

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07034

研究課題名(和文)1分子ナノ計測によるバクテリアべん毛モーター最小機能単位の特性評価

研究課題名(英文)The torque generated by bacterial flagellar motors measured using single-molecule detection techniques

研究代表者

曾和 義幸 (SOWA, Yoshiyuki)

法政大学・生命科学部・准教授

研究者番号：10519440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細菌べん毛モーターは回転する分子機械である。大腸菌べん毛モーターの最大トルクは1300-4500 pNmと報告によって開きがあった。そこで本研究では、光トラップによってトルクを直接的に求めた。べん毛繊維を介してカバーガラスに付着して回転する大腸菌の細胞本体を、1 μ mのビーズで停止させた。モーターが発生するトルクは4500 pNmであったが、光トラップが細胞本体にも影響をしていた。そこで、光トラップの細胞への影響を取り除くことで、モーターが約1800 pNmのトルクを発生することがわかった。

研究成果の概要(英文)：The bacterial flagellar motor is a rotary nano-machine. The maximum torque of Escherichia coli motor was measured in the range from ~1300 to ~4500 pNm, depending on the reports. In this research, we directly measured the generated torque by an optical trap. Rotation of an E. coli cell tethered to coverslip via filament was stopped by a trapped 1 μ m bead. By measuring the displacement of the bead, we determined that the motor generates ~4500 pNm. However, we also found that the optical trap effects on not only a bead but also a cell body itself. Then, by removing the side-effect of an optical trap, the generated torque of the motor was determined to be ~1800 pNm.

研究分野：生物物理学

キーワード：細菌べん毛 1分子計測

1. 研究開始当初の背景

(1) 大腸菌べん毛モーターの最小機能単位
大腸菌べん毛モーターは、菌体の表層から突き出ているらせん状のべん毛フィラメントを回転させる直径約 50 nm の分子機械である。モーターは約 10 個の固定子ユニット (MotA/B 複合体) と回転子リングから構成される。一方、固定子をコードする遺伝子を欠損した大腸菌において、固定子ユニットを人為的に強制発現させると、固定子のモーターへの組み込みに従って段階的にトルクを発生することから、回転子リングに 1 個の固定子ユニットが配置している状態が最小機能単位といえる。

(2) べん毛モータートルク特性評価法

べん毛モーターの回転トルクの計測方法は、粘性抵抗係数を計算して求める方法と力計測によって直接的に求める方法がある。2 つのトルク特性評価法を同じ大腸菌のべん毛モーターに適用されたのにもかかわらず、興味深いことに、得られた最大トルクの大きさに約 3 倍の乖離があった。モーター回転メカニズムを考える上で重要なパラメータが実験ごとにバラツキがあることは課題であった。

(3) 最小機能単位が生み出す低負荷時の回転

モーター回転速度の計測は、比較的高負荷条件下でのみ実験がおこなわれてきた。一方、低負荷条件下の計測は数例報告されているものの、回転速度が固定子ユニット数に依存するという報告と依存しないという報告がある。

2. 研究の目的

本研究では、大腸菌べん毛モーターの最小機能単位が生み出す回転・トルクや角度依存性について研究することを目標としている。まず、背景(2)で述べた基礎パラメータの一つである最大トルクの大きさの乖離について解決することを目指した。そこで、光ピンセット技術の顕微鏡への導入、光ピンセット法を用いた直接的にトルクを計測する方法の確立をおこなった。さらに低負荷時の回転計測を実現する計測法を確立するために、金コロイドの動きを検出する系の確立をおこなった。

3. 研究の方法

(1) ビーズアッセイ

モーター回転の計測には主にビーズアッセイが用いられる。また、最小機能単位が生み出す回転およびトルクの計測にも実績がある。直径 1 マイクロメートル程度のラテックスビーズをべん毛フィラメントに附着させ、その回転を高速カメラや光検出器によって計測する。ビーズの径と計測によって求めた回転半径から、粘性抵抗係数を算出することができる。この係数と角速度の積が回転トルクとして求めることができる。

(2) 光ピンセット法

近赤外光を顕微鏡対物レンズに導入し、その集光点に微小な物体(細胞、ラテックスビーズ等)を捕捉することができる。また、集光点から物体が移動すると、物体を集光点へと戻そうとする復元力が働き、分子レベルの力計測に有効である。光ピンセット法によるトルク計測では、べん毛フィラメントを顕微鏡の試料チャンバーのカバーガラスに附着させて細胞本体が回転するテザードセルを作成し、直径 1 マイクロメートル程度のラテックスビーズを捕捉してテザードセルを停止させる。光ピンセットの中心位置からビーズが動くことでビーズにかかる力を求めることができる。ビーズが細胞と接触する位置とテザードセルの回転中心の距離と計測した力の積がトルクとなる。

4. 研究成果

(1) 光ピンセットによる計測法の確立

1064 nm のレーザーを顕微鏡に導入し、光ピンセットの光学系を構築した。捕捉したラテックスビーズの動きを高速カメラによって解析することで光ピンセットのばね定数を求めて力計測の準備が整った。

(2) 最大トルク解析法の確立

まず、背景(2)で述べた過去の結果の乖離が細胞株の違いによる可能性を排除するために、1 つの菌株に絞って研究をおこなった。固定子を欠損した $\Delta motAB$ の菌株に、プラスミドから *motAB* を発現する菌株を使用した。この株のモーターの動きをビーズアッセイで観察したところ、固定子ユニットを順次組み込む様子が確認でき、約 10 個のユニットが組み込まれる過程を観察できた(図 1)。また、粘性抵抗を計算して最大にユニットが組み込まれた最大トルクを求めたところ、約 1400 pNnm 程度を得ることができた。この値は、過去の結果と 10% 程度の差で一致している。

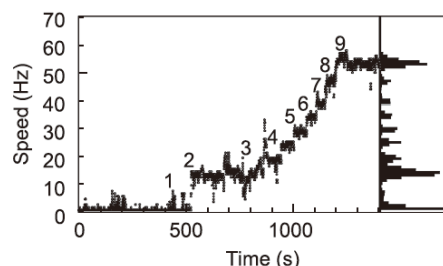


図 1. 固定子ユニット組み込み過程

つぎに(1)で構築した光ピンセットによって直径 1 マイクロメートルのビーズを捕捉して最大トルクを計測したところ、過去の報告と同様に 4500 pNnm であった(図 2)。ただし、光ピンセットが細胞へ与える影響を補正する方法を検討・適用した結果、1800 pNnm となった。この値は、ビーズアッセイからえた結果と 20% 程度で一致している。負荷が高いほどモーターに組み込まれるユニット数が増えるとの報告があり、より負荷が高い光

ピンセットで計測した値が大きなトルクを発生するのは矛盾しない。つまり、背景(2)で述べたデータの乖離は、細胞本体が計測に与える影響の補正の有無であったと結論づけた。

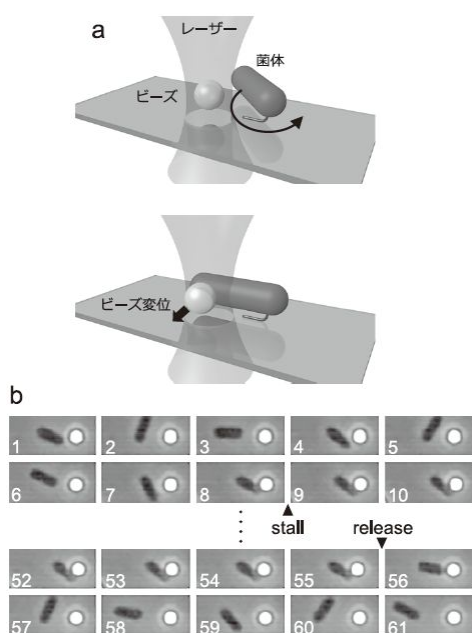


図2. 光ピンセットによる最大トルク計測 (a)実験の模式図, (b)実験計測例. 各フレームは40 ms 間隔. stall の位置でビーズと細胞が接触し, ビーズを数10 nm 押す. 元の位置の差分からビーズにかかる力を算出できる.

(3) 低負荷時の回転計測法の確立

背景(3)で述べたように, 低負荷時の回転計測は, 報告例が少ないとともに, その研究結果にもバラツキがある. そこで, 金コロイドの散乱を検出する顕微鏡の構築をおこなった. この系では, 100 nm の金コロイドを1 ms の時間分解能で0.5 nm の精度で検出できた. なお, 時間分解能は高速度カメラの性能によって制限されているため, カメラの交換によって性能を向上させることが可能である.

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 4 件)

Nord AL, Sowa Y, Steel BC, Lo CJ, Berry RM. Speed of the bacterial flagellar motor near zero load depends on the number of stator units. Proc Natl Acad Sci USA. 114(44):11603-11608 (2017) 査読有
doi: 10.1073/pnas.1708054114.

Kasai T, Sowa Y. Measurements of the Rotation of the Flagellar Motor by Bead Assay. Methods Mol Biol 1593:185-192 (2017) 査読

無

doi: 10.1007/978-1-4939-6927-2_14.

Ma Q, Sowa Y, Baker MA, Bai F. Bacterial Flagellar Motor Switch in Response to CheY-P Regulation and Motor Structural Alterations. Biophys J. 110(6):1411-20 (2016) 査読有
doi: 10.1016/j.bpj.2016.02.023.

Yamamoto K, Tamai R, Yamazaki M, Inaba T, Sowa Y, Kawagishi I. Substrate -dependent dynamics of the multidrug efflux transporter AcrB of *Escherichia coli*. Sci Rep. 6: 21909 (2016) 査読有
doi: 10.1038/srep21909.

[学会発表](計 19 件)

曾和義幸, Direct visualization of the bacterial rotary molecular device, 第91回日本細菌学会総会, 2018年3月29日, 博多市

笠井大司, 曾和義幸, 固定子のイオン結合能とべん毛モーターのトルク, 2017年度べん毛研究交流会, 2018年3月13日, おごと温泉琵琶湖グランドホテル, 大津市

石田 翼, 吉多美祐, 南野徹, 曾和義幸, 低負荷条件下で回転するべん毛モーターの計測, 2017年度べん毛研究交流会, 2018年3月13日, おごと温泉琵琶湖グランドホテル, 大津市

笠井大司, 御法川学, 曾和義幸, “光トラップ法によるべん毛モーター回転計測”, マイクロナノテクノロジーセンター公開シンポジウム, 2018年1月20日, 法政大学(小金井キャンパス), 小金井市

笠井大司, 曾和義幸, “Stall torque of the bacterial flagellar motor measured by optical tweezers”, 第55回日本生物物理学会年会 2017年9月21日, 熊本大学, 熊本市

荒居謙太, 笠井大司, 高橋優嘉, 伊藤政博, 曾和義幸, “Torque-IMF relationship of Na⁺- and K⁺-driven bacterial flagellar motor”, 第55回日本生物物理学会年会 2017年9月21日, 熊本大学, 熊本市

Arai K, Kasai T, Takahashi Y, Ito M, Sowa Y, “Torque generated by the dual-ion driven bacterial flagellar motor”, International Symposium Harmonized supramolecular motility machinery and its diversity, 13-14 September 2017, Nagoya University, Nagoya

Kasai T, Sowa Y, “Measurement of the stall torque generated by the bacterial flagellar motor”, 19th IUPAB congress and 11th EBSA congress, 16-20 July 2017, Edinburgh International

Conference Centre, Edinburgh, UK

荒居謙太, 笠井大司, 高橋優嘉, 伊藤政博, 曾和義幸, “2種イオン駆動型べん毛モーターの入出力の定量”, 第14回21世紀大腸菌研究会, 2017年6月8-9日 KKR ホテル熱海, 熱海市

Sowa Y. Single-molecule studies of the chemo-mechanical coupling in the bacterial flagellar motor. OIST Workshop-Bacterial Flagella, Injectisomes & Type III Secretion Systems, 2017年3月1日, OIST, 沖縄県国頭郡

Arai K, Kasai T, Takahashi Y, Ito M, Sowa Y, Input-output Relationship of the Bacterial Flagellar Motor, OIST Workshop-Bacterial Flagella, Injectisomes & Type III Secretion Systems, 2017年3月2日, OIST(沖縄県国頭郡)

Kasai T, Sowa Y, Stall Torque of the Bacterial Flagellar Motor Measured by Optical Tweezers, OIST Workshop-Bacterial Flagella, Injectisomes & Type III Secretion Systems, 2017年3月4日, OIST(沖縄県国頭郡)

Arai K, Kasai T, Takahashi Y, Ito M, Sowa Y, Input-output relationship of dual ion driven flagellar motor, 第54回日本生物物理学会年会 2016年11月26日, つくば国際会議場(茨城県つくば市)

Kasai T, Sowa Y, Maximum torque generated by the bacterial flagellar motor measured by optical tweezers, 第54回日本生物物理学会年会 2016年11月27日, つくば国際会議場(茨城県つくば市)

曾和義幸. 細菌べん毛モーターの顕微解析, 日本顕微鏡学会-微生物の超微形態解析研究部会主催 2015年研究会, 2015年11月20日, 帝京平成大学池袋キャンパス(東京)

曾和義幸, 高性能バイオナノマシンの解析, 第28回HF-PPEシンポジウム, 2015年9月25日, 富士通川崎工場内岡田記念ホール(神奈川県)

Arai K, Takahashi Y, Ito M & Sowa Y Analysis of bacterial flagellar rotation driven by dual ion, 第53回日本生物物理学会年会 2015年9月13日, 金沢大学(石川県)

曾和義幸, Dynamics of the nano-rotary motor of bacterial flagella, 第53回日本生物物理学会年会, 2015年9月13日, 金沢大学(石川)

曾和義幸, 細菌べん毛モーターの1分子機

能解析, 日本顕微鏡学会第71回学術講演会, 国立京都国際会館, 2015年5月15日, 京都府京都市

〔図書〕(計 1 件)
曾和 義幸, 笠井 大司. バクテリアべん毛モーターの回転を測る, 生物工学会誌, 96 巻 4号, 183-186(2018)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: 微生物分析装置及び微生物分析方法
発明者: 田中裕人, 小嶋寛明, 富成征弘, 田中秀吉, 川岸郁朗, 曾和義幸
権利者: 学校法人法政大学, 国立研究開発法人情報通信研究機構
種類: 特許
番号: 特願 2015-096824
出願年月日: 2015年5月11日
国内外の別: 国内

○取得状況(計 0 件)
該当無し

〔その他〕
ホームページ等
<http://sowalab.ws.hosei.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者
曾和 義幸 (SOWA, Yoshiyuki)
法政大学・生命科学部・准教授
研究者番号: 10519440

(2)研究協力者
川岸 郁朗 (KAWAGISHI, Ikuro)
法政大学・生命科学部・教授
研究者番号: 80234037