

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21370074

研究課題名（和文）バチルス属細菌がもつ新奇なべん毛モーター固定子複合体の機能と構造の解明

研究課題名（英文）Elucidation of structure-function of unique bacterial flagellar stator complex from *Bacillus* spp.

研究代表者

伊藤 政博（ITO MASAHIRO）

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：80297738

研究成果の概要（和文）：枯草菌のべん毛モーターの一分子解析によるトルクを算出し、このモーターが H<sup>+</sup>型固定子 MotAB と Na<sup>+</sup>型固定子 MotPS からなるハイブリッドモーターであることを明らかにした。また、枯草菌の固定子 MotAB、MotPS の 3 番目と 4 番目の膜貫通領域の間にある親水性領域に存在する複数の荷電アミノ酸残基からモーターの回転と固定子複合体の安定性に重要なアミノ酸残基を同定した。更に、好アルカリ性細菌 *Bacillus alcalophilus* のべん毛が、これまで報告例のないカリウムイオンで駆動する新規なモーターであることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：At first, we identified that the flagellar motor of *B. subtilis* was a hybrid motor and it rotated by using both ion motive forces, H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>, by a single molecular mechanism. Next, the critical charged amino acid residues between the second and third transmembrane cytoplasmic loop region in MotA and MotP subunits of *B. subtilis* were identified by using site-directed mutagenesis. Moreover, we identified a novel type flagellar motor from alkaliphilic *Bacillus alcalophilus* which stimulates swimming speed under elevated K<sup>+</sup> or Rb<sup>+</sup> concentrations. This is the first report that describes a flagellar motor that can use both K<sup>+</sup> and Rb<sup>+</sup> as coupling ions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2012 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
総計	11,500,000	3,450,000	14,950,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：べん毛・バチルス・膜タンパク質・構造解析・固定子

## 1. 研究開始当初の背景

べん毛が“回転している”という発見から 40 年以上経つが、固定子複合体の原子レ

ベルの構造が未解明であるため、回転機構の詳細は不明であった。べん毛モーターは細胞膜に埋まっていて、細胞膜を横切る H<sup>+</sup>または

Na<sup>+</sup>の電気化学的駆動力により回転する。モーター駆動部は回転子と固定子からなり、イオンチャンネルとして機能する固定子 “Mot” 複合体中をイオンが通過する際に、回転子複合体中の FliG タンパク質と相互作用してトルクが発生すると考えられている。固定子は、1 ユニットあたり 4 個の MotA 型サブユニットと 2 個の MotB 型サブユニットからなり、回転子の周囲に 8 個から最大 16 個の固定子ユニットが存在すると考えられている。これまで、固定子に関する研究は、大腸菌など多くの微生物に存在する H<sup>+</sup>駆動型固定子 MotAB と、*Vibrio* 属細菌で見つかった Na<sup>+</sup>駆動型固定子 PomAB で行われてきた。しかし、我々のグループは枯草菌や好アルカリ性バチルス属細菌から新たに Na<sup>+</sup>駆動型固定子 MotPS を発見し、それまで大腸菌と同様に H<sup>+</sup>駆動力を利用すると考えられてきた枯草菌のべん毛モーターが、Na<sup>+</sup>駆動力だけを利用して回転できることを明らかにした (Ito et al., *Mol. Microbiol.*, 2004)。MotPS は、*Vibrio alginolyticus* の Na<sup>+</sup>駆動型固定子 PomAB と 36%の相同性 (62%の類似性) があり、枯草菌の H<sup>+</sup>駆動型固定子 MotAB と 40%の相同性 (62%の類似性) を持つ。系統樹解析の結果から、MotPS が PomAB や MotAB と異なる第 3 のグループをべん毛モーター固定子ファミリー中に形成することが示された。ところで、*Vibrio* 属細菌は、H<sup>+</sup>駆動型の周べん毛モーターと Na<sup>+</sup>駆動型の極べん毛モーターを持ち、それぞれのモーターに H<sup>+</sup>駆動型固定子 MotAB と Na<sup>+</sup>駆動型固定子 PomAB に対応した別々の回転子とべん毛基部遺伝子群を持つ。しかし、枯草菌は 2 種類の固定子 (MotAB、MotPS) に対して 1 セットの回転子とべん毛基部遺伝子しか持たない。研究の初期段階では、モーターから固定子部分だけが入れ替わることで、駆動エネルギーを使い分けると考えられていたが、野生株と Mot 欠損変異株を用いた研究から、ひとつの枯草菌べん毛モーターが MotAB と MotPS の両方の固定子ユニットで構成されるハイブリッドモーターであることを発見した (Terahara et al. *J. Bacteriol.*, 2006)。つまり、枯草菌のべん毛モーターは H<sup>+</sup>または Na<sup>+</sup>のどちらか一方の駆動力のみを利用して回転するのではなく、両方の駆動力を合算したエネルギーで回転すると推定された。また、pH7 から pH11 付近まで生育する好アルカリ性細菌 *Bacillus clausii* のべん毛モーターの研究から、*Bacillus clausii* のべん毛モーターが、外環境 pH の変化に応じて中性から pH9.5 付近までは主にプロトン駆動力を、pH10 以上では主にナトリウム駆動力を利用して回転する環境 pH 応答型べん毛モーターであることを明らかにした (Terahara et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008)。これまでこのような報告例はなく、枯草菌や

*Bacillus clausii* のべん毛モーターの機能を解析することで、べん毛モーター回転機構の解明はもちろんのこと、蛋白質のイオン選択性やエネルギー変換機構について、全く新しい知見が得られるのではないかと期待された。

## 2. 研究の目的

我々は、好アルカリ性細菌から新規な Na<sup>+</sup>駆動型のべん毛モーター固定子 MotPS を発見し (Ito et al., *Mol. Microbiol.*, 2004)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の 2 つの固定子 MotAB と MotPS の各サブユニットの機能的な役割を解明した (Ito et al., *J. Mol. Biol.*, 2005, Terahara et al., *J. Bacteriol.*, 2006)。更に、2008 年に、pH7 から 11 付近まで生育が可能な好アルカリ性細菌 *Bacillus clausii* KSM-K16 株のべん毛モーターが、中性から pH9.5 付近までは主にプロトン駆動力を、pH10 以上では主にナトリウム駆動力を利用する、これまでに例のない環境 pH 応答型のべん毛モーターであることを明らかにした (Terahara et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008)。これらの成果を踏まえ、今回は以下の目的について研究を行った。

- (1) 枯草菌や *Bacillus clausii* が持つべん毛モーターについて、一つのモーターユニットのトルクを算出することにより、モーターの性能を解析する。
- (2) 枯草菌のべん毛固定子 MotAB、MotPS と相互作用する回転子複合体の構成タンパク質である FliG に着目し、べん毛モーターの回転に関与するアミノ酸残基を特定する。
- (3) 枯草菌が持つ Na<sup>+</sup>駆動型固定子 MotPS について、大量精製系を確立して X 線結晶構造解析を行い、モーターの回転機構を原子レベルで解明する。
- (4) 新規な共役イオンを利用して回転するモーターの探索を試みた。

## 3. 研究の方法

- (1) べん毛モーターのトルク測定  
4 分割光センサー顕微鏡を用いて枯草菌のべん毛モーター分子のトルクを算出し、モーターの特性を調べた。
- (2) 固定子と回転子への部位特異的変異導入と運動性解析  
枯草菌固定子 MotAB と MotPS の 2 番目と 3 番目の膜貫通領域に存在する親水性のループ領域と回転子 FliG の C-末端領域に存在する荷電アミノ酸に着目し、これらのアミノ酸に変異を導入し、各タンパク質の発現、運動性への影響を解析した。
- (3) 固定子タンパク質の大量発現  
枯草菌の MotPS に着目し、代表菌を用いた大量精製系の確立を試みた。
- (4) 新規なべん毛モーター固定子の探索

19 種類の好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌を理化学研究所 JCM より分譲を受け、それらのべん毛モーター固定子のクローニングと塩基配列の同定および運動特性の解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 4 分割センサー顕微鏡を用いた枯草菌のべん毛モーター分子によるトルク特性の結果は、枯草菌野生株のべん毛モーターが MotAB と MotPS の 2 種類の固定子を一つのモーターに組み込んで駆動する結果を得ることができた。この結果は、まとめ次第、投稿を予定している。

(2) 枯草菌の固定子 MotAB と MotPS への変異導入実験では、固定子の構造面と機能面に重要なアミノ酸残基の同定を行うことができた。現在、この成果は、研究成果を補足するために更なる追加実験を行っている。また、回転子 FliG に関しても、現在、機能面で重要なアミノ酸残基の同定を行っている。現在、投稿準備中である。

(3) 19 種類の好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の中から好アルカリ性細菌 *Bacillus alcalophilus* のべん毛モーターが、これまで報告例のない Na<sup>+</sup> と K<sup>+</sup> を利用できる新規べん毛モーターであることを明らかにした。また、固定子中の一アミノ酸を置換することで K<sup>+</sup> が利用できないモーターの創成に成功した。

(PLOS ONE, 2012)。また、19 種類の菌株の運動性と固定子遺伝子に関する情報をまとめた。この詳細は、現在、投稿準備中である。

(4) 枯草菌の MotPS について大量精製系の確立と結晶化を進めた。精製タンパク質の量が微量でスクリーニングが可能な結晶化ロボット等を用いた結晶化スクリーニングを行ったが、得られた結晶の回折測定で目的の回折像はまだ得られていない。膜タンパク質の結晶化は可溶性タンパク質と比較すると非常に難しく、結晶構造の成功例は圧倒的に少ない。今後は、不活性な複合体やサブユニット単体の結晶化などのステップを経る地道な作業によって完全な複合体構造の構造解明に近づけたいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① 寺原直矢、佐野元彦、伊藤政博、第 3 のイオンで駆動するハイブリッド型生物モーターの発見、バイオサイエンスとインダストリー、査読無、掲載決定 (2013)
- ② Terahara N., Sano M. and Ito M., A *Bacillus* flagellar motor that can use both Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> as a coupling ion is converted by a single mutation to use

only Na<sup>+</sup>, *PLOS ONE*, 査読有, 7(9) e46248 (2012)

DOI: 10.1371/journal.pone.0046248

- ③ Janto B, Ahmed A, Ito M., Liu J, Hicks DB, Pagni S, Fackelmayer OJ, Smith T A, Earl J, Elbourne LD, Hassan K, Paulsen IT, Kolstø AB, Tourasse NJ, Ehrlich GD, Boissy R, Ivey DM, Li G, Xue Y, Ma Y, Hu FZ, Krulwich TA., Genome of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 reveals adaptations that support the ability to grow in an external pH range from 7.5 to 11.4. *Environmental Microbiology*, 査読有, 13(12), 3289-3309, (2011)
- ④ 伊藤政博、微生物に学ぶアルカリ性環境適応戦略、低温生物工学会誌、査読有, 57(1), 25-32 (2011)
- ⑤ Ito M., Fujinami S. and Terahara N., Bioenergetics: cell motility and chemotaxis of extreme alkaliphiles, *Extremophiles handbook*, 査読有, Vol. 1, Springer, 2010, 141-161.
- ⑥ Fujinami S., Terahara N., Krulwich T. A. and Ito M., Motility and chemotaxis in alkaliphilic *Bacillus* species., *Future Microbiology*, 査読有, 4, 1137-1149 (2009)

[学会発表] (計 48 件)

- ① 高橋優嘉、野口有希奈、伊藤政博、好アルカリ性細菌の Na<sup>+</sup> 駆動型べん毛モーター固定子 MotPS への変異導入により中性環境での共役イオン透過を高めるアミノ酸残基の同定、日本農芸化学会 2013 年度大会、東北大学 (宮城)、2013 年 3 月 26 日
- ② Takahashi Y., Noguchi Y. and Ito M., Effect of a single *motP* mutation for motility at neutral pH of the Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor of *Bacillus pseudofirmus* OF4, BLAST meeting 2013, January 20-25, 2013, Tucson, AZ
- ③ 古山琴美、伊藤政博、「枯草菌べん毛モーター固定子におけるイオン流入経路に関わるアミノ酸残基の解析」、2012 年度極限環境生物学会年会、日本大学文理学部 (東京)、2012 年 12 月 1, 2 日
- ④ 高橋優嘉、野口有希奈、伊藤政博、「好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 株の Na<sup>+</sup> 駆動型べん毛モーター固定子 MotPS における中性環境でのイオン透過性に重要なアミノ酸残基」2012 年度極限環境生物学会年会、日本大学文理学部 (東京)、2012 年 12 月 1, 2 日
- ⑤ 古山琴美、伊藤政博「枯草菌べん毛モーター固定子中のイオン流入経路に関与す

- るアミノ酸残基の解析」、2012 年度日本農芸化学会関東支部年会、新潟薬科大学（新潟）、2012 年 10 月 27 日、28 日
- ⑥ 高橋優嘉、伊藤政博「2 種類の共役イオンが利用できるハイブリッド型生物モーターの回転機構の解明」、2012 年度日本農芸化学会関東支部年会、新潟薬科大学（新潟）、2012 年 10 月 27 日、28 日
- ⑦ Koyama K. and Ito M., An analysis of amino acid residues which affect the structure of the ion flux pathway of the flagellar stator complex from *Bacillus subtilis*, 17th European Bioenergetics Conference, Freiburg, Germany, September 15-20, 2012.
- ⑧ Takahashi Y. and Ito M., The charged amino acid residues of two different stators of the flagellar motor in *Bacillus subtilis* are important for motility, 17th European Bioenergetics Conference, Freiburg, Germany, September 15-20, 2012.
- ⑨ Masahiro Ito, “One stator that couples to two different ions: flagellar stator and motility of alkaliphilic *Bacillus* species.” 9<sup>th</sup> International Congress on Extremophiles 2012, Sevilla, Spain, September 12, 2012.
- ⑩ 伊藤政博、「ハイブリッド型生物モーターに関する研究」、平成 24 年度井上円了賞受賞記念講演、東洋大学白山キャンパス（東京）、2012 年 6 月 10 日
- ⑪ 伊藤政博、「極限環境微生物のアルカリ性環境適応戦略」、シンポジウム「細菌センサーと環境応答」、第 85 回日本細菌学会総会、長崎新聞文化ホール（長崎）、2012 年 3 月 29 日
- ⑫ 伊藤政博、「ハイブリッド型生物モーターに関する研究」、第 7 回日本学術振興会賞受賞記念講演、極限環境生物学会 2011 年度（第 12 回）年会、長崎大学坂本キャンパス・良順会館（長崎）、2011 年 11 月 27 日
- ⑬ 高橋優嘉、伊藤政博、「枯草菌べん毛モーターの回転機構における固定子 MotAB、MotPS の重要な荷電アミノ酸残基」、第 11 回極限環境生物学会年会、京都大学宇治キャンパス（京都）、2011 年 11 月 16 日
- ⑭ 野口有希奈、寺原直矢、伊藤政博、「H<sup>+</sup>駆動力と Na<sup>+</sup>駆動力の両方が利用可能な枯草菌べん毛モーターの 1 分子回転計測法によるモーター特性の解明」、第 11 回極限環境生物学会年会、京都大学宇治キャンパス（京都）、2011 年 11 月 15 日
- ⑮ 伊藤政博、「微生物に学ぶアルカリ性環境適応戦略」第 55 回低温生物工学会大会セミナー、東京工業大学大岡山キャンパス

（東京）、2010 年 6 月 25 日

- ⑯ Masahiro Ito, “The Single Flagellar Stator That Supports Use of Both H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> for Motility in an Alkaliphilic *Bacillus clausii* is Changed to Single-coupling by Mutation and Dual Ion Use Is Conferred On Two *Bacillus subtilis* Motors.” International Symposium “Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins”, Kyoto University (Kyoto), Japan, September 8, 2009.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 政博 (ITO MASAHIRO)  
東洋大学・生命科学部・教授  
研究者番号：80297738

### (2) 研究分担者

寺原 直矢 (TERAHARA NAOYA)  
東洋大学・バイオナノエレクトロニクス研究センター・研究助手  
研究者番号：40554738  
(H21 のみ)

### (3) 連携研究者

今田 勝巳 (IMADA KATSUMI)  
大阪大学大学院・理学研究科・教授  
研究者番号：40346143