

機関番号：32675

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870036

研究課題名（和文） 細菌べん毛モーターのトルク発生部位ラベリングによる動態解析

研究課題名（英文） Labeling of torque generation site of bacterial flagellar motors

研究代表者

曾和 義幸 (SOWA YOSHIYUKI)

法政大学・生命科学部・講師

研究者番号：10519440

研究成果の概要（和文）：バクテリアべん毛モーターは、大きさが約 50nm の回転ナノマシンである。この回転モーターは高速回転や回転方向制御など人工ナノマシンへの知見が詰まっている。我々は、この小さなモーターの回転機構を調べるために、モーターが回転力を発生している部位を観察することを目指した。その結果、回転機能を保持したままモーターを蛍光色素で標識することに成功した。

研究成果の概要（英文）：The bacterial flagellar motor is a rotary nano-machine of ~50 nm in diameter. This rotary motor possesses many insights to build artificial nano-machines, e.g. fast rotation, switching of motor direction and so on. To reveal its rotation mechanism, we have tried to develop a method to observe the torque generation sites of the motor. As a result, we succeeded in labeling the functional motor by fluorescent dyes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：べん毛モーター, ナノマシン

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) バクテリアべん毛モーター

バクテリアべん毛モーターは、運動器官でありスクリューとして機能するフィラメントを回転させる回転子とイオンチャネルとして機能する固定子から構成される超分子回転ナノマシンである。その大きさは直径約50 nmであり、1秒間に100回転以上の高速回転や瞬時に回転方向を変換する機構を備えるなど、将来我々が人工ナノマシンを作製するにあたって、多くの知見を与えてくれると期待される。

モーターの本体はバクテリアの細胞膜に埋まっており、共役イオン（水素イオンまたはナトリウムイオン）が固定子の中を流れる際に得られるエネルギーを回転トルク発生へと変換する。しかしながら、モーターが非常に小さいこと、使用しているエネルギー源がイオン流であることなどから、モーターの機能解析が難しいため、その回転メカニズムは未だに明らかとなっていない。

## (2) 従来の回転計測方法およびその問題点

モーターは細胞膜に埋まっており、現在の

技術では人工平面膜などへの再構成は実現できていない。そのためモーターの機能計測、つまり回転計測は、生きている細胞内で機能するモーターに対しておこなう必要がある。

従来の機能計測法は、大きく分けて①テザードセル法、②レーザー暗視野照明法、③ビーズアッセイ法の3つが用いられてきた。テザードセル法は、細胞外につきだしたフィラメントをカバーガラスに固定し、モーターそのものの回転ではなく、細胞の回転からモーターの回転を計測する方法である。次に、レーザー暗視野照明法は、べん毛フィラメントに強力なレーザーを照明し、その散乱光からモーターの回転を計測する方法である。最後にビーズアッセイ法は、細胞外構造物体であるフィラメントやフックに目印となるマーカーを結合させて、モーターそのものではなく、マーカーの動きをナノメートルの精度で計測し、モーターの動きを予測していた。以上の3つの手法によって、モーターの力学特性（出力トルクと回転速度の関係）など重要な知見が得られてきた。

しかしながら、これら3つ手法すべてにおいて、タンパク質が数多く重合した細胞外構造物であるフィラメントを介してモーター回転を計測しており、機能的に柔らかいフック構造（ユニバーサルジョイントとして機能する）を介しているなど、構造自体の弾性が回転計測の結果に影響を与えていることが否定できない。また、モーター内部の構造変化など分子レベルの機能解析することが難しいといった問題点があげられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞外構造物を介した間接的な計測方法ではなく、モーター内部の動きをとらえてモーター回転機構の一端を明らかにすることを目的とした。この目的のために、モーター本体に直接的にラベリングし、その回転を検出する手法の開発が必要である。モーター回転機能を損なわないで直接的なラベリングすることができれば、上述した従来の方法での懸念は大きく減少させることができ、モーターの回転メカニズム解明に大きく近づくことが期待できる。

## 3. 研究の方法

本研究では、研究目的であるべん毛モーター本体の回転計測を実現するために以下の2点について手法開発をおこなった。

### (1) 細胞内ラベリング手法の開発

べん毛モーターがトルクを発生している細胞質側の構成タンパク質を蛍光標識または量子ドットや金粒子で標識する手法の開発をおこなった。蛍光標識では、蛍光タンパク質(GFPなど)およびGFPよりも安定に蛍光を発するローダミンなどの蛍光色素を用いて染色する系

の構築を目指した。

### (2) 分子運動を観察する顕微鏡の開発

標識したモーター本体の動きを高感度に計測するための装置・解析システムの開発をおこなった。特に、分子レベルの蛍光色素の動きを観察することができる対物レンズ型全反射照明システムの導入をおこなった。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞内ラベリング手法の開発

#### ① 蛍光タンパク質を用いた標識法

従来から利用されている GFP によるモータータンパク質 (FliG, MotB など) の標識をおこなった。モーターの機能は保持したまま、蛍光を発していることが確認でき、今後の実験に使用が可能であると期待する。

#### ② 蛍光色素を用いた標識法

蛍光タンパク質よりも安定性・蛍光強度が分子イメージングに適している有機蛍光色素によるモータータンパク質の標識をおこなった。具体的には、Halo-tag と融合したモータータンパク質を作製した。この融合タンパク質が大腸菌内においてトルク発生機能を保持していることを確認した。また、細胞外からローダミンリガンドを導入して、Halo-tag を介してモータータンパク質が蛍光標識されることを確認した。これまでにべん毛モーターの本体をローダミンなど1分子蛍光観察に適した蛍光色素で標識された例はないため、今後の研究の展開が期待できる。しかしながら、モーター回転計測と蛍光観察を実現したものの、照射による細胞へのダメージが大きいため、蛍光観察可能な時間が非常に短いことが課題であることも明らかとなり、溶液条件や細胞培養条件を検討して、照射によるダメージの軽減策を練ることが重要である。

#### ③ 量子ドット、金粒子を用いた標識法

量子ドットや金粒子を細胞外から細胞内導入する条件検討を試みたが、本研究期間中には大きな成果が上がらなかった。しかしながら、モーター回転の詳細な観察においては、蛍光色素よりもより安定な蛍光を発する量子ドットや散乱光を発する金粒子による標識方法は高時間分解能計測には不可欠であり、今後も条件検討をおこないたい。

### (2) 分子運動を観察する顕微鏡の開発

#### ① 蛍光顕微鏡の構築

蛍光分子の動きを分子レベルで追跡する顕微鏡の構築をおこなった。外部からの振動の影響を除くために、防振台上に設置したオリンパス社 IX71 に 473 nm 561 nm などのレーザーを組み込んだ系を構築し、全反射顕微鏡のシステムを整えた。これにより、顕微鏡サンプル表面の 100~200 nm のみの近傍をエバネッセント照明することができる。実際に

表面近傍のみが照明できていることは、懸濁したビーズを観察することで確認した。また、レーザー照明による干渉模様を、ミラーを回転駆動することで解消する手法を導入し、その効果を確認することができた。さらに、モーターの動きを観察するに当たって必要になる顕微鏡システムのナノメートル精度の安定性および制御を実現するために、ピエゾシステムの組み込みをおこなった。構築した顕微鏡を利用して、上述の研究成果(1)で作製した蛍光標識したモータータンパク質を観察した結果を図1に示す。回転する細胞の中心に強い蛍光輝点を観察することができ、計測系の準備が整いつつあることが示された。

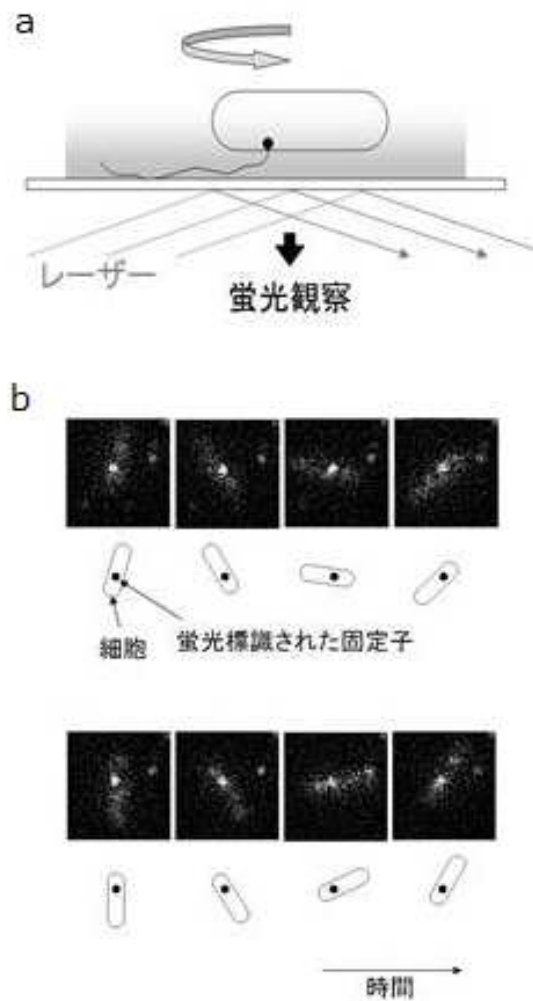


図1. 蛍光標識したモーター固定子の蛍光顕微鏡観察. a: 実験概要図. 細胞はべん毛フィラメントを介して顕微鏡カバーガラスに固定され細胞本体が回転する. 全反射照明によってカバーガラス近傍にある蛍光分子のみを観察することができる. b: 蛍光観察像と各画像の模式図. 回転中心に強い蛍光輝点が観察される.

## ②画像解析による回転計測

回転する細胞の動きから、その回転速度や回転方向を自動的に検出する画像解析システムの構築をおこなった. 一例として、プログラムのパフォーマンスを図2に示す. この結果から、スイッチの時間が3フレーム以上あれば、ほぼ100%の効率で回転方向を判定することが可能であることがわかった. 今後、モーター本体の分子動態の観察とモーターの動きの相関を調べる際に有用になると期待している.

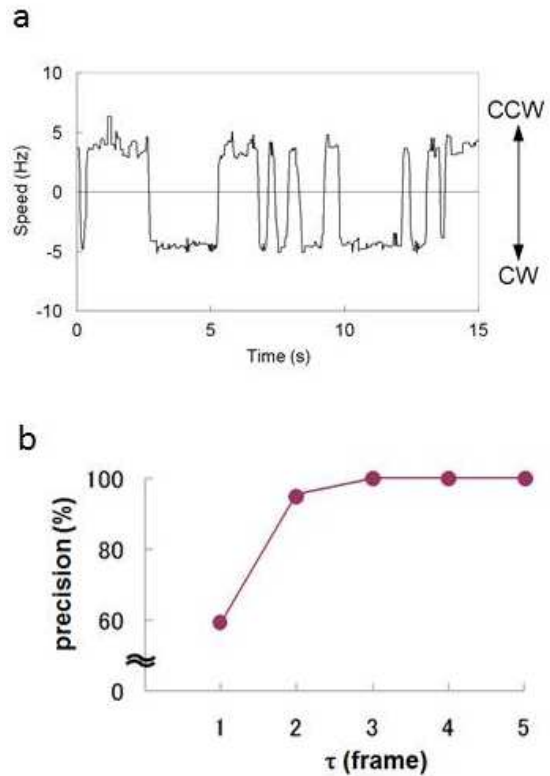


図2. モーター回転検出プログラムのパフォーマンス. プログラムは、テザードセルの連続画像(ビデオレート)から回転速度および方向を自動的に計算する. a: 回転するテザードセルの重心位置から回転速度を求め、その時間変化を示す. 速度がプラス側であれば回転方向は反時計回り(CCW)、マイナス側であれば時計回り(CW)となる. b: aの回転速度変化のグラフから、回転方向を検出した結果. このグラフでは、回転方向変換を正確に検出できた割合と逆転していた時間の関係を示している.

## ③金コロイドの動きを計測するシステム

金コロイドの動きをサブミリ秒程度の分解能で計測する光学系の構築をおこなった. 残念ながら、上述したようにサンプル調整では金コロイドの細胞内導入に成功していないので、モーター内部の動態観察には現在のところ利用できない. しかしながら、すでに

構築済みの蛍光観察と組み合わせることで、  
蛍光観察と高速度回転計測を同時に実現す  
ることは可能である。

#### 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 2 件)

- ① Mora, T., Yu, H., Sowa, Y. & Wingreen,  
N. Steps in the bacterial flagellar  
motor. *PLoS Comput. Biol* 5, e1000540  
(2009) 査読有
- ② Sowa, Y., Steel, B. C. & Berry, R. M.  
A simple back-scattering microscope  
for fast tracking of biological  
molecules. *Rev. Sci. Instrum.* 81,  
113704 (2010) 査読有  
(appears also in November 15, 2010  
issue of *Virtual Journal of Nanoscale  
Science & Technology*)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 曾和義幸, Single-molecule analysis of  
bacterial flagellar motor, *The 1497th  
Biological Symposium*, 2011 年 3 月 29  
日, 遺伝研 (静岡県)
- ② 曾和義幸, Discrete steps in fast  
bacterial flagellar rotation detected  
by back-scattering microscopy, 第 48  
回生物物理学会年会, 2010 年 9 月 22 日,  
東北大学 (宮城県)
- ③ 曾和義幸, 細菌べん毛モーターの動きを  
観る, 第 4 回細菌学・若手コロッセウム,  
2010 年 8 月 28 日, ラフォーレ修善寺 (静  
岡県)
- ④ 曾和義幸, 誘引物質に対する大腸菌応答  
のビデオ解析, 微生物研究会, 2010 年 6  
月 26 日, 法政大学 (東京都)
- ⑤ 曾和義幸, 誘引物質に対する大腸菌の応  
答・適応過程のビデオ解析, 2009 年度べ  
ん毛研究交流会, 2010 年 3 月 15 日, 松  
風園 (愛知県)
- ⑥ 曾和義幸, Steps in fast flagellar  
rotation, 第 47 回生物物理学会年会,  
2009 年 11 月 1 日, アスティ徳島 (徳島  
県)

[図書] (計 1 件)

- ① Pilizota, T., Sowa Y. & Berry RM.  
Springer, Handbook of Single-Molecule  
Biophysics (分担執筆), 2009, 183-216

[その他]

<http://sowalab.ws.hosei.ac.jp/index.htm>

#### 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・講師  
研究者番号: 10519440