

## 第三のイオンで動くナノマシンの発見！

### ～直径わずか40nm！人工ナノマシンや生体分子スイッチの創成が期待～

#### 【概要】

東洋大学(学長 竹村牧男)生命科学部生命科学科教授の伊藤政博と同大学院博士前期課程2年在籍の佐野元彦は、大阪大学大学院生命科学研究科の寺原直矢研究員(平成20年度、東洋大学大学院博士後期課程卒業、博士(生命科学))と共同で、生体ナノマシンとして注目を集めている細菌運動器官のべん毛<sup>もう</sup>モーター(※1)でこれまで報告例のない第三のイオンをエネルギーとして利用できるハイブリッド型生物モーターを極限環境微生物(※2)の好アルカリ性細菌(※3)から発見しました。東洋大学生命科学部とバイオナノエレクトロニクス研究センターでは、これまで極限微生物の生態および分子生物学的解析とその利用を他の大学に先駆けて積極的に展開してきました。今回の成果は、その現れといえます。

べん毛モーターは、これまでプロトン(H<sup>+</sup>)またはナトリウムイオン(Na<sup>+</sup>)のどちらかを共役イオンとして駆動すると考えられてきました。しかし、今回、エネルギー源として新たに**第三のイオンであるカリウムイオン(K<sup>+</sup>)を利用できる生物モーターの発見**は、これまでの常識を覆す研究報告で、いまだ未解明な課題が多い生体分子ナノマシンの世界の理解に大きく貢献するものです。この成果は**9月25日**に電子ジャーナル PLOS ONE(プロス・ワン)に掲載されました。

#### 【背景】

“**回転している**”という発見から40年近くたった細菌の運動器官であるべん毛<sup>もう</sup>の回転機構の詳細は、現在も解明されていません。べん毛モーターは、直径40nm(ナノメートル)程度の“**ナノマシン**”であり、細胞膜に埋め込まれていて、細胞膜を横切るプロトン(H<sup>+</sup>)かNa<sup>+</sup>の電気化学的駆動力(プロトン駆動力とナトリウム駆動力という(※4))によってべん毛を回転させます。べん毛のモーターの駆動部は、**回転子と固定子**からなり(図1)、固定子であるMot複合体は、イオンチャンネルとして機能し、チャンネル中をイオンが通過するときにべん毛の回転子を回転させる駆動力を発生させると考えられています(つまり、**固定子=エネルギー変換ユニット**と考えることができます)。好アルカリ性バチルス属細菌(※5)は、高アルカリ性pHでH<sup>+</sup>が共役イオンとして利用しづらいため、その代わりにNa<sup>+</sup>駆動型のべん毛モーター固定子MotPSを持つものが見つかっていました。しかし、今回、報告する好アルカリ性細菌 *Bacillus alcalophilus* Vedder1934(バチルス・アルカロフィラス・ベダー1934)株(※6)は、これまで報告されていた好アルカリ性細菌が持つNa<sup>+</sup>駆動型の固定子MotPS複合体とは異なるイオンを利用できるように**環境適応進化したモーター**を持っていました。本研究では、Vedder1934株が第三のイオンを利用して運動性を有しているべん毛モーターに着目して研究を行いました。

#### 【研究方法の概要】

初めにVedder1934株のべん毛モーター固定子をコードする遺伝子をPCR法でクローニングし、その塩基配列を解読しました。そして、この菌が持つ固定子は、Na<sup>+</sup>駆動型のMotPSの特徴を持つことがわかりました。また、イオンチャンネルのイオン選択性に関与するアミノ酸残基がこれまで知られていたロイシンではなくメチオニンであるという特徴がありました(図2)。更に、Vedder1934株は、通常的好アルカリ性細菌が生育にNa<sup>+</sup>を要求するのに対して、Na<sup>+</sup>がなくてもK<sup>+</sup>で生育するという特徴がありました(図3)。そこで、Vedder1934株が高アルカリ性pHでK<sup>+</sup>イオンを利用して遊泳するのかを検証しました(図4)。次に、Vedder1934株での遺伝子操作技術が確立されていなかったことから、遺伝子操作の確立している好中性細菌の大腸菌(*Escherichia coli*)にVedder1934株由来のmotPS遺伝子(BA-motPS)を導入し、この株を用いて、遊泳速度の測定、Mot複合体の特異的阻害剤の効果などの検証を行いました。最後に、固定子のイオン選択性に関わる領域をMotSサブユニットから同定し、この領域に変異を導入して、Na<sup>+</sup>とK<sup>+</sup>両方のイオンを利用できる野生型BA-MotPSから、Na<sup>+</sup>が使えてK<sup>+</sup>を利用できなくなった退化型(先祖返り型)の変異型の作製を試みました。

## [結果の概要]

Vedder1934 株のもつべん毛モーター固定子 MotPS は、 $\text{Na}^+$ と $\text{K}^+$ の2種類のイオンを利用できることを明らかにしました。これまで、細菌のもつべん毛モーターで $\text{H}^+$ と $\text{Na}^+$ 以外の第3のイオンである $\text{K}^+$ を利用して遊泳をする生物の報告例はなく新規な成果を得ることができました。これらの結果を、模式的に表したものが、[図5](#)です。

また、以前の研究よりイオン選択性を規定するのは、MotB サブユニットとMotS サブユニットであることがわかっており、さらに、よく保存された領域が膜貫通領域付近であることから、Vedder1934 株由来の MotS サブユニットの膜貫通領域付近にイオン選択性を規定する領域の存在が示唆されていました。そこで、Vedder1934 株の MotS サブユニットのイオン選択性に重要だと考えられるアミノ酸残基のメチオニン(Mと表記)を $\text{Na}^+$ 駆動型固定子間で保存性が高いロイシン(Lと表記)に置換した株を作成しました。[\(図2\)](#)。そして、BAIc-MotS にアミノ酸置換(M33L)を導入した変異型固定子遺伝子 BAIc-motS-M33L を作成しました。最初に、大腸菌 EC-BAPS-MotS\_M33L 株を構築し、遊泳速度を測定しました。その結果、いずれの株においても $\text{K}^+$ を利用できない $\text{Na}^+$ 駆動型のみ<sup>の表現型を示しました</sup>[\(図6\)](#)。これにより、べん毛モーター固定子においてイオン選択性に重要な役割を果たしているアミノ酸残基を同定することに成功したことになります[\(図7\)](#)。

## [考察と今後の展望]

生物が持つ回転運動するモーターは、地球上で2種類のみが発見されているだけです。それらは、ATP 合成酵素とべん毛モーターです。ATP 合成酵素に関する研究では、1997 年にイギリスの Sir. John E. Walker 博士とアメリカ合衆国の Paul D. Boyer 博士がノーベル化学賞を受賞しています。40 年以上前に発見されたべん毛モーターは、発見当時、その構造が人工のモーターと構造が類似しているということで人々に驚きを持って迎えられました。しかし、その回転機構の解明は、その大きさが約 40 ナノメートル(ナノは 10 億分の 1)ということもあり困難を極め、最近の科学技術の進歩によってようやく研究が新たな段階にさしかかってきたところです。

Vedder1934 株のべん毛モーター固定子 MotPS は、多量の $\text{K}^+$ が存在する生息環境に適応するために $\text{Na}^+$ しか利用できないべん毛モーター固定子 MotPS から 1 箇所のアミノ酸置換(MotS-M33)だけで $\text{K}^+$ も利用できるべん毛モーターに進化したと推察されます。今回のハイブリッド型生体ナノマシンの発見は、生物の環境適応進化の分野やナノテクノロジーの分野からも重要な発見であると考えられます。この発見により、べん毛モーターでは、3 種類の駆動力エネルギー( $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )を利用できる設計図(アミノ酸配列情報)を得たことになります。今後は、この情報を利用して共役イオン選択性透過機構について分子構造レベルで解明し、人工的なナノマシンや分子スイッチの創成へ向けた応用研究を進めていく予定です。

### ※1: 細菌のべん毛モーター

細菌のべん毛モーターはATPの化学エネルギーではなく、 $\text{H}^+$ または $\text{Na}^+$ の電気化学的エネルギーが直接使われていると説明されてきました。(今回の $\text{K}^+$ を利用できるべん毛モーターの発見により、今後の説明では、 $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ または $\text{K}^+$ が利用できると変更になる。)べん毛のモーターの駆動部は、回転子と固定子からなり[\(図1\)](#)、固定子である Mot 複合体は、イオンチャンネルとして機能し、チャンネル中をイオンが通過するときにべん毛の回転子を回転させる駆動力を発生させると考えられています。Mot 複合体は、4つの MotA 型サブユニットと2つの MotB 型サブユニットからなり、回転子の周りに 8~16 個の固定子が埋め込まれていることが報告されています。[\(図1\)](#)。原生生物がもつ鞭毛モーターは、ATPの化学エネルギーを利用しています。細菌のもつべん毛は、原生生物の<sup>べん毛</sup>鞭毛と区別するために慣用的に「<sup>も</sup>べん毛」と書かれることもあります。

### ※2: 極限環境微生物

地球上には非常に苛酷な極限環境—たとえば、砂漠、火山、温泉源、高濃度の塩湖、深海など—が存在し、こうした環境は生物にとって生育に不利であると考えられてきました。しかし、近年、このような極限環境にも多様な微生物{好熱菌、低温菌、好塩菌、好酸性菌、好アルカリ性菌、嫌気性菌、好圧菌、好乾燥性菌、放射能耐性菌、溶媒耐性菌、重金属耐性菌、人工化学物質(ダイオキシン、PCB 等)分解菌など}が存在することが明らかになってきました。このような微生物の総称を極限環境微生物といいます。

※3: 好アルカリ性細菌

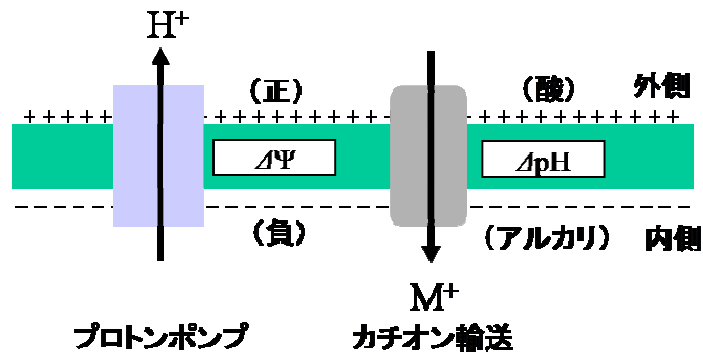
極限環境微生物の一種。一般に好アルカリ性細菌は、pH10 付近の高アルカリ性環境で活発に増殖し、生育にナトリウムイオンを要求します。高アルカリ性環境で生育するため、通常の微生物がプロトン(H<sup>+</sup>)を利用して物質の取りこみやべん毛による運動をするのに対し、ナトリウムイオン(Na<sup>+</sup>)を利用しています。

※4: プロトン駆動力とナトリウム駆動力

プロトン駆動力は膜を介して正の電荷をもった H<sup>+</sup>が移動するので、イオンの移動による膜電位の形成（電気エネルギー）と H<sup>+</sup>の濃度勾配（化学的エネルギー）の二成分からなり(図参照)、下記の式で表わされる電気化学的なエネルギーを指します。ナトリウム駆動力の場合は、[H<sup>+</sup>]が[Na<sup>+</sup>]に置き換わったものです。

$$\Delta\mu_{H^+}/F = \Delta P = \Delta\Psi - Z\Delta pH; \quad Z = 2.3RT/F$$

$\Delta P$  : プロトン駆動力(mV 単位)     $\Delta pH$  : 細胞内 pH－細胞外 pH     $Z$  : 36°Cで 60mV     $T$  : 絶対温度     $R$  : 気体定数     $F$  : ファラデー定数



※5: 好アルカリ性バチルス属細菌

好アルカリ性細菌の中でもバチルス(*Bacillus*)属に属する桿菌は、自然界のアルカリ性環境から、またそうでない環境からも最も一般に分離されます。そして、好アルカリ性バチルス属細菌の生産する有用な菌体外酵素が工業的に利用されています。また、好アルカリ性微生物の生理学的研究においてもバチルス属細菌を利用した研究が最も進んでいます。

※6: 好アルカリ性細菌 *Bacillus alcalophilus* Vedder1934 (バチルス・アルカロフィラス・ベダー1934) 株

好アルカリ性微生物に関する最初の報告は、1934年に Gibson が pH11 まで生育が可能な *Bacillus pasturii* を単離したものと、同年に Vedder が pH8.6～11 の範囲で良好に生育する *Bacillus alcalophilus* をヒトの排泄物から単離したものが挙げられます。一般に、人の排泄物中には、30mM 程度のナトリウムイオン、75mM 程度のカリウムイオン K<sup>+</sup>濃度が含まれており、多くの好アルカリ性細菌が分離されている通常の土壌に比べ、カリウムイオン濃度が高い環境です。今回、実験に使用した菌株は、78 年前に最初に報告された好アルカリ性細菌であり、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターより譲渡して頂いたものです。

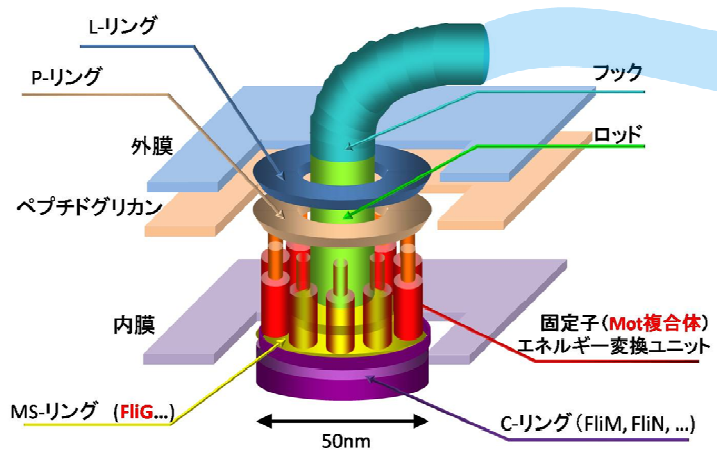


図1. 大腸菌べん毛モーターのモデル図。

固定子である Mot 複合体は、イオンチャネルとして機能し、チャネル中をイオンが通過するときにべん毛の回転子を回転させる駆動力を発生させると考えられています。Mot 複合体は、4つの MotA 型サブユニットと2つの MotB 型サブユニットからなり、回転子の周りに8~16個埋め込まれています。

		TM-1	
	BS_MotB	16 ESWLVPYADILTL <del>LL</del> LALFIVLYASSSTDAAKFQMLSKSF	54 ( <i>B. subtilis</i> Marburg 168)
	BCI_MotB	18 ETWLLPYADMLTLLVALFIVL <del>F</del> FANGQIDQAKYDQLKIVL	56 ( <i>B. clausii</i> KSM-K16)
	BCI_MotB	18 ETWLLPYADMLTLLVALFIVL <del>F</del> FANGQIDQAKYDQLKIVL	56 ( <i>B. clausii</i> JCM9138)
H <sup>+</sup> -type	B0s_MotB	17 ES <del>W</del> LLPYADMLTLLVALFIVL <del>F</del> FANGQVDQAKYDELRVVL	55 ( <i>B. oshimensis</i> JCM12663)
	BW_MotB	14 ES <del>W</del> LIPYADMLTLL <del>L</del> LALFIVLFAVSSVDAEKYQMMVVF	52 ( <i>B. wakoensis</i> JCM9140)
	B0khMotB	14 ES <del>W</del> LIPYADMLTLL <del>L</del> LALFIVLFAVSSVDAEKYQQLMVVF	52 ( <i>B. okhensis</i> JCM13040)
	BH_MotB	16 ES <del>W</del> LIPYADILTL <del>LL</del> LALFIVLFASSVDAKFEQLSRSL	54 ( <i>B. hortii</i> JCM9943)
	BAk_MotB	14 ETWLLPYADMLTLL <del>L</del> LALFIVLFAVSSVDAEKYQQLMVF	52 ( <i>B. akibai</i> JCM9157)
	BAI_MotS	14 PKWMTFS <del>L</del> MTLILVFFV <del>L</del> FSMSSEIDNQRFRAMADSF	52 ( <i>B. alcalophilus</i> Vedder1934)
	BP_MotS	19 PKWMTFS <del>L</del> MMLILVFFI <del>L</del> FSMSVDAQKFRAISESF	57 ( <i>B. pseudofirmus</i> JCM9141)
Na <sup>+</sup> -type	BS_MotS	22 SSWMTFT <del>L</del> LITLILVFFI <del>L</del> FSMSQIDLQKFAAVDSI	60 ( <i>B. subtilis</i> Marburg 168)
	BHa_MotS	13 PRWMTFS <del>L</del> MTLILVFFI <del>L</del> FSMSVDAQKFRAIAESF	51 ( <i>B. halodurans</i> JCM2888)
	B0kuMotS	19 PKWMTFS <del>L</del> MTLILVFFI <del>L</del> FSMSVDAQKFRAISESF	57 ( <i>B. okuhidensis</i> JCM10946)
	BK_MotS	25 PKWMTFS <del>L</del> MMLILVFFI <del>L</del> FSMSVDAQKFRAIADSF	63 ( <i>B. krulwichiae</i> JCM11691)
	BA_MotS	13 PKWMTFS <del>L</del> MTLILVFFI <del>L</del> FSMSVDAQKFRAIAESF	51 ( <i>B. akibai</i> JCM9157)

図2. 共役イオン選択性重要な MotB と MotS サブユニットの膜貫通領域付近の配列比較

四角く囲った部分は、膜貫通領域(TM-1)。緑色のラインは、共役イオンが結合すると推定されているアスパラギン酸(D)残基を、水色のラインは、H<sup>+</sup>を共役イオン(H<sup>+</sup>-type)とする MotB に共通なバリン(V)残基を、黄色のラインは、Na<sup>+</sup>を共役イオン(Na<sup>+</sup>-type)とする MotS に共通なロイシン(L)残基を示しています。*B. alcalophilus* は、Na<sup>+</sup>を共役イオンとする MotS タンパク質を持っていますが、共通する 33 番目の位置がロイシン残基ではなくメチオニン(M)残基であるという特徴がありました。

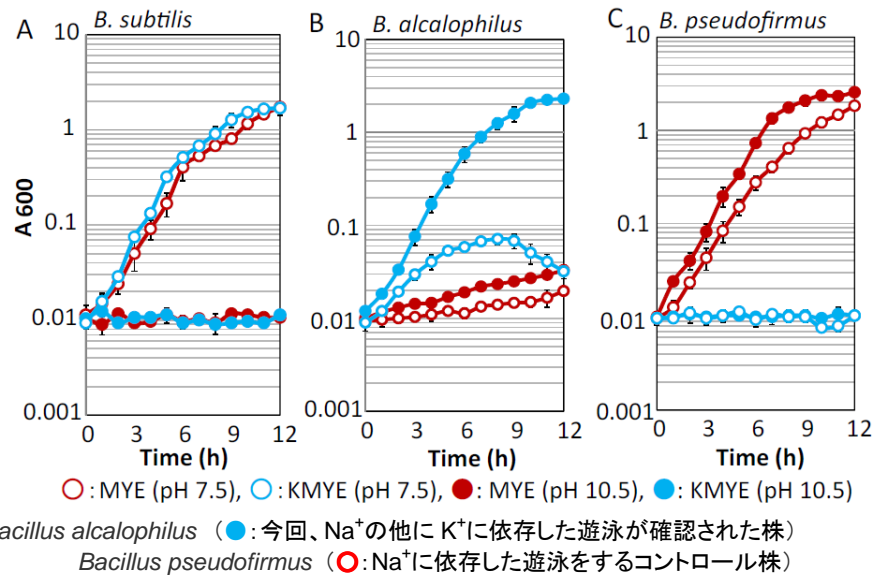


図3. 好中性細菌の枯草菌(*B. subtilis*)と2種類の好アルカリ性細菌 *B. alcalophilus* (バチルス・アルカロフィラス)と *B. pseudofirmus*(バチルス・シュドファーマス)を Na<sup>+</sup>または K<sup>+</sup>を含んだ中性(pH7.5)またはアルカリ性(pH10.5)培地で生育させた生育曲線

MYE 培地 (Na<sup>+</sup>を多く含み、K<sup>+</sup>をほとんど含まない培地)は、189 mM Na<sup>+</sup> と 5.5 mM K<sup>+</sup>を含む培地で、KMYE 培地 (K<sup>+</sup>を多く含み、Na<sup>+</sup>をほとんど含まない培地)は、0.7 mM Na<sup>+</sup> と 210 mM K<sup>+</sup>を含みます(炎光光度計での測定値より)。好中性細菌の枯草菌(A)は、中性付近でのみ生育できるので、pH7.5の培地(MYE(pH7.5:○), KMYE(pH7.5:●))で生育できます。また、Na<sup>+</sup>要求性の好アルカリ性細菌 *B. pseudofirmus* は、Na<sup>+</sup>を含んでいる培地(MYE(pH7.5:○, pH10.5:●))でのみ生育しました。それらに対して、好アルカリ性細菌 *B. alcalophilus* は、いずれの培地条件での生育することが示されました。特に KMYE (pH10.5:●)で良好の生育を示しました。このことは、この *B. alcalophilus* が高アルカリ性環境で良好に生育するには Na<sup>+</sup>ではなく K<sup>+</sup>を要求することを示しています。



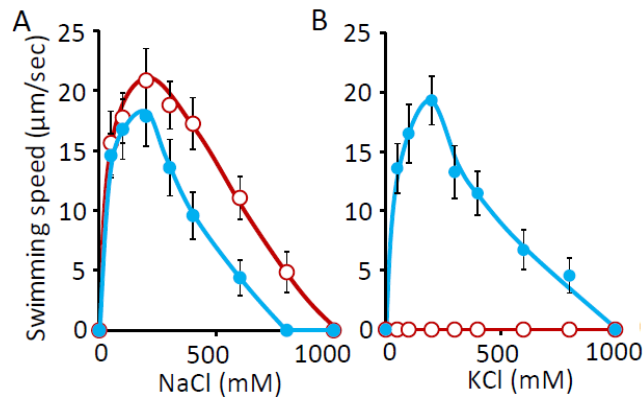


図4. 好アルカリ性細菌 *B. alcalophilus* と *B. pseudofirmus* の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ 濃度を変えた液体培地での遊泳

測定には、Tris-HCl (pH9.0) プラス 5mM グルコースを含む緩衝液に塩化ナトリウム (NaCl) または塩化カリウム (KCl) を添加したもので行いました。A のグラフでは、どちらの細菌も 0mM-NaCl 条件では、遊泳が観察されず、その後 200mM-NaCl 濃度まで遊泳速度の増加 (すなわち  $\text{Na}^+$ 濃度に依存した遊泳) が観察されました。B のグラフでは、*B. pseudofirmus* は、どの KCl 濃度条件においても遊泳は観察されませんでした ( $\text{K}^+$ を利用して遊泳はできないことを示しています)。一方、*B. alcalophilus* では、0mM-KCl 条件では、遊泳が観察されず、その後 200mM-KCl 濃度まで遊泳速度の増加 (すなわち  $\text{K}^+$ 濃度に依存した遊泳) が観察されました。このことは、*Bacillus alcalophilus* は、 $\text{Na}^+$ でも  $\text{K}^+$ でもどちらかの共役イオンを利用してべん毛による遊泳を行えることを示しています。これまで、*Bacillus alcalophilus* のように  $\text{K}^+$ を利用して運動している細菌は、発見されたことがなく、今研究成果が世界で初めて細菌が  $\text{K}^+$ を利用して運動していることを示したことになります。

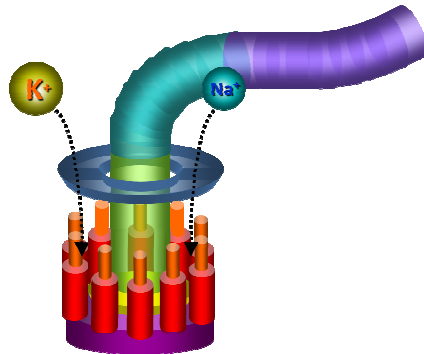
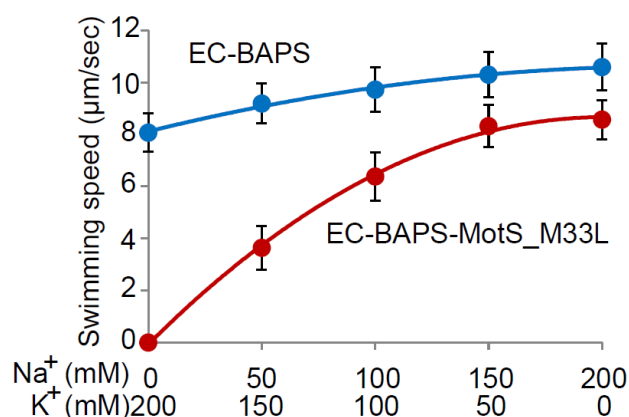
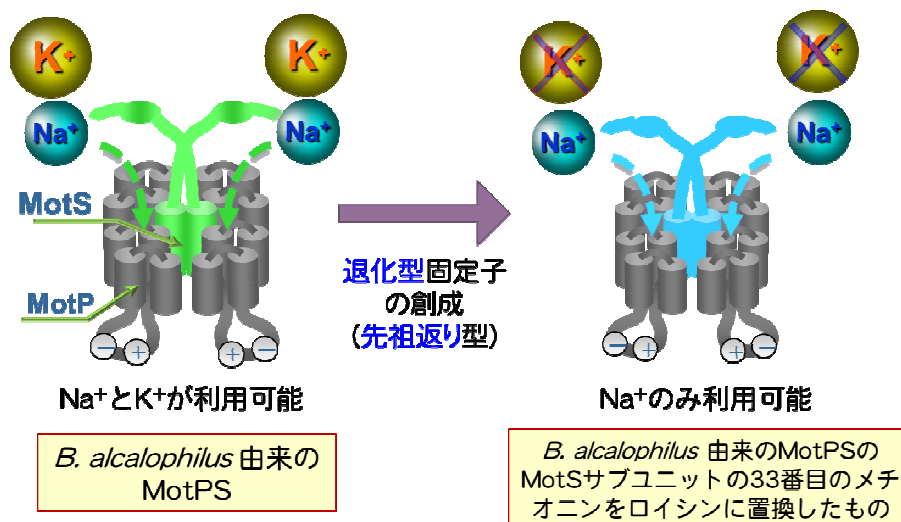


図5 好アルカリ性細菌 *Bacillus alcalophilus* Vedder1934 株のべん毛モーターの概略図

Vedder1934 株のもつべん毛モーター固定子 MotPS は、 $\text{Na}^+$ と  $\text{K}^+$ の 2 種類のイオン駆動力を運動エネルギーに変換して利用できることが明らかとなりました。



**図6.** 大腸菌は、H<sup>+</sup>駆動型の固定子 MotABしか持っていません。大腸菌の *motAB* 遺伝子を欠損させた  $\Delta$  *motAB* 株 (運動性を示しません) を親株として、そこに、*Bacillus alcalophilus* 由来の *motPS* 遺伝子をプラスミドで戻した株 (**EC-BAPS 株**: wild type) と *Bacillus alcalophilus* 由来の *motPS* 遺伝子の MotS の 33 番目のメチオニンをロイシンに置換した遺伝子をプラスミドで戻した株 (**EC-BAPS-MotS\_M33L 株**) を用いて、K<sup>+</sup> と Na<sup>+</sup> 濃度条件をトータルで 200mM になるようにした緩衝液中における遊泳速度を測定しました。*Bacillus alcalophilus* 由来の *motPS* 遺伝子は、大腸菌の中でも発現して機能し、運動性を回復させることができました。**EC-BAPS 株** は、培地中の K<sup>+</sup> または Na<sup>+</sup> どちらから存在すれば遊泳をするのに対して、**EC-BAPS-MotS\_M33L 株** は、0 mM-Na<sup>+</sup>、200mM-K<sup>+</sup> 条件下では、もはや遊泳できないことがわかります。また、Na<sup>+</sup> の増加に依存した遊泳をしていることがわかります。このことは、*Bacillus alcalophilus* の MotS の 33 番目のメチオニン残基が K<sup>+</sup> を利用するためのイオン選択性に重要な役割を果たしていることがわかります。



**図7.** 環境に応じて Na<sup>+</sup> と K<sup>+</sup> が利用できるハイブリッド型モーターから Na<sup>+</sup> しか利用できなくなった退化型モーターの概略図

**お問い合わせ先:**

(本研究について)  
 東洋大学  
 生命科学部生命科学科、バイオナノエレクトロニクス研究センター(兼任)  
 教授 伊藤 政博 電話:(0276)82-9202(研究室)、(0276)82-9305(実験室) e-mail: masahiro.ito@toyo.jp

(報道について)  
 東洋大学 PR 事務局(担当: 後藤/大迫/渡辺)  
 TEL:03-5572-6062 FAX:03-5572-6065 Email: toyodaigaku@vectorinc.co.jp