

戦略的創造研究推進事業
ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ

研究領域「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用」
研究課題「生物ナノマシン回転運動の一般化作動機構の解明」

研究終了報告書

研究期間 平成 14年 10月～平成 20年 3月

研究代表者：相沢 慎一

(県立広島大学生命環境学部生命科学科、教授)

1 研究実施の概要

「バクテリアのべん毛モーターはプロトン駆動力をエネルギー源として回転子と固定子の間でトルクを発生する。トルク発生において使われる物理的な力は静電気力である。固定子は MotA と MotB の 2 種類の膜タンパク質からなり、回転子は FliG, FliM, FliN の 3 種類のタンパク質からなっている。膜の内外をプロトンが通過するとき、MotA と FliG が相互作用してトルクが発生する。」

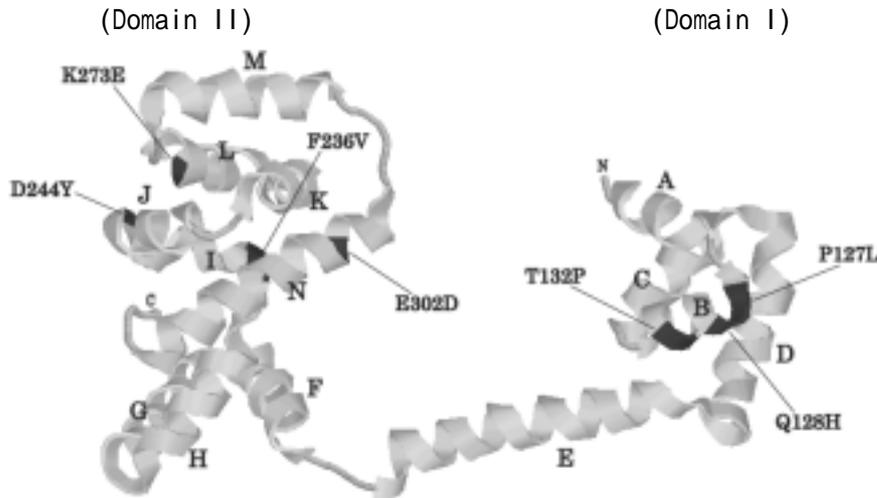
これが現在のべん毛モーターに関する理解である。しかし、その細部を検討すると、まだまだ不明な点が多く、トルク発生のメカニズムは依然見えてこない。べん毛モーターがその発見以来 30 余年たってもまだその仕組みが完全に理解できないのは、これまでの研究のどこかに見落としがあるのではないかと、もう一度研究方法自体を根本から見直してみてもどうだろうか？という疑問や不安がこのプロジェクトの動機である。そこで現在まで解明されていない主要な疑問点をいくつか挙げて、我々の行った研究成果を交えながら研究実施の要点を述べる。

(1) べん毛モーターの回転子と固定子の関係がいまだにはっきりしない。すなわち何が何に対して回転しているのか明らかでない。そこで、我々はトルク発生に関与していると思われるたんぱく質成分の挙動を観察して固定子と回転子を構成するたんぱく質の同定を行い、その相互作用の仕方を明らかにしてべん毛モーターのトルク発生の仕組みを明らかにすることを発足当初のチームの研究目的とした。モーター成分のうち固定子側の MotA/B に関しては主に本間グループが担当し、回転子側の FliG/MN に関しては主に相沢グループで解析を進めた。

大腸菌 H^+ 駆動型べん毛において、回転子 FliG と固定子 MotA 間の荷電アミノ酸残基を介した相互作用がトルク発生過程に重要であるという静電的相互作用モデルが提唱されている。そこで、本間チームでは Na^+ 駆動型モーターの固定子 PomA (MotA に対応) と回転子 FliG の対応する荷電残基に変異導入を行いそれら残基の役割を調べた。それぞれの荷電残基を単独で置換した変異体や二重あるいは三重変異を導入したが、その結果完全に機能を失うものはほとんどなかった。すなわち現在主流となっているモデルでは、トルク発生には電荷をもったアミノ酸残基が必要不可欠であるとされているが、それらを中性のものと置換してもトルクは発生したのである。これは現在の静電的相互作用モデルに疑義を投げかけるものである。

相沢チームでは、回転子の構成成分 (FliG, FliM, FliN) の変異体の行動解析を行った。これらの変異体は以前から多くのグループによって解析されてきたが、我々はその多くが温度感受性であることを見出し、これまでの実験結果を再検討する必要に迫られた。通常、多くの温度感受性株では培養温度が許容範囲内であれば、正常に機能するモーターが構築され、一度完成したモーターは温度が非許容範囲まで高くなっても正常に回転する。一方、培養温度が非許容温度であれば、モーターの構造自体が構築されない。ところが、我々はこのルールに当てはまらない変異株を FliG 変異体の中に見つけた。すなわち、許容温度範囲内で構築されたモーターが温度を上げると即座に速度を落とし、再度温度を下げるとまた元の回転速度に戻る現象を見出し、超温度感受性株と名づけた。これは発生トルクが温度によって、すなわちブラウン運動に呼応して変化することを示した初めての例である。得られた 4 つの超温度感受性部位を調べたところ、FliG のドメイン II の中ほどに (F236V, D244Y, K273E, E302D) 位置することがわかった。これらの部位は静電的相互作用モデルで提唱されているトルク発生部位とは異なる (下図 1 参照)。また必ずしも電荷が関与しているわけではないことにも注目すべきである。今後、この新たな活性部位周辺の性質を調べることにより、新たなべん毛モーター像が出てくると期待される。

(図 1) ベン毛モーター回転子 FliG 上に存在する超温度感受性部位



(2) 回転子と固定子の局在に関する疑問。

上記に述べたように、トルク発生に直接関わっているのは、MotA と FliG であると言われているが、さらに広い意味でトルク発生に関与していると思われる全タンパク質成分は FliG, FliM, FliN, MotA, MotB の 5 つである。これらタンパク質成分の相互作用を知る前段階として、それらの局在が明らかにならねばならない。現在のモデルでは固定子 Mot 複合体はペプチドグリカン層に固定され、細胞膜の内側にある回転子 C リングと膜内で相互作用していると考えられている。しかし、Mot 複合体は構造的な実態がはっきりしないし、ベン毛モーターのどこにあるのか、その局在もあいまいである。理論的にはベン毛モーターに直接接触していなければ回転は生じないはずである。本間グループは、蛍光タンパク質との融合によってできた複合体の挙動を注意深く追うことで局在を明らかにした。

ナトリウム駆動型モーターでのエネルギー変換に最も重要だと考えられている固定子タンパク質 PomA と PomB の N 末端に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合したタンパク質 (GFP-PomA, GFP-PomB) の生菌中での局在を追跡したところ、それら GFP 融合固定子タンパク質は細胞の極に顆粒状の蛍光として観察され、この蛍光顆粒が、ベン毛構造に依存的に観察されることを明らかにした。また、蛍光顆粒が PomA と PomB のお互いを必要とすること、その組込みあるいは固定に B サブユニットの C 末端領域が必須であることを明らかにした。さらに、それら固定子複合体の組込みに対する MotX および MotY が必要であることも示した。すなわち、Mot 複合体は従来考えられてきたように初めからモーター周辺に固定されているのではなく、エネルギー状態 (おそらく PMF) によって移動するというのである。我々は従来から Mot 複合体が固定子ではなく単にエネルギーの供給のみを行う素子ではないかとの疑義をもっていたが、今回の観察はそれを裏付けるものである。

一方、相沢チームでは回転子の構成タンパク質 (FliG, FliM, FliN) のそれぞれに蛍光タンパク質を融合させたキメラタンパク質を作成し、それらが機能的に障害のないことを蛍光顕微鏡で確認した。キメラタンパク質の蛍光輝点は多数の分子から来ていると思われる。FliG や FliM のキメラタンパク質では発現量が増えると運動性が低下することから、付加した蛍光タンパク質による立体障害が現れたものと考えられる。しかし、FliN キメラタンパク質に関しては量が増えても運動性に影響しないことから、これを実験に用いることにした。当初の計画では、FliG あるいは FliM と FliN のキメラタンパク質をそれぞれ別個の蛍光タンパク質で作成し、2 色の点の相互作用の様子を観察する予定であった。しかし、この手法はベン毛モーターの異常な才差運動によって不可能であることが明らかになった。し

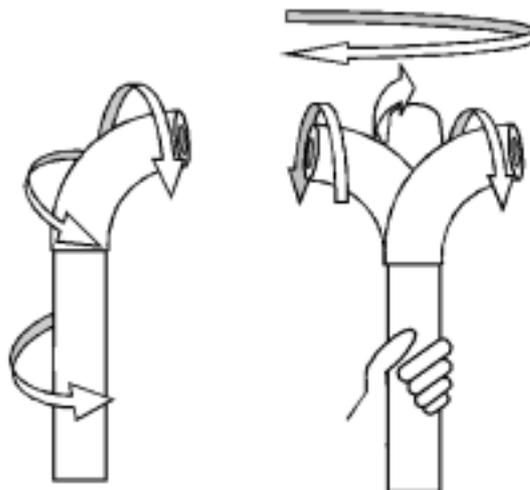
かし、才差運動の原因を探るうちに、以下のような思わぬ発見があった。

3) 回転計測に用いられるテザードセル法は正しくトルクを反映しているか？

モーターの発生する力すなわちトルクを測るのは容易ではない。歴史的にはテザードセル法を用いて菌体の回転数と外部から加える反トルクなどから見積もられてきた。テザードセル法は1本のべん毛でスライドガラス上につながれた(tethered)菌体の回転を観察する方法であるが、その実態がわからないまま様々な実験に用いられてきた。たとえば、つながれているべん毛以外にべん毛があって、そのべん毛が菌体を押して回しているのではないか？フックの柔軟性によるトルクの不均一性はあるか？などの疑問は当初からあったが、均一に回転している菌体を観察すれば問題なしとして強引に実験が進められ、その結果は極めて精度高く計測されたものとして好意的に解釈されてきた。

我々は回転子構成タンパク質 FliGMN に蛍光タンパク質を組み込んだキメラタンパク質を発現させて、べん毛モーターの視覚化に成功した。べん毛モーターの固定子と回転子の関係を明らかにするために、当初べん毛モーター1個の観察にもっとも一般的に用いられているテザードセル法を使って、蛍光タンパク質の挙動を追った。その結果、蛍光輝点が有意な大きさで才差運動していることから、テザードセルがこれまで信じられてきたように1点で安定な回転をしているのではなく、フックの長さに応じてやわらかく曲がりながら回転していることが明らかになった。すなわち、べん毛モーターは直径100ナノメートルくらいで円運動をしており、べん毛モーターの回転子の回転半径50ナノメートルよりも大きい。さらに、菌体がほとんどの場合ガラス表面に接触しながら回転していることが示唆された。これはユニバーサルジョイントとして働くフックの奇妙な性質のためであると考えられる。すなわち、フックは片方の回転を止めても反対側の筒は二重回転するのである(図2)。したがって、テザードセル法を用いたこれまでのトルクの計測自体に疑義があり、べん毛モーターの種々の物理計測にはテザードセル法はふさわしくないと考えられる。最近ではテザードセル法をやめてポリフックに直接蛍光抗体標識したビーズをつけるなどの工夫も見られるが、フックの役割が不明なままでは同じ疑問が残る。まったく新しい原理に基づく計測法の開発が必要である。

図2. フックのユニバーサルジョイントとしての回転運動



2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

べん毛モーター研究の主目的のひとつはそのエネルギー変換機構を明らかにすることである。べん毛モーターのエネルギー変換機構でカップリングがルーズかタイトかとの問題が提起されて久しい。出力については多くの計測があるが、入力であるプロトン流の計測はほとんどできていないのが実情である。そこでプロジェクト発足当初は当時東大にいた小倉助教授（現兵庫県立大学教授）と共同で呼吸量と pH 変化からプロトンの流れを直接計測することを計画した。すなわち、べん毛モーター以外も含めたプロトン全流量は呼吸系の計測により得る。そして、トランスポート系を基質を制御することで抑え野生株と非運動性株（mot 欠損株）との比較により、プロトン流を見積もり、モーターの入力を計測するというものであったが、何度かの計測の結果、現在の計測感度ではまだその差を見ることが出来ず、この実験は時期尚早であると判断した。

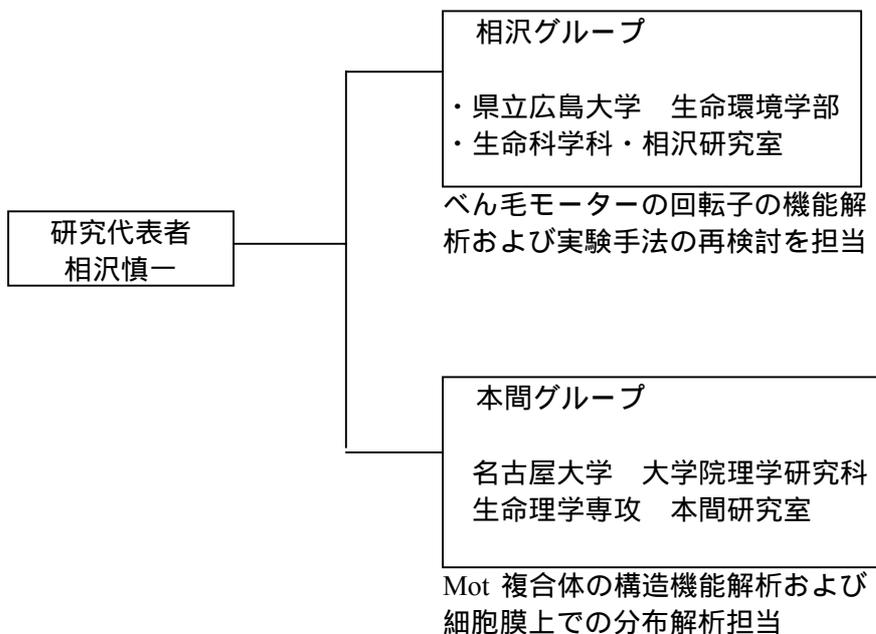
それと平行して、べん毛モーターの回転子構成タンパク質（FliGMN）をコードする遺伝子の変異体の解析を行った。FliGMN の変異体の中でべん毛は構築するが回転することのできない Mot 変異体はトルク発生に直接関与する成分として古くから解析されていたのだが、実はその大半が温度感受性であることが判明した。すなわち、実験温度のわずかなズレで実験結果が変わってしまうのである。この温度感受性株を調べるうちに、我々は fliG の 3 株で異常な温度感受性を示すことを見出した。そして、その超温度感受性部位が従来のモデルで提案されているトルク発生部位とは異なることから、新たなトルク発生部位として提案した（Mashimo 他、2007）。

べん毛フックは約 55 ナノメートルの長さを持つが、この長さの制御をめぐって世界的に大きな議論が起こっている。発端は我々が 2001 年に発表した「計量カップモデル」である。すなわち、フックの長さは輸送系の根元にあるカップでその数量が決められ、それが輸送され重合して一定の長さになるという、量によって長さが決められるというモデルである。その後 2003 年にスイスのグループから、フックに相当するニードルの長さはものさしタンパク質で決まるとする「ものさしモデル」が提案され、阪大のグループからそれをサポートするデータも出され議論が沸き立った。我々は彼らがものさしと呼ぶ FliK の内部欠損株を系統的に作製し、FliK が分泌されなくても長さに制御は出来ることをしめした（Hirano 他、2005）。しかし、我々のデータは無視され、その後もものさしモデルを支持する論調が続いたので、我々はさらに細かな FliK の部分欠損株を作製し、FliK の分子長がフックの長さに比例するが、それには必ずしも FliK の分泌は必要でないこと、さらに分泌される FliK でも長さ制御が出来ないものもあることを示した（Shibata 他、2007）。この論争はまだ終わってないが、その副産物として、我々は様々なフックの長さを持つ変異体を手に入れることになった。この変異体が以下に示す実験では不可欠の役割を果たすのである。

べん毛モーターの機能とそのメカニズムを知るためにはトルクの精密計測が必要である。従来からモーター 1 個の回転を観察する方法としてテザードセル法が用いられていた。この方法ではべん毛抗体を用いてべん毛 1 本だけを持つ菌をスライドガラス上に固定し、その菌体の回転を観測するが、菌体がどのくらいガラス表面に近いかわからない。我々は蛍光タンパク質でラベルしたモーターの動きを詳細に観察した。その結果、菌体はモーターの周りに単純に回転しているのではなく才差運動していることがわかった。その半径はフックの長さに比例することから、テザードセル法ではフックが常に回転し、そのため菌体の一部がいつもガラス表面と接触していることがわかった（Hashimoto 他、2007）。このことからこれまでに行われてきたトルク計測はガラスとの相互作用の結果も含んでいることになり、正確なトルク計測のためには新たな手法の開発が望まれる。

以上、従来から定説のように受け取られていたべん毛モーター像が実はきわめてあいまいなものであることを示した。今後はこれらの成果を踏まえて、さらに真のべん毛モーター像を追い求めるつもりである。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

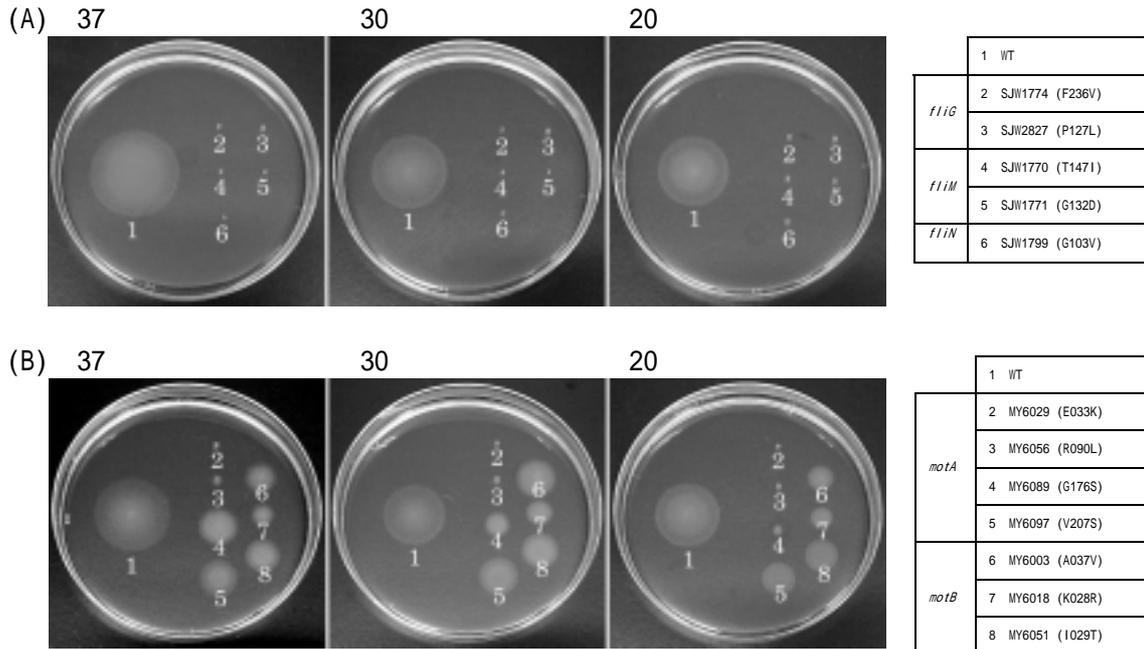
3.1 べん毛モーターの回転子の機能解析および実験手法の再検討(県立広島大学 相沢グループ)

(1)研究実施内容及び成果

べん毛モーターのトルク発生部位の新しい候補の発見

べん毛モーターの実態を知るために、べん毛構造を持ちながら回転できない Mot 変異体が多く用いられてきた。それにより MotA, MotB (MotAM 複合体) と FliG, FliM, FliN (FliGMN 複合体あるいは C リング) がトルク発生に直接関与する成分であることが明らかにされた。つい最近我々は、Mot 変異体のうち FliGMN 複合体に関するものは温度感受性 (TS) であることに気づいた。すなわち、通常の培養温度である 37 °C では動かないが、20 °C では運動性をもっているのである (図 1)。この見落としは変異体の選別方法に原因があった。通常、運動性をなくした変異体は半流動培地で極めて小さなスウォームしか作らないので、運動性のあるものと簡単に区別できる。しかし、運動性も持つものでもスウォームを作れない例が知られている。たとえば、走化性欠損 (Che) 株ではまっすぐに泳ぐ菌はスウォームを作らない。したがって、運動性欠損株を扱うときは半流動培地のみで判断するのではなく、顕微鏡観察によって直接運動性の有無を確認する必要がある。

(図 1) 温度感受性株の半流動培地上でのスウォーム形成。



そこで我々は手持ちの Mot 変異体すべて (*fliG*26 株、 *fliM*12 株、 *fliN*7 株) の温度感受性を顕微鏡観察で調べなおした。そして、強く温度感受性を示すものから弱いものまで 4 グループに分け、温度感受性の強い A グループ株 (*fliG*6 株、 *fliM*6 株 ; 表 1) の解析を進めた。

(表 1) 温度感受性 A グループ

	strain	amino acid change
<i>fliG</i>	SJW1759	Q128H
	SJW1774	F236V
	SJW2810	D244Y
	SJW2819	T132P
	SJW2827	P127L
	SJW2830	K273E
<i>fliM</i>	SJW1762	F131C
	SJW1764	F131L
	SJW1770	T147I
	SJW1771	G132D
	SJW1783	G133D
	SJW1808	T147P

これら A グループ株の挙動を調べると、 *fliM*(T147I, T147P) 2 株はモーター回転が CCW のみで smooth に泳いでいた。一方、 *fliG*(P127L, Q128H, T132P) 2 株と *fliM*(F131L, F131C, G132D, G133D) 4 株はモーター回転が CW に偏り遊泳パターンは tumbly であった。残る *fliG*(F236V, D244Y, K273E)3 株は野生株と変わらなかった (表 2)。 *fliG*(F236V, D244Y, K273E)3 株が野生株と変わらない運動性をもつにもかかわらず、小さなスウォームしか作らない理由についてさらに追求した。

(表2) 温度感受性 A グループ株のモーター回転特性

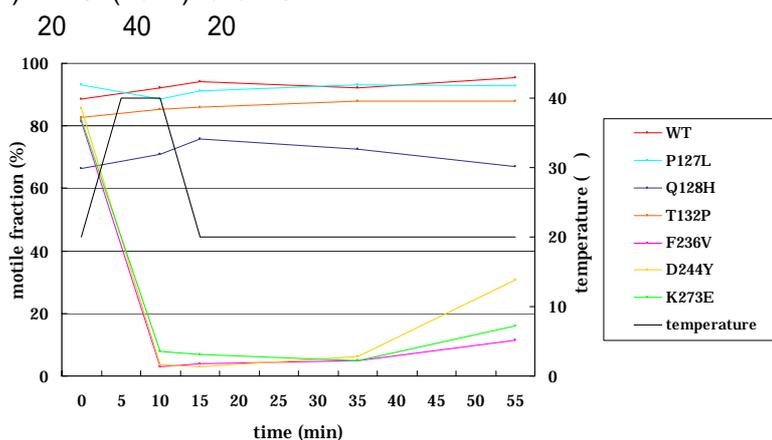
	CCW only	WT	CW >
<i>fliG</i>	none	SJW1774 (F236V) SJW2810 (D244Y) SJW2830 (K273E)	SJW2827 (P127L) SJW1759 (Q128H) SJW2819 (T132P)
<i>fliM</i>	SJW1770 (T147I) SJW1808 (T147P)	none	SJW1764 (F131L) SJW1771 (G132D) SJW1783 (G133D)

温度感受性株は一般に許容温度 (30 以下) でほぼ正常に機能するべん毛を構築することができ、そして一度構築されたべん毛は非許容温度 (35-37) に移しても正常に機能する。また、非許容温度で構築されたべん毛は許容温度に移しても機能を発揮することはなく、新たなべん毛の構築を待たねばならない。すなわち、べん毛を構築する際の温度が構造形成に影響するだけであって、出来上がったべん毛は野生株と変わらない、構造依存的な温度感受性を示す。実際に A グループ株の多くはこのような構造依存的な温度感受性を示した (図2)。ところが、*fliG*(F236V, D244Y, K273E)3 株は構造依存的ではなかった。

fliG(F236V, D244Y, K273E)3 株を許容温度 20 で培養すると正常な運動性を示す。それらを 30 に移すと運動性をなくすものが増え、5 分後もとの温度に戻すと、再び運動性を回復した (図2B)。しかし、40 にシフトした場合は運動性を回復しなかった (図2A)。このことから、*fliG*(F236V, D244Y, K273E)3 株は許容温度で構築されたべん毛が構造的に不安定で、その後の温度に影響されることを示している。これを我々は上記の構造依存的温度感受性と対比して機能依存的温度感受性と呼んだ。

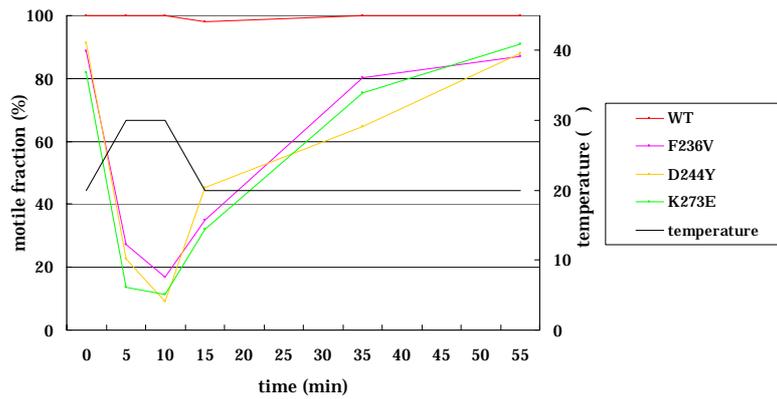
(図2) A グループ株の温度シフトによる運動性の変化。

(A) *fliG* (Mot-)mutants

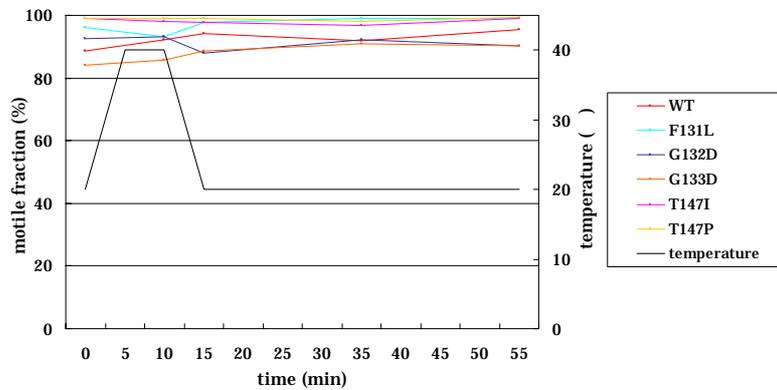


(B) *fliG* (Mot-)mutants

20 30 20



(C) *fliM* (Mot-)mutants
20 40 20



さて、機能依存的温度感受性の原因を探るために、まず *fliG*(F236V, D244Y, K273E)3 株の変異部位の同定を行った。*FliG* の立体構造はすでに解けておりインターネットで取得することができる。そのマップの上に *fliG*(F236V, D244Y, K273E)3 株の温度感受性部位を乗せたものが図3である。

(図 3) *FliG* の立体構造と温度感受性部位。

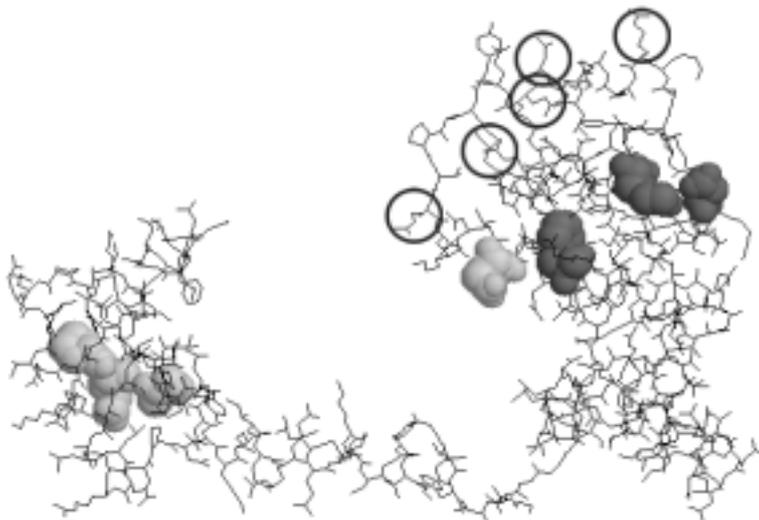


図3で濃い色のボールが機能依存的温度感受性部位(新トルク発生部位と呼ぶ)を示し、薄い色のボールが構造依存的温度感受性部位を示している。また白抜き丸は従来から唱えられているトルク発生部位(定説部位と呼ぶ)である。この定説部位にはすべて電荷のあるアミノ酸残基が配置されているが、新部位は電荷を持ったものばかりでなく疎水性残基も含まれている。そもそも定説部位に変異をもつ株は自然界から分離されたものではなかった。シークエンス保存性の高い領域として、電荷によるトルク発生説を唱えるグループの仮説にしたがって理論的に抽出され、人工的変異を導入するなどして得られたものである。また、本間チームの成果(次節参考)にも見られるように、定説部位の電荷アミノ酸を中性アミノ酸に置換してもモーターは正常に機能するのであるから、定説部位が本当にトルク発生に関与しているかどうかはきわめて疑わしい状況にある。

トルク計測に用いられるテザードセル法の不適合性について

べん毛モーターのトルクを直接計測する方法はない。小さすぎるのである。そこで計測可能なべん毛の回転速度からトルクを推測するのであるが、1本のべん毛の回転計測も現実的にはきわめて難しい。通常はべん毛1本でガラス表面に固定された菌体(テザードセル)の回転を観察して菌体の回転速度からトルクを見積もる方法が取られる。これをテザードセル法という。この方法は1974年SilvermanとSimonによって開発され、べん毛モーターが鞭打ちではなく真の回転運動をしている証拠となったものである。以後、菌体回転の観察の容易さと実験条件の設定のしやすさからモーターのトルク計測にも使われるようになった。しかし、精密なトルク測定をするにあたって、この方法は次のようないくつかの本質的な疑問点があった。

1) フックの柔らかさが回転に影響しないか?

フックはべん毛に比べて柔らかい。したがって回転が生じるとねじれが生じることが、テザードセルの回転の遊びから推測できる。しかし、もしねじれが目一杯起こると、フックはもはや柔軟性を失い剛体として働くであろう。したがって、一定速度で回転しているときはトルクがそのままセルの回転に使われていると考えてよいだろう。

2) ガラス表面との接触はないか?

テザードセルの大部分が不均一回転を示すことから、ガラスとの接触があることがわかる。しかし、数は少ないながら均一に回転している菌も見つかる。したがって、そのような“素性のいい”菌の回転を計測する分には問題ないであろう。

3) ガラス表面からの電氣的な影響はないか?

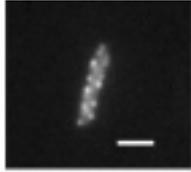
これも上の問題と同様、均一に回転している菌を用いれば、ガラスからの影響は最小限に抑えられるのではないだろうか。

我々もこのようなテザードセル法の有効性を信じて実験を始めた。べん毛モーターの固定子については本間チームが本腰を入れて研究しているので、我々は回転子の挙動について蛍光タンパク質を用いて観察した。

FligMNのいずれのタンパク質も蛍光タンパク質との融合に成功した。すなわち、FligのC端、FlimのN端、そしてFlinのN端に蛍光タンパク質を融合したプラスミドをそれぞれのタンパク質の欠損株に導入すると運動性が回復した。蛍光タンパク質としてはGFP(緑)、YFP(黄)、CFP(赤)のいずれも等しく融合できた。色素の組み合わせによって2色あるいは3色に標識されたモーターを観察する計画であった。テザードセル法を用いる場合、運動性回復の面からも蛍光輝点の明るさの点からも便利であることから、FlinとYFPの融合タンパク質が選ばれた。Flin欠損株にYFP-Flin融合タンパク質を発現させると、菌は運動性を回復する。蛍光顕微鏡で観察すると菌体内にはいくつかの輝点があり、テザードセルで輝点の周りに菌体が回転することや、その数から輝点はべん毛基部に局在していると判定された(図1)。また、この融合タンパク質を野生株に導入しても同様の現象が見られることから、以後の実験ではこの株を用いることにした。

(図 1) YFP-FliN キメラタンパク質を発現した fliN 欠損株

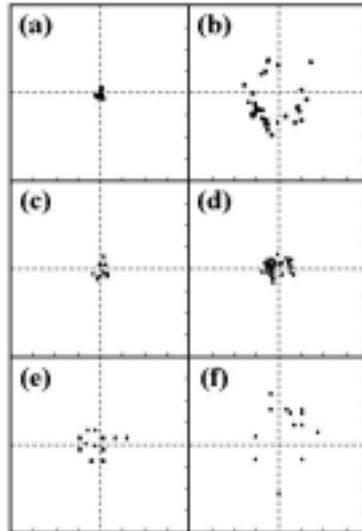
B



テザードセル法ではべん毛がガラスに固定されるため、べん毛モーターも一点に固定されていることを期待していた。しかし、実際にテザードセルを作ってみると、輝点は決して一点に留まることなく、才差運動をしていた。その直径は 100nm くらいで、輝点のゆらぎ 20nm を大きく超えている。このサイズで考えられることはフックの長さである。そこでフックの平均長が異なる変異体も用いてテザードセルの回転を観察したところ、フックの長さに応じて回転直径が変化した (図 2)。この現象は一見均一に回転しているセルでも見られたことから、テザードセルではフックが自由に回転していることが示唆された。

(図 2) センタースポットの才差運動

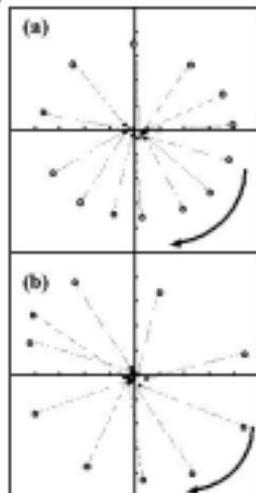
A



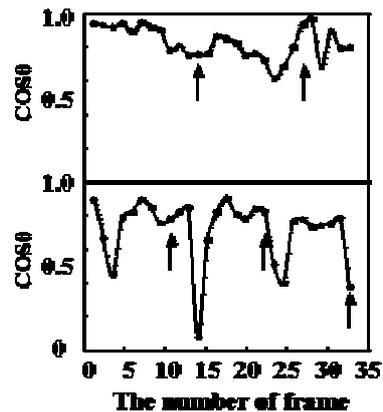
菌体にはたくさんの輝点があるが、回転中心となる輝点をセンタースポット、回転中心から遠く離れた輝点をアウトースポットとし、2点間の距離を測ることで菌体のガラス表面との角度がわかる。多くのテザードセルは 1 回転中にガラス面との角度を変えながら回転していた (図 3)。すなわち、菌体のどこかがいつでもガラス表面と接触しているようであった。

(図 3) テザードセルの不均一回転。

B

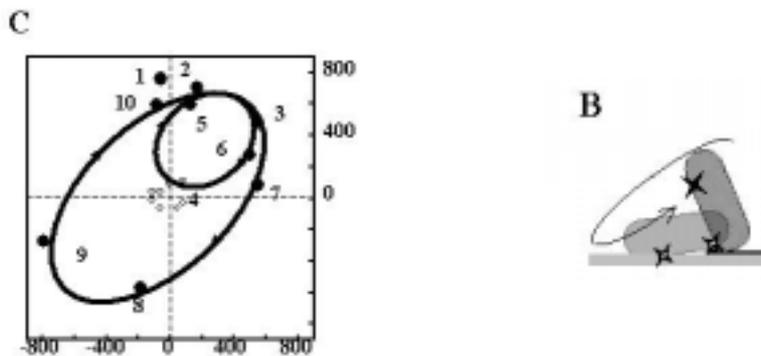


C



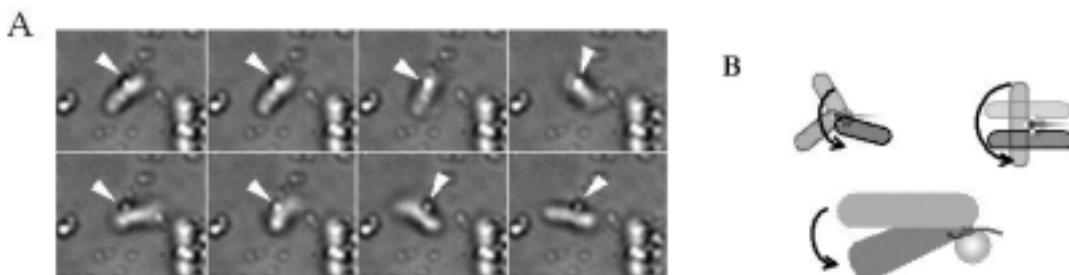
そこで敢えて不均一に回転しているテザードセルを選び、その回転状態を観察したところ、そのほとんどのセンタースポットが菌体の端にあり、回転中に菌体が横になったり立ち上がったりしていることがわかった。極端な場合、センタースポットが1回転する間にアウトースポットが2回転する二重回転が見られた(図4)。

(図4) テザードセルの二重回転



野生株のフックの平均長は55nmである。それに対して1-2 μmの菌体であるから、菌体のどこかが表面と接触する可能性は大である。そこで表面から遠ざけるためにマイクロビーズの上にテザードセルを作ることを試みた。平均直径が200nmのマイクロビーズを用いてテザードセルを作ったところ、テザードセルの出来る割合は直接ガラス上に作る場合よりも多く、したがって、マイクロビーズが期待通りガラスと菌体の距離を広げていることがわかった。しかし、マイクロビーズ上では均一回転の菌体はなく、ほとんどがビーズの周辺をなぞるように回転していた(図5)。ビーズの頂上で回転する菌体は周辺に支えるものがないのでビーズ表面まで“落ちてきて”回転するようである。

(図5) マイクロビーズ上でのテザードセルの回転

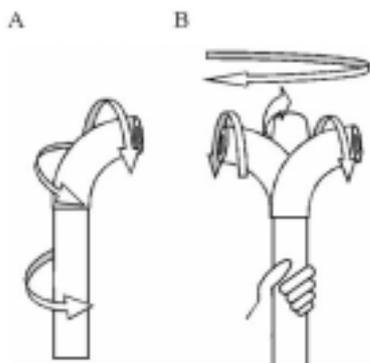


以上の結果を総合して考えると、テザードセル法においてフックが重要な役割を果たしていることがわかる。従来、テザードセルは固いフックによって支えられているのでガラス面から浮いて回転できると考えられていた。しかし、我々の実験からはフックが決して剛体のように菌体を支えているのではなく、むしろ積極的に動き回っていることをしめしている。これはフックの本来の働きであるユニバーサルジョイントとしての動きを考えれば当然であろう。ユニバーサルジョイントでは図6Aのように、菌体についたフックはモーターからのトルクをべん毛に伝えるために角度をもったまま回転をする。もし、べん毛の回転を止めると(テザードセルのように)、フックは回転しながら、さらに全体が回転する(図6B)。一見不思議な回転であるが、AとBの回転状況は等価であること強調したい。

テザードセルの“行いの悪さ”は古くから気づかれていたが、その実態を真剣に解析した例はない。また、最近では蛍光標識したマイクロビーズを直接フックに結合してその回転を観察することも行われているが、マイクロビーズの実験で示したように、その“行いの悪さ”はフックから来るものなので問題が解決されたわけではない。我々はこれまで集積

されたトルク計測のデータを再検討してみる必要がある。そして、新たな計測方法の導入も考えなければならない。

(図6) フックのユニバーサルジョイントとしての回転運動。



(2)研究成果の今後期待される効果

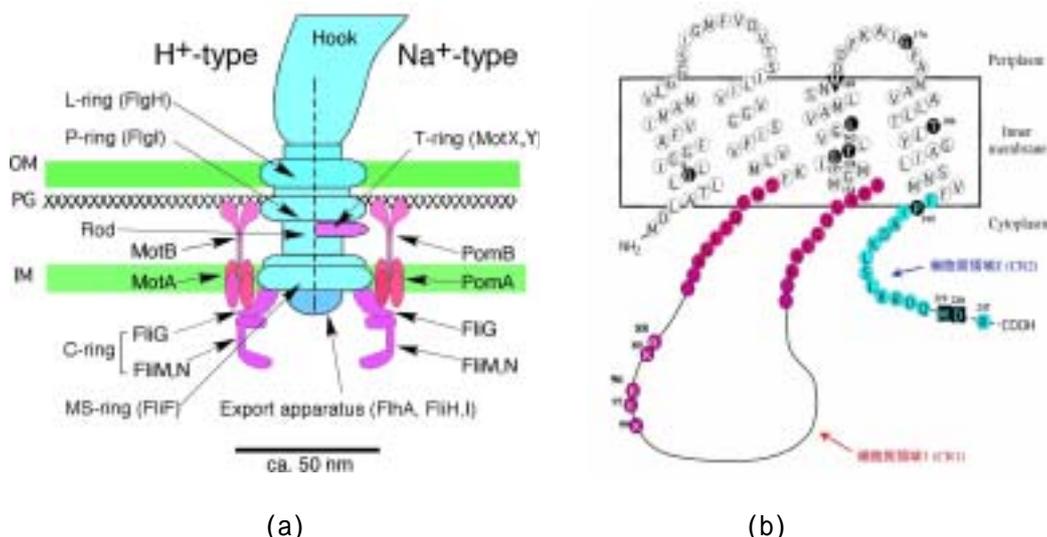
科学の最先端はいつでも目に見えないものとの戦いであるが、その現場において1つの仮説だけが喧伝され、まるで真実であるかのごとく扱われるのは真実を探求する科学にとって後退を余儀なくさせられる可能性のある危険な状態である。現在のべん毛モーター像はアメリカのあるグループによって作り上げられたものである。我々は以前からその仮説に疑問を抱いていたが、このプロジェクトの成果により新たなべん毛モーター像の再構築に向けて進むことができる。

3.2 Mot 複合体の構造機能解析および細胞膜上での分布解析(名古屋大学 本間グループ)
(1)研究実施内容及び成果

I GST-PomA 細胞質領域融合タンパク質を用いた解析

先にも述べているように、プロトン駆動型のべん毛を持つ *E. coli* などは、モーター機能に必須なタンパク質である、4回膜貫通型タンパク質の MotA と1回膜貫通型タンパク質の MotB を持っている。MotB は膜貫通領域で MotA と相互作用して複合体となり、プロトンチャンネルを形成し、また MotB のC末端にはペプチドグリカン結合モチーフがあるため、ペプチドグリカンと相互作用して MotA を固定していると考えられている。一方、ナトリウム駆動型のべん毛を持つ *V. alginolyticus* などは、モーター機能に必須なタンパク質として今までに、PomA、PomB、MotX、MotY の4つのタンパク質が同定されている。PomA、PomB は極毛回転に必須であり、*E. coli* の MotA、MotB とそれぞれ約 20%、約 30% のホモロジーがある。そのため、PomA は4つ、PomB は1つの膜貫通領域とペプチドグリカン結合モチーフを持つと考えられている。更に、PomA と PomB は複合体となり、ナトリウムイオンチャンネルを形成していると考えられている(図1a)。

図1.べん毛モーター模式図つモーター蛋白質 PomA の細胞質領域



pomB の N 末側と *motB* の C 末側を組み合わせたキメラ遺伝子 *potB*^{7E} (以下 *potB*) の遺伝子産物 PotB は PomA と共に働き、Na⁺駆動型モーターとして機能する。そして、この PomA/PotB モーターはビブリオ菌だけではなく、*E. coli* の *motA* 変異、*motB* 変異を相補し、*E. coli* のべん毛モーターを Na⁺駆動型に変換した。このように、同一のローターを MotA/MotB でも PomA/PotB により回転させることが出来ることから、プロトンモーターとナトリウムモーターの基本的な動作原理に大きな違いはないと期待できる。推定アミノ酸配列から、4回膜貫通型タンパク質の MotA (295 アミノ酸残基) には、細胞質側に2本目と3本目の膜貫通領域間の118 アミノ酸残基(細胞質領域1、CR1)と4本目の膜貫通領域からC末端にかけての71 アミノ酸残基(細胞質領域2、CR2)の露出した部位が、同様に PomA (253 アミノ酸残基) にも95 アミノ酸残基(CR1)と53 アミノ酸残基(CR2)の2箇所の露出した部位があることがわかっている(図1b)。更に、MotA CR1 の Arg90 と Glu98 とロータータンパク質 FliG との静電的相互作用がべん毛モーターの回転に重要であると提唱されているが、PomA CR1 には MotA CR1 の Arg90 と Glu98 に対応する Arg88 と Glu96 が保存されており、付近にはさらに1つの Lys と2つの Glu が見られる。これら5つの荷電アミノ酸残基を全て中性化した変異体 PomA (Arg88Ala、Lys89Ala、Glu96Gln、Glu97Gln、Glu99Gln) は機能的

であった。このことから、PomA CR1 には MotA で重要とされている Arg90 と Glu98 が保存されているものの、その役割については明らかではない。一方、PomA CR2 の機能についてはまだわかっていないが、MotA と PomA において機能を失う変異がこの領域に見い出されており、何らかの役割を演じていると考えられる。そこで、PomA CR1 と PomA CR2 の機能、及び、性質について解析することを目的とし、*pomA* CR1 もしくは *pomA* CR2 を GST との融合遺伝子を作製しその GST-PomA CR1、GST-PomA CR2 の過剰発現が PomA/PotB による遊泳にどのような影響を及ぼすのか調べた。また、過剰発現させた GST-PomA CR1 と GST-PomA CR2 の精製を試みた。

GST 融合タンパク質が運動能に与える影響とその発現：PomA の CR1 あるいは CR2 のみでロータータンパク質 FliG あるいは PomA や PomB と相互作用すると考えると、融合タンパク質である GST-PomA CR1 や GST-PomA CR2 の過剰発現は正常な PomA の作用と競合し、その結果として菌の遊泳を阻害するのではないかと予想した。その検討のために、まず *motA* 変異株である M526 株に *pomA* と *potB* を含むプラスミドと GST のみをコードするマルチコピーベクター、pGEX-5X-3 を導入し、運動能を観察した。トランスフォーマントを IPTG 存在下にて培養することで、菌が運動能を持つことが確認出来た。更に pGEX-5X-3 の MCS に *pomA* CR1 (303 bp) もしくは *pomA* CR2 (168 bp) を挿入したプラスミド、それぞれ pIT1、pIT2 を導入した。そして IPTG の添加の有無で、各トランスフォーマントの運動能に変化が出るかどうか、暗視野位相差顕微鏡を用いて調べた。pIT1 及び pIT2 を導入したトランスフォーマントは、コントロールと同様で、IPTG を添加しないと運動能はなく、添加すると運動能があることが観察された。各トランスフォーマント間における運動能には、目立った違いは見られなかった。次に、各トランスフォーマントが IPTG の添加により、GST 融合タンパク質を発現しているのかどうか、ウェスタンブロッティングにより確認した。GST は約 26 kDa のタンパク質で、IPTG を添加すると、コントロールの pGEX-5X-3 からは約 26 kDa の GST タンパク質が発現していることが確認された。また pIT1 を導入したトランスフォーマントからは GST-PomA CR1 の融合タンパク質、約 37 kDa が、pIT2 を導入したトランスフォーマントからは GST-PomA CR2 の融合タンパク質、約 33 kDa が発現していることも確認された。いずれの GST 融合タンパク質においても分解産物とみられる、移動度の大きいバンドが検出された。また各トランスフォーマントにおいて、約 25 kDa の正常な PomA タンパク質も発現していた。そして、正常な PomA よりも各 GST 融合タンパク質の方が過剰に存在していることがわかった。

GST-PomA CR1 の融合タンパク質の性質：GST-PomA CR1 の融合タンパク質が可溶性タンパク質であるかどうかを調べるために IPTG により GST-PomA CR1 を発現させた大腸菌を超音波破碎し、各画分に分け、どの画分に存在するか、ウェスタンブロッティングを行った。すると、GST-PomA CR1 は超音波破碎をした後の低速遠心分離処理で沈殿 (debris) 画分にほとんど存在し、他の超遠心分離処理後の沈殿 (ppt) 画分や、超遠心分離処理後の上清 (sup) 画分には存在していなかった。このことから GST-PomA CR1 は可溶性ではなく、封入体である可能性が高いと言える。わずかに存在した可溶性の GST-PomA CR1 を精製するために、菌破碎後の上清画分をグルタチオンビーズに吸着させて溶出した。得られた溶出画分をゲル濾過したところ、排除限界の領域に GST-PomA CR1 が検出された。またウェスタンブロッティングの結果、GST-PomA CR1 の推定分子量よりも移動度の大きい複数のバンドが検出された。

GST-PomA CR2 の融合タンパク質の性質：GST-PomA CR2 の融合タンパク質についても同様に検討した。debris 画分や、ppt 画分には GST-PomA CR2 はほとんど存在しなかったが、sup 画分に GST-PomA CR2 が存在することを確認した。このことから、GST-PomA CR2 は可溶性で、封入体ではないと考えられる。また、GST-PomA CR2 の大きさを見積もるために、GST-PomA CR2 が一番多く存在した sup 画分を用いて、ゲル濾過を行った。約 67kDa 付近に GST-PomA CR2 と思われるタンパク質が存在した。またウェスタンブロッティングの結果より、GST-PomA CR2 の推定分子量よりも移動度の大きい複数のバンドが検出された。GST-PomA CR1 を精製するために、グルタチオンビーズによって GST-PomA CR2 の吸着を試みたが、原因はわから

ないが、GST-PomA CR2 は溶出画分にはほとんど回収されなかった。そして非吸着画分にはほぼ全て検出された。

GST-PomA CR1 の融合タンパク質の可溶化と再生：GST-PomA CR1 の融合タンパク質が不溶性であったので、GST-PomA CR1 を精製し、2 種類の変性剤を用いて可溶化を試みた。6 M 塩酸グアニジン溶液を用いた場合、DTT の有無に関わらず、GST-PomA CR1 は sup 画分に存在し、ppt 画分にはほとんど存在しなかった。また、8 M 尿素溶液の場合では、DTT を加えないと GST-PomA CR1 はほとんど sup 画分に存在したものの、DTT を加えると ppt 画分にも存在することが確認された。以上のように、変性剤の塩酸グアニジン溶液と DTT を加えない尿素溶液ではその封入体を可溶化出来た。封入体を可溶化出来たことから、次に希釈法を用いて、その変性した GST-PomA CR1 が再生（リフォールディング）するか検討した。DTT を含まない 6 M 塩酸グアニジン溶液で可溶化したサンプルを用いて実験を行った。温度で比較した場合、4 で行った時は各 pH において sup 画分に多少バンドが出たが、ほとんどが ppt 画分に存在した。16、25 の時でも大体、同様な結果になった。pH で比較すると、pH7.5 が他と比べて sup 画分のバンドが濃くなった。

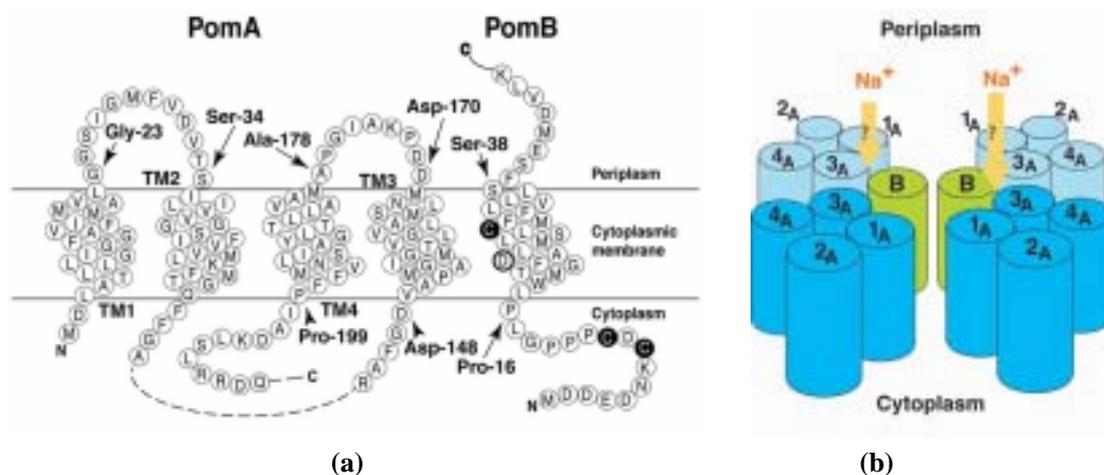
まとめ：FliG と相互作用しトルク発生を担うと推定されている PomA CR1 の性質を理解する上で、構造解析を行うことは重要である。そこで、GST-PomA CR1 の精製を行うために、封入体になった GST-PomA CR1 を可溶化し、再生することで可溶性にしようと試みた。しかし、現段階では実験結果から GST-PomA CR1 を効率よく再生することに成功していない。再生の方法として希釈法を用いているが、高濃度から低濃度の溶液に一段階で希釈するのではなく、高濃度から低濃度の溶液までの間に幾つかの濃度の溶液を入れる、多段階方式で希釈することや、透析法を用いて時間をかけてゆっくり再生させる必要があると考えられる。また今回は再生条件を温度と pH でしか調べていないが、時間、イオン強度、純度や還元剤の有無などの条件を加えることでより GST-PomA CR1 の再生収率を上げることが出来るであろう。但し、GST-PomA CR1 が再生できても可溶性になるとは限らないので、その場合には再考の必要があると思われる。暗視野位相差顕微鏡による泳ぎの観察結果から、GST-PomA CR2 の発現の有無に関わらず、菌の泳ぎには変化がなかった。またウェスタンブロッティングの結果から GST-PomA CR2 は PomA よりも多く発現していたことが確認された。更に GST-PomA CR2 は可溶性蛋白質であることが判明した。すなわち、GST-PomA CR2 は十分に、細胞質で作用できる状態であったが、PomA の機能に影響を及ぼさないことが分かった。

II システイン導入変異体を用いたモーター蛋白質の膜貫通領域の機能解析

PomA のホモログである大腸菌 H^+ 駆動型べん毛モーターの MotA/MotB 複合体では、MotB の TM に存在する Asp 残基の変異 (Asp 残基のプロトン化と脱プロトン化をミミック) によって MotA の TM2 と TM3 を繋ぐ細胞質領域にコンフォメーション変化を誘発するという報告がある。さらに、MotA の細胞質領域の荷電アミノ酸残基と回転子蛋白質の FliG の荷電アミノ酸残基との間の静電的相互作用が回転に重要であると報告されている。これら一連の結果から、イオン流から回転力発生へのエネルギー伝達は次のように想像される。PomA/PomB 複合体 (MotA/MotB 複合体) に Na^+ (H^+) が通過すると、PomB (MotB) にコンフォメーション変化が起き、それが MotA の細胞質領域のコンフォメーション変化を誘発し、最終的に回転子蛋白質 FliG との引力・斥力の変換へとエネルギーが伝達される。一般にペリプラズム領域は酸化的環境にあるため、酸化剤を添加せずにジスルフィド架橋を形成させる目的に、PomA の 4 つの TM、TM1 (G23C)、TM2 (S34C)、TM3 (M169-D171)、TM4 (A178C) のペリプラズム側に Cys を導入した (図 2 a)。PomB は唯一の膜貫通領域のペリプラズム側に Cys を導入した (L37-F39)。タンデム型 PomA を構築し、ジスルフィド架橋形成しやすい P172C 変異を N 末端側、C 末端側、あるいはその両方に導入した。その結果、PomA-D170C (TM3) と PomB-S38C は、それぞれ単独では機能的であったが、これらを組み合わせられると著しく機能を失った。PomA の TM3 と PomB の TM の組み合わせには他にもこのような例があった。この組み合わせでも還元剤存在下には部分的に機能を回復した。PomA-G23C (TM1)、PomA-S34C (TM2)、PomA-A178C (TM4) では PomB-S38C と組

み合わされても還元剤による機能回復はみられなかった。また、PomA-D170C (TM3) と PomB-S38C の組み合わせでは Na⁺ に対する親和性が低くなっていたので、本来 PomA の TM3 と PomB の TM は Na⁺ の流入に関わっていると推測した。PomA-D170C (TM3) と PomBS38C を発現させた膜画分において、約 120 kDa (XL120) の架橋産物を検出した。この時、ジスルフィド結合した PomA の二量体と PomB の二量体も検出された。また、この条件下では 60 kDa 程度の架橋産物(XL60)はほとんど検出できなかった。PomA と PomB は、それぞれが二量体以上の状態で複合体形成すると考えられる。タンデム型 PomA の架橋形成を観察した。タンデム型 PomA はダイマーを形成したので、本来の PomA は四量体で機能することが示唆された。四量体 PomA は PomB と免疫沈降され、PomB の二量体が四量体 PomA と複合体形成をされると考えられる。この量比は以前の生化学的報告によって見積もられた値と矛盾しない。以上の結果から、四量体の PomA と二量体の PomB から形成される PomA/PomB 複合体において、Na⁺ は PomB の TM と PomA の TM3 のインターフェイスを流れ、エネルギーは TM3 から細胞質領域へと伝達されると推測された (図 2 b)。

図 2 PomA と PomB の膜貫通領域のモデル図(a)と PomA/PomB 複合体の推定イオン透過部位(b)



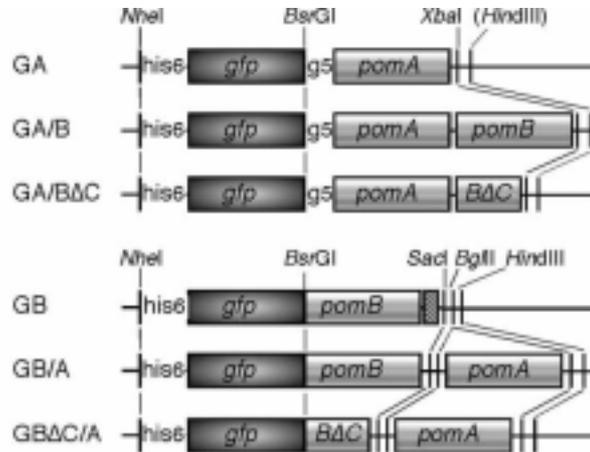
III 固定子タンパク質のべん毛モーターへの組み込み

べん毛関連遺伝子はいくつかの階層に分かれており、発現は厳密に制御されている。モーターの固定子タンパク質をコードする遺伝子はこの階層の最後のクラスに位置しており、べん毛基部体の構築が完了するまでは発現されない。また、固定子タンパク質は、完全なべん毛構造が構築された後もモーターに組み込まれ、モーターの回転力を発生させる。しかしながら、固定子タンパク質がどのような過程を経てべん毛モーターに組み込まれるかはほとんど分かっていなかった。そこで、固定子タンパク質のべん毛モーターへの組み込み過程を明らかにするため、*V. alginolyticus* が一本の極べん毛を持つことを利用して、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合させた固定子タンパク質を発現させ、その細胞内局在を観察した。

GFP-PomA および GFP-PomB の細胞内局在：*V. alginolyticus* 極べん毛モーターの固定子タンパク質 PomA および PomB の細胞内局在を調べるため、PomA および PomB の緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein; GFP) 融合タンパク質の発現プラスミドを構築した (図 3)。GFP はそれぞれ PomA および PomB の N 末端に融合し、GFP-PomA、GFP-PomB とした。これらの GFP 融合固定子タンパク質をコードする遺伝子は *ara* プロモーターの制御下に置き、それぞれ *pomA* 欠損株 (NMB190) および *pomB* 欠損株 (NMB192) で発現させた。GFP 融合固定子タンパク質の機能を調べるため、スォームアッセイを行ったところ、GFP-PomA を発現させた NMB190 株はスォーム能を示さなかった。一方、GFP-PomB を発現させた NMB192 株はわずかではあるがスォーム能が確認された。この菌株を液体培養し

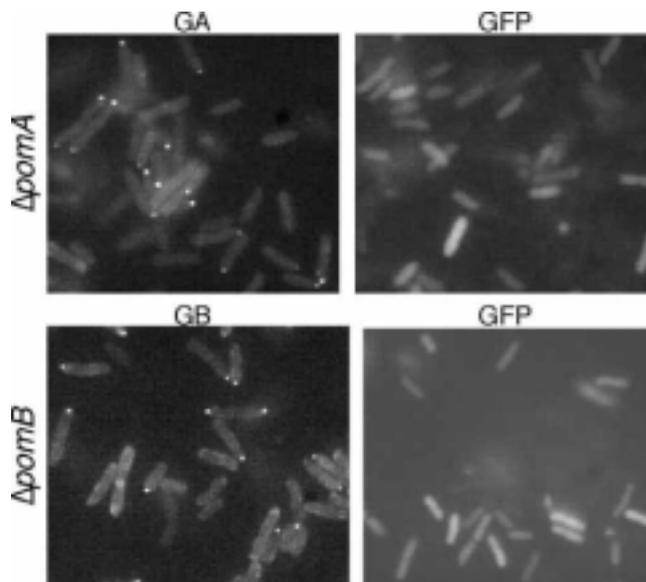
motility buffer 中で観察したところ遊泳する菌が観察された。しかし、その遊泳能は、遊泳速度および遊泳率がそれぞれ 17 $\mu\text{m/s}$ と 26%で、野生型 PomB を発現させた NMB192 株よりも（それぞれ 75 $\mu\text{m/s}$ と 64%）低い値だった。

図3 緑色蛍光タンパク質(GFP)融合モータータンパク質の発現プラスミド



GFP 融合固定子タンパク質の細胞内局在の観察には対数増殖期の細胞を用いた。0.006% のアラビノースを含む培地で NMB190 株に GFP-PomA を発現させたところ、菌体の極に顆粒状の蛍光が観察された(図4)。同様に、GFP-PomB を発現させた NMB192 株でも、0.006% のアラビノースを含む培地で、菌体の極に顆粒状の蛍光が観察された。GFP-PomA もしくは GFP-PomB を発現させた菌の約 50%でどちらか片方の極に顆粒状の蛍光が観察されたが、少数の菌では両極に顆粒状の蛍光が観察された。可溶性タンパク質である GFP を発現させたときは、NMB190 および NMB192 のどちらの菌株でも、蛍光は細胞全体に拡散していた。

図4 GFP-PomA および GFP-PomB の菌体極への局在



ウェスタンブロッティングで GFP 融合固定子タンパク質の発現を確認したところ（全細胞抽出物）、GFP-PomA および GFP-PomB は、それぞれ予想される分子量の 45 kD、66 kD

(SDS-PAGE からの見かけの分子量はそれぞれ、50 kD と 69 kD) に対応するシグナルとして検出された。GFP-PomB ではいくつかの分解産物 (62 kD と 32 kD) と思われるシグナルが抗 GFP 抗体によって検出された。一方、これらの分解産物は抗 PomB 抗体では検出されなかった。GFP-PomB は低レベルではあるが機能を保持している可能性が考えられる。しかし、GFP-PomB タンパク質が特定の部位で切断され機能的な PomB が産出された可能性を除外することはできなかった。

パートナーサブユニット依存的な固定子タンパク質の極局在：固定子タンパク質 PomA および PomB は、固定子複合体を形成して、ナトリウムイオンチャネルとして機能することが明らかにされている。そこで、GFP 融合固定子タンパク質の極局在にそれぞれのパートナーサブユニットが必要とされるかどうかを調べるため、GFP-PomA あるいは GFP-PomB を *pomA* および *pomB* 遺伝子を欠損させた NMB191 株で発現させ、両 GFP 融合固定子タンパク質の局在を観察した。前述したように、GFP-PomA を発現させた *pomA* 欠損株あるいは GFP-PomB を発現させた *pomB* 欠損株では、菌体の極に顆粒状の蛍光が観察された。しかし、GFP-PomA を発現させた NMB191 株では細胞の周縁部でいくつかのクラスター様の蛍光が観察されたが、菌体の極に顆粒状の蛍光は観察されなかった。同様に、GFP-PomB を発現させた NMB191 株では菌体の極に顆粒状の蛍光は観察されず、蛍光は細胞の周縁部に拡散した像として観察された。GFP-PomA あるいは GFP-PomB をそれぞれのパートナーサブユニット (同一プラスミド) とともに発現させた NMB191 株では、菌体の極に顆粒状の蛍光が観察された。ウェスタンブロットティングにより GFP-PomA の産生量を調べたところ、*pomA* 欠損株と *pomA/pomB* 欠損株との間で産生量に大きな差はみられなかった。同様に、GFP-PomB の産生量も、*pomB* 欠損株と *pomA/pomB* 欠損株との間で差はみられなかった。また、GFP 融合固定子タンパク質を単独で発現させた菌株と、それぞれのパートナーサブユニットとともに発現させた菌株の間でも、GFP 融合固定子タンパク質の産生量に差はみられなかった。固定子タンパク質 PomA および PomB の極局在には、それぞれのパートナーサブユニットが必要と考えられる。

極べん毛依存的な固定子タンパク質の極局在：GFP 融合固定子タンパク質による顆粒状の蛍光と *V. alginolyticus* の極べん毛が共局在するかどうかを調べるため、極べん毛を抗べん毛抗体 (一次抗体) およびロダミン結合二次抗体を用いて観察した。多くの細胞で、極べん毛と GFP 融合固定子タンパク質の顆粒状の蛍光が同じ極に観察された。いくつかの細胞では、極べん毛は検出されないが顆粒状の蛍光が極に局在した。一方、顆粒状の蛍光が極べん毛と反対側の極に局在した細胞はほとんど観察されなかった。

GFP 融合固定子タンパク質の極局在が、極べん毛依存的かどうかを調べるため、*V. alginolyticus* の極べん毛欠損株での局在を観察した。極べん毛欠損株として *fliF* 遺伝子を欠損させた NMB196 株を用いた。FliF は MS リングを構成するタンパク質で、べん毛構造は細胞質膜上で重合した MS リングを起点として構築される。したがって、*fliF* 遺伝子を欠損させた菌株はべん毛欠損株となる。GFP-PomA および GFP-PomB をそれぞれべん毛欠損株で発現させたところ、菌体の極に顆粒状の蛍光は観察されなかった。べん毛関連遺伝子は厳密に制御されたいくつかの階層に分けられ、基部体の構成遺伝子の変異株では最後の階層に属する遺伝子は発現されない。*fliF* 欠損株では、最後の階層に属する *pomA* および *pomB* 遺伝子が発現していない可能性を考え、GFP 融合固定子タンパク質をそれぞれのパートナーサブユニットとともに同一プラスミドから産生させた。べん毛欠損株 (NMB196) で GFP-PomA を産生させたところ、細胞の周縁部でいくつかのクラスター様の蛍光が観察されたが、菌体の極に顆粒状の蛍光は観察されなかった。同様に GFP-PomB を産生させた株では、蛍光は細胞の周縁部に一様に拡散し、菌体の極に顆粒状の蛍光は観察されなかった。ウェスタンブロットティングにより GFP-PomA ならびに GFP-PomB の産生量を調べたところ、べん毛欠損株と *pomA/pomB* 欠損株との間で GFP 融合固定子タンパク質の産生量に差はみられなかった。以上の結果から、固定子タンパク質の菌体極への局在には、極べん毛の存在が必要だと考えられる。

GFP 融合固定子タンパク質によるドミナント効果：GFP 融合固定子タンパク質とそれぞ

れのパートナーサブユニットを野生型の極べん毛をもつ菌株 (V105) で発現させた。GFP-PomA、GFP-PomB、あるいは GFP をコードするプラスミドを持つ V105 株は、アラビノースを含まない軟寒天培地では同程度のスウォーム能を示した。一方、0.02%のアラビノースを含む軟寒天培地では、GFP-PomA あるいは GFP-PomB を発現させた V105 株のスウォーム能は、GFP を発現させた V105 株よりも低下した。加えて、0.02%のアラビノースを含む液体培地で GFP-PomA を発現させたときの V105 株の遊泳率は 39%であったのに対し、アラビノースを含まない液体培地での遊泳率は 66%であった。

V105 株で 0.006%のアラビノースで GFP-PomA の発現を誘導すると、多くの細胞では蛍光が細胞の周縁部に検出され、菌体の極に顆粒状の蛍光を持つ細胞はほとんど観察されなかった。同様に GFP-PomB を発現させた V105 株では、少数の細胞では菌体の極に顆粒状の蛍光は観察されたものの、多くの細胞では蛍光は細胞の周縁部に一様に拡散した。0.02%のアラビノースで GFP 融合固定子タンパク質を V105 株に発現させると、細胞周縁部全体に強い強度の蛍光が検出され、菌体の極に顆粒状の蛍光は観察されなかった。おそらく細胞質膜に挿入された多量の GFP 融合固定子タンパク質のために、菌体の極への局在が検出できなかったものと考えられる。

固定子タンパク質の極局在に対する PomB・C 末端領域の必要性：*E. coli*-MotB および *V. alginolyticus*-PomB は、それぞれの C 末端領域に推定ペプチドグリカン結合モチーフをもっており、この領域を介して固定子複合体は細胞壁に固定されると考えられている。PomB の C 末端領域を失った変異体 PomBΔC は、パートナーサブユニットの PomA との複合体形成能を保持しているが、固定子としての機能は失われており、野生株の運動能に対して劣勢である。固定子タンパク質の極局在に対する PomB の C 末端領域が必要かどうかを調べるため、GFP-PomA および PomBΔC、あるいは PomA および GFP-PomBΔC を *pomA/pomB* 欠損株 (NMB191) で発現させ、局在を観察した。GFP-PomA と PomBΔC を発現させた菌株では、細胞の周縁部でいくつかのクラスター様の蛍光が観察されたが、菌体の極に顆粒状の蛍光は観察されなかった。PomA と GFP-PomBΔC を発現させた菌株でも同様に、菌体の極に顆粒状の蛍光は観察されず、蛍光は細胞の周縁部に拡散し、所々にクラスター様の蛍光が観察された。PomB の C 末端領域は固定子タンパク質の極局在に必要であると考えられる。

次に、GFP-PomA と PomBΔC、あるいは PomA と GFP-PomBΔC の相互作用を確認した。それぞれの GFP 融合固定子タンパク質の N 末端に融合させたヒスチジンタグを用いて、実験を行った。菌体の膜画分から GFP-PomA あるいは GFP-PomB を CHAPS で可溶化した後 Ni-NTA アガロースに結合させた。GFP 融合タンパク質を Ni-NTA アガロースから溶出させた後、溶出画分に含まれる固定子タンパク質をウェスタンブロッティングにより検出した。野生型 PomB および PomBΔC は GFP-PomA とともに Ni-NTA アガロースから溶出された。検出された野生型 PomB と PomBΔC のシグナル強度に差はみられなかった。さらに、野生型 PomA は GFP-PomB および GFP-PomBΔC とともに Ni-NTA アガロースから溶出された。以上の結果から、GFP-PomA は PomB および PomBΔC と、または野生型 PomA は GFP-PomB および GFP-PomBΔC と細胞質膜上で複合体を形成していると考えられる。

MotX, MotY 依存的な固定子タンパク質の極局在：GFP 融合固定子タンパク質の極局在に MotX, MotY がどうか調べるため、GFP 融合固定子タンパク質をそれぞれのパートナーサブユニットとともに *motX* 変異株 (NMB94) および *motY* 変異株 (NMB117) で発現させ、局在を観察した。NMB94 株は *motX* 遺伝子内の T488 と G489 の間の 2 塩基が欠失し Cys87 から先は読み枠がずれた変異体、一方の NMB117 株は *motY* 遺伝子の Gln32 (CAG) がストップコドン (TAG) に置き換わった変異体である。GFP-PomA と PomB、あるいは PomA と GFP-PomB を *motX* 変異株 (NMB94) で発現させると、少数の細胞では菌体の極に顆粒状の蛍光は観察されたものの、多くの細胞では蛍光は細胞の周縁部に拡散した。GFP-PomA と PomB、あるいは PomA と GFP-PomB を *motY* 変異株 (NMB117) で発現させても、*motX* 変異株と同様に顆粒状の蛍光が減少し、蛍光が細胞の周縁部に拡散した。しかしながら、*motX* 変異株および *motY* 変異株では野生型の PomA と PomB が産生しているので、GFP 融合固定子タンパク質の局在効率の低下の原因を *motX* 変異あるいは *motY* 変異と断定

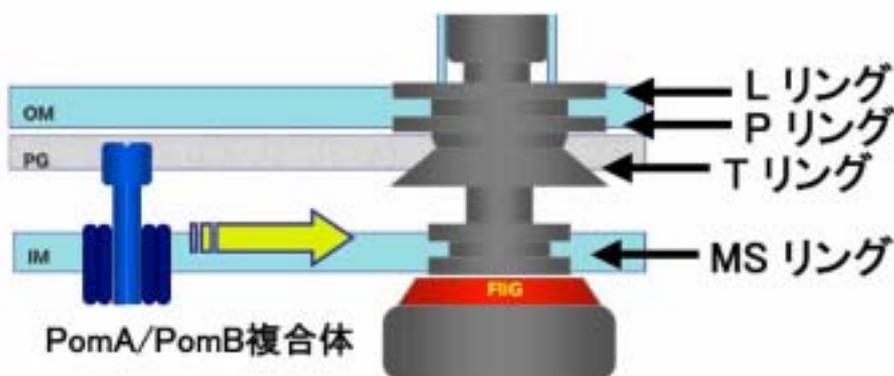
することは困難である。

V. alginolyticus の PomA、PomB、MotX、MotY は *V. cholerae* の *pomA/pomB/motX/motY* 欠損株 (VcΔXYAB) の運動能を相補できる。そこで固定子タンパク質の局在に対する MotX および MotY の役割を詳しく解析するため、*V. cholerae* の *pomA/pomB* 欠損株 (VcΔAB) および *pomA/pomB/motX/motY* 欠損株 (VcΔXYAB) を用いて、GFP 融合固定子タンパク質の局在を観察した。GFP-PomA と PomB、あるいは PomA と GFP-PomB を VcΔAB 株で発現させると、予想したように、菌体の極に顆粒状の蛍光が観察された。しかし、GFP-PomA と PomB、あるいは PomA と GFP-PomB を VcΔXYAB 株で発現させると、菌体の極に顆粒状の蛍光が局在した細胞はほとんど観察されなかった。VcΔAB と VcΔXYAB 株の間で、GFP 融合固定子タンパク質の発現量に差はみられなかった。以上の結果から、固定子タンパク質の極局在には MotX および MotY が関わっていると考えられる。

まとめ： GFP-PomA あるいは GFP-PomB を、それぞれのパートナーサブユニットの PomB あるいは PomA を欠損させた菌株で発現させると、菌体の極の蛍光顆粒は観察されず、細胞の周縁に蛍光が検出された。これは、PomA および PomB 単独では極局在せず、PomA/PomB 複合体になって初めて極に局在できることを意味している。つまり、固定子タンパク質はサブユニット単体ではなく、複合体としてべん毛モーターに組込まれることが示唆される (図 5)。そこで、はじめて、FliG と相互作用できるようになり、トルクを発生する。

PomB の C 末端領域は推定ペプチドグリカン結合配列をもち、固定子タンパク質をペプチドグリカンに結合させることにより、べん毛モーターの周りに固定している。このことにより回転子との相互作用による回転運動を可能にしている。このペプチドグリカンとの固定子の相互作用は、回転子との相互作用後に可能になると考えられている。そうでなければ、合成された固定子タンパク質がべん毛モーターの周りに移動することができないことになる。本研究では、GFP 融合固定子タンパク質の極局在に推定ペプチドグリカン結合配列を含む PomB の C 末端領域が必要であることを示した。Vibrio 属の細菌では MotX および MotY がべん毛モーターの回転に必須であり、MotY は推定ペプチドグリカン結合配列をもち、*V. alginolyticus* では、MotX および MotY が相互作用し複合体を形成すると推測されており、MotX と PomA/PomB 複合体の相互作用を示唆する結果も得られている。Vibrio 属のべん毛モーターでは、MotX ないしは MotY が固定子タンパク質のべん毛モーターへの組み込みや固定に関わっているかもしれない。

図 5 固定子タンパク質のべん毛モーターへの組み込みモデル



これまでの *E. coli* のプロトン駆動型べん毛モーターの仮説では、MotA および MotB は前駆複合体として細胞質膜に挿入され、その後前駆複合体は回転子との相互作用を介してべん毛モーターに組込まれ、イオンチャネルが開き、チャネルへのイオンの流入がべん毛モーターの回転を引き起こすと想像されている。*V. alginolyticus* での固定子タンパク質の組み込み過程のモデルを図にまとめた。本研究で得られた結果から、PomA および PomB は、細

胞質膜中で PomA/PomB 複合体を形成してからべん毛モーターに組込まれると考えられる。固定子タンパク質の組込みに MotX ないしは MotY が関与していると思われる。固定子タンパク質をコードする遺伝子はべん毛関連遺伝子の最後の階層にコードされており、べん毛基部体の構築が完了するまで発現されない。また固定子タンパク質は、完全なべん毛構造が構築された後でもモーターに組込まれ、べん毛を回転させる。このことは固定子複合体がべん毛構造を認識する機構を持っていることを意味する。GFP 融合固定子タンパク質を用いた解析を進めることにより、固定子タンパク質がべん毛基部体の何を認識し、どのように組込まれるかを明らかにできると期待される。

(2)研究成果の今後期待される効果

研究成果を紹介したが、そのエネルギー変換の機構解明にはまだほど遠いという印象を持たれたかもしれない。しかし、ビブリオ菌の Na⁺駆動型極べん毛モーターのエネルギー変換機構について、多くのデータが蓄積されてきたことを理解してもらいたい。H⁺駆動型べん毛モーターと Na⁺駆動型べん毛モーターの比較から、両べん毛モーターの回転機構にそれほど差がないことを明らかにし、べん毛の回転機構の様子が少しずつではあるが明らかになりつつある。べん毛の回転機構を解明するためにはまだ多くの課題が残されており、新たな解析手法の開発など、今後の研究の進展が待たれる。現在、我々の研究グループでは、固定子構成因子 PomA と回転子構成因子 FliG の間の直接的な相互作用の検出を試みている。しかし、研究は進めているが、ネガティブデータだけが積み上げられているのが現状である。両蛋白質がどのように相互作用しているか明らかになれば、べん毛回転機構の分子レベルでの理解に、大きく近づくことになるだろう。さらなるべん毛モーター研究への支援を期待したい。タンパク質で作られたイオンで駆動するというナノマシン作動原理を追求したい。このあくなき探求心が、サイエンスのレベルの向上につながると信じていたい。

4 研究参加者

相沢グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
相沢 慎一	県立広島大学	教授	研究総括	平成14年11月～ 平成20年3月
片山 一恵		チーム事務員	研究チーム事務	平成14年11月～ 平成17年5月
相沢 貞子		研究補助員	データ整理、事務	平成14年12月～ 平成18年3月
		チーム事務員	研究チーム事務	平成18年4月～ 平成20年3月
矢ヶ崎 仁		CREST 技術員	エナジェティックス	平成14年12月～ 平成16年3月
平野 貴謙		CRES 研究員	分子生物学実験	平成15年1月～ 平成17年6月
真下 拓史		研究補助員	研究データ収集解析	平成15年2月～ 平成19年9月
小川 剛史		研究補助員	研究データ収集解析	平成15年4月～ 平成16年3月
柴田 敏史	県立広島大学 大学院生命科学科	研究補助員	研究データ収集解析	平成15年5月～ 平成20年3月
神戸 正臣		研究補助員	研究データ収集解析	平成15年5月～ 平成16年3月
(再雇用)	県立広島大学 大学院生命科学科	研究補助員	研究データ収集解析	平成17年4月～ 平成20年3月
高橋 則子		CREST 技術員	研究データ収集解析	平成15年5月～ 平成20年3月
石川 直洋		研究補助員	研究データ収集解析	平成15年10月～ 平成17年3月
水崎 秀明	県立広島大学 大学院生命科学科	研究補助員	研究データ収集解析	平成15年10月～ 平成20年3月
芳賀 直子		研究補助員	研究データ収集解析	平成16年4月～ 平成17年5月
藤井 美加子		CREST 技術員	研究データ収集解析	平成17年7月から 平成20年3月
橋本 愛美	県立広島大学 大学院生命科学科	派遣研究員	研究データ収集解析	平成17年11月～ 平成20年3月

2 本間グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
本間 道夫	名古屋大学大学院理学研究科	教授	一分子計測	平成14年11月～平成20年3月
薬師 寿治	同上	助手	モーター蛋白改変	平成14年11月～平成16年9月
小島 誠司	同上	助教	モーター蛋白改変	平成17年10月～平成20年3月
篠原 明梨	同上	CREST技術員	研究データ収集解析	平成15年4月～平成19年1月
堀田 韻虹	同上	CREST技術員	研究データ収集解析	平成15年4月～平成18年5月
中條 誓子	同上	CREST技術員	研究データ収集解析	平成19年2月～平成19年7月
福岡 創	同上	大学院生	モーター蛋白改変	平成16年4月～平成17年3月
楠本 晃子	同上	大学院生	研究データ収集解析	平成18年4月～平成19年3月
寺島 浩行	同上	大学院生	一分子計測	平成18年4月～平成20年3月
檜作 洋平	同上	大学院生	一分子計測	平成18年4月～平成20年3月
矢ヶ崎 仁	同上	大学院生	モーター蛋白改変	平成18年4月～平成20年3月
和田 智之	同上	大学院生	モーター蛋白精製	平成18年4月～平成20年3月
小原 円	同上	大学院生	モーター蛋白精製	平成18年4月～平成20年3月
小池 雅文	同上	大学院生	モーター蛋白改変	平成18年4月～平成20年3月

5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
エルンスト ベーベル マーティン ルーサー大学 大学院生(D3)	ニードル複合体発見に関する共同研究のため	栃木県高根沢町 JST 相沢研究室	平成15年11月5日～平成15年12月6日
ケイティ エバンス ノッチンガム大学 大学院生	Bdellovibrio のべん毛モーターの構造解析	栃木県高根沢町 JST 相沢研究室	平成16年3月13日～平成16年4月4日
ケリー ヒューズ ワシントン大学 教授	バクテリアべん毛に関する共同研究	同上	平成16年3月27日～平成16年4月2日
ウエスリー ブラック バージニア工科大学 大学院生(D2)	タイプIVピリの構造解析の共同研究	同上	平成16年7月13日～平成16年8月10日

メラニー サル ウエストヴァージニア大学 大学院生	電子顕微鏡を使っ てスピロヘーター 菌のペリプラズマ べん毛(PF ₅)の構 造を調べる。	同上	平成16年10 月5日～平成1 6年10月28日
ボニー スティーヴンズ ジョージア州立大学 大学院生	根粒細菌アゾバク テリアの2種類のべ ん毛システムの機 能及び構造解析	県立広島大学 相沢研究室	平成17年7月 30日～平成1 7年8月30日
サンディ イイ マン クウィーンズ大学 大学院生	古細菌メタノコッカ スのべん毛の構造 解析	同上	平成17年11 月13日～平成 17年12月9日
ボニー ローラ シャバン クウィーンズ大学 大学院生	べん毛変異体の電 顕観察	同上	平成18年4月1 日～平成18年 4月26日
マクスドゥル アラム ハワイ大学 教授	海洋性滑走細菌 S.grandis の運動メ カニズムの解明に 関する実験及び研 究打ち合わせ	同上	平成18年9月 29日～平成1 8年10月5日
ミッシェル クレマン レツェルター バーゼル大学 Ph.D ポスドク	ニードル複合体の 形成過程の実験	同上	平成18年11月 27日～平成18 年12月29日
Lis Sockett ノッチングム大学 教授	共同研究 べん毛交流会	東広島 JST イノベーション プラザ広島	平成19年3月2 日～平成19年 3月7日
Colin Hughes ケンブリッジ大学 教授	べん毛交流会	東広島 JST イノベーション プラザ広島	平成19年3月2 日～平成19年 3月7日

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 35 件)

(相沢チーム)

Lee, S.K., Stack, A., Katzowitsch, E., Aizawa, S.-I., Suerbaum, S., and Josenhans, C., *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. (2003) *Microbes & Infections*, **5**, 1345-1356.

Kobayashi, K., Saitoh, T., Shah, D.S.H., Ohnishi, K., Goodfellow, I.G., Sockett, R.E., and Aizawa, S.-I., Purification and characterization of the flagellar basal body of *Rhodobacter sphaeroides*. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 5295-5300.

Chen Yona-Nadler, Tatiana Umanski, Shin-Ichi Aizawa, Devorah Friedberg and Ilan Rosenshine, Integration host factor (IHF) mediates repression of flagella in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. (2003) *Microbiology* **149**, 877-884.

- Makinoshima, H., Aizawa, S.-I., Hayashi, H., Miki, T., Nishimura, A., and Ishihama, A., Growth phase-coupled alterations in cell structure and function of *Escherichia coli*. (2003) *J. Bacteriol.* 185, 1338-1345.
- Hou, S., Saw, J.H., Lee, K.S., Freitas, T.A., Belisle, C., Kawarabayasi, Y., Donachie, S.P., Pikina, A., Galperin, M.Y., Koonin, E.V., Makarova, K.S., Omelchenko, M.V., Sorokin, A., Wolf, Y.I., Li, Q.X., Keum, Y.S., Campbell, S., Denery, J., Aizawa, S.-I., Shibata, S., Malahoff, A., & Alam, M. (2004) Genome sequence of the deep-sea α -proteobacterium *Idiomarina loihiensis* reveals amino acid fermentation as a source of carbon and energy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 18036-18041.
- Shibata, S., Alam, M., and Aizawa, S.-I. (2005) Flagella of the deep-sea bacteria *Idiomarina loihiensis* belong to a family different from *Salmonella* flagella, *J.Mol.Biol.* 352, 510-516.
- Hirano, T., Shibata, S., Ohnishi, K., Tani, T., & Aizawa, S.-I. (2005) N-terminal signal region of *FliK* is dispensable for length control of the flagellar hook. *Mol. Microbiol.* 56, 346-360.
- O'Shea, T.M., DeLoney-Marino, C.R., Shibata, S., Aizawa, S.-I., Wolfe, A.J., and Visick, K.L. (2005) Magnesium promotes flagellation of *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.*, 187, 2058-2065.
- Kanbe, M., Shibata, S., Jenal, U., and Aizawa, S.-I. (2005) Protease susceptibility of the *Caulobacter crescentus* flagellar Hook-Basal-Body; a possible mechanism of flagellar ejection during cell differentiation. *Microbiology*, 151, 433-438.
- Kanbe, M., Yagasaki, J., Zehner, S., Gottfert, M., Aizawa, S.-I. (2006) Characterization of two sets of sub-polar flagella in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 189: 1083-1089.
- Maezawa, K., Shigenobu, S., Taniguchi, H., Kubo, T., Aizawa, S.-I., & Morioka, M. (2006) Hundreds of the flagellar basal bodies cover the cell surface of the endosymbiotic bacterium *Buchnera aphidicola* sp. APS. *J. Bacteriol.* 188: 6539-6543.
- Fredericks, C.E., Shibata, S., Aizawa, S.-I., Reimann, S.A., Wolfe, A.J. (2006) Acetyl phosphate-sensitive regulation of flagellar biogenesis and capsular biosynthesis depends on the Rcs phosphorelay. *Mol Micro.* 61: 734-747.
- Lambert, C., Evans, K.J., Till, R., Hogley, L., Capeness, M., Rendulic, S., Shuster, S.C., Aizawa, S.-I., and Sockett, E. (2006) Characterising the flagellar filament and the role of motility in bacterial prey-penetration by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Mol Micro.*, 60: 274-286.
- Woods, R.D., Takahashi, N., Aslam, A., Pleass, R.J., Aizawa, S.-I., and Sockett, R.E. (2007) Bifunctional Nanotube Scaffolds for Diverse Ligands Are Purified Simply from *Escherichia coli* Strains Coexpressing Two Functionalized Flagellar Genes. *Nano Lett.*, 7:1809-1816.
- Mashimo, T., Hashimoto, M., Yamaguchi, S., and Aizawa, S.-I. (2007) Temperature hyper-sensitive sites of the flagellar switch component *FliG* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.*, 189: 5153-5160.

Shibata, S., Takahashi, N., Chevance, F.F.V., Karlinsey, J.E., Hughes, K.T., and Aizawa, S.-I. (2007) FliK regulates flagellar hook length as an internal ruler. *Mol Micro.*, 64: 1404-1415.

Chaban, B., Ng, S.Y.M., Kanbe, M., Saltzman, I., Nimmo, G., Aizawa, S.-I., and Jarrel, K.F. (2007) Systematic deletion analysis of the fla genes in the flagella operon identify several genes essential for proper assembly and function of flagella in the archaeon, *Methanococcus maripaludis*. *Mol. Micro.* 66: 596-609.

Chevance, F.F., Takahashi, N., Karlinsey, J.E., Gnerer, J., Hirano, T., Samudrala, R., Aizawa, S., and Hughes, K.T. (2007) The mechanism of outer membrane penetration by the eubacterial flagellum and implications for spirochete evolution. *Genes Dev.* 21:2326-2335.

Schwan, W.R., Shibata, S., Aizawa, S.-I., and Wolfe, A.J. (2007) The Two-Component Response Regulator RcsB Regulates Type 1 Piliation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 189: 7159-7163.

Hashimoto, M., Mashimo, T., Hirano, T., Yamaguchi, S., and Aizawa, S.-I. (2008) Functional roles of the hook in a rotating tethered cell *J. Mol. Biol.* 375: 367-375.

Taguchi, F., Shibata, S., Suzuki, T., Ogawa, Y., Aizawa, S.-I., Takeuchi, K., and Ichinose, Y. (2008) Effects of glycosylation on swimming ability and flagellar polymorphic transformation of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605. *J. Bacteriol.* 190: 764-768

(本間チー△)

Yorimitsu, T., Mimaki, A., Yakushi, T. & Homma, M. (2003) The conserved charged residues of the C-terminal region of FliG, a rotor component of Na⁺-driven flagellar motor. *J. Mol. Biol.* 334, 567-583.

Sowa, Y., Hotta, H., Homma, M. & Ishijima, A. (2003) Torque-speed relationship of the Na⁺-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*. *J. Mol. Biol.* 327, 1043-1051.

Asai, Y., Yakushi, T., Kawagishi, I. & Homma, M. (2003). Ion-coupling determinants of Na⁺-driven and H⁺-driven flagellar motors. *J. Mol. Biol.* 327, 453-463.

Fukuoka, H., Yakushi, T. & Homma, M. (2004). Concerted effects of amino acid substitutions in conserved charged residues and other residues in the cytoplasmic domain of PomA, a stator component of Na⁺-driven flagella. *J. Bacteriol.* 186, 6749-6758.

Yakushi, T., Maki, S. & Homma, M. (2004). Interaction of PomB with the third transmembrane segment of PomA in the Na⁺-driven polar flagellum of *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* 186, 5281-5291.

Yakushi, T., Kojima, M. & Homma, M. (2004). Isolation of *Vibrio alginolyticus* sodium-driven flagellar motor complex composed of PomA and PomB solubilized by sucrose monooxalate. *Microbiology* 150, 911-920.

Yorimitsu, T., Kojima, M., Yakushi, T. & Homma, M. (2004). Multimeric structure of

the PomA/PomB channel complex in the Na⁺-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*. *J. Biochem. (Tokyo)* 135,43-51.

Sowa Y., Rowe, A.D. , Leake, M.C. , Yakushi, T. Homma, M., Ishijima, A. & Berry, R.M. (2005). Direct observation of steps in rotation of the bacterial flagellar motor . *Nature* 437, 916-919.

Fukuoka, H., Yakushi, T., Kusumoto, A. & Homma, M. (2005). Assembly of motor proteins, PomA and PomB, in the Na⁺-driven stator of the flagellar motor. *J. Mol. Biol.* 351, 707-717

Okabe, M., Yakushi, T. & Homma, M. (2005). Interactions of MotX with MotY and with the PomA/PomB sodium ion channel complex of the *Vibrio alginolyticus* polar flagellum. *J. Biol. Chem.* 280, 25659-25664.

Yakushi, T., Hattori, N. & Homma, M. (2005). Deletion analysis of the carboxyl terminal region of the PomB component of the *Vibrio alginolyticus* polar flagellar motor. *J. Bacteriol.* 187, 778-784.

Terashima, H., Fukuoka, H., Yakushi, T., Kojima, S. & Homma, M., (2006)The *Vibrio* motor proteins, MotX and MotY, are associated with the basal body of Na⁺-driven flagella and required for stator formation. *Mol. Micro.* 62(4):1170-1180.

Yagasaki, J., Okabe, M., Kurebayashi, R., Yakushi, T. & Homma, M. (2006) Roles of the intramolecular disulfide bridge in MotX and MotY, the specific proteins for sodium-driven motors in *Vibrio* spp. *J. Bacteriol.* 188(14):5308-14.

Yakushi, T., Yang, J.-H., Fukuoka, H., Homma, M. & Blair D. (2006). Roles of charged residues of rotor and stator in flagellar rotation: Comparative study using H⁺-driven and N⁺-driven motors in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188, 1466-1472.

Kusumoto, A., Kamisaka, K., Yakushi, T., Terashima, H., Shinohara, A., & Homma, M. (2006). Regulation of polar flagellar number by the *flhF* and *flhG* genes in *Vibrio alginolyticus*. *J. Biochem. (Tokyo)* 139, 113-121.

Shinohara, A., Sakuma, M., Yakushi, T., Kojima, S., Namba, K., Homma, M., Imada, K. (2007) Crystallization and preliminary X-ray analysis of MotY, a stator component of the *Vibrio alginolyticus* polar flagellar motor. *Acta. Cryst.* 63(2): 89-92.

Kojima, M., Kubo, R., Yakushi, T., M., Homma, M. Kawagishi, I. (2007) The bidirectional polar and unidirectional lateral flagellar motors of *Vibrio alginolyticus* are controlled by a single CheY species. *Mol. Micro.* 64(1):57-67.

Fukuoka H, Sowa Y, Kojima S, Ishijima A, Homma M. (2007) Visualization of functional rotor proteins of the bacterial flagellar motor in the cell membrane. *J. Mol. Biol.* 367:692-701.

(2)その他の著作物 (総説、書籍など)

Blocker, A., Komoriya, K., and Aizawa, S.-I., Type III secretion systems and bacterial flagella: Insights into their function from structural similarities. (2003) PNAS, 100,

3027-3030

Aizawa, S.-I., Flagella, (2004) in "The Desk Encyclopedia of Microbiology" ed. by M. Schaechter, Academic Press, 470-479.

Tohru Minamino & Shin-Ichi Aizawa, Biogenesis of flagella, export of flagellar proteins via the flagellar machine.(2003) in " Protein secretion pathways in bacteria", ed. by B. Oudega, KLUWER Academic Publishers (The Netherlands), pp.249-270.

Aizawa, S.-I. (2005) Bacterial Gliding Motility: Visualizing Invisible Machinery. ASM News feature article. 71, 71-76.

相沢慎一(2003)「生物物理学と私」 シリーズ・ニューバイオフィジックス II - 10「生物物理学とはなにか - 未解決問題への挑戦」共立出版、P.220-225

相沢慎一(2004)「べん毛研究の第一人者マクナブ先生を悼む」生物物理学会誌、エコー欄

相沢慎一(2005)「べん毛モーターの抱える問題点」日本機械学会誌、Vol.108, P.44-45.

相沢慎一(2006)「バクテリアを食うバクテリア」NewsLetter Research on HFSP in Japan、No.19 (<http://jhfsp.jsf.or.jp/>)

相沢慎一(2006)「見えないものを見る努力」生物物理学会誌、巻頭言

相沢慎一(2007)「生物物理学ハンドブック」朝倉書店

百武晃宏, 川岸郁朗, 本間道夫(2004): ピブリオ菌におけるべん毛および走化性関連遺伝子と病原性. 日本細菌学雑誌 59: 403-414.

本間道夫(2004): 細菌のべん毛関連タンパク質「廣川タンパク質化学 第10巻 生体エネルギー・光合成」(土屋友房編)廣川書店(東京) pp.179-214.

Homma, M. & Yakushi, T. (2004). Bacterial Flagellar Motor in Reflexive Polymers and Hydrogels (Yui N., Mrsny R.J., and Park K., edit.) pp.49-65, CRC Press LLC, Washington, D. C.

福岡創, 薬師寿治, 本間道夫(2005): イオン駆動型べん毛の回転機構: 回転力はどこで発生しているのだろうか? 生物物理 45: 22-27

楠本晃子, 小嶋誠司, 本間道夫(2006): 細菌細胞のトポロジー: タンパク質の極局在を中心に. 日本細菌学雑誌 61: 325-337.

曾和義幸, 薬師寿治, 本間道夫, 石島秋彦(2006): バクテリアべん毛モーターのステップ運動. 生物物理 46: 341-344.

曾和義幸, 福岡創, 本間道夫(2007): バクテリア超分子ナノべん毛モーターの回転測定. 蛋白質核酸酵素 52: 309-316.

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

招待講演

(国内会議 5 件、国際会議 11 件)

相沢慎一、日大 COE シリーズセミナー 2005.6.22

Aizawa, SI. 105th ASM(米国微生物学会)年会 2005.6.5-6.9. Symposium”Supramolecular assembly on the cell surface: From genes to Ultrastructure. Convener

Aizawa, SI., Department Seminar at British Columbia University 2005.7.21

Aizawa, SI., Department Seminar at Simon Fraser University 2005.7.22

Aizawa, SI., XIIIth IUMS(国際応用微生物学会)年会 2005.7.23-7.28, Symposium “From Cytoplasm to cell surface: Export, secretion, and assembly in prokaryotes. Convener & Speaker.

Aizawa, SI., Pseudomonas2005. 2005.8.27-8.31, Control of the flagellar number in Pseudomonas.

Aizawa, SI., Department Seminar at Basel University 2005.9.5

Aizawa, SI., Department Seminar at ETH(チューリッヒ工科大学) 2005.9.8

小嶋誠司、日本生体エネルギー研究会 2005.12.1、膜システムで機能する超分子複合体：べん毛モーターの回転メカニズム

Aizawa, SI., Institute of Enzymology (Budapest, Hungary) 2006.5.3. Department Seminar

Aizawa, SI., ASM&FEMS Conference (Crete, Greece) 2006.5.6-10. Invited speaker,

Aizawa, SI., ASM 106th Annual Meeting (Orlando,USA) 2006.5.21-25. Convener & Speaker, 「Overview of the Filamentous Structures」

Aizawa, SI., Brandeis University (Boston, USA) 2006.5.30. Department Seminar

第8回 分子ダイナミック分光ワークショップ(浜松名鉄ホテル) 2006.7.6-7

本間道夫「細菌べん毛の超分子ナノモーターの構造と機能を見る」

生理学研究所研究会「機能分子ダイナミクス of 分子機構解明に向けて」(自然科学研究機構・岡崎カンファレンスセンター) 2006.9.28-29

本間道夫「膜超分子イオニックモーターの分子構築」

分子生物学会 2006 フォーラム(名古屋国際会議場) 2006.12.6-8

小嶋誠司・福岡創・和田智之・石島秋彦・本間道夫「膜に埋まった超分子複合体”細菌べん毛モーター”の挙動を追う」

口頭発表 (国内会議 41 件、国際会議 12 件)

S.-I.Aizawa、口頭発表、ゴードン会議、微生物における感覚信号伝達,2004.1.、

S.-I.Aizawa、convener および口頭発表 (New Orleans),ASM 104th Annual Meeting(米国微生物学会第 104 回総会),2004.5.、

Hirano, T., Shibata, S., Ohnishi, K, Tani, T., & Aizawa, S.-I.、口頭発表およびポスター、

BLAST 会議、2005.1., 「CYTOPLASMIC ROLE OF FliK IN THE HOOK LENGTH CONTROL」

S-I. Aizawa, Convener、ASM 105th Annual Meeting(米国微生物学会第 104 回総会),2005.5.,

Y. Ichinose, F. Taguchi, K. Takeuchi, S. Shibata, S-I. Aizawa; 口頭発表およびポスター, ASM 105th Annual Meeting(米国微生物学会第 104 回総会),2005.5., 「Glycosylated Flagellin and Flagellar Assembly in *P. Syringae* pv. *tabaci*: How Does the Glycosylation Occur and Affect the Flagellar Formation? 」

S-I. Aizawa, Convener および口頭発表、IUMS (国際応用微生物連合同会議) 2005,7

S-I. Aizawa, 口頭発表、Pseudomonas2005、2005.8

本間道夫,口頭発表,第 76 回日本生化学会,2003.10.18,「How does the flagellar motor rotate by ion translocation?」

福岡創、薬師寿治、本間道夫,口頭発表,第 76 回日本生化学会,2003.10.17, 「Analysis of stator and rotor interaction in *Vibrio alginolyticus* and *Escherichia coli* flagellar systems」

本間道夫、薬師寿治、岡部真裕子,口頭発表,第 40 回日本細菌学会中部支部総会,2003.10.14, 「外膜の Na⁺駆動型べん毛モータータンパク質 MotX と MotY の生化学的性質と内膜モータータンパク質 PomA、PomB への関与」

曾和義幸、薬師寿治、本間道夫、石島秋彦,口頭発表,日本生体エネルギー研究会第 29 回討論会,2003.12.16, 「大腸菌で機能するナトリウム駆動型べん毛モーターの回転特性の解析」

福岡創、薬師寿治、本間道夫,口頭発表,日本生体エネルギー研究会第 29 回討論会,2003.12.16, 「Na⁺駆動型べん毛モータータンパク質 PomA 細胞質領域の部位特異的変異導入による解析」

薬師寿治、川岸郁朗、本間道夫,口頭発表,蛋白研セミナー 「脳・神経系の総合プロテオミクス」,2004.3.8, 「細菌のべん毛モータータンパク質 MotY と細菌化学受容体 Tsr の発現と精製」

本間道夫, 口頭発表,膜輸送ナノマシンの構造・作動機構とその制御:公開シンポジウム,2004.7.24, 「ナトリウムイオン駆動型バクテリアべん毛モーターの構造と機能」

楠本晃子、薬師寿治、本間道夫,口頭発表,第 41 回日本細菌学会中部支部総会,2004.10., 「*Vibrio alginolyticus* の極べん毛数増加変異体の解析」

薬師寿治,口頭発表,第 30 回日本生体エネルギー研究会,2004.12.16 「Na⁺共役型バクテリアべん毛モーターはエネルギーを使ってどう動くのだろうか??回転子と固定子の荷電残基の役割」

福岡創,口頭発表,第 30 回日本生体エネルギー研究会,2004.12.16, 「ビブリオ菌べん毛モーター」

ター固定子タンパク質の極局在化：GFP 融合タンパク質を用いた解析から」

薬師寿治, , 口頭発表, 2004 年度べん毛交流会, 2005.3.2-3.4, 「H⁺型大腸菌と Na⁺型ビブリオ菌のべん毛モータータンパク質荷電残基の役割」

福岡 創, 楠本晃子, 薬師寿治, 本間道夫, 口頭発表, 2005 生物物理中部支部, 2005.3.29, 「ビブリオ菌べん毛モーター固定子タンパク質の極局在化」

寺島浩行、薬師寿治、本間道夫, 口頭発表、生化学会中部支部会, 2005.5.21, 「ビブリオ菌 Na⁺駆動型べん毛モーターの精製」

曾和義幸, 曾和義幸、Alex Rowe、薬師寿治、本間道夫、Richard Berry、石島秋彦, 口頭発表, 第 2 回 21 世紀大腸菌研究会, 2005.6.23-24, 「大腸菌で Na⁺駆動型として機能するべん毛モーターの回転計測」

薬師寿治、Jung-Hoon Yang、福岡 創、本間道夫、David F. Blair, 口頭発表, 第 2 回 21 世紀大腸菌研究会, 2005.6.23-24, 「大腸菌で構築した Na⁺共役型べん毛モーターにおける回転子と固定子の荷電残基の役割」

本間道夫, 口頭発表, ゴードン会議、微生物における感覚信号伝達, 2004.1., 「Ion coupling to motor rotation: What is different between H⁺ and Na⁺-driven motor?」

Toshiharu Yakushi, Jung-Hoon Yang, Hajime Fukuoka, Michio Homma and David F. Blair, 口頭発表, BLAST meeting, 2005.1.16-21, 「ELECTROSTATIC INTERACTIONS BETWEEN THE STATOR AND THE ROTOR COMPONENTS IN THE NA⁺-DRIVEN FLAGELLAR MOTOR」

Yoshiyuki Sowa, Alexander D. Rowe, Toshiharu Yakushi, Michio Homma, Akihiko Ishijima and Richard M. Berry, 口頭発表, BLAST meeting, 2005.1.16-21, 「STEPS IN SLOW FLAGELLAR ROTATION」

曾和義幸、Alex Rowe、薬師寿治、本間道夫、Richard Berry、石島秋彦、国内、第 2 回 21 世紀大腸菌研究 2005.6.23、大腸菌で Na⁺駆動型として機能するべん毛モーターの回転計測

薬師寿治、Jung-Hoon Yang、福岡 創、本間道夫、David F. Blair、国内、第 2 回 21 世紀大腸菌研究 2005.6.23、大腸菌で構築した Na⁺共役型べん毛モーターにおける回転子と固定子の荷電残基の役割

薬師寿治、国内、特定領域研究「生体超分子 2005.9.8-バクテリアべん毛モーターの回転子と固定子の精製と結晶化

Jin Yagasaki, Mayuko Okabe, Rie Kurebayashi, Hiroyuki Terashima, Toshiharu Yakushi, and Michio Homma, 国内、第 78 回日本生化学会大会 2005.10.19-22、*Vibrio alginolyticus* のナトリウムイオン共役型べん毛モーターの回転に必須な因子 MotX と MotY に存在するシステイン残基の役割

檜作 洋平 薬師 寿治 川岸 郁朗 本間 道夫、国内、第 78 回日本生化学会大会 2005.10.19-22、大腸菌べん毛モーター P リングタンパク質 FlgI における分子内ジスルフィド結合の役割 The role of the intramolecular disulfide bond in FlgI, the flagellar P-ring component of *Escherichia coli*

福岡創、楠本晃子、薬師寿治、本間道夫、国内、第 41 回日本細菌学会中部支部総会、2005.11.5-6、GFP 融合タンパク質を用いたビブリオ菌の極べん毛モーター固定子タンパク質極局在化の解析

曾和義幸、Alex Rowe、Mark Leake、薬師寿治、本間道夫、Richard Berry、石島秋彦、国内、日本生物物理学会第 43 回年会、2005.11.23-25、バクテリアべん毛モーターにおけるステップ回転の直接観察

寺島浩行、福岡創、薬師寿治、神戸正臣、相沢慎一、本間道夫、国内、第 28 回日本分子生物学会年会、2005.12.7-10、Na⁺駆動型べん毛のモータータンパク質 MotX、MotY の局在と機能

小嶋誠司、蔡荣淑、南野徹、上池伸徳、難波啓一、国内、第 28 回日本分子生物学会年会、2005.12.7-10、プロトン駆動型べん毛モーターの回転機構：固定子 MotA/MotB 複合体中をプロトンはどのように流れるのか？

小嶋 勝、久保瑠美、本間道夫、川岸郁朗、国内、日本生体エネルギー研究会第 31 回討論会「情報とエネルギー」、2005.12.19-21、*Vibrio alginolyticus* のもつ二種類のべん毛モーターの回転制御機構

寺島浩行、福岡創、薬師寿治、神戸正臣、相沢慎一、本間道夫、国内、日本生体エネルギー研究会第 31 回討論会「情報とエネルギー」、2005.12.19-21、海洋性ビブリオ菌べん毛モーターの回転に必須なタンパク質 MotX、MotY の解析

檜作 洋平、薬師 寿治、川岸 郁朗、本間 道夫、Richard Berry、石島秋彦、国内、日本生体エネルギー研究会第 31 回討論会「情報とエネルギー」、2005.12.19-21、大腸菌べん毛モーターP リングタンパク質 FlgI における分子内ジスルフィド結合とリング形成の相関

和田智之、薬師寿治、本間道夫、国内、べん毛交流会 2006.3.5-7、ビブリオ菌極べん毛モーター固定子タンパク質 PomA/PomB 複合体の極局在の解析

小嶋 勝、鈴木大介、薬師寿治、本間道夫、川岸郁朗、国内、べん毛交流会 2006.3.5-7、*Vibrio alginolyticus* のもつ二種類のべん毛モーターの回転制御機構

檜作洋平、薬師寿治、川岸郁朗、本間道夫、国内、べん毛交流会 2006.3.5-7、べん毛 P リングたんぱく質 FlgI とジスルフィド結合

曾和義幸、Alexander D. Rowe、Mark C. Leake、薬師寿治、本間道夫、石島秋彦 & Richard M. Berry、国内、べん毛交流会 2006.3.5-7、べん毛モーターのステップ

福岡 創、曾和義幸、小嶋誠司、石島秋彦、本間道夫、国内、べん毛交流会、2006.3.5-7、蛍光タンパク質を用いたべん毛モーター構成因子の観察

寺島浩行、福岡創、薬師寿治、小嶋誠司、相沢慎一、本間道夫、国内、生物物理中部支部会 2006.3.24、ビブリオ菌 Na⁺駆動型べん毛基部体に結合するモータータンパク質 MotX および MotY の役割

楠本晃子、薬師寿治、小嶋誠司、本間道夫、国内、第 79 回日本細菌学会総会 2006.3.29-31、

Vibrio alginolyticus の極べん毛数制御因子 FlhF と FlhG の相互作用解析

谷ヶ崎仁、岡部真裕子、薬師寿治、小嶋誠司、本間道夫、国内、第 79 回日本細菌学会総会、2006.3.29-31、Na⁺駆動型べん毛モータータンパク質の MotX と MotY におけるジスルフィド分子内架橋の役割

本間道夫、薬師寿治、小嶋誠司 第 43 回日本細菌学会中部支部総会 (ば・る・るプラザ岐阜) 2006.10.19-20 「*Vibrio alginolyticus* 極べん毛モータータンパク質 MotX と MotY が作る基体 T リング構造」

楠本晃子、薬師寿治、小嶋誠司、本間道夫 第 43 回日本細菌学会中部支部総会 (ば・る・るプラザ岐阜) 2006.10.19-20 「*Vibrio alginolyticus* 極べん毛の形成位置と本数の制御における FlhF の役割」

篠原明梨 平成 18 年度「ソフトナノマシン」領域会議(名古屋 住友生命ビル) 2006.10.25-26 「Na⁺駆動型べん毛モータータンパク質 MotY の構造と役割」

和田 智之、福岡 創、小嶋 誠司、本間 道夫 日本生体エネルギー研究会第 32 回討論会「様々なエネルギー代謝」(東京工業大学デジタル多目的ホール) 2006.12.14-15 「ナトリウムイオン駆動型べん毛モーター構築における共役イオンの関与」

楠本晃子、寺島浩行、篠原明梨、薬師寿治、小嶋誠司、本間道夫 2006 年度べん毛研究交流会(JST 研究成果活用プラザ広島) 2007.3.5-7 「Genes for the regulation of flagellar number and location on cell of *Vibrio alginolyticus* (極べん毛の数と位置を制御する遺伝子)」

小嶋誠司、篠原明梨、今田勝己、薬師寿治、佐久間麻由子、本間道夫 日本生物物理学会中部支部討論会(岡崎統合バイオサイエンスセンター) 「ナトリウムイオン駆動型べん毛モータータンパク質 MotY の結晶構造解析」

Aizawa, S.-I. BLAST IX MEETING (第 9 回細菌運動とシグナル伝達に関する国際会議) (Laughlin, Nevada) 2007.1.14-19 「Roles of the hook in a rotating tethered cell」

Seiji Kojimu, Akari Shinohara, Katsumi Imada, Toshiharu Yakushi, Mayuko Sakuma, Michio Homma BLAST IX MEETING(第 9 回細菌運動とシグナル伝達に関する国際会議) Laughlin, Nevada) 2007.1.14-19 「Crystal structure of MotY, an essential component for the torque generation of sodium-driven polar flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*」

ポスター発表 (国内会議 61 件、国際会議 38 件)

(国内学会)

柴田敏史、相沢慎一、露無慎二、ポスター、第 41 回生物物理学会、2003.9.23、「植物病原菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* EC1 の運動性と病原性への関与」

小川剛史、高橋則子、相沢慎一、ポスター、第 41 回生物物理学会、2003.9.23、「polyhook mutant を用いた mot 遺伝子の発現時期の解明」

神戸正臣、相沢慎一、JenaUrs、嶋田勝彦、ポスター、第 41 回生物物理学会、2003.9.23、「*Caulobacter crescentus* の自発的べん毛放出のしくみ」

石川直洋, 中木原江利, 溝手朝子, 相沢慎一、ポスター, 第 41 回生物物理学会,2003.9.23, 「Helicobacter pylori の走化性レセプター変異株の環境応答」

谷ヶ崎仁, 南澤究, 相沢慎一、ポスター, 第 41 回生物物理学会,2003.9.23, 「ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* の 2 種類のべん毛と運動性」

平野貴謙, 南澤究, 相沢慎一、ポスター, 第 41 回生物物理学会,2003.9.23, 「ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* DJ2 株のべん毛構造と分泌タンパクの解析」

齋藤崇, 水崎秀明, 相沢慎一、ポスター, 第 42 回生物物理学会,2004.12.15, 「Azospirillum brasilense のべん毛基部体の解析」

真下拓史, 山口滋, 相沢慎一、ポスター, 第 42 回生物物理学会,2004.12.15, 「べん毛モーターの回転機構」

平野貴謙, 柴田敏史, 谷知己, 大西浩平, 相沢慎一、ポスター, 第 42 回生物物理学会,2004.12.15, 「べん毛フックの長さ調節蛋白質 FliK の細胞質内での役割」

柴田敏史, 相沢慎一、ポスター, 第 42 回生物物理学会,2004.12.15, 「Pseudomonas aeruginosa fleN 変異株を用いたべん毛構築数制御の解析」

石川直洋, 相沢慎一、ポスター, 第 42 回生物物理学会,2004.12.15, 「Saprospira grandis の滑走運動装置」

水崎秀明, 山崎裕未子, 秋光和也, 相沢慎一、嶋田勝彦, ポスター, 第 42 回生物物理学会,2004.12.15, 「Monoterpene Volatiles の Salmonella typhimurium に対する抗菌作用と病原性タンパク質分泌への影響」

柴田敏史・相沢慎一・露無慎二、ポスター、日本植物病理学会、「植物病原性細菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* EC1 の運動性の病原性への関与」

Shibata, S. Alam, M. and Aizawa, S.-I., ポスター, BLAST 会議、2005.1., 「SYMMETRY IN THE FLAGELLAR WORLD; FLAGELLAR POLYMORPHISM IN THE DEEP SEA BACTERIA *Idiomarina loihiensis*」

H. Mizusaki, Y. Yamazaki, K. Akimitsu, S-I. Aizawa; ポスター, ASM 105th Annual Meeting(米国微生物学会第 104 回総会),2005.5., 「Monoterpenes of Plant Essential Oils Specifically Inhibit the Type III Secretion of Salmonella Virulence Factors」

T. Hirano, J. Yagasaki1,, N. Haga, S-I. Aizawa; ポスター, 国際学会,ASM 105th Annual Meeting(米国微生物学会第 104 回総会),2005.5., 「Analysis of Protein Secretion Systems in *Bradyrhizobium japonicum*」

柴田敏史、相沢慎一、Nyles W. Charon 国内、日本生物物理学会第 43 回年会、2005.11.23-25 「*Borrelia burgdorferi* のペリプラズミックべん毛の構造解析」

藤井美加子、柴田敏史、相沢慎一、国内、日本生物物理学会第 43 回年会、2005.11.23-25、「べん毛多型ファミリーのらせんパラメーターによる分類」

神戸正臣、蛭沢達郎、相沢慎一、国内、日本生物物理学会第43回年会、2005.11.23-25、
「根粒菌 *Azospirillum* の2つのべん毛系の構造解析」

高橋則子、柴田敏史、相沢慎一、Kelly Hughes、国内、日本生物物理学会第43回年会、
2005.11.23-25、「べん毛フックの長さ制御における FliK 中央ドメインの役割」

真下拓史、相沢慎一、山口滋、国内、日本生物物理学会第43回年会、2005.11.23-25、「サ
ルモネラ菌低速回転べん毛モーターの構造解析」

水崎秀明、山崎裕未子、秋光和也、相沢慎一、国内、日本生物物理学会第43回年会、
2005.11.23-25、「*Salmonella typhimurium* の病原性遺伝子発現における Monoterpene とビ
タミン類の影響」

T. Hirano, J. Yagasaki, N. Haga, S-I. Aizawa, 国際学会、105th ASM(米国微生物学会)
年会 2005.6.5-6.9. Analysis of Protein Secretion Systems in *Bradyrhizobium japonicum*

Mizusaki, H., Yamazaki, Y., Akimitsu, K., & Aizawa, S-I. 国際学会、105th ASM(米国微生物学会)
年会 2005.6.5-6.9. Monoterpenes of plant essential oils specifically inhibit the type III secretion of
Salmonella virulence factors.

Ichinose, Y., Taguchi, F., Takeuchi, K., Shibata, S., & Aizawa, S-I. 国際学会、105th ASM(米国微
生物学会)年会 2005.6.5-6.9. Glycosylated flagellin and flagellar assembly in *P. syringae* pv.
Tabaci.

Takahashi, H., Aizawa, S.-I. and Hughes, K.T. 国際学会、105th ASM(米国微生物学会)
年会 2005.6.5-6.9. Length Determination of the Bacterial Flagellar Rod is Intrinsic
to the Rod structural Subunit FlgG and Hook-Length Control Protein FliK

Fujii, M., Shibata, S., and Aizawa, S.-I. 国際学会、105th ASM(米国微生物学会)年会
2005.6.5-6.9. Classification of the Flagellar Polymorphic Family by Helical Parameters

Morehouse, K.A., Kanna, M., Evans, K.J., Aizawa, S.-I. and Sockett, R.E. 国際学会、
105th ASM(米国微生物学会)年会 2005.6.5-6.9. Assaying the roles of Flagellar Motor
Proteins and the Fate of Predator Flagellar Filaments During Predation by *Bdellovibrio*」

Mashimo, T., Yamaguchi, S., and Aizawa, S.-I. 国際学会、ゴードン会議 2006.1.22-27,
Temperature sensitivity of the flagellar switch components FliGMN in torque generation.

Kanbe, M., Stephens, B., Alexandre, G., Ebisawa, T., Aizawa, S.-I., 国際学会、ゴ
ードン会議 2006.1.22-27. Characterization of the two flagellar systems of *Azospirillum*
brasiliense.

Shibata, S., Takahashi, N., Chevance, F.F.V., Hughes, K.T., and Aizawa, S.-I. Fifth East Asian
Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
(Okinawa Convention Center) 2006.11.12-16 「Correction between the flagellar hook length and
FliK molecular size」

Hashimoto, M., Mashimo, T., and Aizawa, S.-I. Fifth East Asian Biophysics Symposium &
Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa Convention Center)

2006.11.12-16 「 Influences of the hook length on the rotational vibration of a tethered cell 」

Kanbe, M., Ebisawa, T., Stephens, B., Alexander, G., and Aizawa, S.-I. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa Convention Center) 2006.11.12-16 「 Structural analysis of the flagella in the soybean symbiont *Azospirillum brasilense* 」

Takahashi, N., Chevance, F.F.V., Hughes, K.T., and Aizawa, S.-I. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa Convention Center) 2006.11.12-16 「 Analysis of the flagellar rod in *flgG* mutants 」

Mashimo, T., Hashimoto, M., Yamaguchi, S., and Aizawa, S.-I. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa Convention Center) 2006.11.12-16 「 Temperature sensitive sites in the rotor components of flagellar motor 」

Mizusaki, H., Yamasaki, Y., Akimitsu, K., and Aizawa, S.-I. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa Convention Center) 2006.11.12-16 「 Generegulation for a specific inhibition of the type III secretion of *Salmonella typhimurium* virulence factors by monoterpene of plant essential oils 」

Kanbe, M., Yamasaki, J., Zehner, S., Göttfert, M., and Aizawa, S.-I, BLAST(Bacterial Locomotion & Signal Transduction) IX Meeting (Laughlin, Nevada) January 14-19, 2007 「 Characterization of two sets of sub-polar flagella in *Bradyrhizobium japonicum* 」

Shibata, S., Takanashi, N., Chevance, F., Hughes, K., and Aizawa, S.-I. BLAST(Bacterial Locomotion & Signal Transduction) IX Meeting (Laughlin, Nevada) January 14-19, 2007 「 The real role of FliK in the hook length control 」

Takanori, Hirano., Noriko Takahashi, Shin-Ichi Aizawa and Kelly Hughes. BLAST(Bacterial Locomotion & Signal Transduction) IX Meeting (Laughlin, Nevada) January 14-19, 2007 「 Hook length versus rod plus hook length: longer rod structure bypasses negative regulation of flagellar assembly in *salmonella* 」

岡部真裕子, 岡部真裕子, 薬師寿治, 本間道夫, ポスター, 第 76 回日本細菌学会, 2003.4.1, 「 外膜に局在するべん毛モーター蛋白質 MotX と MotY の生化学的性質 」

薬師寿治, 岡部真裕子, 本間道夫, ポスター, 第 76 回日本細菌学会, 2003.4.1, 「 ナトリウムイオン駆動型べん毛モーター蛋白質 MotX による生育阻害の再検討 」

服部奈緒子, 薬師寿治, 小嶋勝, 本間道夫, ポスター, 第 41 回生物物理学会, 2003.9.23, 「 Na⁺駆動型べん毛モーターの固定子 PomB に保存されたペプチドグリカン結合タンパク質相同領域の欠失変異体の解析 」

福岡創, 薬師寿治, 本間道夫, ポスター, 第 41 回生物物理学会, 2003.9.23, 「 Na⁺駆動型べん毛モータータンパク質 PomA の温度感受性変異体の解析 」

岡部真裕子, 岡部真裕子, 薬師寿治, 本間道夫, ポスター, 第 41 回生物物理学会, 2003.9.23, 「 外膜の Na⁺駆動型べん毛モータータンパク質 MotX と MotY の生化学的相互作用 」

曾和義幸, 薬師寿治, 本間道夫, 石島秋彦, ポスター, 第 41 回生物物理学会, 2003.9.23, 「 大

腸菌で機能する Na⁺駆動型モーターの回転計測」

薬師寿治、篠原明梨、岡部真裕子、本間道夫,ポスター,第76回日本生化学会,2003.10.17,
「Purification and characterization of soluble form of MotY, an outer membrane motor
component of the Na⁺-driven flagella」

岡部真裕子、薬師寿治、本間道夫,ポスター,第76回日本生化学会,2003.10.17,「Alteration
in the localization of PomA/PomB complex upon co-expression of MotX, an outer membrane
motor protein of the sodium-driven flagella」

薬師寿治、依光朋宏、本間道夫,ポスター,日本生体エネルギー研究会第29回討論
会,2003.12.15,「バクテリアべん毛モーターの蛋白質, PomA-PomB間の相互作用と複合体形
成」

岡部真裕子、薬師寿治、本間道夫,ポスター,第77回日本細菌学会総会,2004.4.3,「Na⁺駆
動型べん毛における外膜モータータンパク質と内膜モータータンパク質の相互作用」

福岡 創、楠本 晃子、薬師 寿治、本間 道夫,ポスター,第42回生物物理学会,2004.12.15,
「Na⁺駆動型べん毛モーター固定子タンパク質 PomA と PomB のモーターへの組み込み過
程, Assembly of the stator proteins, PomA and PomB, into flagellar motor」

檜作洋平、檜作洋平、薬師寿治、川岸郁朗、本間道夫,ポスター,第42回生物物理学
会,2004.12.15,「大腸菌べん毛モーターP-リングタンパク質 FlgI に形成される分子内ジス
ルフィド結合の解析」

薬師寿治、高清水一慶、本間道夫,ポスター,第42回生物物理学会,2004.12.15,「Na⁺駆動型
べん毛モータータンパク質 PomA の細胞質領域の過剰発現と精製」

楠本晃子、神坂健司、寺島浩行、篠原明梨、薬師寿治、本間道夫,ポスター,第42回生物物
理学会,2004.12.15,「*Vibrio alginolyticus*における FlhF と FlhG による極べん毛数制御」

篠原 明梨、篠原明梨、佐久間麻由子、薬師寿治、今田勝巳、本間道夫,ポスター,第42回
生物物理学会,2004.12.15,「X線結晶構造解析を目指したナトリウム駆動型べん毛モーター
タンパク質 MotY の精製と結晶化」

曾和義幸、Alex Rowe、薬師寿治、本間道夫、Richard Berry、石島秋彦,ポスター,第42回
生物物理学会,2004.12.16,「細菌べん毛モーター低速回転時のステップ検出」

寺島浩行、薬師寿治、神戸正臣、相澤慎一、本間道夫,ポスター,第42回生物物理学
会,2004.12.15,「ビブリオ菌 Na⁺駆動型べん毛モーターの精製」

曾和義幸、薬師寿治、本間道夫、石島秋彦、,ポスター,第30回日本生体エネルギー研究
会,2004.12.16-18,「大腸菌で機能するナトリウム駆動型モーターのステップ検出」

篠原 明梨、,ポスター,第30回日本生体エネルギー研究会,2004.12.16-18,「外膜局在ナト
リウム駆動型べん毛モータータンパク質 MotY の発現・精製・性質」

曾和義幸, ,ポスター,ゴードン会議、微生物における感覚信号伝達,2004.1.,

塩見大輔,ゴードン会議 微生物における感覚信号伝達,2004.1.,

Okabe, M., Yakushi, T. & Homma, M.ポスター, (New Orleans), ASM 104th Annual Meeting(米国微生物学会第104回総会),2004.5.,

薬師寿治, ,ポスター, (New Hampshire), Gordon Research Conferences Bac cell surfaces,2004.6.27-7.2.,

Jung-Hoon Yang, Jung-Hoon Yang, Toshiharu Yakushi, Hajime Fukuoka, Michio Homma and David F. Blair,ポスター, BLAST meeting,2005.1.16-21, 「STUDIES ON ROTOR-STATOR INTERACTIONS IN THE FLAGELLAR MOTOR OF E. COLI」

Akiko Kusumoto, Kenji Kamisaka, Toshiharu Yakushi, Hiroyuki Terashima, Akari Shinohara, and Michio Homma,ポスター, BLAST meeting,2005.1.16-21, 「REGULATION OF THE POLAR FLAGELLAR NUMBER BY FLHF AND FLHG IN VIBRIO ALGINOLYTICUS」

寺島浩行、薬師寿治、本間道夫、国内、生化学会中部支部会、国内、2005.5.21、ビブリオ菌 Na⁺駆動型べん毛モーターの精製

寺島浩行、国内、特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第1回ワークショップ、2005.9.8、Na⁺駆動型べん毛モーターの精製：回転に必要なタンパク質 MotX と MotY の基部体との相互作用

福岡 創, 曾和 義幸, 依光 朋宏, 石島 秋彦, 本間 道夫、国内、日本生物物理学会第43回年会、2005.11.23-25、GFP 融合回転子タンパク質によるべん毛モーターの生菌における可視化

薬師寿治, Jung-Hoon Yang, 福岡 創, 本間道夫, David F. Blair、国内、日本生物物理学会第43回年会、2005.11.23-25、べん毛モーターの回転子と固定子の荷電残基の役割：大腸菌で機能的な Na⁺共役型キメラモーターを用いた解析

小嶋 勝, 久保瑠美、本間道夫、川岸郁朗、国内、日本生物物理学会第43回年会、2005.11.23-25、*Vibrio alginolyticus* のもつ二種類のべん毛モーターは単一の CheY により異なる様式で制御される

篠原明梨、佐久間麻由子、薬師寿治、今田勝巳、本間道夫、国内、日本生物物理学会第43回年会、2005.11.23-25、Na⁺駆動型細菌べん毛モータータンパク質 MotY 結晶の改良と重原子探索

楠本晃子、篠原明梨、薬師寿治、本間道夫、国内、日本生物物理学会第43回年会、2005.11.23-25、*Vibrio alginolyticus* の極べん毛数制御因子 FlhF と FlhG の局在と機能、Subcellular localization of the polar-flagellar number regulators FlhF and FlhG in *Vibrio alginolyticus*

檜作 洋平、薬師 寿治、川岸 郁朗、本間 道夫、国内、日本生物物理学会第43回年会、2005.11.23-25、大腸菌べん毛モーターP リングタンパク質 FlgI：分子内ジスルフィド結

合とリング形成の解析

福岡創 薬師寿治 神戸正臣 相沢慎一 本間道夫、国内、日本生物物理学会第43回年会、2005.11.23-25、Na⁺駆動型べん毛モーターの回転に必須なタンパク質 MotX、MotY と基体との結合

小嶋誠司、蔡栄淑、南野徹、上池伸徳、難波啓一、国内、日本生物物理学会第43回年会、2005.11.23-25、サルモネラ菌べん毛モーター固定子タンパク質 MotB のペリプラズム側断片の解析

谷ヶ崎仁、本間道夫、国内、日本生物物理学会第43回年会、2005.11.23-25、Dissection of role of MotY in the Na⁺-driven flagellar rotation of *Vibrio alginolyticus*

曾和義幸、Alexander Rowe、Mark Leake、薬師寿治、本間道夫、国内、日本生体エネルギー研究会第31回討論会「情報とエネルギー」、2005.12.19-21、べん毛モーター回転ステップの計測

篠原明梨、今田勝巳、佐久間麻由子、薬師寿治、本間道夫、国内、日本生体エネルギー研究会第31回討論会「情報とエネルギー」2005.12.19-21、ナトリウム駆動型べん毛モーター蛋白質 MotY の結晶構造解析

福岡 創， 曾和義幸， 小嶋誠司， 薬師寿治， 石島秋彦， 本間道夫、国内、日本生体エネルギー研究会第31回討論会「情報とエネルギー」、2005.12.19-21、GFP 融合タンパク質によるべん毛構成タンパク質の可視化

谷ヶ崎仁、岡部真裕子、紅林里枝、薬師寿治、本間道夫、国内、日本生体エネルギー研究会第31回討論会「情報とエネルギー」、2005.12.19-21、ビブリオ菌べん毛モータータンパク質 MotX・MotY におけるシステイン残基の役割

楠本晃子、神坂健司、寺島浩行、篠原明梨、薬師寿治、小嶋誠司、本間道夫、国内、日本生体エネルギー研究会第31回討論会「情報とエネルギー」、2005.12.19-21、*Vibrio alginolyticus* の極べん毛はどのようにして1本に制御されているのか？

Hajime Fukuoka, Yoshiyuki Sowa, Seiji Kojima, Akihiko Ishijima, and Michio Homma、国際学会、06 ゴードン会議 2006.1.22-27、Functional GFP fusions of rotor and stator of the bacterial flagellar motor

Yoshiyuki Sowa, Alexander D. Rowe, Mark C. Leake, Toshiharu Yakushi, Michio Homma, Akihiko Ishijima & Richard M. Berry、国際学会、06 ゴードン会議 2006.1.22-27、Direct observation of steps in the bacterial flagellar rotation

Seiji Kojima, Yukio Furukawa, Tohru Minamino, Keiichi Namba、国際学会、2006 生物物理(US2006.2.21)、Structural and mutational studies of the periplasmic domain of MotB, a stator component of the bacterial flagellar motor

楠本晃子、薬師寿治、小嶋誠司、本間道夫、国際、第8回日韓微生物シンポジ 2006.3.29-30、Regulation of polar flagellar number by the *flhF* and *flhG* genes in *Vibrio*.

寺島浩行 小嶋誠司 本間道夫 日本生体エネルギー研究会第32回討論会(東京工業大学)

デジタル多目的ホール)「様々なエネルギー代謝」2006.12.14-15「細菌べん毛モーター固定子タンパク質の無細胞タンパク合成システムを用いた合成」

寺島浩行 小嶋誠司 本間道夫分子生物学会 2006 フォーラム (名古屋国際会議場) 2006.12.6-8「無細胞タンパク質合成系を用いた細菌べん毛モーター固定子の膜再構成の試み」

和田 智之、福岡 創、小嶋 誠司、本間 道夫分子生物学会 2006 フォーラム (名古屋国際会議場) 2006.12.6-8「ナトリウムイオン駆動型べん毛モーターのステーターの局在はナトリウムイオンに依存する」

鈴木 大介、伊東 靖晃、百武 晃宏、本間 道夫、川岸 郁朗分子生物学会 2006 フォーラム (名古屋国際会議場) 2006.12.6-8「コレラ菌アミノ酸受容体の同定と解析」

篠原明梨、今田勝巳、佐久間麻由子、薬師寿治、小嶋誠司、本間道夫分子生物学会 2006 フォーラム (名古屋国際会議場) 2006.12.6-8「ナトリウム共役型べん毛モータータンパク質 MotY の結晶構造」

小原円、薬師 寿治、小嶋 誠司、本間 道夫分子生物学会 2006 フォーラム (名古屋国際会議場) 2006.12.6-8「ビブリオ菌極べん毛モーター固定子タンパク質 PomA の C 末端荷電アミノ酸残基の解析」

楠本晃子、小嶋誠司、本間道夫第 80 回日本細菌学会総会 (アジア太平洋トレードセンター) 2007.3.26-28「FlhG が FlhF の極局在を調節することで *Vibrio alginolyticus* の極べん毛は 1 本に制御されている」

Seiji Kojima, Yukio Furukawa, Tohru Minamino, Keiichi Namba 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Kyoto) 2006.6.18-23「Biochemical studies of the periplasmic domain of MotB, a stator component of the bacterial flagellar motor」

Hajime Fukuoka, Yoshiyuki Sowa, Seiji Kojima, Akihiko Ishijima, Michio Homma 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Kyoto) 2006.6.18-23「Visualization of rotor and stator components in a rotating bacterial flagellar motor」

Akari Shinohara, Katsumi Imada, Mayuko Sakuma, Toshiharu Yakushi, Seiji Kojima and Michio Homma Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa Convention Center) 2006.11.12-16「Crystal structure of MotY ; an essential component of the torque generator of Na⁺-driven flagellum in *Vibrio alginolyticus*」

Tomoyuki Wada, Hajime Fukuoka Seiji Kojima Michio Homma, Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa Convention Center) 2006.11.12-16「Localization of the stator of the Na⁺-driven flagellar motor dependent on Na⁺ ion」

Hiroyuki Terashima, Seiji Kojima, Michio Homma, Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa Convention Center) 2006.11.12-16「Attempt of functional reconstitution of stator of the bacterial flagellar motor」

Madoka Obara, Toshiharu Yakushi, Seiji Kojima, Michio Homma, Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa Convention Center) 2006.11.12-16 「The role of charged residues in C-terminus of PomA in *V. alginolyticus*」

Akiko Kusumoto, Hiroyuki Terashima, Akari Shinohara, Toshiharu Yakushi, Seiji Kojima, Michio Homma, Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa Convention Center) 2006.11.12-16 「Mutational studies of GTP-binding motif of FlhF in regulation of the number and location of flagella in *Vibrio alginolyticus*」

Hiroyuki Terashima, Hajime Fukuoka, Toshiharu Yakushi, Seiji Kojima and Michio Homma, BLAST(Bacterial Locomotion & Signal Transduction) IX Meeting (Laughlin, Nevada) January 14-19, 2007 「MotX and MotY from the T-ring on the basal body of Na⁺-driven flagella and are required stator formation」

(4)特許出願

国内出願 (1件)

1. 「かんきつ類芳香成分による病原性細菌の毒素分泌抑制作用」、相沢慎一、独立行政法人科学技術振興機構、平成15年5月5日、出願番号

海外出願 (0件)

(5)受賞等

受賞

新聞報道

【本間グループ】

バクテリアのべん毛回転を解明 ナノマシン開発に貢献 名大
平成17年10月6日、日刊工業新聞

バクテリアべん毛モーター 回転ステップ状変位を計測 名大など研究グループ ナノサイズ
アクチュエーター開発に道、平成17年10月6日、化学工業新聞

細菌の「モーター」観察 名古屋大学
平成17年10月14日、朝日新聞 科学 大学発

バクテリア鞭毛モーター 回転運動 ステップ状変位計測 名大の石島氏グループ ナノマシン
開発期待
平成17年10月14日、科学新聞

細菌のべん毛 動く仕組み解明 名古屋大など
平成17年10月20日、日経産業新聞

その他

7 研究期間中の主な活動(ワークショップ・シンポジウム等)

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H18.3.24	生物物理学会中部支部会	名古屋大学	70人	中部地区の生物物理学会による研究発表会
H17.12.19-21	生体エネルギー研究会	名古屋大学	120人	全国レベルの生体エネルギー関連研究の研究会発表会とシンポジウム
H19, 3, 5-7	べん毛研究交流会	東広島市	120人	日本のべん毛研究者が一同に会し、研究成果を披露、討論した。
H19. 9. 11	領域横断会議	東広島市	30人	べん毛構造を利用したバイオミネラリゼーションによるナノ構造構築に関するJST領域横断検討会

8 研究成果の展開

(1)他の研究事業への展開

(2)実用化に向けた展開

9 他チーム、他領域との活動とその効果

(1)領域内の活動とその効果

領域会議で蛍光顕微鏡を用いた研究成果が多く出された。そこでプロジェクト発足当時心に描いていたべん毛モーター回転の蛍光顕微鏡観察を実行すべく、他チームの専門家の意見を聞いた。特に木下チームの伊藤博康さんと足立さんには細かな実験指導を受けた。そのおかげでテザードセル法の実態が明らかになってきた。

(2)領域横断的活動とその効果

茅領域の山下一郎研究代表(松下電器先端技術研究所)のグループと「べん毛構造を利用したバイオミネラリゼーションによるナノ構造構築に関するJST領域横断検討会」を開催し双方のグループが研究成果を披露し、その結果について意見交換した。べん毛を用いたナノワイヤーの作製はナノテクノロジーの基盤技術の要である。我々チームは金属を吸着することのできるべん

毛を作製することに成功したが、それらを実際に応用するとなるとわからないことが多い。応用面につよい松下グループの助言により、実用化への方向が見えてきた。

10 研究成果の今後の貢献について

(1) 科学技術の進歩が期待される成果

我々のチームは新しい技術の開発よりは、現在一般に信じられているべん毛モーターのトルク発生における物理的原理の追求に力を注いでいる。そのためにはこれまでに用いられた手法および得られたデータの信憑性について厳しい検討を加え、従来のべん毛モーター像にいくつかの間違いがあることを指摘してきた。今後新たな視点にたつ実験が世界的に出てくることを期待している。

(2) 社会・経済の発展が期待される成果

上記のべん毛を用いたナノワイヤー作製は実現すれば、ナノテクノロジーの分野での発展は大きい。また、べん毛関連の研究で実用に付される可能性のあるのは、有用タンパク質の大量発現におけるべん毛タンパク質輸送系の原理の応用である。すでに見切り発車で種々の有用タンパク質の大量発現系が多くの国の研究グループで実現されているが、さらに系の欠点を改良するためには、我々に基礎研究(特にフックの長さ制御研究はタンパク質輸送系の要である)は欠かせない。

11 結び

科学研究の最先端はいつでも五里霧中で進む方向さえ定かではないのだが、CREST プロジェクトとはそのような提案にも寛容に対応してくれ、なおかつ辛抱強く成果の出るのを待ってくれた。おかげで当初想像さえしていなかった成果が得られ、再び新たなべん毛研究の芽が出てきた。プロジェクトの各チームの運営はすっかり自分たちに任せられたので、私なりの研究方針で指導でき、参加メンバーの全員の論文を出すことができた。プロジェクト終了後は研究に残る人と会社に行く人と別れるが、どこに身を置こうとも科学する心を忘れないことを指導してきた。将来、各人が各職場で現状に甘んずることなく常に何かを発見するような科学の探究心を持ち続けることを信じている。

【相沢研究グループの集合写真】



【本間研究グループ:春のお花見】

