

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22640

研究課題名(和文)ゴーストを用いたアーキアべん毛モーター化学・力学エネルギー変換機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the chemo-mechanical coupling in the archaeal motor using ghosts

研究代表者

木下 佳昭 (Yoshiaki, Kinoshita)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・基礎科学特別研究員

研究者番号：30879846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：微生物は、化学エネルギーを力学的な仕事に変換する分子機械を持つ。本研究ではアーキアが有するATP駆動型の分子機械、『アーキアべん毛』研究対象にして、運動機構の解明を目指した。本研究ではゴーストを用いて、細胞内部の反応を制御した状態で、それに伴った分子機械の回転運動を可視化した。高濃度ATP存在下では、べん毛の回転運動は滑らかであり、顕著な停止点は見られなかった。一方で、ATP濃度がナノモラー程度の範囲では停止点が見られ、停止間の角度はおおよそ60度であった。この大きさはATPaseの周期構造と一致していた。また、ATP加水分解の速さが1/200倍の変異株でも実験を行い、同様の結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物が持つ分子機械はその名の通り、ナノサイズの機械である。分子機械は化学的な"入力"を力学的な仕事として"出力"しており、その作動機序を解明することは将来的なナノロボット作製に貢献する。

微生物研究において、入力を調節することは非常に難しかった。その理由は細胞膜や細胞壁といった表層構造の存在によるもので、過去の多くの研究は出力のみを定量していた。本研究では独自に開発したゴーストを用いて、入りに伴った出力を捉えることができた。また、周期的な停止を検出することで、本研究で用いたアーキアべん毛はステップモーターであることを示し、作動機序解明に資する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Microorganisms form the molecular motor that converts chemical energy into mechanical work. In this study, we challenged to elucidate the motility mechanism of the ATP-driven molecular motor of archaea, called an archaeallum. We performed the ghost-bead assay, enabling us to visualize the rotational motion of the archaeallum, with the controlled intracellular-chemical condition. At high [ATP], the rotational motion of the archaeallum was smooth without significant pauses. On the other hand, in the range of nM [ATP]s, frequent pauses were detected, and the angles between pauses were approximately 60 degrees. This size was consistent with the periodic structure of ATPase. We also performed the same experiments with a mutant that hydrolyzed ATP at 1/200 times slower, showing a similar stepping motion.

研究分野：生物物理学

キーワード：アーキアべん毛 回転モーター ピーズアッセイ ゴースト ATP ステップ回転 Walker B 変異体 D well time

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

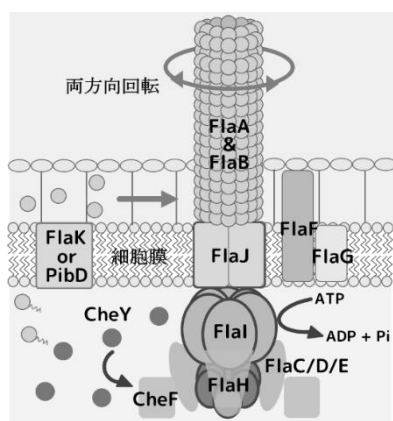


図 1. アーキアべん毛の現在のモデル

生き物の運動—すなわち生体運動は、化学エネルギーを力学的な仕事に変換する分子機械により駆動される。特に、微生物の運動はバクテリアべん毛に代表されるような複数のタンパク質が組み合わさった運動装置複合体による。本研究で注目するアーキアの運動は、アーキアべん毛と呼ばれる回転モーターにより駆動されており、約 10 種程度のタンパク質複合体である。興味深いことに、バクテリアべん毛とは全く相動性がない。

更にアーキアべん毛のエネルギー源は ATP 駆動型であり、イオン駆動型のバクテリアべん毛とはエネルギー源の観点からも全く異なると言える。

両者は構造上全く異なる運動装置であるが、回転という共通の機能を示す。また、アーキアは水平伝播によりバクテリアから化学走性物質を獲得しており、化学走性物質が異なる 2 つの回転モーターの方向制御を担っている (Briegel *et al.*, *Environ. Microbiol. Rep.*, 2015)。この様な事実から、アーキアは微生物モーターの普遍性・多様性・進化の理解を深化する研究対象と言えらるう。

2. 研究の目的

本研究はアーキアべん毛の化学・力学エネルギー変換機構の理解を目的に、回転ステップの検出を目指す。すなわち ATP 反応過程における、ATP 結合、加水分解、生成物放出といった反応素過程ごとの回転角度を決定し、化学反応と力学的な運動との共役スキームを完成させることを研究目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、『アーキアべん毛の化学状態と力学的な仕事』の 1:1 対応を明らかにする。しかし、通常のアッセイでは化学状態を制御することが出来ない。これは細胞の表層構造である脂質と S 層の存在によるものであり、これまでの研究は力学的な仕事のみ定量化してきた (Kinosita *et al.*, *Nature microbiology*, 2016; Iwata *et al.*, *Communications Biology*, 2019)。本研究では細胞の表層構造を界面活性剤処理し、部分的に破壊することで問題の解決を図った。この方法は ATP 駆動型のモーターを持つ滑走細菌で確立したゴーストと呼ばれる手法である (Uenoyama and Miyata, *PNAS*, 2005; Kinosita *et al.*, *PNAS*, 2014)。この手法を完成させたのち、回転の入力となる“ATP 濃度”および出力となるべん毛の回転”をビーズの動きから可視化することにした。

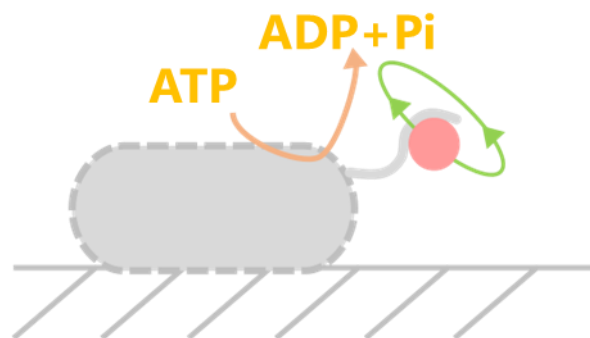
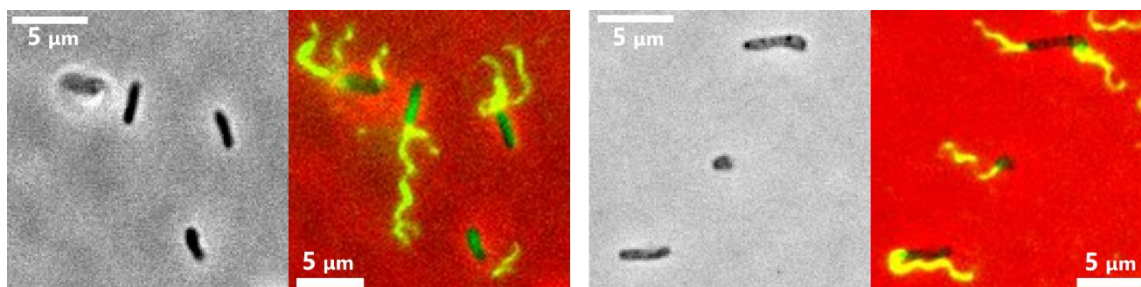


図2.入力を制御し、それに伴った出力を可視化する実験系: ゴーストビーズアッセイ

4. 研究成果

—ゴースト実験系の確立—

アーキアが活性型のべん毛を維持した状態で、ゴースト化する条件を探した。Triton X-100 や CHAPS といった様々な界面活性剤を確認したが、これらの界面活性剤は処理後、細胞が破裂し、形状を維持していなかった。一方で、コール酸により処理した細胞は形状を維持し、べん毛を持つことを蛍光顕微鏡により確認した（下図）。



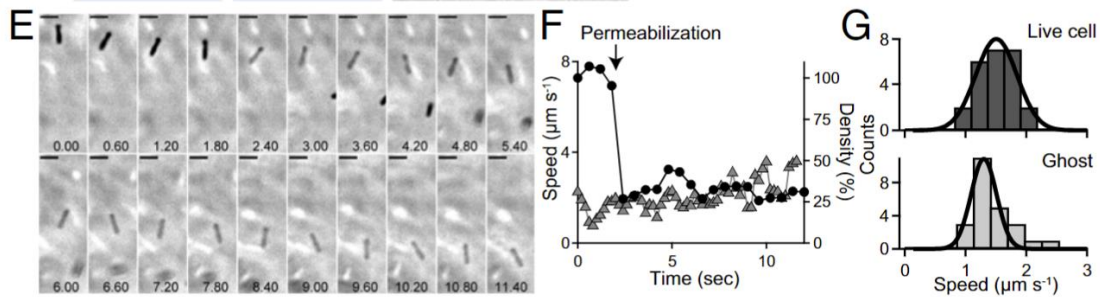
生細胞の位相差像と蛍光像

ゴーストの位相差像と蛍光像

—ゴーストの遊泳運動—

ゴースト作製にあたって、界面活性剤処理はエッペンチューブ内で行った。これはアーキアが遊泳運動を示す性質によるものである。もし、顕微鏡観察に用いるフローセル内で溶液交換を行った場合、細胞全部が流される。

本方法を用いて行った結果が下記の連続写真である。2.4 秒付近で細胞密度が減少していることが確認されるが（下図 E）、これは界面活性剤処理により細胞質が放出されたことによる。また破裂後も、細胞は一方向に移動し続けていることが確認される。これは溶液内に ATP を含んでいるからである。破裂前後で、遊泳速度は変化しないことが見て取れる（下図 F）。一方で、ゴーストの平均速度は生細胞に比べて、若干減少する（下図 G）。これは界面活性剤処理時間に依存して、遊泳速度が減少するためである。従って、界面活性剤の影響を少なくした実験系が望まれる。

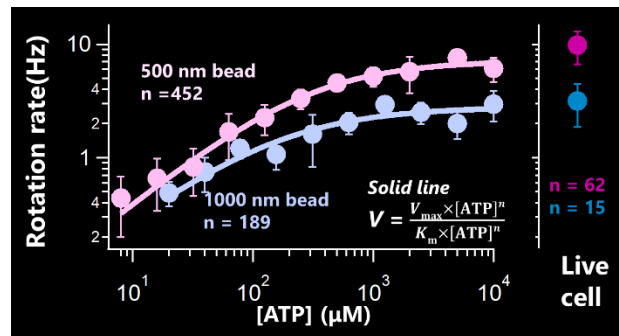


E: 生細胞からゴーストの移り変わりを示した位相差像 F: 遊泳速度および細胞密度の時間変化 G: 生細胞およびゴーストの遊泳速度のヒストグラム

The figures are reused with permission from “*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 117 (43), 26766-26772, 2020” for Fig. 1E-G, with modification.

-ゴーストが示す ATP 依存的なべん毛回転運動-

上記の系を用いて、アーキアゴーストが有効であることが確認できた。しかし、界面活性剤の影響が強いことに加えて、溶液交換ができない欠点が存在した。そこで本研究では細胞をガラスに固定し、ガラス上でゴースト作製することにした (図 2)。本アッセイ系の動画は原著論文で報告しており、Movie S5 を見ていただきたい (Kinosita et al., PNAS, 2020)。動画上では、生細胞のモーター回転を確認でき、その後界面活性剤処理により細胞が破裂およびモーター回転の停止が確認され、その後、ATP 添加によりモーター回転の再活性化を確認できる。ビーズを用いたゴーストの系を用いることで、溶液交換が簡単に行える。従って、様々な ATP 条件を任意に設定し、それに伴った回転運動を可視化できた。下図はまとめ図であり、ATP 依存的な回転運動を可視化できた。



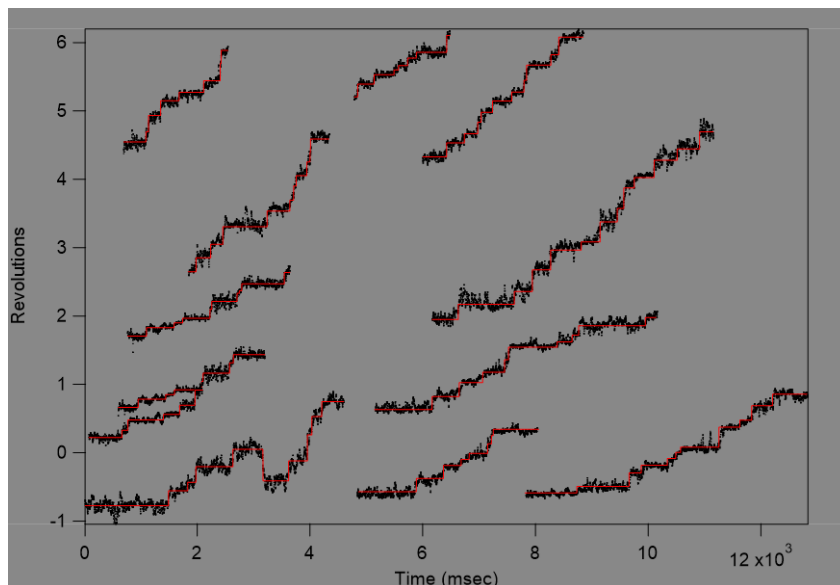
-ステップ状回転-

上記で示したゴーストの系を用いることで、化学状態に伴った力学的な仕事を定量化できる。更に、本研究は化学-力学変換機構の理解を深化するため、ステップ状回転の検出に挑戦した。ステップ状回転は精製されたモータータンパク質の実験において報告されており、F₁-ATPase では低濃度 ATP 状態や高濃度リン酸存在下において、ビーズの回転運動が離散的な階段状の運動となることが知られている。これは α, β サブユニット界面上の触媒サブユニットで起こる ATP 結合反応 (80 度回転ステップ) とリン酸リリース (40 度回転ステップ) といった律速段階の反応が見えるからである。従って、撮

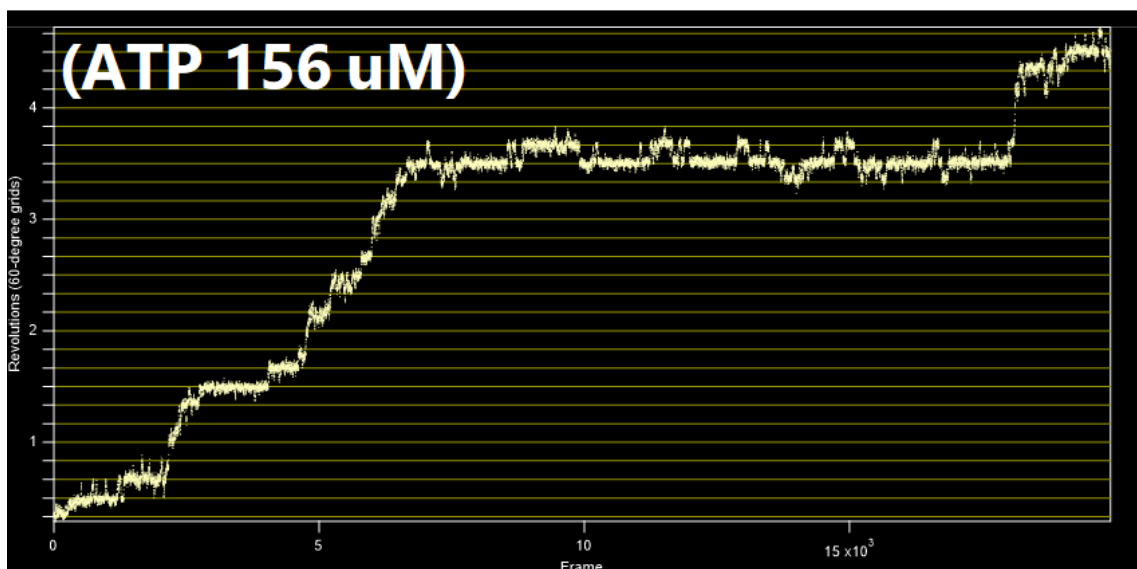
動に対する回転ステップの影響から化学・力学変換機構の議論が可能となる。

本研究ではまず、ATP加水分解が遅くなる変異体を作製し、ステップ状回転が確認されるか検証した。詳細は論文発表前なので伏せるが、ATPaseである FlaI に点変異を入れている。この点変異により、回転速度は 1/200 遅くなることが確認された。

次に、この変異株を用いて回転アッセイを行った。その結果、特徴的なステップ状回転を検出した。下図に示すのは他の生細胞の結果をまとめたものである。赤線は Kerssemakers 解析による近似線であり、この解析によりステップサイズ並びに待ち時間の解析ができる (Kerssemakers et al., Nature, 2006)。Kerssemakers 解析により得られたステップサイズは 58 度であり、これは ATPase である FlaI の周期構造 (6 量体) と一致する。



次にゴーストを用いて、化学状態とステップ角の関係性を解き明かすことにした。下記が結果の一部である。現在、ステップ角と化学状態の 1:1 対応を決めている最中であり、今年度中に論文を提出する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

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 Escherichia coli 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 1-11
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 Kinosita Yoshiaki, Mikami Nagisa, Li Zhengqun, Braun Frank, Quax Tessa E. F., van der Does Chris, Ishmukhametov Robert, Albers Sonja-Verena, Berry Richard M.	4. 巻 117
2. 論文標題 Motile ghosts of the halophilic archaeon, Haloferax volcanii	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 26766 ~ 26772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2009814117	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 木下 佳昭、曾和 義幸	4. 巻 61
2. 論文標題 蛍光イメージングで見えてきた大腸菌の異なる運動様式	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 316-320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophys.61.316	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshiaki Kinosita, Richard M. Berry
2. 発表標題 Motile ghosts of the halophilic archaeon, Haloferax volcanii
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 Yoshiaki Kinoshita, Richard M. Berry
2. 発表標題 Motile ghosts of the halophilic archaeon, Haloferax volcanii
3. 学会等名 BLAST - Bacterial Locomotion and Signal Transduction (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下 佳昭
2. 発表標題 ゴーストと歩んだ10年間
3. 学会等名 第47回日本生体エネルギー研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下 佳昭、渡邊 力也
2. 発表標題 高度好塩菌アーキアの回転モーターにおける化学走性
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会
4. 発表年 2021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
---------	---------