

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15062

研究課題名(和文) 生物界の垣根を超えた化学走性物質による回転制御機構の解明

研究課題名(英文) Eluciation of the mechanism in motor switching through the chemotactic signals

研究代表者

木下 佳昭 (Kinosita, Yoshiaki)

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アーキアべん毛の回転制御機構に迫る適切な機能解析系のプラットフォームを構築し、回転制御に関するパートナーの同定、および、それらのタンパク質を摂動として印加した際の反転運動を可視化することを目的としている。

本研究の主な結果は、(i) 化学走性物質の変異体は反時計から時計方向の回転に寄与、(ii) Alphafoldによる*in sillico*下での方向制御に関わるタンパク質の同定と実験による実証、および、(iii) 細胞内部に化学走性物質を直接的に印加することで、それに伴った反時計方向から時計方向への切り替えの様子のリアルタイム計測である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物の運動は、『宿主体内への侵入(感染症)』や『宿主生理機能の発現(恒常性維持)』など、私たち哺乳類の日常生活と深く関わっている。この運動は、細胞内の化学反応などで得られた自由エネルギーを細胞外の力学的な仕事として出力する『異種エネルギー変換素子』、運動マシナリーにより駆動されており、運動制御を目的に、その作動機構が研究されてきた。運動マシナリーは、エネルギー変換効率が100%を誇るなど、医学的関心に留まらず、人工分子モーター設計といった応用の観点からも注目されている。

本研究の成果は運動方向の制御を担うメカニズムの解明であり、適切な制御から感染症といった予防効果が見込まれる。

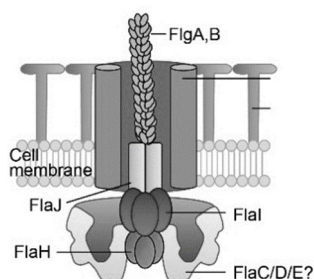
研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to establish a platform for an appropriate functional analysis system to elucidate the mechanism of motor switching in the archaeum, including the identification of partners related to motor switching and visualization of the reversal motion when chemotactic proteins are applied into a cell as a perturbation.

The main results of this study are (i) the switching of counterclockwise to clockwise rotation were detected in chemotactic mutants, (ii) identification and experimental demonstration of proteins involved in directional control predicted by Alphafold, and (iii) direct application of chemotactic proteins into the inside of the cell, and the real-time visualization of the counterclockwise-to-clockwise switching was detected.

研究分野：生物物理学

キーワード：アーキア アーキアべん毛 回転 反転 ゴースト 化学走性物質

1. 研究開始当初の背景



微生物の運動は、『宿主体内への侵入（感染症）』や『宿主生理機能の発現（恒常性維持）』など、私たち哺乳類の日常生活と深く関わっている。この運動は、細胞内の化学反応などで得られた自由エネルギーを細胞外の力学的な仕事として出力する『異種エネルギー変換素子』、運動マシナリーにより駆動されており、運動制御を目的に、その作動機構が研究されてきた。運動マシナリーは、エネルギー変換効率が100%を誇るなど、医学的関心に留まらず、人工分子モーター設計といった応用の観点からも注目されている。

図1. べん毛の現在のモデル

本研究は真核生物、バクテリアと共に生物界を構成する微生物、アーキアに注目している。多くのアーキアは遊泳運動を示し、この運動を駆動している装置こそアーキアべん毛である。アーキアべん毛は8種の異なるタンパク質の複合体であるが（図1）、申請者はこの運動装置が回転モーターであること（Kinosita et al., *Nature microbiology*, 2016）、回転の駆動力がATP加水分解であることを明らかにしてきた（Kinosita et al., *PNAS*, 2020）。

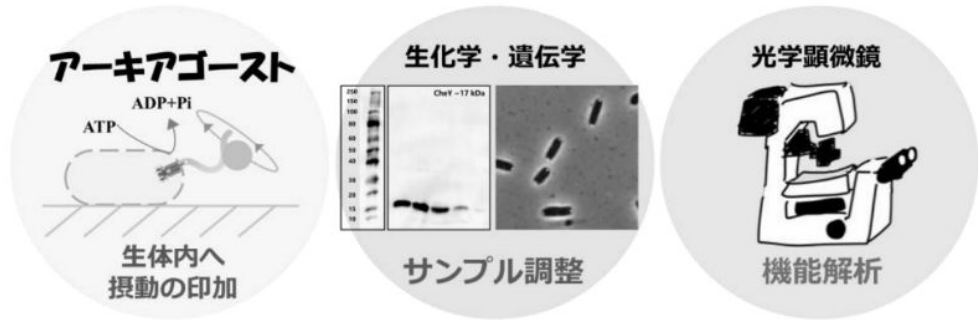
研究対象であるアーキアが面白い点は、回転モーターであるべん毛が両方向回転性であり、回転の反転には化学走性物質が関わっている点である。この化学走性物質はバクテリアの運動装置であるバクテリアべん毛の制御にも関わっており、多様なタンパク質において、普遍的なタンパク質が『反転』という普遍的な制御機構を担う好例である。過去の研究から、アーキアべん毛における回転制御に関わる走化性物質、および、その相互作用のパートナーと思しきべん毛タンパク質が同定されている。しかし、過去の研究は、回転を捉えるための適切なアッセイ系が欠如しており、回転制御機構は不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究の目標は、アーキアべん毛の回転制御機構に迫る適切な機能解析系のプラットフォームの構築である。また、そのプラットフォームを用いて、回転制御に関するパートナーの同定、および、それらのタンパク質を摂動として印加した際の反転運動を可視化し、分子レベルで回転制御機構の理解を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、下図左のゴーストを用いる。ゴーストは細胞膜を半透過性にした抜け殻構造であり、細胞内にATPなどの化学的な摂動を与えることのできる実験系である。また、ビーズアッセイと呼ばれる、べん毛繊維に結合したビーズを介する方法を組み合わせることで、モーターの回転運動を間接的に可視化できる。この可視化には光学顕微鏡を用いることで、リアルタイムで回転運動を可視化すると共に、回転制御を担う化学走性物質を発現し、その物質を適切に処理するための遺伝学・生化学も実装した。



4. 研究成果

(1) 遺伝学とビーズアッセイの融合による回転に必要なタンパク質の同定

本研究では過去に予想されていた反転制御に関わるタンパク質に関して、欠損株を作製した。作製に関しては、過去に我々が利用してきたPop-in, pop-outによる実験系を用いた (L. Kinoshita et al., *mBio*, 2019)。作製した欠損株をビーズアッセイに施したところ、ほぼすべての株において、反時計方向の回転のみを示すことが明らかとなった。これは過去の研究代表者の実験データとも一致しており、化学走性物質は反時計方向から時計方向に切り替えるというモデルを支持した (Kinoshita et al., *PNAS*, 2020)。一方で、1つの欠損株においては、時計方向が優先であり、異なる反転制御に関する pathway が示唆された。

(2) AlphaFold を介した、反転に関するタンパク質の同定とアッセイによる実証

(1) では、化学走性物質に関して注目した。2 では逆に、化学走性物質と相互作用するアーキアベン毛に関して注目した。特に過去の研究で注目されてきた FlaC/D/E に関して着目している。研究実施期間中に、AlphaFold 2 が実装された為、CheY と FlaC/D/E 間で複合体形成をするか否か *in silico* で確認した。その結果、FlaD との間で複合体形成を行っており、特に重要な数種類の残基を確認した。この残基にアラニン置換をした所、通常の数倍程度のオーダーで反転の切り替えが起こることを確認した。このような短時間での反転の切り替えは初めての観察結果であり、alphaFold で予想された残基の重要性がアッセイによって実証されたことを意味している。

(3) 回転制御に関わるタンパク質の大量培養

本研究では過去に示されたように (Kinoshita et al., *PNAS*, 2020)、CheY が反時計方向から時計方向への回転を駆動するか否かを直接的に示したい。そこで、CheY を大量に取得し、ゴーストに施して濃度依存的に反転運動が起こるか否かを確認する。そのために、大腸菌、および、アーキアを介した大量発現のための plasmid を作製し、それらに形質転換した。その結果、CheY のバンドを SDS-PAGE、および、Western blot で確認することに成功した。

(4) 回転制御に関わるタンパク質を摂動として印加した際、反転運動の可視化

(3) で精製した CheY について、ゴースト下でのビーズアッセイに適用した。その結果、頻度は数%程度であるが、反時計方向から時計方向の回転に切り替わる様子を確認できた。このような反転に関しては、CheY を添加した状況下では確認できず、CheY 依存的な反転と考えられる。一方で、この反転に関して濃度依存的な反転を確認できていないため、今後、アッセイ系の改善、および、in vivo で反転を確認できない点変異体を用いて更なる検証が必要とされる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshiaki Kinosita, Mitsuhiro Sugawa, Makoto Miyata, Takayuki Nishizaka	4. 巻 2646
2. 論文標題 Detection of Steps and Rotation in the Gliding Motility of Mycoplasma mobile	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 327-336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-3060-0_27.	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Yoshiaki Kinosita	4. 巻 2646
2. 論文標題 Direct Observation of Archaeellar Motor Rotation by Single-Molecular Imaging Techniques	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 197-208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-3060-0_17.	査読の有無 無
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 -

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 -

1. 著者名 Yoshiaki Kinosita, Yoshiyuki Sowa	4. 巻 in press
2. 論文標題 Flagellar polymorphism-dependent bacterial swimming motility in a structured environment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 0件）

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

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 Yoshiaki Kinosita, Jun Ando, Tastyua Iida, Rikiya Watanabe
2. 発表標題 Detection of the stepwise rotation of the archaellar motor in <i>Haloferax volcanii</i>
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 木下 佳昭
2. 発表標題 生物物理学的アプローチを用いた、アーキアべん毛の回転計測
3. 学会等名 第34回アーキア研究会
4. 発表年 2022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
---------	---------