

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005 ～ 2009
 課題番号：17076005
 研究課題名（和文） ハイブリッドバクテリアを用いたべん毛モーターのエネルギー変換・
 情報伝達機構の解明
 研究課題名（英文） Clarification of the energy and signal transduction of bacterial
 flagellar motor using hybrid motor
 研究代表者
 石島 秋彦 (ISHIJIMA AKIHIKO)
 東北大学・多元物質科学研究所・教授
 研究者番号：80301216

研究成果の概要（和文）：バクテリアべん毛モーターは直径が高々 40 nm の回転モーターであり、バクテリアの運動機関として知られている。その原動力は、細胞内外のイオン濃度差であり、種により、プロトン、ナトリウムが用いられる。我々はこれら 2 種類のキメラ菌体を作成した。このキメラ菌体は、回転計測に適しており、回転機構の解明に重要な役割を果たす。我々はこのキメラ菌体を用いて、初めてステップ状変異の計測に成功した。

研究成果の概要（英文）：The bacterial flagellar motor is a rotary molecular machine that rotates the helical filaments that propel many species of swimming bacteria. The rotor is a set of rings up to 45nm in diameter in the cytoplasmic membrane³; the stator contains about ten torque generating units anchored to the cell wall at the perimeter of the rotor^{4,5}. The free-energy source for the motor is an inward directed electrochemical gradient of ions across the cytoplasmic membrane, the protonmotive force or sodium-motive force for H⁺-driven and Na⁺-driven motors, respectively. Here we demonstrate a stepping motion of a Na⁺-driven chimaeric flagellar motor in *Escherichia coli*⁶ at low sodium-motive force and with controlled expression of a small number of torque-generating units. We observe 26 steps per revolution, which is consistent with the periodicity of the ring of FliG protein, the proposed site of torque generation on the rotor^{7,8}. Backwards steps despite the absence of the flagellar switching protein CheY indicate a small change in free energy per step, similar to that of a single ion transit.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|------|------------|
| 2005 年度 | 19,000,000 | 0 | 19,000,000 |
| 2006 年度 | 17,400,000 | 0 | 17,400,000 |
| 2007 年度 | 15,500,000 | 0 | 15,500,000 |
| 2008 年度 | 15,400,000 | 0 | 15,400,000 |
| 2009 年度 | 15,200,000 | 0 | 15,200,000 |
| 総計 | 82,500,000 | 0 | 82,500,000 |

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：バクテリア，べん毛モーター，ナノ計測，

1. 研究開始当初の背景

バクテリアべん毛モーターは直径が高々40nmの回転モーターであり、その原動力は、細胞内外のイオン濃度差であり、種により、プロトン、ナトリウムが用いられる。我々はこれら2種類を融合したキメラ菌体を作製した。このキメラ菌体は、回転計測に適しており、回転機構の解明に重要な役割を果たす。しかしながら、まだこのキメラ菌体の基本的な性質については、まだ確認していない。

2. 研究の目的

ナトリウム駆動型べん毛モーターを有する大腸菌株を用いて、ナトリウムイオン駆動によるべん毛モーターの回転を高分解能で計測し、その回転メカニズム・情報伝達機構の解明に迫る。浅井らによって開発されたハイブリッドバクテリアは、大腸菌上で機能するナトリウム駆動型べん毛モーターを有する。この菌体を用いることにより、プロトン駆動型とナトリウム駆動型との類似性、イオン（プロトン、ナトリウム、リチウム）の選択性、遺伝子発現と機能発現との相関、化学・機械的刺激による情報伝達機構、などを明らかにすることが可能となる。期間内においては、回転計測に適した菌体の構築、モーターユニットの発現量と発生トルク・角速度との関係、回転の素過程（最小回転ユニット）、情報伝達機構との対応などを明らかにしていく予定である。

3. 研究の方法

ハイブリッド菌体を用いたバクテリアべん毛モーターのエネルギー変換機構・情報伝達機構の解明のため、生化学的、物理学的、分子遺伝学的アプローチをおこなう。

生化学的アプローチ（本間、川岸）においては、モータータンパク質（PomA, PomB, PotB）の大量発現をおこない各タンパク質の相互作用、構造解析に向けて結晶化の条件検討を行う。また、レセプタータンパク質のダイマー間相互作用を明らかにするため、部位特異的 S-S 架橋法を用いてレセプターダイマー間相互作用を *in vivo* で解析する。とくに、リガンド結合やその他の刺激、メチル化の影響について調べ、シグナル増幅に対するダイマー間相互作用の関与の可能性について検討する。また、すでに用いた部位以外に Cys を系統的に導入して架橋効率を調べる。さらに、これまでの結果により示唆されたレセプター6量体ユニットの生菌の極での存在様式、それと複合体を形成する CheA, CheW の量比など、複合体の構造についても解析する。

分子遺伝学的アプローチ（本間、川岸）においては、ハイブリッドモーターを回転計測に適用するための改変をおこなっている。具

体的には、繊維状タンパク質（Pili）の除去、プロトン駆動型モーターユニット、MotA, MotB タンパクの除去、変異フィラメントの導入、などである。さらに、ハイブリッドモーターユニット（PotB）の融合位置の変更、相互作用部位の電荷の置き換え、などを行い、回転の様子の変化との対応を計る。また、情報伝達機構においては、レセプタータンパク質などの各種情報伝達に関わるタンパク質の発現量を調節することにより、外部からの力学的、化学的刺激に対するべん毛モーターの回転速度、回転方向変換頻度との対応を試みる。さらに、モータータンパク質と GFP との融合タンパク質の作成（Flig-GFP）をおこない、べん毛モーター内局在、融合タンパク質の活性状態の検討を行う。また、情報伝達機構においては、受容体タンパク質や細胞質シグナルタンパク質の GFP との融合タンパク質を用いて細胞内局在化とその制御機構の解析をおこなう。具体的には、様々な変異体や細胞分画、*in vivo* 結合アッセイを組み合わせて局在化の原因、発現量の調節機構を明らかにする。また、CFP, YFP との融合タンパク質を作製し、レセプターダイマー間相互作用を FRET を用いて解析する。また、レセプターをメチル化、脱メチル化する酵素（刺激に対する適応に関わる）の間の相互作用についても解析する。

物理学的アプローチ（石島）においては、現在の計測においては、プローブの位相差像を4分割に投影し、その差動出力よりプローブの位置を求めている。しかし、この計測システムでは、位置の分解能・精度はプローブの位相差像の光強度に依存することとなり、プローブの大きさが小さくなると位置の分解能・精度は低下する。そこで、計測系の改良として、

- ・光ロスの少ない位相差照明法の開発

- ・バックフォーカル計測システムの導入を検討している。位相差像を使う場合の一番の問題点は、位相板を使う必要があるため、そこで光強度が大幅に減少してしまう、という点にある。位相差像の観察においてはほとんど問題にならないが光計測においては光強度の大幅な低下という大きな問題となる。そこで、市販の位相板の位置・形状を検討し直し、光計測に適した光学系の構築を目指す。さらに、位相板を使わない光学系の構築（アキシコンプリズムを利用した光学系）を目指す。また、バックフォーカル計測システム（AOD システム, YLF レーザー）の導入することにより、プローブのサイズに依存しない計測手法を確立する。バックフォーカル計測システムはプローブの結像像ではなく、フーリエ像をセンサーに投影してその光強度の変化よりプローブの位置を計測するものである。光学系自体は非常にシンプルであるが、

非常に感度が高いために少しの外乱により、大幅に出力が変化してしまう。そのため、光学系のセッティングの最適化の検討が必要となる。また、共同研究者であるイギリス、オックスフォード大の Richard Berry と計測システムの共同開発をおこなうために、イギリスに出向き、装置の開発に当たっての議論、計測データの議論をおこなう。

さらに、細胞内 GFP の局在、移動を高分解能で計測可能な、顕微鏡システム（エバネッセント照明）の構築をおこなっている。GFP の蛍光強度の変化を高時間、空間分解能で計測することにより、GFP 融合タンパク質の局在、さらにはモーターユニットとの融合 GFP タンパクの強度変化より回転の様子を検知可能となる。

4. 研究成果

バクテリアべん毛モーターは直径が高々 40 nm の回転モーターであり、バクテリアの運動機関として知られている。その原動力は、細胞内外のイオン濃度差であり、種により、プロトン、ナトリウムが用いられる。我々はこれら 2 種類のキメラ菌体を作成した。このキメラ菌体は、回転計測に適しており、回転機構の解明に重要な役割を果たす。我々はこのキメラ菌体を用いて、初めてステップ状変異の計測に成功した (Nature, 2005)。

バクテリアべん毛モーターは直径が高々 40 nm の回転モーターであり、その原動力は、細胞内外のイオン濃度差であり、種により、プロトン、ナトリウムが用いられる。我々はこれら 2 種類を融合したキメラ菌体を作成した。このキメラ菌体は、回転計測に適しており、回転機構の解明に重要な役割を果たす。しかしながら、まだこのキメラ菌体の基本的な性質については、まだ確認していない。そこで、我々はこのキメラ菌体の基本的な性質を明らかにすることを試みた。その結果、キメラ菌体のトルク-速度関係は元となる二つのモーターと同様の回転-トルク特性を持つことがわかった。さらに、固定子の発現量を調整することにより、固定子のモーターへの組み込みとともに回転速度が段階的に上昇することを観察できた。さらに、1 個の固定子による回転-トルク特性を明らかにすることができた。その結果、キメラ菌体は元となる菌体、ナトリウム型、プロトン型、のちょうど中間に位置するモーターであった。具体的には、最大トルクはプロトン型、最大速度はナトリウム型であり、低回転域においては一定のトルク、ある速度域からは回転速度の上昇とともにトルクは直線的に減少した。この特性は、プロトン、ナトリウム型共通の性質であり、三者とも共通のメカニズムで機能していることを示唆するものである。さらに、一つのモーターには膜に固定

された固定子が 10 個程度組み込まれ、回転子と相互作用して回転運動を引き起こすことが知られているが、一つの固定子の性質を調べるために、固定子の発現量を調整し、その特性を検討した。さらに、遺伝子変異体を導入し、その特定変化を検討した。

バクテリア菌体内における情報のやりとり、モーター複合体の構築状況、モーターの回転の様子を明らかにするためには、菌体内の分子のイメージング技術が必須となる。菌体内のイメージングに関しては、従来のイメージング技術に比べて、菌体の小ささ、さらには菌体が俵型をしていることからの光学的という問題がある。我々はエバネッセント照明を最適化し、バクテリア菌体内の GFP 融合タンパクのイメージングを試みた。その結果、モーター構成タンパクの一つである FliG と GFP の融合タンパクが菌体内を拡散運動している様子を観察することに成功した。さらに、蛍光輝点の重心解析により、拡散定数を見積もることに成功した。また、テザードセル法を導入することで菌体の回転中心と FliG-GFP 融合タンパクとの輝点が一致することを明らかにすることができた。

モーターを構成する、固定子が恒常的にモーターに存在しているのではなく、外部環境に応じて、離合集散を繰り返していることを見いだした。具体的には、外部イオン (Na⁺) 濃度が高い場合には、固定子はモーターに局在し、イオン濃度が減少すると、モーターから離れていく。このことは、細胞内分子メカニズムを考える上でも非常に有益な知見となる。現在、生命科学系専門誌に投稿中である。

さらに、一つのモーターには様々なタンパク質によって構成されているが、その中で、回転子を構成する、Fli-G, M, N において、細胞中での交換反応が起こるかどうかを検討した。その結果、Fli-G においては、交換反応が起きないが、Fli-M, N においては、交換反応が起こることを見いだした。

マルチモーター計測においては、従来のフォトダイオードを用いた計測では不可能なため、ハイスピードカメラを用い、画像解析から回転の計測を試みた。そのために必要なカメラの選定、購入、解析ソフトの作成などを行った。現時点までに複数モーターの解析に成功した。同一菌体内のモーターの回転速度、回転ゆらぎ、そして回転方向の変換タイミングは非常によい相関を示し、他菌体のモーターとの相関はほとんどなかった。また、レセプターとの関係を求めるため、レセプター構成タンパク質の一つである、CheW に GFP を融合させ、その局在を蛍光観察により確かめた。その結果、レセプターに近いモーターが常に回転の転換が遠い方のモーターに先んじていることを見いだした。この結果は、

モーターの回転の転換が、レセプターからの情報によるものであることを強く示唆している。

べん毛モーターを制御する走化性情報伝達系について、以下のことを明らかにした。

走性受容体による刺激の受容機構：大腸菌走化性受容体は、温度刺激に対する走性のセンサーとしても働く。この温度刺激の受容に受容体膜外ドメインは必須でないことを示した。また、忌避物質に対する応答機構の解明は遅れている。大腸菌の忌避物質であるNi²⁺イオンは、通説ではペリプラズムにあるNi²⁺結合タンパク質を介してアスパラギン酸受容体に認識されるとされていたが、本研究において、Ni²⁺応答にNi²⁺結合タンパク質は不要であること、Ni²⁺イオンはアスパラギン酸受容体の膜外ドメインに直接結合することを示した。

走化性情報伝達系因子局在機構：大腸菌走化性受容体は、菌の極で巨大クラスターを形成する。この性質は、シグナルの増幅や適応に重要である。ところが、走化性受容体がどのようにして細胞の極に局在するのかという基本的な疑問については全くわかっていない。走化性受容体 (GFP 融合体) に欠失変異や点突然変異を導入した解析から、膜貫通領域直下の HAMP ドメインが局在に関与することを見出した。また、走化性受容体およびそれと相同性をもつ酸化還元センサーが極で共クラスターを形成することを見出した。そのような極クラスター内で走化性受容体ダイマー同士が相互作用すること、それが局在にも重要であることを示した。一方、全反射型蛍光顕微鏡を用いた解析により、細胞膜中での受容体蛋白質 (GFP 融合体) の動きは細胞骨格またはそれに付随する構造により制限されることを見出した。一方、全反射型蛍光顕微鏡を用いて、細胞膜中での受容体蛋白質 (GFP 融合体) の動きを観察することに成功した。さらに、受容体と共局在するタンパク質のうち、受容体メチル化酵素・脱メチル化酵素の局在制御について解析し、とくに脱メチル化酵素が受容体のメチル化自体によって局在を大きく変えることを見出した。

コレラ菌における走化性および走化性類似情報伝達システムの機能と局在：コレラ菌は、3 組の Che 蛋白質群 (Che システム) および 45 種の走化性受容体様蛋白質をもつ。このようなパラレルなシグナル伝達系が、どのように使い分けられているのか解析するため、GFP 融合体を作製した。とくに、走化性に直接関与しない系の構成蛋白質が、環境条件によってその局在を変えるという予備的結果を得ている。

大腸菌走化性受容体は、菌の極で巨大クラスターを形成する。この性質は、シグナルの

増幅や適応に重要であるが、走化性受容体がどのようにして細胞の極に局在するのかという基本的な疑問については全くわかっていない。本研究では、これまでの走化性システムに関する研究を進展させつつ、より視野を広げて、細胞骨格系や脂質との相互作用、走化性以外の環境応答系の局在、コレラ菌におけるパラレルな 3 つの走化性類似システムの使い分けや病原性との関連なども含めて解析している。

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 24 件) すべて査読有

1. Fukuoka, H., Wada, T., Kojima, S., Ishijima, A. & Homma, M., Sodium dependent dynamic assembly of membrane complexes in sodium-driven flagellar motors, *Mol Microbiol*, 71, 2009, 825-835
2. Inoue, Y., Lo, C. J., Fukuoka, H., Takahashi, H., Sowa, Y., Pilizota, T., Wadhams, G. H., Homma, M., Berry, R. M. & Ishijima, A., Torque-speed relationships of Na⁺-driven chimeric flagellar motors in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.*, 376, 2008, 1251-1259
3. Hizukuri, Y., Kojima, S., Yakushi, T., Kawagishi, I., and Homma, M., Systematic Cys mutagenesis of FlgI, the flagellar P-ring component of *Escherichia coli*., *Microbiology*, 154, 2008, 810-817
4. Fukuoka, H., Sowa, Y., Kojima, S., Ishijima, A. & Homma, M., Visualization of functional rotor proteins of the bacterial flagellar motor in the cell membrane. *J Mol Biol*, 367, 2007, 692-701
5. Sowa, Y., Rowe, A., Leake, M., Yakushi, T., Homma, M., Ishijima, A., and Berry, R., Direct observation of steps in rotation of the bacterial flagellar motor., *Nature*, 437, 2005, 916-919

[学会発表] (計 130 件)

1. Shun Terasawa, Hajime Fukuoka, Hiroto Takahashi, Yuichi Inoue, Akihiko Ishijima, Simultaneous measurement of rotational movement of multiple flagellar motor in a single cell, 第 83 回日本細菌学会総会, 2010 年 3 月 27 日-3 月 29 日, パシフィコ横浜
2. Hajime Fukuoka, Shun Terasawa, Hiroto Takahashi, Yuichi Inoue, Akihiko Ishijima, Simultaneous measurement of rotational movement of multiple flagellar motor in a

single cell, 文部科学省 科学研究費補助金 「特定領域研究」マルチスケール操作によるシステム細胞工学 (バイオ操作), 第 8 回公開シンポジウム, 2010 年 3 月 11 日, 九州大学医学部百年講堂

3. Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima, The chemotactic response and correlation of the multiple flagellar motors in a single bacterial cell, International Symposium "Innovative Nanoscience of Supramolecular Motor Proteins" 2009 年 9 月 8 日-10 日, Shirankaikan, Kyoto University

4. Hiremath, G., Hyakutake, A., Banno, S., Nishiyama, S., Kawagishi, I., Regulation of localization of chemotaxis-related signaling systems in *V. cholerae*", 第 82 回日本細菌学会総会, 平成 21 年 3 月 13 日, 名古屋市 (名古屋国際会議場)

5. Kawagishi, I. Receptor localization and signaling in bacterial chemotaxis, Japan-Mexico Workshop on "Pharmacobiology" and "Nanobiology", 平成 21 年 2 月 25 日, Mexico City

6. Akihiko Ishijima, Single molecule measurement using nano-measurements and imaging technique, 日本生物物理学会第 46 回年会, 平成 20 年 12 月 4 日, 福岡国際会議場

[図書] (計 7 件)

1. 石島秋彦, 井上裕一, 福岡創, 田中裕人, 株式会社エヌ・ティー・エス, ナノイメージング, 第 5 章 観察対象を動かしたり固定したりして観察する, 2008, 572, 716-731.
2. 石島秋彦, 曾和義幸, 井上裕一, 福岡創, 田中裕人, 株式会社 産業技術サービスセンター, 実用 精密位置決め技術事典, 第 2 編位置決め技術の適用事例, [4] 最近の精密機器・情報機器関連装置, 3. バイオ操作(2) (レーザーなど光ピンセット), 2008, 639-645, 総ページ数 754 ページ.
3. 笹川千尋, 林哲也 編, 南江堂, 書, 『医科細菌学』改訂第 4 版 (第 3 章 8 節を川岸が分担執筆), 2008, 87-96, 総ページ数 430
4. 塩見大輔, 川岸郁朗, 細菌の膜貫通型受容体の局在とそのメカニズム, 生物物理, 48, 2008, 30-34
5. 鈴木大介, 西山宗一郎, 川岸郁朗, 私達の研究: 細菌のもつ化学センサーのしくみを探る, 化学療法の領域, 24, 2008, 1092-1099
6. 坂野聡美, 本間道夫, 川岸郁朗, 蛋白質の細胞内局在と細胞骨格, 蛋白質核酸酵素, 53, 2008, 1739-1745

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者:

石島 秋彦 (ISHIJIMA AKIHIKO)
東北大学・多元物質科学研究所・教授
研究者番号: 80301216

(2) 研究分担者:

川岸 郁朗 (KAWAGISHI IKURO)
法政大学・工学部・教授
研究者番号: 80234037

本間 道夫 (HOMMA MICHIO)
名古屋大学・理学研究科・教授
研究者番号: 50209342

(3) 連携研究者