

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570177

研究課題名(和文)べん毛モータの機械的強度と出力特性

研究課題名(英文)Mechanical strength and output characteristics of flagellar motor

研究代表者

工藤 成史(Kudo, Seishi)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70308550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：バクテリアが泳ぐのは、より良い環境に到達するためである。その推進機関であるべん毛モータが簡単に壊れるようでは、彼らの生存に関わる事態となる。したがって、べん毛モータは十分な強度を持つ必要があるが、それを定量的に確かめた実験は無かった。本研究では、べん毛モータの機械的強度を定量的に測る手法を開発し、サルモネラ菌の野生型モータと強度が低下した突然変異体モータの強度を求めることができた。得られたデータから、バクテリアの生育環境下において、野生型のモータが過不足のない適度な強度を有することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Bacteria swim to search favorable environments for their survival. If their locomotion apparatus, flagellar motor, is easy to be broken, they cannot live a good life. Therefore the flagellar motor should have sufficient mechanical strength. However, no quantitative data of its strength had been reported. In this study, we developed a method to measure the motor strength, and obtained the quantitative data of motor strengths for Salmonella wild type and mutants whose motors are easy to be broken in viscous environment. Our results indicate that the wild type motor has just enough strength for bacteria to move around their growth environment.

研究分野：生物物理学

キーワード：べん毛モータ バクテリア 運動

1. 研究開始当初の背景

真核生物が運動に使用している分子機械、例えば筋肉は基本的に多数のユニット機械が一体化された形で機能している。このような構造をとっている結果、仮にいくつかのユニット機械が故障したとしても、全体としては運動機能を失わずに済むことが多い。一方、原核生物であるバクテリアでは、ユニット機械であるべん毛モータが独立して機能している。この場合、1個のユニット機械(べん毛モータ)の故障が、菌の運動機能喪失に直接繋がることになる。そのため、個々のべん毛モータは、十分な機械的強度を有しているはずである。しかし、その強度に関する定量的知見は、得られていなかった。

べん毛モータが自力で回転する際に発生するトルクは $1 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}$ のオーダー、べん毛繊維が発生する推進力(べん毛が逆転した際には引っ張り力になる)は約 0.5 pN である。したがって、野生型のモータは、少なくともこの程度のトルクや引っ張り力で壊れるものであってはならないことは想像できていた。一方で、自身のモータが発生する力でモータが壊れてしまうサルモネラ菌突然変異体が見つかった。この突然変異体(菌株名 SJW3060)は、通常の液体培地中では野生型と同様な遊泳を行う。ところが、ゼラチンを加えて粘度を上げた溶液中で培養すると、べん毛が抜けてしまう。抜け落ちたべん毛を電子顕微鏡で観察した結果などから、ロッドと呼ばれる部品が壊れることが分かっていた。ところが、突然変異はロッドに隣接する MS リングと呼ばれる部品に起こっていた。この知見は、べん毛モータを構成するタンパク質の構造変化が、隣接する他のタンパク質の構造にも影響を与えていることを示唆していた。また、ロッドに構造変化があるとすると、軸受である L-P リングとの摩擦力(モータの内部抵抗)に変化が生じている可能性もある。べん毛モータの内部抵抗に関しては、これまで実験的解析例は殆ど無く、その変化を観測できれば、タンパク質間のトライボロジカルな相互作用に関する新たな分野を展開できる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

バクテリアが泳ぐのは、より良い環境に到達するためである。その推進機関であるべん毛モータが簡単に壊れるようでは、彼らの生存に関わる事態となる。したがって、べん毛モータの基本構造は十分な強度を持つ必要があり、構造タンパク質同士が強固に結びついて構造を形成する典型例となっている。本研究では、べん毛モータの機械的強度が低下した突然変異体を手がかりに、モータが正常に機能するのに必要な強度を定量的に求め、構造形成に寄与するタンパク質間相互作用の大きさを明らかにすることを目的とした。また、これらの変異体モータの出力特性を測定することで、変異に伴う構成部品の構造変

化がモータの内部抵抗に与える影響の有無について評価することも目的とした。

3. 研究の方法

モータ強度が低下した変異体 SJW3060 に、他の変異が加わることで菌の運動能が回復した復帰変異体を単離して遺伝子を解析した。これらの変異体を用いて、モータ強度を定量的に測定する実験を行った。並行して、モータの発生トルクをビーズ法で調べ、変異がモータ出力に影響しているかどうかも調べた。

ロッドの強度が低下した変異体である SJW3060 から、運動能を回復した復帰変異体を単離するために、軟寒天培地中でのスウォーム形成能が回復したものを多数単離した。バクテリアべん毛の遺伝子が分布する4つの領域のどこに第2の変異が起きたかを同定するために、P22 ファージを用いた形質導入法により SJW3060 から Region または を欠失させた株を作製し、復帰変異株との交雑によるマッピングを行った。マッピングの結果に基づいて DNA シークエンシングを行い、変異箇所を決定した。

べん毛モータの機械的強度を調べるために、外部から引っ張り力を加える実験を行った。べん毛モータに引っ張り力を加えるには、実験の定量性と簡便性を考慮して、粘性力を利用した。まず、テザードセルを用意した。次に、カバーガラスを移動させることで、周辺の水溶液を流動させて、テザードセルが離脱するまで流速を増大させた。そのときの流速から粘性力(べん毛モータに加わった力と等しい)を求めることで、モータ強度を評価した。また、モータが外部トルクにより破壊されるかどうかを検証するために、高周波回転電場によりテザードセルにトルクを印加する実験も行った。

テザードセルを作製する方法としては、最初は抗べん毛抗体を用いてべん毛をスライドガラスに固定したが、後半はべん毛がガラスに付着しやすくなる sticky filament の変異を、野生型の菌と変異型の菌にそれぞれ導入したものを作製して用いるようにした。

変異がモータの発生トルクに与えた影響を評価するため、遊泳速度の計測と、ビーズ法による回転計測を行った。

4. 研究成果

バクテリアのべん毛モータについて、強度が低下した突然変異型のモータと、別の変異が加わることで強度がある程度回復した復帰変異型モータを用いて、構造タンパク質間の相互作用の大きさと、それを変化させる要因を明らかにすることを目指して、遺伝子解析ならびにモータの機械的強度とモータ特性の測定を行った。

単離・解析した復帰突然変異体は400種で、その約70%について2番目の変異箇所を同定できた。そのうち、元の変異体でモータが壊

れる箇所であるロッドに第2の変異が入ったものは2つあった。残りのうち、111種はMotと呼ばれる部分に、71種はCリングと呼ばれる部分に変異が入っていた。MotもCリングもモータのトルク発生に直接関わる部位であることから、べん毛の抜けやすさが回復したように見える復帰変異体の多くで、モータの出力低下によりべん毛が抜けなかったことが示唆される結果であった。

べん毛モータの機械的強度を調べるために、外部から粘性力を加える実験系を構築した。べん毛がスライドグラスに付着した状態で菌体が回転するテザードセルを作製し、カバーグラスを移動させて周辺の水溶液を流動させ、テザードセルが離脱したときの流速から粘性力(べん毛モータに加わった力)を求めた。その際、離脱したセルはスライドグラスの近傍にあるので、壁の効果により粘性力がバルクの場合より大きくなることを考慮して値を補正した。

モータ強度の測定は、野生型、SJW3060、ロッドに第2の変異が入った復帰変異株を対象に行った。得られた野生型のモータ強度は、約20 pNであった。SJW3060ではその半分の約12 pNまで低下していることが分かった。復帰変異体の場合は、約14 pNと、両者の間の値が得られた。なお、統計的検定を行った結果、野生型とSJW3060、野生型と復帰変異体のモータ強度の間には明確な有意差が認められたが、SJW3060と復帰変異体の間には有意差は認められなかった。

高周波回転電場による外部トルク印加実験では、モータの発生トルクの10倍程度までのトルクを印加したが、いずれの菌株でもモータが壊れることは無かった。変異によりモータの内部抵抗が大きくなるような変化があれば、外部トルクによりモータが破壊される例が観測される可能性があるが、ここで得られた結果は、そのような変化が起こったことを示すものではなかった。

調べた全ての菌株の間で、遊泳速度には殆ど差が無かった。ビーズ法によるモータ回転計測の結果も同様であった。このことから、今回調べた変異体のモータ出力は、変異の影響を受けておらず、野生型と変わらないと言える。換言すれば、変異体のべん毛が抜けやすいのは、モータの機械的強度が低下したことのみによることが確認できた。

以上のように、べん毛モータの機械的強度に関する定量的データを初めて得ることができた。SJW3060のべん毛がゼラチンを含む培養液中で抜ける際に巨大バンドルを作るといつて報告された現象は、巨大バンドルに捕捉された菌が菌体を回転させようとしてバンドルを押し出す際の力をモータの発生トルクから見積もると、今回測定された機械的強度を越えることで説明できる。それに対して、この力は野生型のモータ強度を越えてはいなかった。これは、野生型のモータが、自然界でバクテリアが生存するのに過不足

のない適度な強度を有していることを示すものである。

本研究では、SJW3060のMSリングの変異と、復帰変異体のロッドの変異について、それぞれの変異部位とモータの機械的強度の変化を定量的に求めることができた。しかし、機械的強度が変化するメカニズムを明らかにするには至らなかった。べん毛モータの機械的強度が変化した理由や、モータが強度を保つメカニズムを理解するには、関連するモータ部位の構造が詳細に解かれる必要がある。構造が解かれれば、今回見出された変異部位がどのような位置にあるか、近傍にどのようなアミノ酸残基があるかなどの情報から、モータの強度維持に関する理解が進むことが期待できる。

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) Hitomi Komatsu, Fumio Hayashi, Masahiro Sasa, Koji Shikata, Shigeru Yamaguchi, Keiichi Namba and Kenji Oosawa: Genetic analysis of revertants isolated from the rod-fragile fliF mutant of Salmonella, *Biophysics and Physicobiology*, Vol. 13, pp.13-25 (2016). 査読あり
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophysico/>
- (2) Akira Asaumi, Shun Taga, Takahiro Abe, Shuichi Nakamura, Fumio Hayashi, Kenji Oosawa, and Seishi Kudo: Mechanical strength of flagellar motors of Salmonella MS ring mutant, *Proc. 6th Int. Symp. on Aero Aqua Bio-mechanisms ISABMEC 2014*, pp.223-226 (2014). 査読無し

[学会発表](計 3 件)

- (1) Akira Asaumi, Shun Taga, Takahiro Abe, Shuichi Nakamura, Fumio Hayashi, Kenji Oosawa, and Seishi Kudo: Mechanical strength of flagellar motors of Salmonella MS ring mutant, . 6th Int. Symp. on Aero Aqua Bio-mechanisms ISABMEC 2014, (2014, 11,15) Honolulu (USA).
- (2) Shun Taga, Akira Asaumi, Shuichi Nakamura, Fumio Hayashi, Kenji Oosawa, Seishi Kudo: Structural stability and rotational characteristics of the flagellar motor of Salmonella MS-ring mutant and its psuedo-revertants, 第51回日本生物物理学会年会, 2P194 (2013, 10, 29) 国立京都国際会館(京都).
- (3) S. Taga, A. Asaumi, S. Nakamura, F.

Hayashi, K. Oosawa, S. Kudo:
Structural stability and rotational
characteristics of flagellar motor of
Salmonella MS-ring mutant, 第50回日
本生物物理学会年会, 2PS030 (2012, 9,
23) 名古屋大学・東山キャンパス(名古
屋).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 成史 Seishi Kudo

(東北大学・工学研究科・教授)

研究者番号: 70308550

(2) 研究分担者

大澤 研二 Kenji Oosawa

(群馬大学・理工学府・教授)

研究者番号: 50203753

中村 修一 Shuichi Nakamura

(東北大学・工学研究科・助教)

研究者番号: 90580308

(3) 連携研究者

林 史夫 Fumio Hayashi

(群馬大学・研究・産学連携戦略

推進機構・准教授)

研究者番号: 60400777