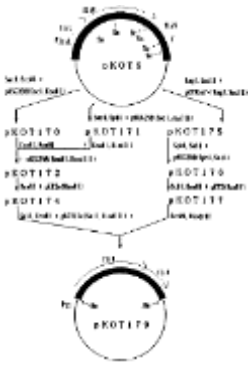


図 2　FliM,N 大量産生用プラスミドの作成

図 3　HAP2 大量産生用プラスミドの作成

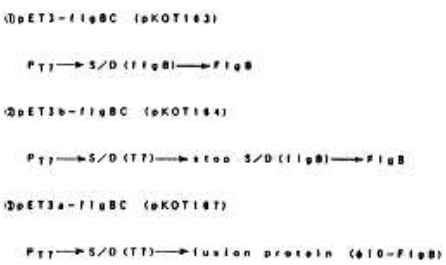


図 4　ロッドタンパク(FlgB,FlgC)大量産生系

成果展開可能なシーズ、用途等

1) 超分子の構造形成の仕組みの解明

特許出願

なし

報告書他

1) H.Okino,M.Isomura,S.Yamaguchi,Y.Magariyama,S.Kudo and S.-I.Aizawa, Release of Flagellar Filament-Hook-Rod-CompIex by a Salmonella typhimurium Mutant Defective in the M-ring of the Basal Body., J.Bacteriol Vol.171,No.4,p.2075-2082(1989)

2) Characterization of the fliE Genes of Escherichia coli and Salmonella typhimurium and Identification of the FliE Protein as a Component of the FIagellar Hook-Basal Body Complcx: V.Muller,C.J.Jones,I.Kawagishi,S.-I.Aizawa & R.M.Macnab(1992) J.Bacteriol.,174,2298-2304.
3) 大澤研二・上野貴将，べん毛モーター回転子の再構成，細胞,Vol.24,No.13,p.22-29(1992)
他

〔研究者名〕大澤研二、上野貴将、相沢慎一

11. べん毛モーターの再構成　― FliF リングとそのドメイン構造 ―

べん毛モーター回転子構成タンパク(FliF タンパク質)の大量生産と再構成を行い性質を調べた

研究成果の概要

1) 細胞内膜に局在する FliF タンパク質を界面活性剤を用いて膜を可溶化させて取り除くことで高純度に精製した。

2) FliF タンパク質は細胞内膜中でモーター回転子(FliF リング)と直径が等しいリング構造を形成していることを電子顕微鏡により確認し、さらにリング構造を保ったままモーター回転子を取り出した。(図 1)

3) 電子顕微鏡を用いて FliF リングの微細構造の観察を行い、FliF リングは M リングだけでなく S リングやロッドも形成していることを解明した。(図 2)

4) タンパク質分解酵素を用いて FliF リングのドメイン構造を調べ、FliF タンパク質の両末端が M リングを構成していることが解明された。(図 3)

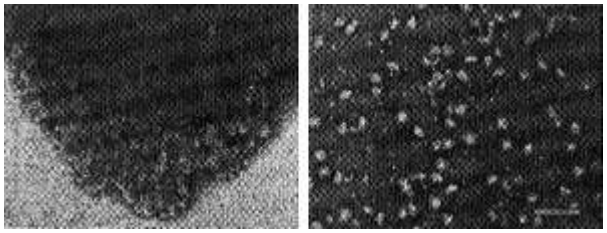
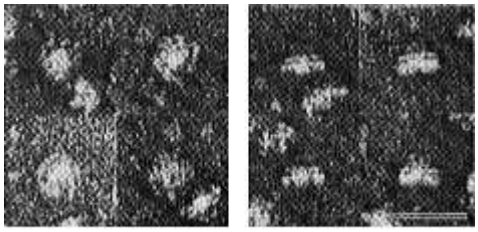


図 1　FliF リングの電子顕微鏡写真（ネガティブ染色法）
リング構造が密に詰まった膜片と単離したリング構造



正面図　　側面図

図 2　FliF リングの微細構造

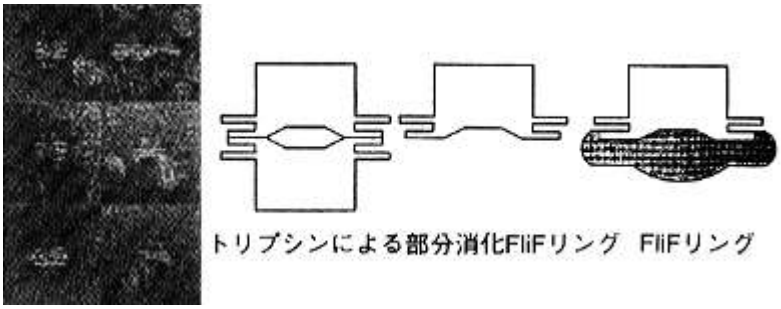


図 3　トリプシン消化 FliF リングと FliF リング構造の比較

成果展開可能なシーズ、用途等

1) 超分子の構造形成のしくみの解明

2) べん毛モーターの機能の解明

特許出願

なし

報告書他

1) The M ring,S sing and proximal rod of the flagellar basal body of Salmonella typhimurium are composed of subunits of a single protein,FliE.:T.Ueno,K.Oosawa & S.-I.Aizawa(1992) J.Mo1.Biol.,227,672-677.

2) 宝谷紘一，生体超分子―超化学の立場から―，化学 3 月号,VOL46,p.19-21(1991)

他

〔研究者名〕上野貴将、大沢研二、相沢慎一

12. リポソームと自己組織性タンパク質を利用したモデル人工細胞の構築

リポソーム中に微小管タンパク質を入れて形態変化を起こさせ、モデル人工細胞を構築した

研究成果の概要

1）細胞骨格の主要成分である微小管をリポソーム内で重合させることにより二極性リポソームを作製し、その突起の成長過程を観察した。(図 1)

2）微小管を含むリポソームの温度を 30～32DEG C にすると、微小管の伸張短縮に対応しリポソームの突起も伸張短縮を繰り返しながら成長することを発見した。

3）リポソームに含まれる微小管の量を多くすると多極性の多様な形態をしたリポソームが形成されることを観察した。(図 2)

4）リポソームの形態変化が内部の微小管の重合によって引き起こされていることを解明した。

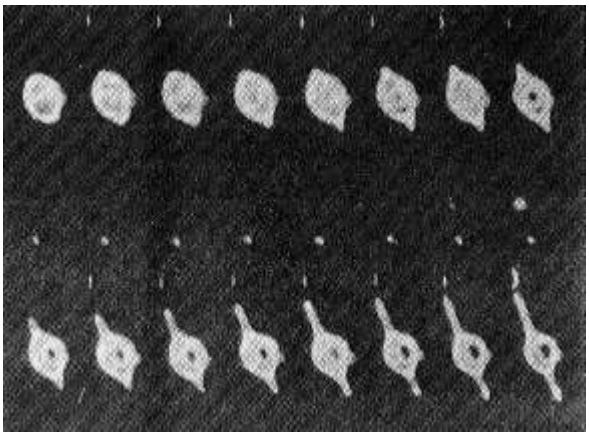


図 1 微小管の重合により突起を成長させるリポソーム

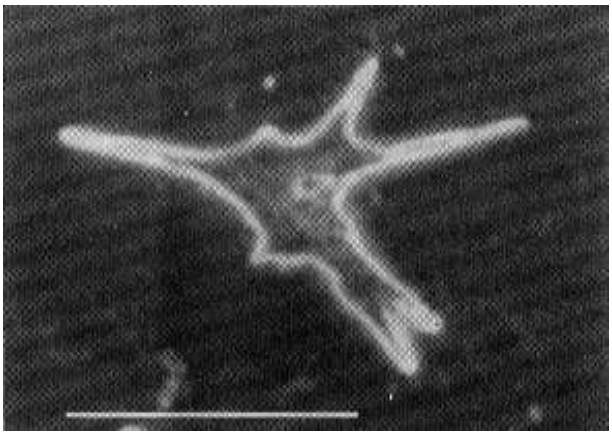


図 2　リポソーム中の微小管重合によって形成されたモデル細胞（スケール：10myu m）

成果展開可能なシーズ、用途等

1）細胞骨格を構成する種々のタンパク質の機能解析のモデル系

2）細胞骨格に関連したタンパク質と膜との間の相互作用の解析

3）人工細胞の形態制御

特許出願

なし

報告書他

1) H.Miyamoto and H.Hotani, Dynamic Behavior of Bilayer Membrane Which Consists of Phospholipids and Microtubule Proteins., Cell Str.Func.,Vol.13,p.580(1988)

2) H.Hotani, Dynamic Structures of Liposomes Visualized by Video Microscopy., J.Dispersion Science and Technology Vol.10,p.441-454(1989)

3) H.Hotani and H.Miyamoto, Morphotogenesis of Liposomes Visualized by Video Microscopy., Forma Vol.5,p.103-112(1991)
4) R.Vale and H.Hotani, Formation of Membrane Networks in vitro by Kinesin-driven Microtubule Movement., J.Cell Biol.107,2233-2241(1988).
5) 宝谷紘一, 人工細胞へのアプローチ, パリティ, Vol.4,No.1,p.82-84(1989).
6) H.Miyamoto and H.Hotani, Polymerization of Microtubules within Liposomes Produces Morphological Change of Their Shapes, In "Dynamics of Microtubules" ed. by H.Hotani,Taniguchi Foundation Pub.pp.220-242,(1988).
7) H.Hotani and H.Miyamoto, Dynamic Features of Microtubulcs as Visualized by Dark-field Microscopy., Advc.Biophys.26,135-156(1990).
8) H.Miyamoto and H.Hotani, Polymerization of Microtubules with in Liposomes Produces Morphological Change of Their Shapes., 2nd Japan-China Bilateral Symp. on Biophys. Abstract,p.319(1988)
9) H.Hotani and H.Miyamoto, Morphogenesis of Liposome induced by Polymerization of Microtubule in Vitro., Proc.10th Intnatl. Biophys,Congress,p.443(1990)
10) H.Hotani, Morphtogenesis of Liposomes., Proc. of Work Shop on Biointerface.p.141-144(1990)
11) H.Hotani and H.Miyamoto, Morphotogenesis of a Membrane Vesicle by Polymerization of Microtubule Subunit Proteins., Proc of Coherent and Emergent Phenomena in Biomolecular Systems.p.36(1990)
12) H.Hotani,H.Miyamoto,T.J.Itoh and H.Miyata, Morphotogenesis of A Membrane Vesicle by PoIymerization of Cytoskeleton Proteins., Proc. of 3rd China Japan Bilateral Symposium on Blophysics.p.211(1991)
13) Miyata,H.,Miyamoto,H.,Itoh,T.J. and Hotani,H., Morphogenesis of Membrane Vesicles Caused by Polymerization of Encapsulated Tubulin and Actin., Abst.5th International Congress on Cell Biology.,pp.68(1992).
14) Hotani,H.,Miyamoto,H.,Itoh,T.J. and Miyata,H., Transformation of Liposomes Caused by Polymerization of Encapsulated Tubulin and Actin., Abst.4th Int.Conf.on Biophysics and Synchrotron Radiation.,pp.158(1992).
他

〔研究者名〕宮本 宏

13. 膜小胞と細胞骨格によるモデル細胞の創製

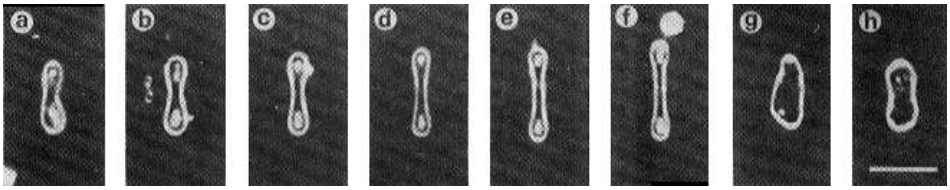
筋骨格より精製したアクチンをリポソームに閉じ込めた系を開発

研究成果の概要

1) モノマー状態のアクチンと金属イオンを含む氷温の溶液中でリポソームをつくらせ、同時にモノマー状態のアクチンを取り込ませた。更に、温度の制御により、リポソーム中のアクチンの重合をコントロールした。(図 1)

2) 取り込まれたアクチンの重合にともなうリボソームの形態変化を高輝度暗視野顕微鏡で観察した。

3) リポソーム中でのアクチンの状態を偏光顕微鏡により観察し、アクチンフィラメントがリポソームの輪郭に沿って配列していることを解明した。(図 2)



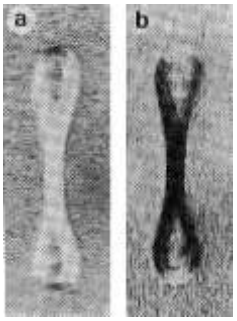


図 1（上）アクチンを取り込んだりポソームの形態変化(スケール:10myu m)
図 2（右）リボソームの偏光顕微鏡写真(アクチンとリポソームの方向のちがいにより明暗のコントラストが現れる)

成果展開可能なシーズ、用途等

1) 細胞の運動や形態形成および形態変換のモデル系

特許出願

なし

報告書他

1) H.Hotani and T.Sekimura, The Morphogenesis of Liposomes Viewed from The Aspect of Bending Energy., J.Theoretical Biology,Vol.149,p.325-337(1991)

2) T.Sekimura and H.Hotani, The Morphogenesis of Liposomes Viewed from the Aspect of Bending Energy., J.Theor.Biol.149,325-337(1990).

3) H.Miyata and H.Hotani, Morphological Changes of Liposomes Caused by Polymerizatin of Encapsulated Actin and Spontaneous Formation of Actin Bundles., Proc.Natl.Acd.Sci.USA,89,11547-11551,(1992)

4) 宝谷紘一, 赤血球型リポソーム形成のダイナミックス, 日本バイオレオロジー学会誌、(1991)5.182-187.

5) H.Hotani, Morphogenesis of Liposomes., Proc.Workshop on Biointerface.p.141-144(1990)

〔研究者名〕宮田英威

14. 微小管動態の MAP2 による制御

微小管の重合・脱重合には MAP2 分子が微小管上に結合することが必要であり、結合部位で脱重合相から重合相への変換が起こると考えられる

研究成果の概要

暗視野高輝度光学顕微鏡による超分子の直接観察により以下の知見を得た。

1) 微小管結合タンパク質 MAPS が存在しないと微小管は脱重合相から重合相への変換ができない。

2) MAPS 成分の濃度の増加に依存して、1 脱重合相あたりの脱重合長が短くなる。(図 1)

3) 脱重合相からの重合相への相変換は微小管上の同一部位で起こりやすい。

4) 微小管上に結合する MAP2 分子の間隔は 1 脱重合相あたりの距離と相関がある。(図 2)

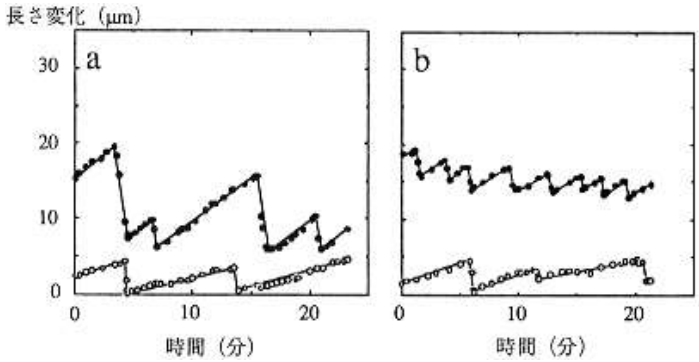


図 1　MAPS 存在下での微小管の動的不安定性
a：0.05mg/mlMAPs、b：0.27mg/mlMAPs

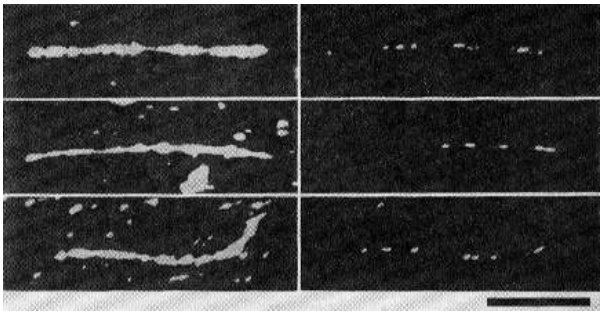


図 2　抗 MAP2 抗体染色により可視化した微小管上の MAP2 の分布(スケール:10myu m)
左：暗視野顕微鏡像、右：蛍光顕微鏡像

成果展開可能なシーズ、用途等

1) 微小管ダイナミクスの分子機構の解明

2) 多機能超分子の機能転換機構

特許出願

なし

報告書他

1) H.Hotani and T.Horio, Visualization of the Dynamic Instability of Individual Microtubules by Dark-Field Microscopy., Nature,321,p.605(1986)

2) H.Hotani and T.Horio, Dynamics of Microtubules Visualized by Dark-Field Microscopy:Treadmilling and Dynamic Instability., Cell Motil. Cytoskel.,VoL10,p.229-235(1988)

3) T.J.Ito and H.Hotani, MAPS Dependent Regulation of the Dynamic Instability of Microtubules., Cell Str.Func.,VoL.13,p.681(1988)
4) H.Hotani,E.M.Mandelkow,E-M Mandelkow,B.Hess and S.C.Muller, Spatial Patterns from Oscillating Microtubules., Science Vo1.246,p.1291-1293(1989)
5) M.Murata, T.J.Itoh, S.Kagiwada, R.Hishida, H.Hotani and S.Ohnishi., Interaction of the Golgi Membranes Isolated from Rabbit Liver with Microtubules in vitro., Biol.Cell,75,127-134(1992).
6) 宝谷紘一、伊藤知彦，微小管の形成・解体による構造形成制御，蛋白質核酸酵素,Vo1.34,No.13.p.1455-1461(1989)
7) T.J.Itoh and H.Hotani, MAPS Dependent ReguIation of the Dynamic Instability of Microtubules., In "Dynamics of Microtubules"ed.by H.Hotani,Taniguchi Foundation Pub.pp.187-203,(1988).
8) 宝谷紘一、伊藤知彦，微小管形成と GTP，実験医学(1990)8.1965-1969.
9) 伊藤知彦、宝谷紘一，有糸分裂期に働くモータータンパク質，生物物理、(1992)32.161-163.
10) 宝谷紘一、伊藤知彦，微小管の動的性質，シリーズ分子生物学の進歩 7、細胞増殖、細胞運動 p.203-221(1989)
11) T.J.Itoh and H.Hotani, MAPS Dependent Regulation of the Dynamic Instability of Microtubules., Abstracts of the 14th Taniguchi internatl.Symp.p.A-18(1988)
12) T.J.Itoh and H.Hotani, The Regulatory of MAP2 on the Dynamic Instability of Microtubules., Proc.10th 1ntnatl.Biophys.Congress p.444(1990)
13) T.J.Itoh and H.Hotani, The Regulatory Role of MAP2 The Dynamic Instability of Microtubules., Proc.of 3rd China Japan Bilateral Symposium on Biophysics.p.212(1991)
14) Hotani.H.and Itoh,T.J., Switching of Microtubule Assembly., Proc.4th Intnal.Symp.Bioelet.Mol.Elect.Devices.,pp.68-69(1992).
他

〔研究者名〕伊藤知彦

15. 微小管の脱重合開始機構

微小管脱重合開始は、重合の停止の後、GTP の加水分解反応が重合反応に追いついて起こる

研究成果の概要

1）微小管の重合・脱重合を暗視野顕微鏡で直接観察し、画像処理し解析した。(図 1)

2）微小管の重合相から脱重合相への相変換の直前には、重合も脱重合もしない重合停止期が存在し、この停止期の長さは重合速度と相関があった。(図 2)

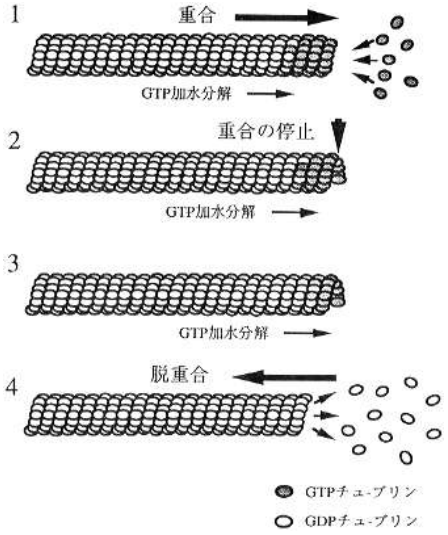


図 1　微小管の重合・脱重合機構のモデル

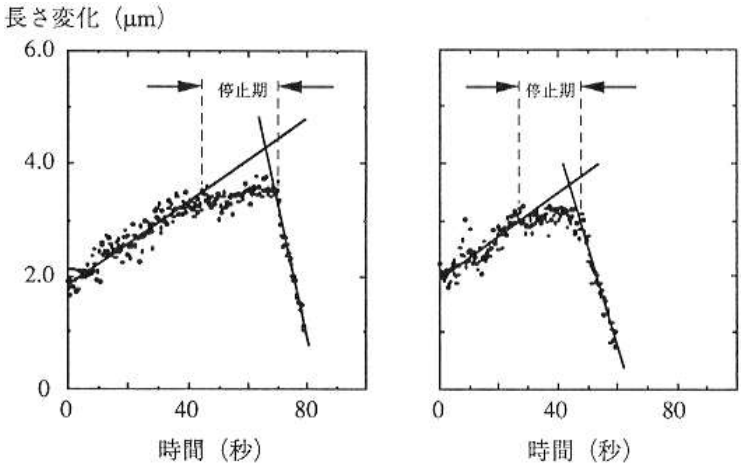


図 2　フレーム解析による微小管の長さ変化の解析

成果展開可能なシーズ、用途等

1）微小管重合素過程の解明

2）超分子のリサイクル機構

特許出願

なし

報告書他

1）　H.Hotani,R.Lahoz-Beltra,B.Combs.S,Hameroff and S,Rasmussen., Microtubule Dynamics,Liposomes and Artificial Cells:in vitro Observation and Cellular Automata, Simulation of Microtubule AssemblY/Disassembly and Membrane Morphogenesis., Nanobiology,1,61-74(1992).

2）H.Hotani,T.Ikeda, Dynamic Features of Biomolecular Assemblies Visualized by Dark-Field Microscopy., X-Ray Microscopy in Biology and Medicine p.269-276(1990)

〔研究者名〕伊藤知彦