

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770141

研究課題名(和文)プロトン駆動型細菌べん毛モーターのメカノケミカルサイクルの分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of mechano-chemical reaction cycle in the proton-driven flagellar motor

研究代表者

中村 修一(Nakamura, Shuichi)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90580308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細菌べん毛モーターのエネルギー変換機構を解明することを目指して、高輝度ナノプローブと超高速サンプリングを組み合わせた一分子計測を行った。サルモネラべん毛に標識された直径100 nmの金ナノ粒子の回転をフレームレート2.5 μ sで撮影した結果、約300 Hzで回転するべん毛モーターにおいて、回転と停止を繰り返しながら動作する「回転ステップ」を検出することに成功した。エネルギー変換の素過程であるステップ動作の検出と解析は、べん毛モーターの動作原理の本質に迫る重要な手がかりである。

研究成果の概要(英文)：Bacteria can move by rotating flagella. The flagellar filament is linked with the rotary nanomachine called the flagellar motor, which is embedded in the cytoplasmic membrane. The flagellar motor consists of a rotor and stators. It is known that the proton translocation through the stator unit is converted to the mechanical work, but the energy-conversion mechanism still remains unclear. In this study, we performed a single-molecule measurement of the bacterial flagellar motor in order to elucidate the mechanism of energy conversion. Observation of a 100-nm gold nanoparticle adhered to a single flagellar filament of Salmonella showed step motions, tracks with moving and waiting periods. The step event is believed to be an elementary process of the energy-conversion reaction. Thus, our results offer important insight into the rotation mechanism of flagellar motors.

研究分野：生物物理学

キーワード：分子モーター べん毛モーター 一分子計測 回転ステップ エネルギー変換 細菌運動

1. 研究開始当初の背景

細胞には、分子モーターと呼ばれる蛋白質複合体が数多く存在し、生命活動のあらゆる重要機能を担っている。分子モーターは、ATPや細胞膜を介したイオン濃度勾配のような化学的エネルギーを力学的仕事に変換する。分子モーターのエネルギー変換機構には未だに不明な点が多く、これを解明することは、あらゆる生命機能のダイナミクスの完全理解や、分子モーターの機能不全を原因とする病気の新規予防・治療法の開発のブレークスルーとなる。

本研究では細菌の運動器官であるべん毛モーターを計測対象とした。べん毛モーターは、細胞外から細胞内に流入する水素イオン(プロトン)をエネルギー源として1秒間に300回転以上の高速で回転する。べん毛モーターには長さ5 - 10 μm のらせん状繊維が連結し、この繊維がスクリュープロペラのように回転して推進力を生みだす(図1)。エネルギー変換効率率はほぼ100%と見積もられており、人工ナノモーター開発の手本となることが長期待望されてきたが、その作動原理は未だ解明されていない。

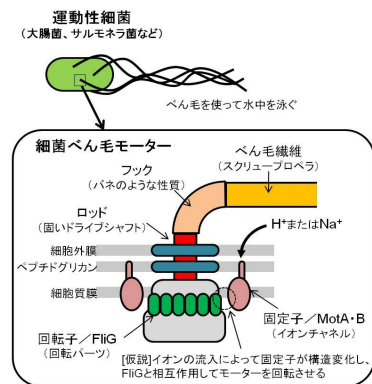


図1. 細菌べん毛モーター

2. 研究の目的

本研究では、プロトン駆動型べん毛モーターの回転ステップを高精度に検出することにより、プロトンの結合・解離反応がどのようにして力学的仕事に変換されるかという、エネルギー変換機構の本質に迫ることを目的とした。また、申請者がこれまでにを行ったキネティックモデル計算の実験的証明を通して、固定子のイオンチャネルとしての特性を明らかにすることを目指した。

近年の一分子計測では、微小ビーズなどのプローブを分子モーターに標識し、プローブの動きを追跡する手法が主流となっている。カメラなどの高機能化によって、かなり高分解能の顕微計測が可能となっているが、分子モーターの蛋白質らしい柔らかさやプローブの輝度不足などが計測精度の大幅な低下

を招いている。検出器のサンプリングレートも十分とは言えない。本研究では、これらの問題点を可能な限り排除し、分子モーターの力発生過程を高い時空間分解能で検出することを目指す。

3. 研究の方法

- (1) 1ユニットのべん毛モーターの回転を測定するため、ガラスに固定したサルモネラ菌のべん毛軸構造に直径1 μm のポリスチレンビーズ、または直径100 nmの金ナノ粒子を附着させ、暗視野顕微鏡と高速カメラを用いてプローブの回転を測定した。3 - 12%のフィコール溶液(高分子)を用いることにより、モーターに対する負荷を変化させ、広範な負荷条件下でべん毛モーターの回転数 - トルク特性を調べた。本実験では、固定子蛋白質 MotB のペリプラスム領域を欠損したサルモネラ変異株を測定した。
- (2) 直径1 μm のポリスチレンビーズをプローブとしてサルモネラべん毛モーターの回転計測を行った。倒立型顕微鏡で観察されるビーズの位相差像を4分割フォトダイオードセンサーに投影し、サンプリングレート1 kHzでビーズの変位を検出した。得られたシグナルの時間変化をもとに、1周期ごとの回転速度のゆらぎを解析した。本実験では、プロトン透過活性を失った機能不全の固定子(MotB(D33N))と野生型固定子を共発現するサルモネラ株を測定した。
- (3) 直径100 nmの金ナノ粒子をプローブとして附着させた。He-Neレーザー(波長632 nm)を光源とする後方散乱暗視野照明光学系(24 - 25年度に構築)により、回転する金ナノ粒子の散乱像を観察した(図2)。散乱像は4分割フォトダイオードセンサーまたは高速度カメラ(撮影速度 $\approx 2,000$ fps)によって検出した。本実験では、野生型サルモネラ株を用いた。

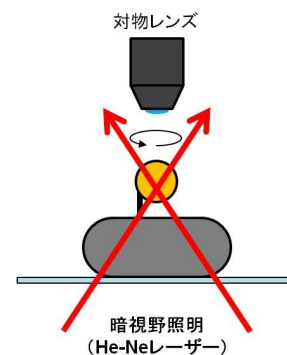


図2. ビーズ法
(レーザー暗視野照明の場合)

4. 研究成果

- (1) MotA と MotB という 2 種類の蛋白質から成る固定子ユニットが回転子周囲に安定して組み込まれるには、MotB のペプチドグリカン結合 (PGB) ドメインを介して、固定子がペプチドグリカン層にアンカリングされる必要がある。本研究では、MotB のペリプラスムドメインを欠損した変異型モーター (MotB(Δ 72-100)) の回転を様々な負荷条件下で解析し (図 3)、MotB のペリプラスムドメインが負荷依存的な固定子の安定化に重要であることを示した (Castillo & Nakamura et al., 2013 BIOPHYSICS)。

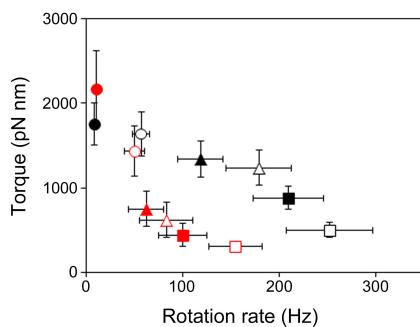


図 3 . サルモネラべん毛モーターの回転速度 - トルク特性

野生型 (黒) と変異型 (MotB(Δ 72-100), 赤) の結果を示す。回転数が速くなるにつれて、変異型のトルクは急激に減少する。MotB ペリプラスム領域の欠損により、固定子アッセムブリの安定性が低下したと考えられる。

- (2) べん毛モーターには約 10 個の固定子が存在し、回転中にもその数が変化する。本研究では、プロトン透過活性を失った固定子 MotB(D33N) を野生型サルモネラで大量発現させた。MotB(D33N) は、野生型固定子と競合してモーターに組み込まれ、モーター速度を一時的に低下させる。しかし、モーター速度は短時間で回復し、MotB(D33N) の発現量が増えるとともに、回転速度の揺らぎが大きくなることが分かった (図 4)。このことから、固定子の安定した組み込みにプロトン透過が必要で、MotB(D33N) は野生型固定子に比べて高頻度にモーターから解離することが示唆された (Nakamura et al., 2014 BIOPHYSICS)。固定子と回転子の相互作用で起こるステップ状回転を観察するには、固定子数の制御が必要である。本成果は、ステップ解析のための基礎的知見として重要である。

- (3) 野生型モーターに標識された金ナノ粒子の散乱光をフォトダイオードセンサ

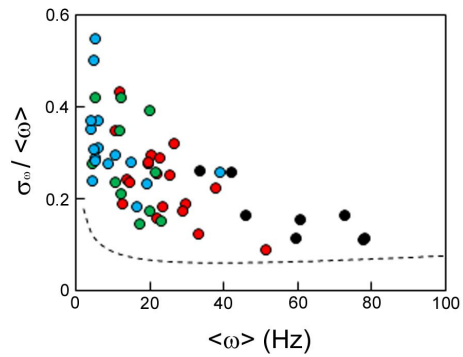


図 4 . 回転速度のゆらぎ
野生型サルモネラに機能不全固定子 MotB(D33N) を発現させた結果を示す。シンボルの色の違いは、MotB(D33N) の発現量の違いを示す。MotB(D33N) が多く発現するほど、回転速度 ($\langle \omega \rangle$) は遅く、速度揺らぎ ($\sigma_{\omega} / \langle \omega \rangle$) が大きくなる。

で検出することを試みたが、サンプリング高速化のために縮小されたセンサーでは十分な電圧が得られず、ステップ検出に必要な空間分解能が得られなかった。しかしながら、超高速カメラを用いた測定では、最高 300 Hz で回転するモーターのステップを 1 nm 以下の空間分解能で検出することに成功した。測定されたステップを解析したところ、同一モーターでもステップスピードが大きく揺らぐこと、プロトンの解離反応が遅くなると、ステップの待ち時間が長くなり、ステップスピードにはほとんど影響しないことなどが明らかになった。これらの結果を踏まえ、べん毛モーターがブラウン運動を利用して動作するというモデルを提案することとした (論文作成中)。これまでにべん毛モーターで検出されたステップは、いずれも回転速度 1 Hz 程度の低速回転モーターで得られたもので、その解析で得られる情報はごく限られたものであった。本研究の成果により、べん毛モーターの作動原理に関する理解が大きく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 3 件)

Nakamura S, Minamino T, Kami-ike N, Kudo S and Namba K. (2014) Effect of the MotB(D33N) mutation on stator assembly and rotation of the proton-driven bacterial flagellar motor. *BIOPHYSICS* **10**: 35-41. DOI: 10.2142/biophysics.10.35 (査読有)

Che YS, Nakamura S, Morimoto YV, Kami-Ike N, Namba K, Minamino T. (2014)

Load-sensitive coupling of proton translocation and torque generation in the bacterial flagellar motor. *Mol. Microbiol.* **91**:175-184. DOI:10.1111/mmi.12453(査読有)

Castillo DJ, Nakamura S., YV. Morimoto, YS Che, N. Kami-ike, S. Kudo, T. Minamino, K. Namba. (2013) The C-terminal periplasmic domain of MotB is responsible for load-dependent control of the number of stators of the bacterial flagellar motor. *BIOPHYSICS* **9**: 173-181. DOI: 10.2142/biophysics.9.173 (査読有)

[学会発表](計 3件)

Nakamura S. (発表題目) Observation of fast steps of the proton-driven flagellar motor. (会議名) Human Frontier Science Program Japan meeting. (発表場所) Rusutsu Resort, Hokkaido, Japan (発表年月日) 2015年2月23日

Shuichi Nakamura, Yusuke V. Morimoto, David J. Castillo, Yong-Suk Che, Nobunori Kami-ike, Seishi Kudo, Tohru Minamino and Keiichi Namba. (発表題目) In-frame deletions in the periplasmic region of MotB cause unusual torque-speed relationship in the *Salmonella* flagellar motor. (会議名) Sensory Transduction in Microorganisms, Gordon Research Conference (発表場所) Ventura Beach Marriott in Ventura, CA, United States (発表年月日) 2014年1月13-16日

Shuichi Nakamura, Yusuke V. Morimoto, David J. Castillo, Yong-Suk Che, Nobunori Kami-ike, Seishi Kudo, Tohru Minamino, Keiichi Namba. (発表題目) Effect of in-frame deletion in the periplasmic region of MotB on the torque-speed relationship of *Salmonella* flagellar motor MotB. (会議名) 日本生物物理学会 第51回年会 (発表場所) 京都国際会議場, 京都 (発表年月日) 2013年10月28-29日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 修一 (NAKAMURA, Shuichi)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 90580308