

ハイブリッド型細菌べん毛モーターとその適応進化

伊藤 政博

はじめに

生体分子ナノマシンとして注目を集めている真正細菌(バクテリア)の運動器官であるべん毛モーターが回転するモーターであると報告されたのは、1974年5月のNature誌で、当時、驚きをもって迎えられた¹⁻³⁾。それからすでに44年が経つ。この間、このモーターはプロトン(H⁺)やナトリウムイオン(Na⁺)といったイオン駆動力で回転するモーターであると長い間考えられてきた。しかし、過去10年間の研究成果から二種類のカチオンを利用できるハイブリッドエンジンを持つモーターやH⁺やNa⁺以外のイオン駆動力でも回転するモーターが自然界より発見された。これらの発見からは細菌の巧みな環境適応戦略が見えてくる。今回は、これらの従来とは異なる駆動力で回転する細菌べん毛モーター、特にハイブリッドべん毛モーターとその適応進化について最近の研究を紹介する。

細菌べん毛モーターについて

バクテリアのべん毛は、外部に伸びたべん毛フィラメント、膜に埋め込まれたモーター部分、そしてモーターとべん毛フィラメントを連結する自在継手として機能するフックの三つの部分から構成されている⁴⁾(図1a)。大腸菌などのグラム陰性細菌のべん毛は、LおよびPリングがあるが、*Bacillus*属などのグラム陽性細菌のべん毛にはこれらのリングがない⁵⁾(図1a)。モーターは、さらに回転子と固定子に分類される。大腸菌の固定子複合体タンパク質あるMotA/MotBは、MotBのC末端側のペプチドグリカン結合モチーフを介して細胞壁に固定される。また、MotA/MotBは、四つのMotAサブユニットと二つのMotBサブユニットから構成され、べん毛を取り囲むように10個程度の固定子が配置された膜に埋め込まれている。大腸菌の固定子は、H⁺が通過するイオンチャネルとして機能する。MotAは、2番目と3番目の膜貫通領域の間に大きな細胞質ループを有する4回膜貫通型タンパク質で、MotBは、1回膜貫通型タンパク質である(図1bと図1c)。これまでにアミノ酸配列が報告されている細菌のMotB型タンパク質のすべてに保存されているアスパラギン酸残基が大腸菌では、MotBの32番目(MotB_Asp32)に存在する。大腸菌のMotBの突然変異研究から、MotB_Asp32が共役イオン結合

部位であることが強く示唆されている⁶⁾。また、MotAの細胞質親水性ループ領域と回転子複合体のFliGサブユニットのC末端領域との間の静電相互作用が、モータートルクの生成と固定子のモーターへの取込みに重要であると報告されている^{7,8)}。FliG, FliM, FliNタンパク質は、Cリングという複合体を形成し、べん毛モーターの回転方向を順方向・逆方向と変えるスイッチとしての役割を持っている(図1c)。これらのタンパク質は、べん毛の組み立て、トルク生成、およびべん毛運動の回転方向の制御に必要となる。

表1に細菌のべん毛モーターについてその特徴をまとめた。大腸菌などの好中性細菌では、べん毛モーターの回転エネルギーとしてH⁺駆動力を利用し、そのべん毛モーター固定子はMotA/MotB複合体として知られている。一方、回転エネルギーにNa⁺駆動力を用いる細菌として*Vibrio*属細菌、*Shewanella*属細菌、*Aeromonas*属細菌および好アルカリ性*Bacillus*属細菌がある。好アルカリ性細菌が良好に生育する高アルカリ性環境は、プロトン濃度が低く、好アルカリ性細菌は、H⁺駆動力の代

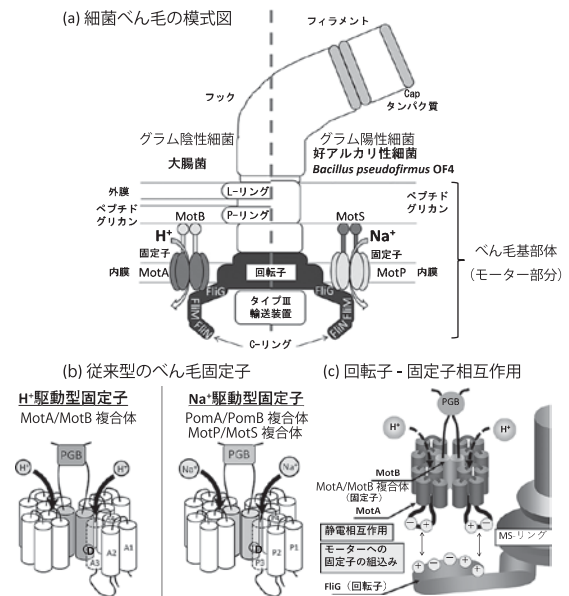


図1. 細菌のべん毛モーターの概要。(a) 細菌べん毛モーターの模式図。中心から左側には、グラム陰性細菌の、右側にはグラム陽性細菌のべん毛モーターの模式図を示した。べん毛基部部分に固定子と回転子が存在する。(b) べん毛固定子の概略図。PGB: ペプチドグリカン結合モチーフ、A1-A4, P1-P4: 膜貫通領域。(c) 回転子と固定子の相互作用の模式図。

わりに栄養分の取り込みやべん毛の回転にNa⁺駆動力を利用している。グラム陰性細菌の前者3属のNa⁺駆動型べん毛モーター固定子はPomA/PomBと命名され、グラム陽性細菌の好アルカリ性*Bacillus*属細菌のべん毛モーター固定子はMotP/MotS (MotPとMotSはpHとsodiumが由来)と命名された。両固定子は、いずれもMotA/MotBとアミノ酸レベルで相同性がある。好アルカリ性*Bacillus*属細菌とコレラ菌 (*Vibrio cholerae*) は、Na⁺濃度依存的な運動性を有していることが知られている。しかし、ゲノム情報から、Na⁺およびH⁺駆動型のべん毛モーターの両方を有すると推測されているものもある。たとえば、海洋性*Vibrio*属細菌は、桿状細胞の極部分から生えたNa⁺駆動型の極べん毛と特定の条件下で発現する複数の側面部から生えたH⁺駆動型の側べん毛の2種類のべん毛を持っている。これらの構成タンパク質をコードする遺伝子群は染色体上に二つの別々の遺伝子セットとして存在する。生育環境のNa⁺濃度や粘性 (液体中か寒天培地表面上かなど)、pHなどの条件に応じて、1種類または2種類の共役イオンを利用して

いるものもある。枯草菌 (*Bacillus subtilis*) では、H⁺駆動型MotA/MotBおよびNa⁺駆動型MotP/MotSが、*Shewanella oneidensis* MR-1株では、H⁺駆動型MotA/MotBおよびNa⁺駆動型PomA/PomB固定子が、一つのモーター内に組み込まれてハイブリッドモーターとしてべん毛回転に必要なトルクを発生させていることが報告されている^{9,10)}。これらの例は、一つのモーターに2種類の固定子が組み込まれているのでモーターレベルのハイブリッドモーターといえる。ただし、各固定子が利用する共役イオンは、従来のMotA/MotB型は、H⁺を、MotP/MotS型およびPomA/PomB型は、Na⁺を利用するという点で従来型の固定子として分類する。

従来型とは異なるイオン駆動力を利用する細菌べん毛モーターについて

長い間、細菌のべん毛のモーターは、H⁺駆動力またはNa⁺駆動力を利用して回転すると考えられていた。しかし、近年、さまざまな新しいタイプのべん毛モーターが発見され、その常識は覆った (表1)。生物はさまざま

表1. べん毛モーターの種類による分類

べん毛モーターの分類	菌株名	モーター遺伝子セット	べん毛の種類	固定子と共役イオン			
				固定子	共役イオン	共役イオン	共役イオン
1種類のモーターに1種類の固定子 (従来型)	<i>Escherichia coli</i>	1種類	周べん毛	MotA/MotB	H ⁺		
	<i>Vibrio cholerae</i>	1種類	極べん毛	PomA/PomB	Na ⁺		
	<i>Bacillus pseudofirmus</i> OF4	1種類	周べん毛	MotP/MotS	Na ⁺		
2種類のモーターにそれぞれ1種類の固定子 (従来型)	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2種類	周べん毛	MotA/MotB	H ⁺		
			極べん毛	PomA/PomB	Na ⁺		
1種類のモーターに2種類の固定子 (モーターレベルのハイブリッド)	<i>Bacillus subtilis</i> 168	1種類	周べん毛	MotA/MotB	H ⁺	MotP/MotS	Na ⁺
	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	1種類	極べん毛	MotA/MotB	H ⁺	PomA/PomB	Na ⁺
1種類のモーターに1種類の固定子 (2種類の共役イオンを使い分けて駆動、固定子レベルのハイブリッド)	<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16	1種類	周べん毛	MotA/MotB	中性付近: H ⁺ 中性~高アルカリ性: H ⁺ とNa ⁺ 両方 高アルカリ性: Na ⁺		
1種類のモーターに1種類の固定子 (従来とは異なる共役イオンで駆動)	<i>Bacillus alcalophilus</i> AV1934	1種類	周べん毛	MotP/MotS	Na ⁺ , K ⁺ , Rb ⁺		
1種類のモーターに2種類の固定子 (従来とは異なる共役イオンで駆動)	<i>Paenibacillus</i> sp. TCA-20	1種類	周べん毛	MotA1/MotB1	Ca ²⁺ , Mg ²⁺	MotA2/MotB2	H ⁺

な手段を講じて環境に適応しながら進化してきた。おそらく、新奇なべん毛モーターの誕生過程は、はじめにH⁺駆動力またはNa⁺駆動力を利用できる細菌が出現し、その後、長い地球の歴史の中で特殊な環境(たとえば、Ca²⁺やK⁺が豊富な環境)に細菌が進出していく過程で、その環境に適応するために新たな共役イオンをエネルギー駆動力として利用できるべん毛モーターが誕生したと推察される。生命の誕生の過程で、生命が最初にH⁺駆動力とNa⁺駆動力のどちらをエネルギー源として利用したのかの議論には結論が出ていない。しかし、分子系統樹において比較的根元に近い超好熱性真正細菌*Aquifex aeolicus*は、Na⁺駆動力で駆動するべん毛モーターをもっていることは大変興味深い¹¹⁾。

2種類の共役イオンを使い分けて駆動する固定子レベルのハイブリッドモーター H⁺駆動力で駆動するMotA/MotB型べん毛モーター固定子を持つ好アルカリ性細菌*Bacillus clausii* KSM-K16株は、ゲノム上に通常の好アルカリ性*Bacillus*属細菌が持つNa⁺駆動型べん毛モーター固定子遺伝子*motP/motS*が存在しない。そのため、高アルカリ性環境で運動性を獲得するためには、

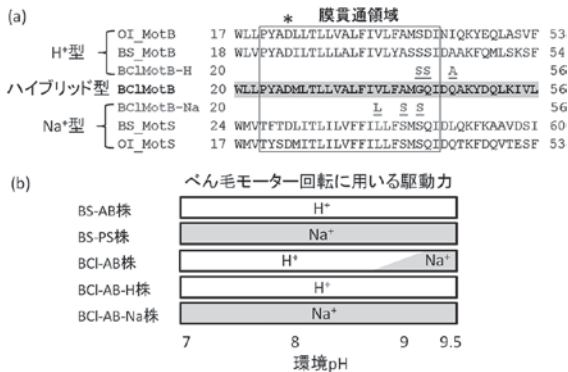


図2. *Bacillus clausii*のMotBサブユニットの膜貫通領域付近と*Oceanobacillus iheyensis* (OI)と枯草菌(BS)のMotB、MotSサブユニットとの配列比較と変異型固定子BCIMotB-HとBCIMotB-Naの構築とその解析結果。(a)四角く囲った部分は、推定上の膜貫通領域。*は推定上の共役イオン結合部位のアスパラギン酸残基。BCIMotB-H:枯草菌のMotB(BS_MotB)を参考にして*B. clausii*のMotB(BCI_MotB)へ3か所のアミノ酸置換を導入した変異型固定子、BCIMotB-Na:枯草菌のMotS(BS_MotS)を参考にしてBCI-MotBから3か所のアミノ酸置換を導入した変異型固定子。(b)各菌株の環境pHとモーター駆動力の関係。変異型固定子BCIMotB-Hを導入した枯草菌BCI-AB-H株と変異型固定子BCIMotB-Naを導入した枯草菌BCI-AB-Na株を構築し、遊泳速度を測定した。その結果、BCI-AB株は、pH9.5では、共役イオンとしてNa⁺を利用するが、BCI-AB-H株は枯草菌のMotABのみを持つ株(BS-AB株)と同じ様に共役イオンとしてプロトンのみが利用できるタイプに“退化”した。また、BCI-AB株は、pH8.5以下では、共役イオンとしてプロトンを利用するが、BCI-AB-Na株は、枯草菌のMotPSのみを持つ株(BS-PS株)と同じように共役イオンとしてNa⁺のみが利用できるタイプに“進化”した。

MotA/MotBがNa⁺を利用できるように適応進化する必要に迫られたと考えられる。実際、*B. clausii*の運動性解析から、*B. clausii*のMotA/MotBは、1種類の固定子複合体で外環境pHが中性付近ではH⁺駆動力を、高アルカリ性pH環境ではNa⁺駆動力を利用する世界初のハイブリッドモーター固定子であることがわかった¹²⁾。同時に、MotA/MotBおよびMotP/MotSの2種類の固定子を持っている枯草菌および*Oceanobacillus iheyensis*由来のMot複合体配列とのマルチプルアライメントによって、このMotA/MotB複合体のMotBサブユニットの膜貫通領域にイオン選択透過性に関与するアミノ酸残基が同定された。そして、これらのアミノ酸部位を改変することにより、H⁺駆動力のみ利用できる先祖返り型の固定子と、Na⁺駆動力のみ利用できる進化型固定子へと創製することにも成功している(図2)。

以上の結果は、*B. clausii*が高アルカリ性環境に長い間生息する過程で、H⁺以外にNa⁺も利用できるモーターに進化した過程をバイオインフォマティクスと遺伝子工学的手法を用いて再現し、そこから新たなモーターの創製ができることを証明した。

K⁺とNa⁺で駆動するハイブリッドモーター 好アルカリ性微生物は、意外かもしれないが自然界のいたる所に分布しているといつてよい。世界最深海底11,000mのマリアナ海溝チャレンジャ海淵の土壌からも好アルカリ性微生物が分離されたという報告もある¹³⁾。好アルカリ性微生物の中でも*Bacillus*属に属する細菌は、自然界のアルカリ性環境からもそうでない環境からも、もっとも一般に分離される。一般に自然界から分離される好アルカリ性*Bacillus*属細菌は、Na⁺を生育に要求する。しかし、Na⁺の代わりにK⁺を要求する好アルカリ性*Bacillus*属細菌も存在する。これらの細菌に共通することは、ヒトや昆虫などの排せつ物や腸内環境から分離されるということである。ヒトの排せつ物中には、30 mM Na⁺と70 mM程度のK⁺が含まれていることが知られている。また、シロアリの腸の解剖から各腸内のpHが詳細に測定されている。その中の後腸と肛門管のpHは、それぞれ10.4と11.9と報告されている。このような環境からは、Na⁺に感受性を示しK⁺要求性の好アルカリ性細菌が分離されている¹⁴⁾。たとえば、好アルカリ性細菌*Bacillus alcalophilus* AV1934は、ヒトの排せつ物より分離され、好アルカリ性細菌*Bacillus tryposylicola*は、ニホンカブトムシの幼虫の腸内から分離されたNa⁺もしくはK⁺を生育に要求する細菌である。

一般の土壌から分離された好アルカリ性細菌*Bacillus halodurans* C-125や*Bacillus pseudofirmus* OF4がNa⁺のみで駆動するMotP/MotS型べん毛モーター固定子を持つものに対して、*B. alcalophilus*のべん毛モーター固定

		* 膜貫通領域		
H ⁺ 型	BS MotB	20	IPYADLTLLLLALFIVLYASSSD	43 (<i>B. subtilis</i> Marburg 168)
	BCI MotB	22	IPYADMTLLVLFVLFVFMGQSD	45 (<i>B. clausii</i> KSM-K16)
	BOs MotB	21	IPYADMTLLVLFVLFVFMGQSD	44 (<i>B. okenensis</i> JCM12663)
	BN MotB	18	IPYADMTLLLLALFIVLFVAVSSSD	41 (<i>B. wakoensis</i> JCM9140)
	BOk MotB	18	IPYADMTLLLLALFIVLFVAVSSSD	41 (<i>B. okenensis</i> JCM13040)
	BHo MotB	20	IPYADLTLLLLALFIVLFVAVSSSD	43 (<i>B. horii</i> JCM9157)
Na ⁺ 型	BAk MotB	18	IPYADMTLLLLALFIVLFVAVSSSD	41 (<i>B. akibai</i> JCM9157)
	BA MotS	18	VFESDLMTLLLVFFVMLFSMSVSD	41 (<i>B. alcalophilus</i> AV1934)
	BF MotS	23	VFESDMTLLLVFFVLLFSMSVSD	46 (<i>B. pseudofirmus</i> JCM9141)
	BS MotS	26	VFETDLITLLLVFFVLLFSMSVSD	49 (<i>B. subtilis</i> Marburg 168)
	Bha MotS	17	VFESDLMTLLLVFFVLLFSMSVSD	40 (<i>B. halochlorans</i> JCM2888)
	BK MotS	29	VFESDMTLLLVFFVLLFSMSVSD	52 (<i>B. krubiensis</i> JCM11691)
	BAk MotS	17	VFESDLMTLLLVFFVLLFSMSVSD	40 (<i>B. akibai</i> JCM9157)

図3. *Bacillus*属細菌のMotB, MotSサブユニットとの配列比較. 四角く囲った部分は, 推定上の膜貫通領域. *は推定上の共役イオン結合部位のアスパラギン酸残基. MotBとMotSの膜貫通領域でそれぞれ高度に保存されているバリニン残基(V)とロイシン残基(L)を太字で記した. *B. alcalophilus*のMotS(下線)では, メチオニン残基(M)になっている.

子のイオン選択性を調べると同じMotP/MotS型固定子であるにもかかわらず, Na⁺, K⁺, Rb⁺を利用して駆動することがわかった¹⁵⁾. このことは, 土壌中とは異なり腸内環境においてK⁺が豊富な高アルカリ性環境に適応するために, *B. alcalophilus*のべん毛モーターもK⁺で駆動するように進化したことが推察される.

H⁺で駆動するMotA/MotB型固定子とNa⁺で駆動するMotP/MotS型固定子では, MotB, MotSの膜貫通領域の共役イオン結合部位であるアスパラギン酸残基から10アミノ酸C末端側に, それぞれバリニン残基, ロイシン残基が高度に保存されている(図3). *B. alcalophilus*のMotSでは, 33番目の位置がそれに相当するが, その位置はロイシン残基ではなくメチオニン残基である. このメチオニン残基をロイシン残基に置換した先祖返り型のべん毛モーターを構築して運動性を調べると, Na⁺で駆動するがK⁺では駆動できなくなった¹⁵⁾. このことは, *B. alcalophilus*がK⁺が豊富な高アルカリ性環境に適応するために, MotSの33番目をロイシン残基をメチオニン残基に置換することによってK⁺で駆動する運動性の獲得へとつながったことを示唆している.

二価カチオンで駆動する新規ハイブリッドモーター
カルシウム(Ca)は自然界に豊富に存在する元素である. また, カルシウムを豊富に含む温泉も世界中に存在する. 神奈川県秦野市にある鶴巻温泉は, 弱アルカリ性塩化物泉で温泉中のカルシウム濃度が牛乳並みに高い(1740 mg/kg)ことで知られた温泉である.

この環境から生育にマグネシウムイオン(Mg²⁺), カルシウムイオン(Ca²⁺), ストロニウムイオン(Sr²⁺)といった二価カチオンを要求する*Paenibacillus* sp. TCA20が分離された¹⁶⁾. この菌の全ゲノム解析より1種類のべん毛モーターに対して, 2種類の固定子遺伝子が同定された. これらの固定子TCA-MotA1/MotB1とTCA-MotA2/MotB2について共役イオンの解明を行った結果, TCA-MotA1/MotB1は, Ca²⁺やMg²⁺を利用し,

TCA-MotA2/MotB2は, H⁺を利用していることがわかった¹⁷⁾. 二価カチオンで駆動するべん毛モーターは世界初である.

最後に

これまでの研究報告をふり返れば, 生命は, べん毛モーターというイオン駆動力で駆動する運動装置を誕生させたのち, この装置をさまざまな環境に適応進化させてきたことが見て取れる.

自然界には, 我々がまだ知らない独自の進化を遂げた生物がたくさん存在しているに違いない. 従来とは異なるべん毛モーターの発見は, その一例であり, これまでの考えを凌駕するものだった. 今後, これまでの既知の概念にとらわれずに, 異なる視点からアプローチすることが新たな発見に結びつくであろうし, 自然界から得られた情報を利用して究極のナノマシンを創製することも可能になるのではと考えている.

謝 辞

本研究は, 東洋大学・伊藤研究室および文科省科研費新学術領域「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」に参画した多くの共同研究者の協力のお陰で推進することができた. ここに共同研究者たちに感謝いたします. 研究は, 文科省科研費新学術領域「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」(24117005)と文科省科研費, 基盤研究(B)(21370074)の支援を受けて行われた.

文 献

- 1) Silverman, M. and Simon, M.: *Nature*, **249**, 73 (1974).
- 2) Larsen, S. H. et al.: *Nature*, **249**, 74 (1974).
- 3) Berg, H. C.: *Nature*, **249**, 77 (1974).
- 4) Minamino, T. and Imada, K.: *Trends Microbiol.*, **23**, 267 (2015).
- 5) Fujinami, S. et al.: *Future Microbiol.*, **4**, 1137 (2009).
- 6) Zhou, J. et al.: *J. Bacteriol.*, **180**, 2729 (1998).
- 7) Zhou, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6436 (1998).
- 8) Morimoto, V. V. et al.: *J. Bacteriol.*, **195**, 474 (2013).
- 9) Terahara, N. et al.: *J. Bacteriol.*, **188**, 2701 (2006).
- 10) Paulick, A. et al.: *Mol. Microbiol.*, **96**, 993 (2015).
- 11) Terakawa, N. et al.: *Sci. Rep.*, **6**, 31526 (2016).
- 12) Terahara, N. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14359 (2008).
- 13) Takami, H. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **152**, 279 (1997).
- 14) Ohkuma, M. et al.: *Microbes Environ.*, **18**, 145 (2003).
- 15) Terahara, N. et al.: *PLoS One*, **7**, e4624 (2012).
- 16) Fujinami, S. et al.: *Genome Announc.*, **2**, e00866-14 (2014).
- 17) Imazawa, R. et al.: *Sci. Rep.*, **6**, 19773 (2016).