

事後評価報告書

研究課題名： ベン毛のモーター回転と化学感覚系へのシステムバイオナノテクノロジーを用いた解析

研究代表者名：

2-1. 日本側研究代表者：

本間 道夫（名古屋大学 大学院理学研究科 教授）

2-2. 英国側研究代表者：

Judith Patricia Armitage（オックスフォード大学 生化学部 教授）

総合評価： （優）

3. 研究交流実施内容及び成果

本研究交流では、細菌の運動を担うベン毛モーターの解析を目的とする。

本研究交流課題を遂行する上で必要な環境を整えるために日本側研究チームは全反射顕微鏡を購入して蛍光タンパク質の検出をさらに高感度で行うことを可能とし、蛍光化ベン毛モータータンパク質やレセプターの観察を英国グループと一部においてほぼ同等にできるようにした。それによって、各々が融合タンパク質を交換し、お互いの測定系で検出を行うことで、技術的な問題を解決することができた。

ビブリオ菌が細胞の片極に単ベン毛をもつという点を利用して、固定子タンパク質と緑色蛍光タンパク質(GFP)の融合タンパク質の細胞内極在を観察することにより、PomA と PomB のベン毛モーターへの組み込み過程を調べることに成功した。

この実験によって、GFP-PomA あるいは GFP-PomB はそれぞれ単独では極局在しないが、PomA/PomB 複合体となるとベン毛のある側の極に局在すること、さらにその極局在が回転子に依存的であることを明らかにした。また、ビブリオ菌の Na⁺駆動型モーターの回転に必須な MotX と MotY が、基部位に付随した新たなリング構造（T リング）の形成に関与していることが最近の研究で明らかになり、この構造が固定子の極局在化に必要であることを示した。

さらに、日本側研究チームではモータータンパク質の膜上での集合が、ナトリウムイオンに依存することを見いだした。Na⁺ が *Vibrio alginolyticus* のモーターのトルク発生だけでなく固定子の構築にも関与していることがわかった。このことから日本側研究チームは、Na⁺が固定子に結合する、もしくは固定子内に流入することで、固定子が回転子の周囲に集合できるような構造に変化するのかもしれない、このことは、PomA/PomB 複合体のモーターへの組み込みが、Na⁺に依存していると考えた。この研究結果を英国側研究代表に示したところ研究をまとめる上で大きな示唆を得た。

英国側研究チームでも、モーター複合体構成蛋白質の MotB に GFP を融合し、単一分子レベルの精度で、分子の数と動きを追跡することに成功した。GFP を融合したモーター蛋白質が機能的であるのかを、ベン毛をガラス面に固定した菌体（デザート菌体）の回転で

確認し、その回転している菌体において、標識した GFP 分子を全反射蛍光顕微鏡により段階的な蛍光退色を観察し、モーターに含まれる MotB 分子数を推定した。

また、日本側研究チームでは、MotB の種々の変異体を作成しているが、この変異体と英国側研究チームの作成した GFP-MotB とを共発現させることで、機能解析を日英協力して行っている。以上の GFP 融合蛋白質の性質を調べて、研究をさらに進めるために、最近開発された無細胞蛋白質合成系を用いて合成を行った。

日本側研究チームは全反射蛍光顕微鏡を用いて、受容体 Tar に GFP を融合した Tar-GFP の動きを、リアルタイムで観察した。レセプター Tar は、細胞の極に直接挿入されるのではなく、いったん膜の側面に挿入され、膜挿入装置と共に膜側面でらせん状に配置することを明らかにした。

英国側では同様のことを *Rhodobacter* 菌の受容体においても観察し、両者を比較検討することで、膜タンパク質が極に集まる機構の解明に共同して研究を進めることが出来た。

蛍光物質をタンパク質に結合して一分子レベルで観察する技術は、本来、日本で大きく発展した。しかし、データの解析や解釈そして、さらにべん毛モーターに特化した装置の改良をするという点で、日本側の研究チームは遅れていた。この点については、本研究交流を深めることで改善された。

今後の計画としては、日本側研究チームは、本研究交流の成果を踏まえてエネルギー変換の機構解明を進める計画を持っている。短期的には、今後も続ける共同研究を通じて、現在行っている 1 個のモーターに何分子のモータータンパク質が集合しているのかを明らかにする計画である。

現在、日本側研究チームでは、固定子構成因子 PomA と回転子構成因子 FliG の間の直接的な相互作用の検出を試みている。本当に両蛋白質が相互作用しているかが明らかになれば、べん毛回転機構の分子レベルでの理解に、大きく近づくことになるだろう。

4. 事後評価結果

4-1. 総合評価

日本側の分子生物学研究グループと英国側の一分子生理学研究グループとが学術的に相補的に共同研究を推進した。この共同研究により、べん毛モーターの回転は小さなステップで刻まれていることが分子生物学グループが調製したハイブリッドバクテリアを用い、最新の単分子計測技術によって解析した結果実証された。この結果は *Nature* に発表された。また、GFP 結合タンパク質による研究により Na^+ がナトリウム駆動型モーターのトルク発生だけではなく固定子の構築にも関与していることが明らかにされた。またこの共同研究に於いて、一方の技術に他方が完全に依存するのではなく、双方が同じレベルの技術を持つことができるように技術及び情報の相互移入を行い、異なる種類の細菌を用いて研究を進めた。これは生命科学の新しい共同研究のあり方として注目すべきであろう。

4-2. 研究交流の有効性

本研究交流の主な研究成果は以下の 2 項目である。①約 30 年以前に、べん毛モ-

ターの回転が確認されて以来、それがステップを刻んだ回転であるかどうかについて、多くの研究者の努力にもかかわらず、未解明のままであった。そこで、遺伝子工学的に調製されたハイブリッドバクテリアを用いて、最新の一分子計測技術により、ステップを検出することに成功した。この成果は *Nature* に報告されるとともに2007年度 Daiwa Adrian Prize が授与された。また、科学工業系の新聞だけではなく一般全国紙にも報道された。②GFP 結合タンパク質を用いた実験により、固定子タンパク質が培地の Na^+ に依存して極局在がみられることが発見された。この結果は Na^+ がモーターのトルク発生だけではなく固定子の構築にも関与していること、すなわち Na^+ が固定子に結合することにより回転子の周囲に集合出来るように構造変化が誘起されることを示している。これらの成果はこのように世界的な研究グループ間の共同研究でこそ可能であったといえる。

この二国間共同研究事業に大学院生を主体的に参加させるため、分子生物学的、生化学的実験を担当させると共に、回転計測やイメージングの実験系の改良にも参加させた。このようにして大学院生の国際感覚の涵養を図った。

一分子測定に必要な最新の装置を日本側研究グループは、英国の装置技術に学びながら、日本に設置した。これにより、英国側の一分子生理学技術はほぼ完全に移送された。一方分子生物学的研究の進展に関する両研究グループ間の情報交換は緊密に行われた。このようにして当事業を端緒として研究交流は飛躍的に増加した。また本研究課題は今後さらに発展する可能性が見込まれるため両研究グループとも今後も活発な研究交流を継続することを強く希望している。そのため、英国側研究代表者が日本側研究代表者を研究分担者とした英国の新たな研究費を申請し採択されている。

4-3. 当初目標の達成度

日本側の分子生物学研究グループと英国側の一分子生理学研究グループとの共同研究として当事業は発足したが双方が同じレベルの技術と情報を共有し、それぞれが異なった種類のバクテリアを用いて、結果を比較しながら、それぞれが独立して研究を推進することができるよう研究交流実施体制は整備された。このような体制は日本と英国のように地理的に遠い二国間の共同研究の効率化を図るために誠に好適である。勿論このようなことはどちらの研究グループにも独自に分子生物学と一分子生理学を推進するに十分な人員が所属していてこそ可能である。

この規模の研究グループ間の研究交流事業としては相互派遣回数も少ないし独自のワークショップも開催されていない。しかし上述のような研究交流体制であるので、研究推進のための相互派遣の必要性はそれほど高くない。また日英セミナーが開催されたため独自のワークショップも研究推進のためには不必要であると考えられる。したがって、研究推進のための交流（相互派遣等）は過不足なく行われたといえる。