

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19770125

研究課題名（和文） 膜超分子複合体の膜内構築位置決定に関する研究

研究課題名（英文） Research for the mechanism of flagellar construction in the bacterial cell membrane.

研究代表者

福岡 創 (FUKUOKA HAJIME)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：50447190

研究成果の概要：

1. べん毛モーター固定子の共役イオン依存的なモーターへの組込みの発見.
2. 大腸菌プロトン駆動型べん毛モーター回転子構成素子の GFP 融合タンパク質発現系の構築.
3. 機能的モーターにおける回転子構成素子の GFP 融合タンパク質の観察系の構築.
4. 細胞膜上におけるべん毛構造体の拡散運動の検出および拡散運動解析システムの構築.
5. 機能的なべん毛モーターにおける, べん毛モーター回転子構成素子の交換の可視化.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	0	2,900,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	180,000	3,680,000

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：生体膜, 受容体, チャンネル

## 1. 研究開始当初の背景

細菌のべん毛モーターは直径 50 nm ほどの巨大なタンパク質複合体である。運動器官としてのべん毛は、べん毛繊維(スクリュー)、膜に埋め込まれたモーター、両者をつなぐフック(ユニバーサルジョイント)の3つの部分から構成されており、数十種類のタンパク質が、それぞれ数十分子ずつ重合することで構成される。モーターは、C, MS, L, P の複数のリングとロッド(ドライブシャフト)で構成される回転子と、その周囲に配置された10個程の固定子から成る。イオンチャンネルである固定子はイオン流入のエネルギーを、回転

子との相互作用を通じて回転エネルギーに変換する。べん毛構築に必要な遺伝子、およびべん毛構成タンパク質の重合過程は、過去の分子遺伝学的研究および生化学的研究によって、明らかになってきていた。しかし、大腸菌のような複数本の周毛性べん毛を有する細菌種において、直径 50 nm にも達する巨大分子複合体が、流動性に富んだ生態膜上でどのように構築されているのかという点については明らかにさされていなかった。また、研究開始の時点で、我々の研究において、構築途中のべん毛構造体が生体膜上を拡散する可能性を示唆する実験結果を得ていた。

## 2. 研究の目的

べん毛モーターの構成タンパク質を蛍光標識し、生きた細胞において、巨大タンパク質複合体が流動性に富んだ生体膜上で構築される機構、また、そのべん毛構造体が維持される機構を明らかにする。また、べん毛関連タンパク質の細胞内での動態を調べる。

## 3. 研究の方法

### (1) ビブリオ菌関連の実験操作

#### ① 菌株, プラスミド

ナトリウム型べん毛モーター固定子の観察には、野生型の極べん毛を持つビブリオ菌の固定子遺伝子欠損株を用いた。 *gfp-pomA* あるいは *gfp-pomB* をコードするプラスミドでビブリオ菌を形質転換し、これらの菌株を固定子の局在観察に用いた。

#### ② 蛍光観察のための細胞調整

ビブリオ菌の終夜培養液を 1/100 容量となるように VPG500-0.006% アラビノース培地へ加え 30°C で 4 時間培養した。培養液 6ml を遠心分離し、細胞を TMN500 buffer (500mM ナトリウム含) へけんだくした。蛍光観察のために 100 $\mu$ l を分取した。残りの細胞を遠心分離により集菌し、TMK500 buffer (カリウム含) へけんだくした。蛍光観察のために 100 $\mu$ l を分取した。残りの細胞を遠心分離により集菌し、TMN500 buffer へ再けんだくし、蛍光観察に用いた。固定子タンパク質の局在に対する sodium motive force の影響を調べるため、20 $\mu$ M CCCP を TMN50 (50mM ナトリウム) へ加え、局在観察に用いた。また、固定子タンパク質の局在に対するナトリウムチャンネル阻害剤の影響を調べるため、300 $\mu$ M フェナミルを TMN500 buffer へ加え、局在観察に用いた。

### (2) 大腸菌関連の実験操作

#### ① GFP 融合タンパク質の発現システムの構築

機能的なべん毛モーター回転子を蛍光観察するため、回転子構成素子の GFP 融合タンパク質(GFP-FliN, FliM-GFP)の発現プラスミドを作製した。それぞれの GFP 融合タンパク質を容易に観察するために、*fliN* および *fliM* 遺伝子の欠損株を作製した。GFP-FliG の発現には、過去に作製されたプラスミドおよび *fliG* 欠損株を用いた。また、機能的なべん毛モーターをテザードセル (べん毛繊維をガラス表面に固定し、菌体の回転を観察) 観察するために、*fliC-sticky* 遺伝子をプラスミドでそれぞれの変異株に導入した。

#### ② 顕微鏡システムの構築

大腸菌細胞内における GFP 融合タンパク質を観察するために、全反射蛍光顕微鏡を構築した。また、観察において、標的スポットの解析を容易にするため、クリティカル照明による蛍光退色系を導入した。

#### ③ 蛍光観察のための細胞の調整

GFP-FliN および FliM-GFP 発現株の終夜培養液を、1/100 容量となるように T-0.002% アラビノース培地に加え 30°C で 5 時間培養した。GFP-FliG 発現株は、T-0.0005% アラビノース培地で 30°C、5 時間培養した。1.2 ml の培養液から遠心分離にて細胞を集めた後、細胞を 100  $\mu$ l の motility buffer にけんだくした。細胞けんだく液を、スぺーサーを挟んだ 2 枚のカバーガラスの間に充填し、細胞をガラス表面に付着させた後、motility buffer でガラスに付着しなかった細胞を洗い流した。ガラス表面に残った細胞を蛍光顕微鏡下で観察した。

#### ④ 拡散解析および蛍光強度計測

全ての画像は EMCCD カメラで取得され、16 bit の tiff 形式画像を解析に用いた。対象とする蛍光スポットを 2 次元のガウス関数で近似することにより、蛍光スポットの蛍光強度を見積もった。また 2 次元のガウス関数近似のピーク値を蛍光強度とした。蛍光スポットの画像フレーム毎の重心位置に対し MSD (mean square displacement) を計算することで、蛍光スポットの拡散定数を見積もった。

#### ⑤ 全反射蛍光顕微鏡を用いた FRAP 観察

各 GFP 融合タンパク質を発現させたテザードセル (べん毛繊維をガラス表面に固定し、菌体の回転を観察) において、全反射蛍光顕微鏡を用いた FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) を観察した。テザードセルに対し強い励起光を照射することで、回転中心に局在する蛍光スポットを完全に退色させた。退色後、定期的にテザードセルを蛍光観察し、回転中心の蛍光回復を観察した。

## 4. 研究成果

当初の研究計画では GFP 融合タンパク質で標識されたモーター構造体の拡散を解析することで、べん毛モーターの膜上での構築位置を明らかにすることを目指した。しかしながら、研究の過程で、機能的なべん毛モーターにおいて、回転子構成素子が交換される可能性を示唆する結果が得られた。この現象は当初の研究計画に含まれていない事項であるが、本研究によって発見されたまったく新しい事実である。また、固定子タンパク質のモーターへの組み込みに、モーター回転に利用される共役イオンが必要であることも明らかになった。そこで、本計画研究では、回転子構成素子の交換について研究を進め、そ

の成果をここに記述する。

(1)共役イオン依存的な、べん毛モーター固定子のモーターへの組み込み。

べん毛モーター固定子の GFP 融合タンパク質を発現させたビブリオ菌を、ナトリウムイオンを含む motility buffer (TMN500)で蛍光観察すると、細胞の片方の極に、単一の蛍光スポットが観察された。観察に用いたビブリオ菌は極端網を持ち、さらに、蛍光スポットの位置はビブリオ菌の極べん毛の位置と一致していたことから、蛍光スポットはモーターに組み込まれたモーター固定子タンパク質であると考えられる。同じ細胞(同じ調整試料)を、ナトリウムイオンを含まない motility buffer (TMK500)にけんだくし蛍光観察すると、細胞極への GFP 融合タンパク質の局在が観察されなかった。この細胞を、ナトリウムイオンを含む motility buffer (TMN500)へ再度けんだくし蛍光観察すると、細胞極への GFP 融合タンパク質の局在が観察された。また、ナトリウムチャンネル阻害剤(フェナミル)を加えた motility buffer 中では、極局在の割合が低下した。さらに、いおんチャンネルである固定子の、ナトリウムイオン結合部位の変異体では、細胞極への固定子の局在が観察されなかった。以上のことから、ビブリオ菌のナトリウムイオン駆動型べん毛では、固定子のモーターへの組み込みに、モーター回転の共役イオンであるナトリウムイオンが必要であることがわかった。

ビブリオ菌は、中性 pH 下では proton motive force を利用することで sodium motive force が形成され、CCCP(プロトノフォア)を加えることで二次的に sodium motive force を消失させることができる。中性 pH 条件にて CCCP 存在下で蛍光観察したところ、固定子の極局在が著しく低下した。以上のことから、固定子のモーターへの組み込みには sodium motive force が必要であることがわかった。

(2)大腸菌における GFP 融合回転子タンパク質の細胞内局在

各菌株で発現させた GFP 融合タンパク質がべん毛モーターに組み込まれるかどうかを調べるために、GFP 融合タンパク質の局在を、テザードセルおよび全反射蛍光顕微鏡を用いて観察した。GFP-FliN を発現させた *fliN* 欠損株のテザードセルを観察したところ、菌体の回転中心に GFP-FliN に由来する蛍光スポットが観察された。同様に、FliM-GFP あるいは GFP-FliG を発現させた菌株においても、テザードセルの回転中心に、それぞれの菌株で発現させた GFP 融合タンパク質に由来する蛍光スポットが観察された。それぞれの菌株では、細胞の遊泳も観察された。また、ウ

エスタンブロットングにより、それぞれの GFP 融合タンパク質の発現が確認された。以上の結果から、GFP-FliN, FliM-GFP, GFP-FliG のいずれも、べん毛モーターに組み込まれ、かつ、モーター回転子としての機能を保持していると考えられる。

また、これらの3種類の菌株では、それぞれの GFP 融合タンパク質に由来する蛍光スポットの細胞膜上での拡散が観察された。蛍光スポットの拡散定数を見積もったところ、それぞれの菌株の蛍光スポットの拡散定数はほぼ同程度だった(約  $0.005 \mu\text{m}^2/\text{s}$ )。それぞれの菌株において観察された蛍光スポット数はほぼ同程度で、約1個の動かない蛍光スポットと、約2個の蛍光スポットが観察された。我々の光学系では細胞下面の約6分の1の領域が励起されることから、細胞全体では約6個の動かない蛍光スポットが存在すると見積もられ、この数は一般的な大腸菌のべん毛数と一致する。これらの結果から、観察された蛍光スポットは GFP 分子によるアーティファクトではなく、細胞内に存在するべん毛構造体に由来すると考えられる。

(3)機能的べん毛モーターにおけるモーター構成素子交換の検出。

機能的べん毛モーターにおいて、モーター構成素子が交換されるかどうかを調べるため、各 GFP 融合タンパク質を発現させたテザードセルにおいて、全反射蛍光顕微鏡を用いた FRAP を観察した。GFP-FliN を発現させたテザードセルテザードセルに対し強い励起光を照射することで、回転中心に局在する蛍光スポットを完全に退色させた。退色の30分以降、同じ細胞を蛍光観察すると、回転中心に再び蛍光スポットが観察された。FliM-GFP を発現させたテザードセルに対し回転中心に局在する蛍光スポットを完全に退色させたところ、退色の2時間後には、再び回転中心に蛍光スポットが観察された。しかしながら、GFP-FliG を発現させたテザードセルでは、退色後の時間経過に伴った回転中心の蛍光回復は観察されなかった。以上のことから、回転子構成因子のうち FliN および FliM は、機能的なモーターにおいて交換されることが分かった。一方、今回の観察条件では、FliG では蛍光回復が見られなかったことから、FliG は交換されない可能性が示唆された。

本研究では、結果的に当初の研究計画とは異なる方向性を持って進んだが、機能的なべん毛モーターにおける回転子構成素子交換というまったく新しい事実を発見するに至った。また、固定子タンパク質のモーターへの組み込みに、モーター回転に利用される共役イオンが必要であることも明らかになった。つまりべん毛モーターは常に安定なもの

ではなく、機能的な状態であっても構成素子が交換されることを意味している。このメカニズムは、もしかしたら細菌のべん毛モーターだけでなく、自然界に存在する数多くの機能性の細胞内構造体において、その機能を維持するために採用されているのかもしれない。

#### 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1件)

1. Hajime Fukuoka, Tomoyuki Wada, Seiji Kojima, Akihiko Ishijima, Michio Homma. Sodium-dependent dynamic assembly of membrane complexes in sodium-driven flagellar motors. *Molecular Microbiology*, **71**, 825-835 (2009).査読あり。

[学会発表] (計6件)

1. 福岡創, 石島秋彦. 光学顕微鏡を用いた細菌べん毛モーター1分子の観察および計測. 第82回細菌学会. 日本, 名古屋. 2009.3.12

2. Hajime Fukuoka, Shun Terasawa, Yuichi Inoue, Akihiko Ishijima. Visualization of exchange of rotor component in functioning bacterial flagellar motor. BLAST X. Mexico, Cuernavaca. 2009.1.20

3. Hajime Fukuoka, Shun Terasawa, Yuichi Inoue, Takeharu Nagai, Akihiko Ishijima. FRAP analysis for visualization of exchange of rotor component in functional bacterial flagellar motor. 第46回生物物理学会年会. 日本, 福岡. 2008.12.5

4. 福岡創, 井上裕一, 本間道夫, 石島秋彦. Eva-FRAPを用いて細菌べん毛モーター構成素子の交換を検出する. 第5回東北大バイオサイエンスシンポジウム. 日本, 仙台. 2008.5.19

5. Hajime Fukuoka, Yuichi Inoue, Michio Homma, Akihiko Ishijima. Single molecular labeling of rotor component for detection of rotation in bacterial flagellar motor. Gordon Research Conference. USA, Ventura. 2008.1.16

6. 福岡創, 齋藤健太, 永井健治, 本間道夫, 石島秋彦. イオン駆動回転モーター構成素子のGFPによる一分子標識. 第45回日本生物物理学会. 日本, 横浜. 2007.12.23

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

福岡 創 (FUKUOKA HAJIME)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号 : 50447190

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書