

論文審査の結果の要旨

論文題名

「微生物運動超分子マシナリーの作動機構の解明」

論文審査の要旨

1. 論文の概要

本論文は、マイコプラズマ=モービシという滑走バクテリア並びに高度好塩性アーキアの一種であるハロバクテリウム=サリナラムの運動についてまとめられている。両者に共通する特徴は、微生物が有する新規の分子モーターという点である。

自然界には、様々な階層における生物の“動き”が観察され、個体の移動から細胞内の小器官の微小な変位まで、多岐にわたっている。そしてこれらのほとんどは化学エネルギーを力学的な仕事に変換する特徴的なタンパク質、もしくはその超分子複合体によって実現されている。それらの効率の高さや正確な動作から、動きの礎となるタンパク質は数十年にわたり多くの研究者を魅了し続け、今や“分子モーター”あるいは“分子機械”とも呼ぶべき重要な研究対象という地位が確立されている。

さて生物物理の分野では、分子モーターの研究は、真核生物のミオシン・キネシン・ダイニン、あるいはバクテリアのべん毛運動を中心に展開していた。ところが近年、上記の生体分子機械を持たないにも関わらず運動能を持つ微生物が次々に見いだされ、注目が集まってきている。本学位申請者は、この新しい流れを牽引すべく、滑走バクテリアやアーキアの未知なる運動に注目した。そして全反射顕微鏡や高速イメージングといった、「1分子生化学」という精密測定分野で発展してきた観察技術を微生物に応用し、新規の運動装置の特性を次々に明らかにした。本学位論文では、これら重層な研究の中で、主に原著論文として発表されたものをまとめている。

本論文は全4章と Appendix から構成されており、以下に概略を記す。

第1章では、マイコプラズマ=モービレという細菌が示す滑走運動のステップ状変位について述べられている。マイコプラズマ=モービレは、2-4.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ という滑走運動の中でも最速の運動性を示す細菌の1つとして知られている。この細菌の運動は現在のところ、3つのタンパク質から構成されていると考えられており、それらが1つのタンパク質複合体を形成している。この装置は1細胞あたり約450ユニット存在しており、ATP加水分解のエネルギーを利用して駆動することもわかっている。過去の研究において、運動装置複合体の中のひとつである Gli349 というタンパク質が構造変化することが、運動に重要とされていた。しかし、直接的な証拠はなく作動機構は不明のままであった。

本学位申請者は細胞を蛍光色素で染色することにより、2ミリ秒の高時間分解能のもと、サブナノメートルの動きを追跡可能な観察系を構築した。加えて、シアル酸オリゴ糖の遊離型の添加並びにゴースト作製という2つの工夫を組み合わせることで、階段状の離散的な運動の検出に成功した。ペアワイズ解析の結果から、マイコプラズマ=モービレの運動装置は70ナノメートル大きさで構造を変化させていることが示された。また、ステップ運動の停止時間 (Dwell time) の解析も行われており、Dwell time は ATP 濃度に依存することが示された。すなわち、ステップ状変位は ATP の化学反応を伴った運動であると結論付けられている。

2章では、マイコプラズマ=モービレの回転運動について述べられている。回転運動の作製は、高い濃度の界面活性剤で菌体を処理することで検出するにより得られている。回転運動は ATP 濃度に依存しており、ミカエリスメンテン近似の結果から $V_{\text{max}} = 2.2 \text{ Hz}$, $K_m = 31 \mu\text{M}$ と見積もられた。本学位申請者は回転運動の作動機構を解明するために、変異株やシアル酸を用いた実験も行っている。Gli349 の結合因子であるシアル酸を溶液中に添加した結果、回転しているマイコプラズマは回転を停止した。この結果を基に、膜などがガラスと結合を支えている状況下で、あしの一方向的な構造変化によるモーメントの発生により回転運動が駆動されると結論付けている。また、Gli349 がない変異株において、微小な蛍光ビーズの挙動を観察している。その結果、80 ナノメートルの幅で規則的な大きさの振動を検出している、この結果から本学位申請者は、Gli521 というタンパク質の周期的な直線運動がステップ状変位の駆動力ではないかと述べてある。

3章では、ハロバクテリウム＝サリナラムというアーキアの運動について述べられている。この菌体は、死海などの高塩濃度環境から見つかった高度好塩菌というアーキアの一種である。一般的に遊泳性のアーキアは、細胞表面上に細い繊維を有しており、繊維の回転により駆動力を得て水中において遊泳運動を示す。この繊維はアーキアべん毛と呼ばれているが、バクテリアのべん毛と遺伝子の相同性は全くない。

本学位申請者はアーキアべん毛の作動機構を解明するために、複数の実験手法を組み合わせている。1つ目として、べん毛繊維や菌体本体の形状について、透過型電子顕微鏡を用いた解析を行っている。2つ目は、蛍光顕微鏡下におけるべん毛繊維の動態計測である。べん毛繊維の染色は、ビオチン・アビジン系の新しい蛍光ラベルの方法で構築することで解決している。観察には EMCCD カメラを用いており、2 ミリ秒の高い時間分解能のもと、繊維の動態計測に成功している。

特筆すべき点は、全反射顕微鏡を用いた運動アッセイの方法を構築したところである。全反射顕微鏡の特徴のひとつは、ガラス近傍の 200 ナノメートル以内の蛍光色素のみが励起される点である。この特徴をべん毛繊維の可視化に応用することで、べん毛繊維のらせん形状並びに回転数を画像から抽出する方法を構築した。これは Cross-kymography という新規の解析方法となり、今後はべん毛繊維の多型変換のリアルタイム計測に威力を発揮すると考えられる。これらの方法を用いた結果、アーキアべん毛は右巻きらせんの形状を取っており、約 23 Hz で両方向に回転するということが明らかにした。

さらに3章では、べん毛繊維の動態計測だけではなく、モーター部位の動きの検出についても詳述されている。べん毛をガラスに結合して細胞本体をマーカーとすることで、べん毛繊維の回転を高負荷のもとで観察した。観察に中央遮光暗視野法を用いることで、1 秒間に 2000 枚の高速度撮影を可能としている。その結果、36 と 60 度の周期性のあるステップ状回転の検出した。このステップ運動の大きさは、アーキアべん毛モーターの ATPase の周期構造と一致しており、アーキアの回転運動は ATP 反応を伴う ATPase 部位で起こっていることを示唆する結果を示している。

第4章では、本論文のまとめと、分子モーター研究における本論文の位置づけ、今後の課題などが記述されている。

Appendix では、解析の手順並びに本論文に関わるコントロール実験の結果を述べてある。

2. 審査の方法, 内容の評価, および結論

本論文は、2016 年 11 月に提出された論文を 3 名の審査員がそれぞれ査読し、さらに 2017 年 1 月 20 日に開催した公聴会と質疑応答をもとに審査した。

本論文の注目すべき点は、従来の生物物理学の思想やアプローチを引き継ぎつつも、滑走バクテリアのステップ運動、並びにアーキアモーターの特性を明らかにするといった、新しい研究領域を切り開いた快挙に尽きる。限られた技術の習得や与えられたテーマをこなしがちな（いわゆる秀才の）アプローチをやすやすと凌駕し、独自の研究対象を貪欲に突き詰めた木下佳昭氏の研究姿勢が、本論文に余すところなく記述されているのである。3 名の審査員は、木下佳昭氏の研究者としての潜在力について、本論文を通じて高く評価した。また第 3 章の内容をもって「第 54 回日本生物物理学会年会 若手奨励賞」および「第 7 回 日本学術振興会 育志賞」を受賞した業績、さらには第 2 章と第 3 章の内容について、それぞれが平成 26 年 7 月と 28 年 12 月の「学習院大学 学長表彰」の対象となっている点も、刮目に値するものとして評価に加えた。

以上に述べたように、本論文は博士の学位論文として十分な内容があり、3 名の審査員は一致して、本学位申請者に博士の学位を授与することがふさわしいと結論した。

論文審査主査	西坂 崇之	教授
	安達 卓	教授
	宮田 真人	特別非常勤講師
	(大阪市立大学 教授)	