

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06564

研究課題名（和文）細菌べん毛モーターのトルク発生ユニットがもつ構造対称性と機能の連関

研究課題名（英文）Relationship between structural symmetry and function of the torque-generating unit in bacterial flagellar motors

研究代表者

曾和 義幸（Sowa, Yoshiyuki）

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：10519440

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：大腸菌を含む多くの遊泳細菌が用いるべん毛モーターは、高エネルギー変換効率、高速回転、スイッチ機構を特徴とする分子機械である。本研究では、化学-力学エネルギー変換を担う固定子ユニットに注目して研究を遂行した。固定子ユニット内の構造対象を崩したヘテロ固定子ユニットの基礎データの取得、モーターの無負荷から高負荷までの固定子ユニット集合特性の解析、固定子ユニット共役イオン特異性の解析、固定子ユニットの蛍光標識などをおこなった。本研究で得られた成果は、今後のモーター回転計測の基盤技術となる点で意義深いと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌べん毛モーターは、人工モーターでは実現できないような高効率、高速回転を実現するわずか直径50 nmの分子機械である。このモーターの回転機構が解明されれば、人工的な小型モーターの開発にも貢献できると期待される。本研究では、エネルギー変換の中心を担う固定子ユニットについて研究をおこない、今後の研究の基盤的な技術となる手法を構築できた。

研究成果の概要（英文）：The bacterial flagellar motor is a reversible rotary nano-machine that rotates at high speed and runs with high efficiency. This study focused on the stator unit responsible for the chemical-mechanical energy conversion. We characterized the “hetero” stator unit by breaking its structural symmetry, the stator assembly depending on the load to the motor, the specificity of coupling ions on stator units, and newly developed fluorescent protein-fused stator units. The results obtained here are significant in that they will provide the basic technology for further analysis of the motor rotation.

研究分野：生物物理学

キーワード：べん毛モーター 回転計測

1. 研究開始当初の背景

大腸菌を含む多くの遊泳細菌は、運動器官であるらせん状のべん毛を回転させて推進力を生み出し、より良い環境へと移動する走性を示す。べん毛は、その根元の細胞膜に埋まる分子機械・べん毛モーターによって駆動される。べん毛モーターは、回転子とその周囲に集合する複数の固定子ユニットから形成される巨大なタンパク質複合体である(Sowa & Berry 2008)。化学-力学エネルギー変換を担う固定子ユニットは、回転子と相互作用する細胞質ドメイン、イオン流入を担う膜に埋まったチャネル部分とペプチドグリカンと結合するドメインおよびその間をつなぐリンカー部位から構成される。リンカーが折りたたまれチャネルを塞ぐ不活性化型の固定子ユニットは細胞膜上を拡散し、回転子と相互作用するとリンカー部分が伸長して、ペプチドグリカンと結合し、チャネル部分がイオンを透過できるようになり、活性型となる(Kojima et al. 2018)。大腸菌べん毛モーターの固定子ユニットは、4個の MotA と2個の MotB で構成される膜タンパク質複合体(注: 報告書を作成した 2024 年時点では5個の MotA と2個の MotB で構成されることが構造解析で明らかとなっている Santiveri et al. 2020 他)であり、構造的に対称な2つのプロトン透過経路をもつ。プロトンの MotB への結合・解離と共役した MotA の細胞内領域の構造変化がモーター回転の原動力となり、固定子内の構造対称性と構造変化サイクルを考慮すると、2個のプロトンの結合・解離と1回の構造変化が共役するモデルが有力視されている(Kojima & Blair 2001)。MotB へのプロトンの結合・解離にともなう MotA 細胞質ドメインの構造変化サイクルが連動した結果、モーター回転運動の素過程を引き起こされると予想される。

2. 研究の目的

本研究では、モーター回転素過程を生む構造変化サイクルを完了させるために、固定子内の構造的な対称性がイオン透過に果たす役割を明らかにすることを目的とした。これを実現するためには、固定子ユニット内の構造的対称性を破るようなヘテロ型固定子ユニットを用いること、ヘテロ型固定子が1ユニットのみ相互作用する条件で回転計測すること、またその共役エネルギーを制御することが必要である。べん毛モーターが回転することが1970年代に示され、1980年代には複数の固定子ユニットがモーター回転を駆動していることが明らかとなり、2000年代になってモーター回転を定量的に計測する手法の開発が進められてきた。現在のモーター計測は、回転子リングと1個の固定子ユニットの相互作用を機能単位とした解析が進められている。通常、モーター内の固定子ユニットの数は、ある条件下にユニット当たり1つに生み出される回転トルクから見積もっている。本来なら固定子ユニットを蛍光タンパク質で標識し、その蛍光強度から組み込みユニット数を求めるのが望ましい。固定子ユニット内には複数個のタンパク質が集合しているため、ユニット当たりの蛍光タンパク質数から個数を確定することが難しい。ヘテロ型固定子を用いれば、ユニット当たり1つの蛍光タンパク質で標識できる可能性があり、この手法を確立することも目的の一つである。

3. 研究の方法

大腸菌のべん毛モーターの固定子(MotA/MotB)および海洋ビブリオ菌の PomA/PomB とのキメラ固定子 PomA/PotB を用いた。一般的な遺伝子組換え実験により、多数の固定子変異体、蛍光タンパク質融合体を作製した。モーターの機能解析は、(1) スウォームアッセイ、(2) 遊泳速度解析、(3) テザードセルアッセイ、(4) ビーズアッセイでおこなった。なお、スウォームアッセイは軟寒天培地上での遊泳を簡便に観察できる手法である。また、テザードセルアッセイとは、細胞本体から伸びるべん毛1本を顕微鏡カバーガラスに付着させ、モーター回転を細胞回転から計測する手法である。ビーズアッセイは、細胞本体を顕微鏡カバーガラスに付着させ、60 nm の金コロイドから2 μ m のラテックスビーズまでの様々なサイズのマイクロビーズをべん毛に結合させて、ビーズの運動を解析する手法である。蛍光観察では、473 nm または 561 nm のレーザーを組み込んだ全反射蛍光顕微鏡を用い、細胞膜上で拡散する、またはモーターに組み込まれた固定子ユニットの可視化をおこなった。

4. 研究成果

本研究では、主に以下4点の成果を得ることができた。

(1) ヘテロ固定子ユニットの作製と機能解析

我々のこれまでの研究により、大腸菌の固定子ユニットの特定の部位に変異を加えることでヘテロ型固定子ユニットの作製に成功していた。対称性を自由に制御できるため、2つのうち1つのイオン結合部位のアミノ酸を変異させて、その機能をスウォームアッセイで評価した。その結果、固定子は2つのイオン結合部位の両方が必要であると推測された。一方、テザードセルアッセイでは、非常に稀ではあるが、片方のイオン結合部位しか機能していない状況でもモーター回転が駆動されるようであった。これらの相反する結果の違いが生じた原因は現在検討中であるが、モーターにかかる負荷の違い、モーターに組み込まれた固定子ユニットの数の違い、走性(モーター回転方向転換頻度の制御)の実験環境の違い

が候補として考えられた。

(2) モーター負荷とその調節機構

モーターの回転特性は、負荷によって調整される。固定子ユニットの数と回転トルクの関係、負荷に依存した固定子ユニット数の調節については複数の見解がある(Yuan & Berg 2008, Lo et al. 2013)。また、項目(1)で記載したように、結果の解釈に大きく与える可能性がある。そこで、無負荷条件から高負荷条件まで、負荷を調節しながら計測できるように 60 nm の金コロイドから 2 μm のラテックスビーズの動きを追跡できる装置を構築した。その結果、無負荷条件でも複数個の固定子ユニットが同時に相互作用して最大速度を生み出すことが明らかとなった。さらに、負荷依存的な固定子ユニットの集合を調節していると考えられている FliL タンパク質の有無によるトルク特性の違いを調査したところ、大腸菌 FliL は他の菌種と異なり、負荷が小さいところで効果的に機能していることが明らかとなった。これらの成果は現在とりまとめて、投稿準備中である。

(3) イオン結合の特性

細菌べん毛モーターの共役イオンは主にプロトンとナトリウムイオンが知られている。オーストラリア UNSW の Baker 博士との共同研究で、ナトリウムイオン駆動型モーター PomAPotB をプロトンも共役できるように分子進化させた。その結果、PotB の 20 番目の G を V にするような変異でナトリウムイオンが無くてもモーター回転ができ、ナトリウムイオン駆動型モーターへの特異的な阻害剤の効果もなくなった(図 1)。この結果は、共役イオンの特異性を知る手がかりとなると同時に、今後ヘテロ固定子ユニットを使った解析にも利用できると考えている。この結果は、Ridone et al. 2022 として発表した。

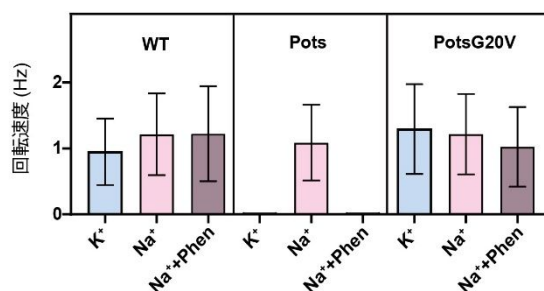


図 1. 固定子ユニット変異とイオン特異性

(4) 固定子ユニットの蛍光標識

固定子ユニットの数を調整し、その個数を定量しながら、モーター回転特性を知ることは機能解析に重要である。ヘテロ固定子ユニットと FRET を用いて、確実にユニット当たり 1 つの蛍光タンパク質で標識できると考え、複数のアプローチをおこなっており、現在も検討中である。また、ナトリウムイオンの濃度で比較的容易にユニット数を調節できる PomAPotB の蛍光標識を試みた。リンカーの長さ等を検討し、回転計測と蛍光強度の相関が見られる結果を得られつつある。この系が機能解析に利用することができれば、ユニット数と回転特性の同時観察およびその操作をおこなうことができ、機能解析への展開が見込まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ridone Pietro, Ishida Tsubasa, Lin Angela, Humphreys David T., Giannoulidou Eleni, Sowa Yoshiyuki, Baker Matthew A. B.	4. 巻 8
2. 論文標題 The rapid evolution of flagellar ion selectivity in experimental populations of <i>E. coli</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabq2492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abq2492	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Islam M. I., Bae J. H., Ishida T., Ridone P., Lin J., Kelso M. J., Sowa Y., Buckley B. J., Baker M. A. B.	4. 巻 203
2. 論文標題 Novel Amiloride Derivatives That Inhibit Bacterial Motility across Multiple Strains and Stator Types	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e0036721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00367-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kinosita Yoshiaki, Ishida Tsubasa, Yoshida Myu, Ito Rie, Morimoto Yusuke V., Goto Kazuki, Berry Richard M., Nishizaka Takayuki, Sowa Yoshiyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Distinct chemotactic behavior in the original <i>Escherichia coli</i> K-12 depending on forward-and-backward swimming, not on run-tumble movements	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15887
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-72429-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Onoe Sakura, Yoshida Myu, Terahara Naoya, Sowa Yoshiyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Coupling Ion Specificity of the Flagellar Stator Proteins MotA1/MotB1 of <i>Paenibacillus</i> sp. TCA20	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1078 ~ 1078
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom10071078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Nakaya J, Kumazaki Y, Ishida T, Yoshida M, Ito R, Sowa Y
2. 発表標題 Analysis of the interaction interface between the rotor and stator of the bacterial flagellar motor at the amino acid residue level
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tajima H, Kashihara K, Yamamoto K, Sowa Y, Kawagishi I
2. 発表標題 Identification of the indole-sensing region of the sensor kinase BaeS
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Omori F, Matsuda M, Imada K, Tajima H, Sowa Y, Kawagishi I
2. 発表標題 Role of divalent metal cations in ligand recognition by the Salmonella citrate chemoreceptor Tcp
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田翼, 吉多美祐, 南野徹, 曾和義幸
2. 発表標題 大腸菌FliLは低負荷領域でべん毛モーターの回転を支援する
3. 学会等名 第1回 発動分子科学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田翼, 吉多美祐, 南野徹, 曾和義幸
2. 発表標題 大腸菌FliLは低負荷条件下でべん毛モーターの回転速度を調節する
3. 学会等名 第17回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田翼, 吉多美祐, 南野徹, 曾和義幸
2. 発表標題 FliLが制御するべん毛モーターの負荷感受性
3. 学会等名 2021年度べん毛研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高井亮太郎, 手塚武揚, 石田翼, 大西康夫, 曾和義幸
2. 発表標題 放線菌Actinoplanes missouriensisの極べん毛モーター回転計測
3. 学会等名 2021年度べん毛研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 亀野真理衣, 熊崎優美, 石田翼, 曾和義幸
2. 発表標題 光架橋法と蛍光観察によるべん毛モーターの固定子ダイナミクスの解析
3. 学会等名 2021年度べん毛研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 曾和義幸
2. 発表標題 大腸菌べん毛モーターの出力制御因子の解析
3. 学会等名 第10回分子モーター討論会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Sowa, T. Ishida
2. 発表標題 Bacterial flagellar rotation at low load
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Ishida, M. Yoshida, T. Minamino, Y. Sowa
2. 発表標題 FliL assists flagellar motor rotation in Escherichia coli under low load condition
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 H. Tajima, M. Nishikawa, Y. Miura, Y. Sowa, I. Kawagishi
2. 発表標題 Low cooperativity of flagellar motor switching in Vibrio cholerae the bacterium of a single polar flagellum
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------