

細菌の祖先がもつ運動マシナリーを現代に蘇らせる

西山 雅祥^{1*}・金井 保²・竹川 宜宏³

はじめに

地球誕生は46億年前であり、生命誕生は約40億年前と推定されている¹⁾。当時の地球で生まれた「よちよち歩きの」生命は、やがてさまざまな環境へと進出していく。こうした生息域の拡大には、生命は自ら望む場所へと移動する術、つまり、運動マシナリーが重要な役割を果たしたことであろう。本誌の第96巻第4・5号に連載される特集では、現代を生きるさまざまな運動マシナリーに関して²⁾、最新の知見が紹介される。では、生命が初めて獲得した運動マシナリーはどのようなものであったのだろうか？本稿では、はじめに、生命誕生を今にとどめる痕跡や環境などを紹介し、次に、筆者らが行った超好熱性細菌の動作機構の研究について解説する³⁾

生命の痕跡

グリーンランド南西部、イスア地方。この地では、地球史の中でもとりわけ古い時代にできた地層、つまり、38億年前の海底に噴出した溶岩を間近にみることができ^{4,5)}。その多くが形成当時の組織や化学組成を失うなか、堆積岩のように形成当時の姿を現代に伝えるものもある。特にイスアの堆積岩は、これまでに発見されたなかでもっとも古く、38億年前の海底の状態を現代に伝える「タイムカプセル」と言えよう。

にわかに耳目を集めることになったのは、このイスアの堆積岩から生命の「痕跡」が発見されたからである⁶⁾。非生命的な化学反応では、軽い炭素の安定同位体比(¹²C:¹³C)が天然存在比率よりも高くなることはまれである。堆積岩のグラファイトには軽い炭素(¹²C)の含有量が多かったため、生命活動を示す証拠と判断された(窒素からも同様の結果が得られた⁷⁾)。また、西オーストラリアのビルバラ地方にある35億年前の地層からは、長さ50 μm程度のフィラメント状の化石が発見されており、この微生物のような構造体にも軽い炭素が多く含まれていた⁶⁻⁸⁾。さらに、同じ地域のチャートからは、炭素同位体比が軽いメタン(具体的な物質名が挙げられている点に注意)も発見された。これらの化学化石の結果を信じるならば、化石として痕跡を残すぐらいなのだから、

当時の地球には相当数の原始生命体があったことになる。

過酷な地球環境

この当時の地球表面はあまりに過酷な環境である¹⁾。大気中には二酸化炭素が充満する一方で、(酸素欠乏のため)オゾン層は未形成。つまり、宇宙から飛来する放射線はそのまま地表に到達していたことになる。また、アポロ計画で採取された月面の岩石から、40-37億年前には地球にも巨大隕石が頻繁に衝突していた可能性が示されている(その衝撃で海水はすべて干上がったとする説もある)¹⁾。このような環境下では、仮に偶発的に生命が誕生したとしても、進化どころか生命を継続することさえ困難を極めたのではなかろうか？このように過酷な環境にありながら生命が誕生した場所として、深海底にある熱水噴出孔が注目されてきた^{6,9-12)}。それ以外にも、陸上にある熱水溜まり(温泉)とする研究者もいて論争は続いている¹³⁾。ここでは、前者の説をとり、話を進める。

深海底の熱水噴出孔

深海底の熱水活動が、潜水調査艇アルビン号により発見されたのは1979年である¹⁴⁾。その後の探査により300箇所を超える場所が報告されている⁶⁾。陸上とは異なり、深度200 mを超えると太陽光はほぼ届かなくなるので¹⁴⁾、生命にとって有害きわまりない放射線の問題は回避できる。また、周りにある大量の海水は、環境変化をきつと穏やかなものにしてくれたことであろう。次に、深海底では静水圧が高いため、水は100°Cで沸騰せず、水温はさらに上がる。事実、深海探査により400°Cを超える熱水や超臨界流体(らしきもの)が吹き出す地点が発見されている[水の臨界温度は374°C、臨界圧力は22 MPa(深度2200 mの静水圧)]。一方、熱源から少し離れると、海水の温度は3°C以下(深度1000 m以上)となる¹⁴⁾。この大きな温度差は、場所ごとに異なるパラエティ豊かな反応環境を生み出したことであろう。

材料として使える岩石の組成は多種多様。水は使いたい放題。両者が高い温度で反応し、水素や硫化水素などの還元分子や微量の必須元素が大量に産生されれば、原

*著者紹介 ¹近畿大学理工学部(准教授) E-mail: mnishiyama@phys.kindai.ac.jp
²京都大学大学院工学研究科(講師)、³大阪大学大学院理学研究科(研究員)
生物工学 第96巻 第4号(2018)

始生命体のエネルギー源や栄養源になったはずである。そして、忘れてはならないのは、1億年以上ものほぼ無限ともいえる時間である。太古の地球では、おそらく、有象無象の原始生命体は数多くいたことであろう。おそらく「さあ、実験を始めようか」と同時多発的な生存競争が繰り返され、最後に生き残ったのが現在の地球に生息する全生物の共通祖先（コモノート）であったと考えられる¹⁾。

超好熱性細菌 *Aquifex aeolicus*

もし、コモノートを現代に蘇らせることができるのであれば、生命が初めて獲得した運動マシナリーに限りなく近い研究ができるだろう。ただ、残念ながら時計の針は元には戻せないで、筆者らは系統樹をもとにして昔の生命の姿を今にとどめる超好熱性細菌に着目した³⁾。

アクウィフェクス門 (Aquificae) は、温泉や海底火山周辺を好んで生息するグラム陰性菌である¹⁵⁾。一般に高温環境を好むアーキアドメイン¹⁶⁾を除けば、この門はもっとも好熱性に長けた生命体となる (*Aquifex* 属は最高95°Cで生育可¹⁵⁾)。16SリボソームRNAの系統解析から、この門は細菌ドメインの中でも最初期に分岐しており、原始生命体の特徴を色濃く残していると考えられている。

*Aquifex aeolicus*はこの門に属する代表的な超好熱性細菌であり、地中海のエオリア諸島 (*Aeolian islands*) にある浅瀬の熱水系で初めて採取された。生育温度は67–95°Cであり、至適生育温度は85°Cであった。*A. aeolicus* VF5株の全ゲノム配列は1998年に決定されており¹⁷⁾、時期的にはかなり早かった(ショットガンシーケンス法による世界初の全ゲノム解析が発表されたのは1995年¹⁸⁾)。VF5株のゲノムの塩基数は1.55 Mb、遺伝子推定領域は1576であり、大腸菌の約1/3であった。この株に由来する組換え体タンパク質は構造解析研究でよく利用されている [Protein Data Bankには*A. aeolicus*由来のタンパク質構造が483件登録 (2018年2月16日現在)]。しかしながら、その一方で、*A. aeolicus*は未だ国際的な分譲機関に登録されておらず、本菌の細胞生理的研究はほぼ皆無に近い状態であった。

*A. aeolicus*の遊泳運動観察

このような状況の中、筆者らはVF5株をHuber博士から提供していただき、運動マシナリーの研究を開始することにした。まず、ゲノム情報からVF5株はほぼすべてのべん毛遺伝子を持つこと、そして、この近縁種で

ある *A. pyrophilus* は極べん毛を複数持つことが判明していた¹⁵⁾。だから、VF5株の運動マシナリーはべん毛であると予想はついていた。この菌体は、1) 水素、チオ硫酸、硫黄を電子供与体とし、酸素と硝酸塩や亜硝酸塩を電子受容体として生育し、2) 炭酸ガスしか炭素源として利用できない性質がある。そのため、筆者らは完全合成培地を作製し、その気相を水素、二酸化炭素、酸素の混合ガスを用いて、2気圧まで加圧した(微好気性のため、至適酸素濃度は1%)¹⁵⁾。Huber博士から提供していただいたVF5株を培養液に植菌後、85°Cで静置培養を行った³⁾。

A. aeolicus VF5株の運動マシナリーであるべん毛形状を調べるため、菌体をネガティブ染色し透過型電子顕微鏡で撮影した³⁾ (図1)。細胞本体は桿菌であり、近縁種である *A. pyrophilus* と似ていた。べん毛が生えている菌体は概して少なく、べん毛がある場合は、極べん毛が1本であることが多かった(非常にまれな頻度で複数本の場合もみられた)。次に、*A. aeolicus* VF5株の遊泳運動観察を試みた。これまでの研究で、筆者らは、高精細な画像を取得できる高圧力顕微鏡を開発しており、この顕微鏡を利用すれば、高温、高圧、嫌気条件などの条件下で観察できる^{19–22)} (図2A)。菌体の培養液を顕微鏡用のチャンバーに封入し、至適生育温度である85°Cで観察した。しかし、泳いでいる菌体は見当たらなかった。そもそも濁度が低く(OD₆₆₀ ~ 0.004)、さらに電子顕微鏡写真から多くの菌体はべん毛を持たなかったため、当然の結果でもある。なすすべもなく観察を続けていると、突然、細胞の凝集体が出現し、(あたかも

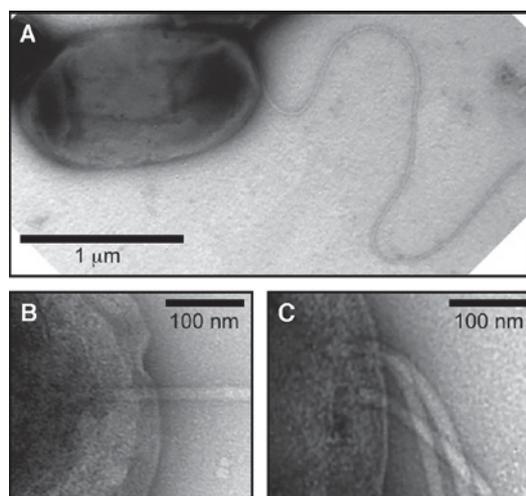


図1. 超好熱性細菌 *Aquifex aeolicus* の電子顕微鏡写真。(A) 細胞本体とべん毛線維。(B–C) 細胞の極の拡大図。

大怪物ガメラが飛来するかのように)ぐるぐる自転しながら再び画面外へと去っていった(Aquificaeは凝集しやすい¹⁵⁾). 気持ちをあらたに観察を続けると、凝集していない細胞がおおむねまっすぐな軌跡で高速に泳ぎ去る様子を録画することができた[$93 \pm 40 \mu\text{m s}^{-1}$ (mean \pm SD, $n = 55$), 85°C]³⁾. また、興味深いことに生育下限より低い温度でも菌体は遊泳していた(図2B).

A. aeolicus 運動マシナリーの動作機構

*A. aeolicus*の運動マシナリーを詳細に調べるため、菌体の調製が容易な大腸菌を利用した実験系を構築した. 細菌べん毛モーターは細胞膜に位置する巨大なタンパク質複合体であり^{23,24)}, モーターの中央にあって滑らかに回転する「回転子」と、その周囲に位置する「固定子」からなる. 固定子は膜タンパク質複合体であり、特定の陽イオン(代表例は H^+)の流れをエネルギー源として、回転子にトルクを発生させる. 筆者らは、この固定子に着目し、*A. aeolicus*由来の固定子を大腸菌内で発現させ、大腸菌が本来持つ回転子と組み合わせることにした³⁾.

べん毛モーターの固定子は2種類のタンパク質MotAとMotBからなる. *A. aeolicus* VF5株の場合、そのオペロンは一つの*motA*と二つの*motB*から構成されている. これらの遺伝子は大腸菌由来の各因子と4割弱の相同性があり、トルク発生に直接関わる重要な残基は保存されていた. VF5株に由来する*motA*と*motB*を大腸菌内で機能させるため、トルク発生とは直接関わない部位を改変した(詳細略). この改変したVF5株由来の固定子と、大腸菌由来の回転子によるトルク発生をテザードセルアッセイ^{23,24)}により測定した. この回転速度は溶液中にある Na^+ 濃度に依存したことから(図2C), VF5株のモーターは Na^+ 駆動型であると判断された.

べん毛モーターのエネルギー源の変遷

これまでの研究で明らかにされているべん毛モーター固定子*motA/motB*を対象に遺伝子配列の系統解析を行った³⁾. その結果、*A. aeolicus*の固定子は、進化の最初期に分岐した*Thermotoga maritima*との相同性が高く、細菌の祖先は Na^+ 駆動型のモーターをまず獲得したと推定さ

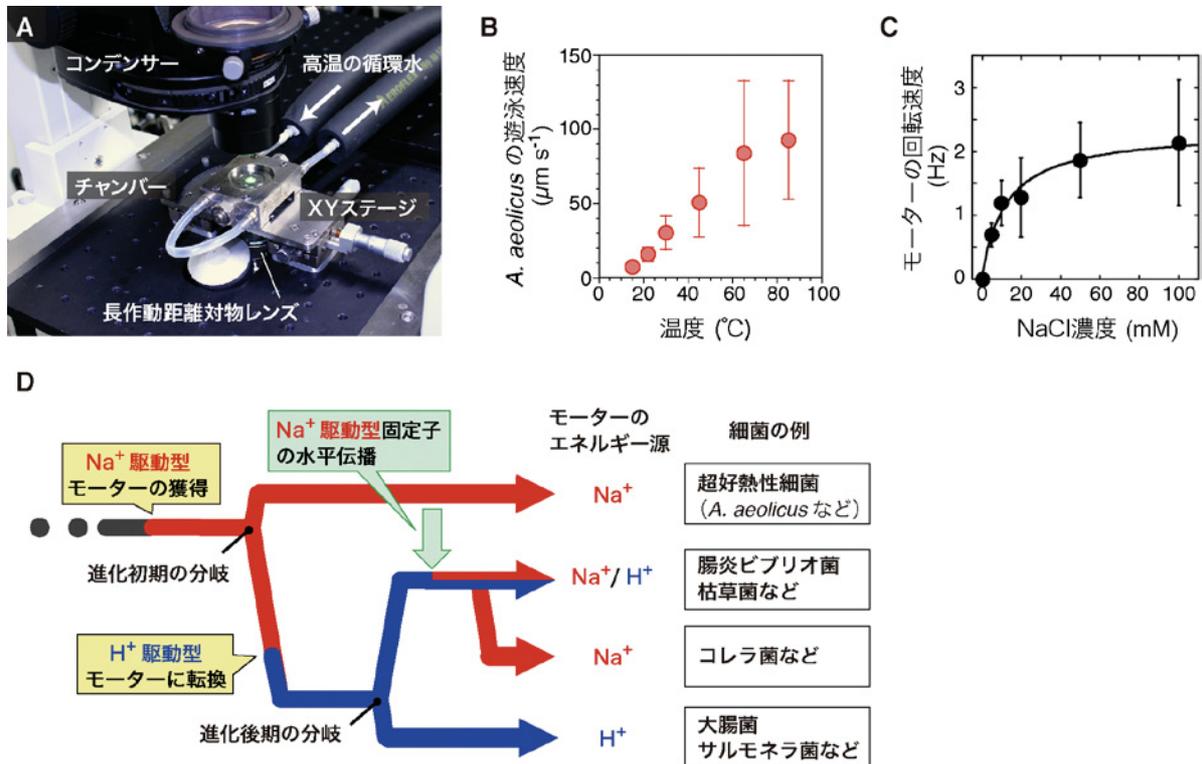


図2. 超好熱性細菌*A. aeolicus*の運動マシナリー. (A) 実験装置の写真. (B) *A. aeolicus*の遊泳速度の温度依存性. 菌体は 85°C で培養した後、各温度で観察した. (C) 大腸菌内で発現させた*A. aeolicus*に由来する固定子のトルク発生 (MotA^{Aa}(A225D)/MotB^{Ae})³⁾. 室温で行ったテザードセルアッセイ. (D)べん毛モーター・エネルギー源の変遷予想図. はじめに、細菌の祖先は Na^+ 駆動型モーターを獲得する. 次に、進化の比較的初期にモーターは Na^+ 駆動型から H^+ 駆動型へと転換し、多くの細菌が H^+ の流入により駆動するようになる. その後、ピブリオ菌やコレラ菌などの一部の細菌に Na^+ 駆動型の固定子が水平伝播する. ※学会HPのPDFではカラーで表示されます.

れる(図2D)。その後、細菌の多くは陸上(NaClが少ない所)に生息域を拡大する過程で、モーターのエネルギー源を H^+ へと変えていったのであろう(現在では H^+ 駆動型が主流)。同じような例として V_0V_1 -ATP合成酵素があげられる。一般にこの酵素は H^+ 駆動型が多いが、海洋性の超好熱性アーキアである*Pyrococcus furiosus*は Na^+ 駆動型である²⁵⁾。これらの結果は、細菌やアーキアの祖先と考えられている超好熱性菌が、NaClが豊富な海洋性環境で発生したことを強く示唆している。

その一方で、*A. aeolicus*の固定子は、 Na^+ 駆動型の固定子を持つ*Vibrio alginolyticus*、*V. parahaemolyticus*、*B. subtilis*とも相同性が高かった。この結果は、進化の過程で Na^+ 駆動型の固定子が他の細菌へと水平伝播したものと推察される(図2D)。以上のようなエネルギー源の変遷は、生息域の拡大や他の菌との交流を示す証拠になるだろう。

今後の展望

本稿では、生命が初めて獲得した運動マシナリーの動作機構を調べるために行った超好熱性細菌*A. aeolicus*のべん毛運動について紹介してきた。筆者らの研究からは、細菌の祖先は Na^+ をエネルギー源として遊泳していたこと、その基本的な化学-力学エネルギー変換機構は現在に至るまでよく保存されていることが明らかになった。また、モーターのエネルギー源の変遷は細菌が生息域を拡大していく過程をとどめた証拠とも言えよう^{26,27)}。

最後に、より原始的な生命体を紹介して筆をおくことにする。近年、地下水から、小さく(0.2 μm 以下)かつ、これまで培養例のない細菌群のゲノムが計35門も同定され(Candidate Phyla Radiation, CPR)、系統樹が刷新された^{28,29)}。新しい系統樹では、細菌ドメインの多様性がきわだち、中でもCPRはもっとも多様であることが判明した。つまり、CPRが生命史の最初期に出現し進化を遂げたと推察される(他よりも進化速度が速かった可能性もある)。

さらに、アメリカのザ・シダーズにある蛇紋岩体湧水(pH 11)からCPRに含まれる菌体群(のゲノム)が見つけた^{29,30)}。総じて、ゲノムサイズがきわめて小さく(大腸菌の約1/10)、中には、生命の維持・存続に必要なはずの遺伝子群(呼吸や代謝、ATP合成……)さえ持たない菌体が含まれていた。こうした菌体群は、原始生命体の姿により近いのではないかと考えられる。今後の研究の伸展を期待したい。

謝 辞

本稿を執筆するにあたり、ご助言をいただきましたDr. Harald Huber、高井研上席研究員、加藤千明博士に御礼申し上げます。次に、今回、紹介させていただいた超好熱性細菌*A. aeolicus*の研究は、金関剛史氏、跡見晴幸教授、小嶋誠司博士、本間道夫教授との共同研究であり、新学術領域「運動マシナリー」からの研究支援により達成されました(No. 25117511, 15H01319)。また、常日頃からお世話になっています栗原達夫教授、今田勝己教授にこの場をお借りして御礼申し上げます。

文 献

- 1) 山岸明彦編：アストロバイオロジー—宇宙に生命の起源を求めて、化学同人(2013)。
- 2) 日本化学会編：分子マシンの科学、化学同人(2017)。
- 3) Takekawa, N. *et al.*: *Sci. Rep.*, **5**, 12711 (2015)。
- 4) 掛川 武：地質ニュース, **596**, 60 (2004)。
- 5) ジム・アル-カリ-リら著、水谷 淳翻訳：量子力学で生命の謎を解く、SBクリエイティブ(2015)。
- 6) 高井 研：生命はなぜ生まれたのか、幻冬舎新書(2011)。
- 7) 渋谷岳造、高井 研：化学と工業, **65**, 761 (2012)。
- 8) 上野雄一郎：地学雑誌, **112**, 208 (2003)。
- 9) Deming, J. W. and Baross, J. A.: *Geochim. Cosmochim. Acta*, **57**, 3219 (1993)。
- 10) 大島泰郎：生命は熱水からはじまった、東京化学同人(1995)。
- 11) 高井 研：Viva Origino, (2018)。(印刷中)
- 12) 高井 研編：生命の起源はどこまでわかったか—深海と宇宙から迫る—、岩波書店(2018)。
- 13) Van kranendonk, M. J. *et al.*: 日経サイエンス, **48**(3), 30 (2018)。
- 14) 加藤千明ら編著：深海と地球の事典, p. 1, 丸善出版(2014)。
- 15) Huber, R. and Stetter, K. O.: "Aquifex" Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 1, Wiley (2001)。
- 16) 日本 Archaea 研究会監修：アーキア生物学, 共立出版(2017)。
- 17) Deckert, G. *et al.*: *Nature*, **392**, 353 (1998)。
- 18) Fleischmann, R. D. *et al.*: *Science*, **269**, 496 (1995)。
- 19) 西山雅祥, 木村佳文：LTMセンター誌, **22**, 18 (2013)。
- 20) 西山雅祥, 曾和義幸：化学, **68**, 33 (2013)。
- 21) 西山雅祥ら：顕微鏡, **51**, 118 (2016)。
- 22) NHKスペシャル ディープオーシャン 超深海 地球最深への挑戦, NHKエンタープライズ, Blu-ray Disc (2017)。
- 23) 曾和義幸, 笠井大司：生物工学, **96**, 183 (2018)。
- 24) Minamino, T. and Namba, K. eds.: The Bacterial Flagellum, Humana Press (2017)。
- 25) Mayer, F. and Müller, V.: *FEMS Microbiol. Rev.*, **38**, 449 (2014)。
- 26) 伊藤政博：生物工学, **96**, 187 (2018)。
- 27) 伊藤政博ら編：極限環境生命, コロナ社(2014)。
- 28) Hug, L. A. *et al.*: *Nat. Microbiol.*, **1**, 1 (2016)。
- 29) 中島林彦：日経サイエンス, **48**, 40 (2018)。
- 30) Suzuki, S. *et al.*: *ISME J.*, **11**, 2584 (2017)。