

令和元年6月16日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04364

研究課題名(和文)アーキアべん毛研究の基盤構築

研究課題名(英文) Exploring of a new molecular motor in archaeal flagella

研究代表者

西坂 崇之(Nishizaka, Takayuki)

学習院大学・理学部・教授

研究者番号：40359112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：生命科学において未踏の領域であった、アーキア(古細菌)が遊泳するメカニズムについて、生物物理学の視点より解明した。極限環境で生息するアーキアのべん毛は、理解が進んでいる真核生物の分子モーターや大腸菌のべん毛と異なり、分泌装置がベースとなったATP駆動による独自の運動機構を備えている。このアーキアべん毛について、らせんの構造・運動装置の特徴・それが生み出す流体への推進力の定量化・単位素子が生み出すステップを検出し、原著論文としてNature Microbiologyに発表した。さらにエネルギー変換の詳細を明らかにすることによって、全てのATP駆動型回転モーターに適応できる新しい学説を提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子モーターは化学エネルギーを力学運動に変換する機能を持つ蛋白質である。究極のナノマシンであるという認識から、モーターの研究はここ20年で飛躍的な進歩を遂げたが、アーキア遊泳を生み出す装置は手つかずのまま残されていた。この分子メカニズムは、細菌学のみならず生物物理・進化・タンパク質科学からも注目すべき課題であるはずだが、培養条件や実験の再現性の難しさから、世界的に見てもドイツの1グループを除いて大きな進展は見られなかったのである。本課題では、遊泳の仕組みを分子メカニズムにまで踏み込んで明らかにすることに成功した。生物物理においてアーキアモーターという新しい研究分野が開拓されたことになる。

研究成果の概要(英文)：Motile archaea swim using a rotary filament, the archaellum, a surface appendage that resembles bacterial flagella structurally. Little is known about the mechanism by which archaella produce motility. In a series of studies supported by this grant, we characterized archaellar function in the model organism Halobacterium salinarum. Three-dimensional tracking of quantum dots enabled visualization of the left-handed corkscrewing of archaea in detail. An advanced analysis method was developed and revealed a right-handed helical structure of archaella with a rotation speed of 23 Hz. We also determined motor torque by imposition of various loads on archaella; markers of different sizes were attached to single archaella, and their trajectories were quantified. We show that rotation slows as the viscous drag of markers increases, but torque remains constant at 160 pN nm independent of rotation speed. A new and general model for the mechanism of ATP-driven rotary motors are finally suggested.

研究分野：生物物理学

キーワード：アーキア 分子モーター 光学顕微鏡

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

- (1) 広く認められているように、化学エネルギーを力学運動に変換する機能を持つタンパク質である「分子モーター」の研究は、ここ 20 年で飛躍的な進歩を遂げた。構造、ゲノム、細胞内での機能から 1 分子レベルでの動作機構について、先進的な技術を通じて多方面からの決定的な知見が数多く得られた。しかしながら、実は研究の対象となってきた分子モーターの種類は生物界全体を考えるとあまりにわずかである。真核生物におけるミオシン・キネシン・ダイニン、バクテリアのべん毛モーター、そして回転分子モーターである F1-ATPase および V1-ATPase に限定される。他にも多くの分野の研究者が、力学エネルギーを産み出す酵素の研究を進めているが、分子メカニズムにまで踏み込むことができたモーターの種類は、世界全体でも 10 を超えることは無いと言えるだろう。
- (2) 本課題では、これまで未踏とされてきた極限環境に生息する生命、アーキアに焦点を当て、その運動装置の解明を目指す。構造、推進力、エネルギー源、さらには装置の単位素子が生み出すステップの詳細について明らかにする。

2. 研究の目的

- (1) 生命科学の未踏の領域である「古細菌 (Archaea、アーキア) 遊泳の分子メカニズム」を解明する。運動装置の構造、それが生み出す流体への推進力の定量化、さらには、装置の単位素子が生み出すステップを検出し、新規の分子モーターにおける化学-力学共役の詳細を明らかにする。極限環境で生息するアーキアべん毛は、理解が進んでいる真核生物の分子モーターや大腸菌の回転モーターと異なり、分泌装置がベースとなった ATP 駆動による独自の運動機構を備えていると考えられている。細菌学のみならず、生物物理・進化・タンパク質科学・ナノマシンデザインからも注目すべき課題であるはずだが、培養条件や実験の再現性の難しさから、未だ大きな進展は見られていない。本課題により、アーキアモーターという新しい研究分野を開拓する。
- (2) 本課題の目的は、単なる 1 つの基礎研究課題のそれに留まってははいない。再現性のある確実な測定方法を、未知の試料に対して確立することによって、プロジェクト終了後でも数多くの研究者がアーキアべん毛の研究に参画できるような大きな流れを生み出す—この大きな目標の標榜こそが、本課題の真の重要性である。

3. 研究の方法

光学顕微鏡・電子顕微鏡・生化学さらに細菌学の技術を結集し、アーキア遊泳の観察を再現性良く行うための一連の研究手法を樹立する。運動中のアーキアべん毛の可視化を光学顕微鏡で、また構造については電子顕微鏡でその実体を撮影し、教科書レベルの完全な形で記述できるところまでべん毛およびべん毛モーターの性質について明らかにする。次の段階で、分子メカニズムにまで踏み込むための方法として、「テザードセル」の実験系を確立する。溶液条件を選ぶことで、単位エネルギー入力によるステップ出力の検出・評価にまで研究を押し進める。ここ 20 年間で大腸菌において進められた研究手法を、アーキアに対して踏襲・深化させることで、4 年の期間でアーキアモーターの研究を大腸菌のべん毛モーターに比肩し得る段階にまで到達させる。

4. 研究成果

- (1) アーキアべん毛の機能を調べる最も単純な方法は、その動きを直接映像としてとらえることである。しかし、アーキアのべん毛は、10 ナノメートル（1 ミリの 10 万分の 1）と細く、通常の観察では見るることができない。本研究では、この問題点を克服し、アーキアべん毛の光学顕微鏡下での可視化、および、動態計測に成功した。
 - ① 「ハロバクテリウム・サリナラム」という種類のアーキアを特殊な試薬で処理すると、アーキアべん毛に蛍光色素や、量子ドットと呼ばれる微小な半導体素子を目印として付着させられることを見出した。これにより、細胞が遊泳する際にアーキアべん毛がぐるぐると回転する様子をはっきりと画像化することが可能となった。その結果、アーキアが毎秒 3 ミクロンの速さで運動する際、右巻きらせん形状のべん毛を時計回りに毎秒 20 から 30 回転させると同時に、細胞本体はゆっくりとすりこぎ運動をしながら推進することが明らかになった。
 - ② 興味深い発見の 1 つは、アーキアべん毛のらせん構造である。バクテリアでは、運動を制御する際、べん毛回転方向が変化すると、べん毛のらせん構造も変化することが知られている。ところが、アーキアべん毛では、べん毛の回転方向が変化しても、右巻きのらせんしかとらないことが分かった。このことから、1 本 1 本のべん毛につながった複数のモーターが同期して回転することで、べん毛がからまることなく、前進・後退という秩序だった動きをすることが予想される。
 - ③ さらに「モーター本来の動き」を観察することにも成功した。100 万分の 1 ミリメートルの動きを正確に追いかける顕微鏡の上で、モーターの回転を高速カメラ

で撮影した。驚くべきことに、べん毛の根元にあるモーターは、まるで時計の針のように、正確な角度とリズムを刻みながら回転することが分かった。これまでに様々な分子モーターがステップを刻むことが報告されてきたが、これほどはつきりした運動をするモーターは初めてである。

- ④ 以上の数々の発見は、西坂の率いる研究グループで開発してきた新しい技術 – 特に、3次元の動きを明らかにする顕微鏡と、全反射型蛍光顕微鏡 – を駆使することで、初めて明らかになった成果である。
 - ⑤ 上記の成果を踏まえ、この動きを計算によって再現することを試みた。水中で物体が動こうとすると、物体は、その動きに応じた抵抗を水から受けるが、大きさが千分の数ミリしかないアーキアのような生物は、ヒトや魚のように水の流れる勢い（慣性）を使って泳ぐことはできない。つまりアーキアにおいては、べん毛をスクリューのように回し続けることで、水から受ける抵抗を推進力に変換することになる。べん毛の生み出す推進力と、細胞本体が受ける抵抗のつりあいから、アーキアの泳ぐ速度が求められる。その理論的なモデルの作成を、東北大学の内田就也博士と共同で行った。精密に見積もられた確かな測定結果に基づいて、アーキアが水中で泳ぐ様子を理論的に再現することができた。そしてアーキアの運動の特徴であるすりこぎ運動も再現され、右巻きらせんのべん毛によってこの特別な生き物が前進することが示された。
- (2) エネルギー出力（トルク）の精密測定に成功した。近年の結晶構造や生化学的な解析により、アーキアべん毛を構成するタンパク質の個々の形や機能は明らかになりつつある。しかし回転のメカニズムを決定するような生物物理学的研究は、我々の前述のものを除いてほとんど見られなかった。そこで本項目では、物理の視点からこの回転モーターの性質を理解しようと試みた。
- ① アーキアの細胞をガラスに貼り付け、目印となる微小ビーズをべん毛繊維に付着させる。これによりアーキアべん毛の回転をダイレクトに検出することが可能となる。微小ビーズの大きさを変えると、モーターに異なる負荷を与えることができる。興味深いことに、負荷が小さくなる（ビーズが小さくなる）につれて、回転数が速くなることを見出された。このときのエネルギー出力は回転数に依らず、 1.6×10^{-19} ジュールとなることが明らかとなった。
 - ② これは非常に示唆的である。バクテリアのべん毛モーターは出力可変型のモーターであるのに対し、アーキアべん毛は出力一定型となった。この違いは、アーキアべん毛の根元にあるモーター FlaI が関与していると考えられる。FlaI は6量体を形成するATP依存的なモーターであるが、この特徴的な構造を従来の考え方に当てはめると、エネルギー効率は200%になってしまう。
 - ③ この矛盾は、既存の回転モデルが不十分なことを意味している。そこで本研究では新しい原理を提案した。ひとつのエンジンに注目したときの化学反応に対し、軸の構造の対称性が関係するというものである。これが正しいとすれば、見積もりに用いるエネルギー入力とは2倍以上になり、測定結果が説明できる。今回得られた知見は、生物が持つ回転モーターがどのようなメカニズムで動くのか、その基本原理の理解を助ける重要な情報となる。人間がデザインする微小モーターの開発への足掛かりになるだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 22 件、(邦文誌 2 件)）

- 1 Sani, M. A. & Nishizaka, T. Structural Biology, ASB/ABA meeting, Melbourne. *Biophys Rev*, doi:10.1007/s12551-019-00518-1 (2019).
- 2 Naito, T. M., Masaike, T., Nakane, D., Sugawa, M., Okada, K. A. & Nishizaka, T. Single-molecule pull-out manipulation of the shaft of the rotary motor F1-ATPase. *Sci Rep* **9**, 7451, doi:10.1038/s41598-019-43903-2 (2019).
- 3 Kimura, T., Tezuka, T., Nakane, D., Nishizaka, T., Aizawa, S. I. & Ohnishi, Y. Characterization of zoospore type IV pili in *Actinoplanes missouriensis*. *Journal of bacteriology*, doi:10.1128/JB.00746-18 (2019).
- 4 Iwata, S., Kinoshita, Y., Uchida, N., Nakane, D. & Nishizaka, T. Motor torque measurement of *Halobacterium salinarum* archaeall suggests a general model for ATP-driven rotary motors. *Commun Biol* **2**, 199, doi:10.1038/s42003-019-0422-6 (2019).
- 5 Sugawa, M., Masaike, T., Mikami, N., Yamaguchi, S., Shibata, K., Saito, K., Fujii, F.,

- Toyoshima, Y. Y., Nishizaka, T. & Yajima, J. Circular orientation fluorescence emitter imaging (COFEI) of rotational motion of motor proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, doi:10.1016/j.bbrc.2018.08.178 (2018).
- 6 Mizutani, M., Tulum, I., Kinoshita, Y., Nishizaka, T. & Miyata, M. Detailed Analyses of Stall Force Generation in *Mycoplasma mobile* Gliding. *Biophys J* **114**, 1411-1419, doi:10.1016/j.bpj.2018.01.029 (2018).
- 7 Kinoshita, Y. & Nishizaka, T. Cross-kymography analysis to simultaneously quantify the function and morphology of the archaellum. *Biophys Physicobiol* **15**, 121-128, doi:10.2142/biophysico.15.0_121 (2018).
- 8 Kinoshita, Y., Miyata, M. & Nishizaka, T. Linear motor driven-rotary motion of a membrane-permeabilized ghost in *Mycoplasma mobile*. *Sci Rep* **8**, 11513, doi:10.1038/s41598-018-29875-9 (2018).
- 9 Kinoshita, Y., Miyata, M. & Nishizaka, T. Publisher Correction: Linear motor driven-rotary motion of a membrane-permeabilized ghost in *Mycoplasma mobile*. *Sci Rep* **8**, 12820, doi:10.1038/s41598-018-31113-1 (2018).
- 10 Kinoshita, Y., Kikuchi, Y., Mikami, N., Nakane, D. & Nishizaka, T. Unforeseen swimming and gliding mode of an insect gut symbiont, *Burkholderia* sp. RPE64, with wrapping of the flagella around its cell body. *ISME J* **12**, 838-848, doi:10.1038/s41396-017-0010-z (2018).
- 11 Katoh, T. A., Ikegami, K., Uchida, N., Iwase, T., Nakane, D., Masaike, T., Setou, M. & Nishizaka, T. Three-dimensional tracking of microbeads attached to the tip of single isolated tracheal cilia beating under external load. *Sci Rep* **8**, 15562, doi:10.1038/s41598-018-33846-5 (2018).
- 12 Nakane, D. & Nishizaka, T. Asymmetric distribution of type IV pili triggered by directional light in unicellular cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**, 6593-6598, doi:10.1073/pnas.1702395114 (2017).
- 13 Katoh, T. A., Fujimura, S. & Nishizaka, T. in *Handbook of Photonics for Biomedical Engineering* (eds A. H.-P. Ho, D. Kim, & M. G. Somekh) 755-766 (Springer, 2017).
- 14 Fujimura, S., Ito, Y., Ikeguchi, M., Adachi, K., Yajima, J. & Nishizaka, T. Dissection of the angle of single fluorophore attached to the nucleotide in corkscrewing microtubules. *Biochem Biophys Res Commun* **485**, 614-620, doi:10.1016/j.bbrc.2017.01.165 (2017).
- 15 Tanaka, A., Nakane, D., Mizutani, M., Nishizaka, T. & Miyata, M. Directed Binding of Gliding Bacterium, *Mycoplasma mobile*, Shown by Detachment Force and Bond Lifetime. *MBio* **7**, doi:10.1128/mBio.00455-16 (2016).
- 16 Sugawa, M., Okazaki, K., Kobayashi, M., Matsui, T., Hummer, G., Masaike, T. & Nishizaka, T. F₁-ATPase conformational cycle from simultaneous single-molecule FRET and rotation measurements. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, E2916-2924, doi:10.1073/pnas.1524720113 (2016).
- 17 Kinoshita, Y., Uchida, N., Nakane, D. & Nishizaka, T. Direct observation of rotation and steps of the archaellum in the swimming halophilic archaeon *Halobacterium salinarum*. *Nat Microbiol* **1**, 16148, doi:10.1038/nmicrobiol.2016.148 (2016).
- 18 Yamaguchi, S., Saito, K., Sutoh, M., Nishizaka, T., Toyoshima, Y. Y. & Yajima, J. Torque generation by axonemal outer-arm dynein. *Biophys J* **108**, 872-879,

- doi:10.1016/j.bpj.2014.12.038 (2015).
- 19 Lee, W., Kinoshita, Y., Oh, Y., Mikami, N., Yang, H., Miyata, M., Nishizaka, T. & Kim, D. Three-Dimensional Superlocalization Imaging of Gliding Mycoplasma mobile by Extraordinary Light Transmission through Arrayed Nanoholes. *ACS Nano* **9**, 10896-10908, doi:10.1021/acsnano.5b03934 (2015).
- 20 Kurushima, J., Nakane, D., Nishizaka, T. & Tomita, H. Bacteriocin protein BacL1 of *Enterococcus faecalis* targets cell division loci and specifically recognizes L-Ala2-cross-bridged peptidoglycan. *Journal of bacteriology* **197**, 286-295, doi:10.1128/JB.02203-14 (2015).
- 1 西坂崇之 & 内藤達也. 光ピンセットの衝撃. *現代化学* **573**, 17-20 (2018).
- 2 加藤孝信 & 西坂崇之. 光ピンセットによるマニピュレーション技術とその繊毛への応用. *実験医学* **36**, 974-975 (2018).

[学会発表] (計 107 件、西坂が発表した 22 件のみを表示)

- 1 Nishizaka, T. in *Current and Future Perspectives in Active Matter* (The University of Tokyo, 2016).
- 2 Nishizaka, T. in *Bacterial Flagella, Injectisomes and Type III Secretion Systems* [招待講演] (Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University, Main Campus, 2017).
- 3 Nishizaka, T. in *19th IUPAB congress and 11th EBSA congress* (Edinburgh International Conference Centre, Edinburgh, UK, 2017).
- 4 Nishizaka, T. in *Telluride Science Research Center Workshop on Protein Dynamics* (TSRC, Telluride, USA, 2017).
- 5 Nishizaka, T. in 新学術領域 ゆらぎと構造の協奏 研究会「アクティブマターの概念で繋ぐ生命機能の階層性」 “Hierarchy of biological functions connected by concept of active matter” (函館 グリーンピア大沼, 2017).
- 6 Nishizaka, T. in *The 15th International Conference of “Na,K-ATPases and Related Transport ATPases”* [招待講演] (Otsu, Japan, 2017).
- 7 Nishizaka, T. in *The 2nd Korea-Japan Joint Symposium on Single-Molecule Biophysics* [招待講演] (Seoul National University, Seoul, South Korea, 2017).
- 8 Nishizaka, T. in *International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2017* [招待講演] (仙台国際センター, 2017).
- 9 Nishizaka, T. in *10th International Conference on Advanced Materials and Devices* [招待講演] (Ramada Plaza Jeju Hotel, Jeju, Korea, 2017).
- 10 Nishizaka, T. in *THE 21st PLANOVA™ WORKSHOP* [招待講演] (Grand Hyatt Hotel Union Square, San Francisco, CA, USA, 2018).
- 11 Nishizaka, T. in 新学術領域 “ゆらぎと構造の協奏” 若手研究会「統計物理学とその周辺」 [受賞講演] (2018).
- 12 Nishizaka, T., Fujimura, S., Sohma, Y. & Nakane, D. in シンポジウム「多角的な視点で読み解く膜デバイスの基本原理と新しい機能解析技術 “Multiple aspects to understand mechanisms of membrane proteins as devices and novel approaches to dissect biomolecules”」 (第55回 日本生物物理学会年会, 2017).
- 13 Nishizaka, T., Iwata, S. & Nakane, D. in *Les Houches-TSRC Workshop on Protein Dynamics* [招待講演] (the Ecole de Physique des Houches, Les Houches, France, 2018).

- 14 Nishizaka, T., Iwata, S. & Nakane, D. in *Asian Biophysics Association Symposium and Annual Meeting of the Australian Society for Biophysics* (the RMIT University City Campus, Melbourne, Australia, 2018).
- 15 Nishizaka, T., Kinoshita, Y., Katoh, T. A. & Nakane, D. in *31st International Congress on High Speed Imaging and Photonics [招待講演]* (Hotel Hankyu Expo Park, 2016).
- 16 西坂崇之. in *第53回日本生物物理学会年会* (金沢大学 角間キャンパス 自然科学本館, 2015).
- 17 西坂崇之. in *WPI-next international workshop "High resolution cell biology" [招待講演]* (E & S building, Nagoya Univ., 2015).
- 18 西坂崇之. in *第89回日本生化学会大会* (東北大学川内北キャンパス, 2016).
- 19 西坂崇之. in *日本物理学会 第72回年次大会* (大阪大学 豊中キャンパス, 2017).
- 20 西坂崇之. in *日本生体エネルギー研究会 第43回討論会* (京都産業大学むすびわざ館, 2017).
- 21 西坂崇之. in *日本生物物理学会 東北支部会 2018 [招待講演]* (山形大学米沢キャンパス百周年記念会館セミナー室, 2018).
- 22 西坂崇之, 岩田誠司, 村田幸樹, 鈴木香菜 & 中根大介. in *第91回日本細菌学会総会* (福岡国際会議場, 2018).

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称：立体視表示方法及び観測装置

発明者：西坂崇之

権利者：学校法人 学習院

種類：特許

番号：第 6 4 2 1 4 1 6 号

取得年：平成 3 0 年

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.gakushuin.ac.jp/univ/sci/phys/nishizaka/lab/lp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者 無し

(2) 研究協力者 無し

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。