

平成 31 年 4 月 16 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 197

氏名 木下 佳昭

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) フライブルク大学 (ドイツ 国)

2. 研究課題名 (和文)

アーキアべん毛の形成と機能の 1 分子計測技術による直接観察(※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。)

3. 派遣期間 (2 年間)

平成 29 年 8 月 10 日 ~ 平成 31 年 4 月 13 日 (612 日間)

4. 受入機関及び受入研究者

Institute of Biology II, Freiburg University, GermanyProf. Sonja-Verena Albers.5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

【研究の学術的・社会的背景】

ヒトからバクテリアまで様々な階層において運動は見られるが、それらの運動は化学エネルギーを力学的な仕事に変換する生体分子モーターにより達成される。これまで世界中の研究者がミオシンや細菌べん毛といった代表的な分子モーターの研究を行い、分子・原子レベルで駆動メカニズムを解明してきた。近年、既知の分子モーターに依存しない細菌運動が多数発見され、大阪市立大学の宮田真人教授を代表とする新学術領域が解明を目指している。一方で、**新たな局面を迎えた生体運動研究であるが、真核生物・細菌に限定されている。**何故なら、真核生物・細菌と共に生物界を構成するアーキアは高温・高塩濃度といった極限環境に生息しており、日本の生体運動研究者の参画を阻んでいるからだ。**アーキアは生体運動研究未踏の領域であり、多様性のある生体運動の理解、普遍性追求のために必要不可欠な研究対象である。**

【研究開始時の目標】

筆者はアーキアの運動観察をするための実験基盤を構築した (Kinosita et al., *Nature microbiology*, 2016) 次なる課題は、イメージング技術を生かしたべん毛形成並びにトルク発生の分子機構を解明することである。受け入れ研究者である Sonja-Verena Albers 教授の持つ遺伝学と融合を行い、以下の4点について研究成果を挙げることが申請書時点での目標であった。

1. べん毛形成の観察 2. モーターの回転制御 3. ステップ運動 4. モーターの形状観察

残念ながら4については既に、他のグループにより論文が報告されてしまった。本派遣中は1-3の解明を目標に実験を行う。以下に、結果の詳細を述べる。

アーキアべん毛形成の観察

【研究の学術的・社会的背景】

II型分泌装置がベースとなったアーキアべん毛は、バクテリアべん毛とは異なる運動装置である(図1)。分泌装置だけでなく、アーキアべん毛は病原性バクテリアの表面運動を生み出すIV型線毛とよく似た遺伝子配列を有する。これらの分泌装置並びに線毛の伸長は、細胞質に存在するATPaseの加水分解に伴い根元部分で起こる。従って、バクテリアべん毛繊維の先端成長とは根本的に異なる。しかしながら、根端成長はATPase欠損株等の間接的証拠に基づくものであり、直接的な証拠はない。そこで、2色の蛍光色素を用いてべん毛繊維の根端成長の可視化に挑戦した。

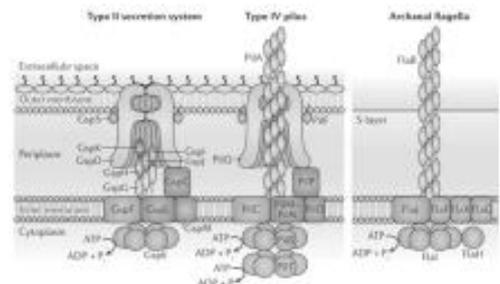


図1: アーキアべん毛と分泌装置の模式図
Korotkov et al., *Nat. Rev. Microbiol.*, 2012

結果

本研究では遺伝子操作が可能な *Haloferax volcanii* を用いた。この株は、アーキアべん毛と共にIV型線



図2: Δ PilB3 における蛍光観察

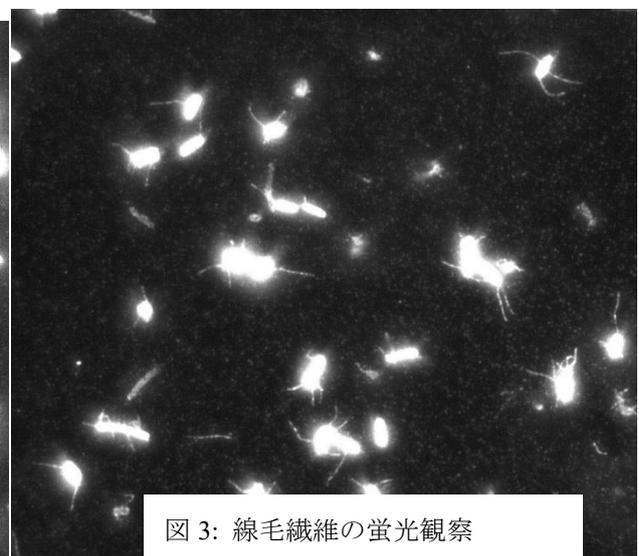


図3: 線毛繊維の蛍光観察

毛を形成する。べん毛繊維と線毛を区別するために、べん毛繊維形成に必要な FlaI を欠損させた株を作製した。次に、Kinosita et al., Nature microbiology に従いべん毛繊維の染色に挑戦した (図 2)。

残念ながら、以前の方法 (Kinosita et al., Nature microbiology, 2016) ではべん毛繊維の観察には成功していない。べん毛繊維は糖鎖修飾されていることが、べん毛蛍光染色を阻害しているものと考えられる。べん毛繊維の可視化には成功していないが、上述の方法で IV 型線毛の可視化に成功した (図 3)。

そこで、当初アーキアべん毛繊維で予定していた 2 種類の蛍光色素による根端成長の証拠を線毛で行うことにした (図 4)。

図 4 で示すように先に Alexa594 で染色を行ったが、興味深いことに細胞近くに線毛繊維のシグナルを確認することができなかった。一方で、後染めの Alexa488 のシグナルは確認出来た。新しい色素が根元についていることから、世界で初めて線毛繊維の根端成長を明らかにすることができた。現在では、タイムラプスイメージングを行い線毛の成長レートの計測に取り組んでいる。このデータを取り次第、論文として報告する予定である。

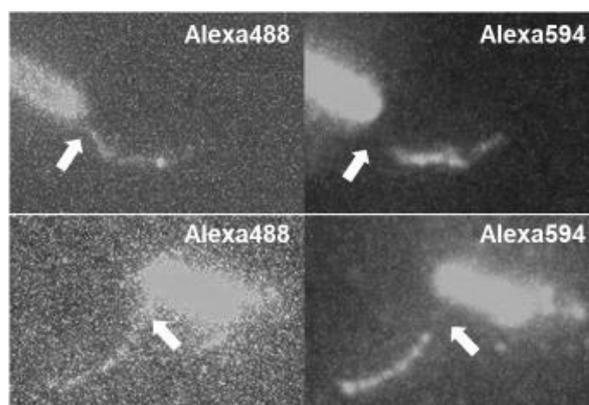


図4: 線毛の2色蛍光イメージング
Alexa594(先染め)のシグナルは細胞近くに存在しないが、488(後染め)は存在→根端成長

アーキアべん毛モーターの回転制御

【研究の学術的・社会的背景】

アーキアはべん毛モーターの回転方向を変換させることで、前進・後退運動を行うことができる。この方向転換は、バクテリア同様、Che と呼ばれる化学走性物質による。近年、CheY の結晶構造の解明や CheY と相互作用するタンパク質が明らかとなった (Quax et al., PNAS, 2018)。しかし、“CheY を持たない場合べん毛モーターはどちらに回転するのだろうか?”という根本的な問題は全く明らかとなっていない。

結果

著者は CheY の回転方向への影響を議論するために、CheY を欠損させた株を作製した (図 5)。 Δ CheY は寒天プレート上で広がりを確認することができなかった。これはべん毛繊維の回転方向の変化がないことによるものと推測される。

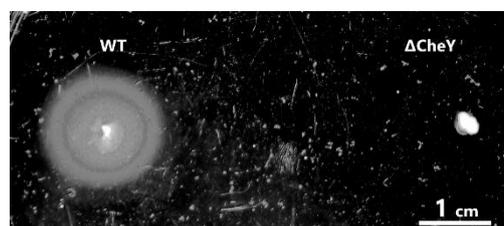


図 5: 0.25 %寒天プレート上での運動

次に、1 細胞を光学顕微鏡で追跡を行い、運動速度の測定を行った (図 6)。その結果、WT は毎秒 2 ミクロンと 5 ミクロンの速度で運動していた。一方で、 Δ CheY 株は 2 ミクロンと遅い速度の分布のみを検出した。著者は以前、CW 回転は CCW 回転に比べて 2 倍程度の効率で運動が可能であることを報告している (Kinosita et al., Nature microbiology, 2016)。この事実を踏まえると、 Δ CheY 株のモーターは CCW 方向のみに回転していることが推測される。

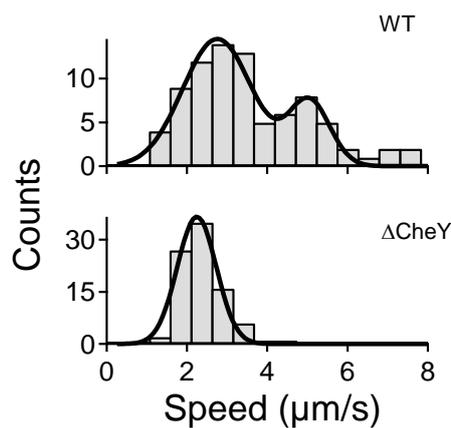


図 6: 遊泳速度のヒストグラム

上記の仮説を検討するために、べん毛繊維に蛍光ビーズを結合させ回転方向の確認を行った (図 7)。その結果、 Δ CheY は CCW 方向に確認していることを明らかにした。この結果は、現在著者を第 1 著者として論文を準備している。

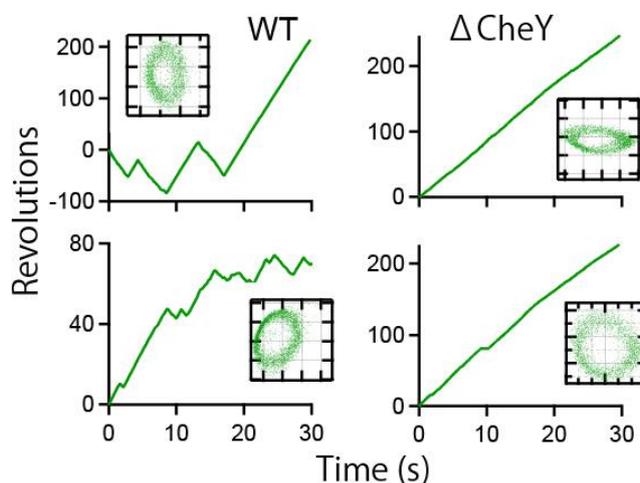


図 7: べん毛ビーズアッセイの結果

モーターのステップ運動

申請者はテザードセル法を用いて、*Halobacterium salinarum* のステップ運動を検出した (Kinosita et al., Nature microbiology, 2016)。これは野生株のデータである。ステップ運動の詳細な解析のため、筆者は Walker A, B 並びに Pi リリースが遅い変異株を作製した。寒天上、溶液中で運動を観察した所、Pi リリースが遅い変異株のみ運動性を示した (図 8)。

現在ではべん毛繊維にシステイン残基を導入し、運動の確認並びにべん毛蛍光染色に成功している。これはべん毛モーターの回転を可視化することが期待でき、今後モーターのステップ回転を検出したいと考えている。

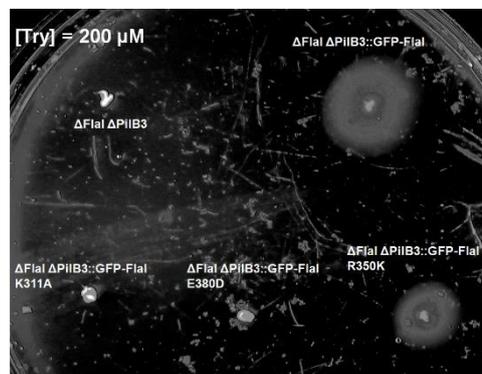


図 8: 寒天上での運動

モーターの交換

細菌べん毛は絶えずモーターの 1 部を交換することで機能を発揮する。この現象は蛍光を退色させた後の蛍光強度の回復を観察する、FRAP の実験により明らかになった。本研究ではアーキアべん毛モーターの 1 部に GFP を発現させ、FRAP の実験によりダイナミクスを明らかにしたいと考えた。本実験は当初の予定ではなかったが、遺伝学を習いながら新たに目標の 1 つとしたものである。

図 9 はモーター回復の蛍光像である。

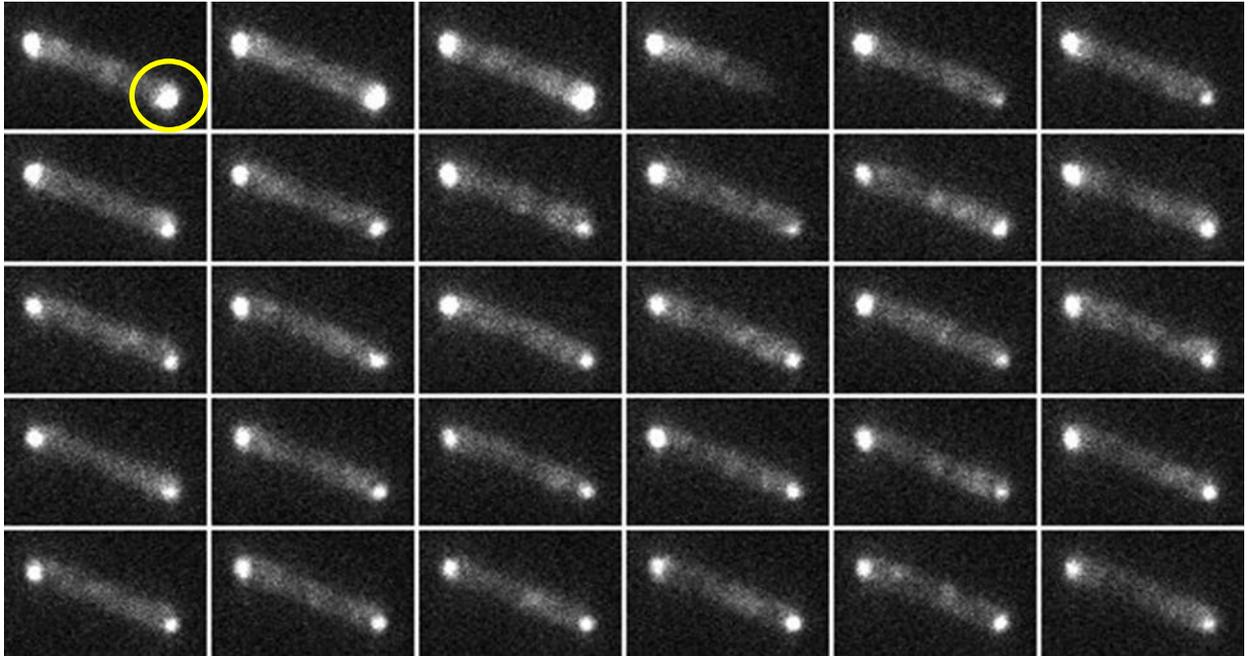


図 9: モーターのダイナミクス ○部分に強いレーザーを当て、退色させた

この方法を画像解析することで、回復時間などを定量化している。また、変異体などを作製して結果を比較しており、2019 年度中に論文として報告できるだろう。