

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20570147

研究課題名 (和文) バクテリアべん毛モーターによる回転機能発現の瞬間を観る

研究課題名 (英文) Single motor mechanics of bacterial flagellar motor

研究代表者

井上 裕一 (INOUE YUICHI)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：50323499

研究成果の概要(和文):バクテリアべん毛モーターによる回転運動メカニズム解明を目指して、べん毛モーター1個による運動の高分解能計測を行った。モーターの基本特性としてトルク-速度関係を明らかにすると共に、開発した1分子計測用の温度制御システムを用いて計測した結果、トルクが高温時にステップ状に減少すること、さらには室温でステップ状に回復することを発見した。この結果は、トルク発生単位である固定子が、回転機能中にダイナミックに結合解離していることを示唆する。

研究成果の概要(英文): High speed measurement of rotation of the bacterial flagellar motor was made to understand the molecular mechanism of force generation. Using a new system for temperature control, we found the torque steps induced by the heating and the recovery steps by restoring temperature, suggesting dynamics of torque-generating units in a motor.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：生物物理、分子モーター、マイクロ・ナノデバイス

1. 研究開始当初の背景

バクテリアべん毛モーターは、細胞膜を介したイオン濃度差によって駆動される回転モーターである。べん毛モーター1個には、最大11個程度の固定子と呼ばれるトルク発生単位が含まれると考えられているが、固定子1個がどれ位のトルクを発生するのか、またどのようにモーターに取り込まれてトルクを発生する状態になるのか、などは分かっていなかった。さらには、固定子に限らず、モーターを構成するタンパクがどのように、組み込まれてモーターが出来上がっていくのかについては研究が行われていたが、一端

形成されたモーターが、機能中にどのような構成的ダイナミクスを持つかは知られていなかった。

2. 研究の目的

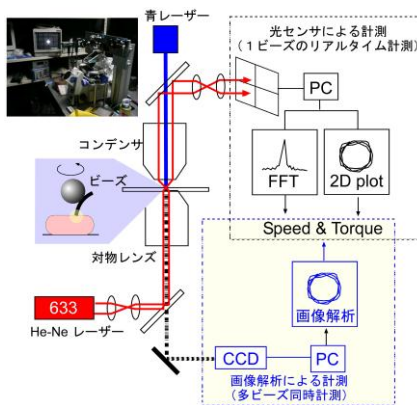
バクテリアべん毛モーターによる回転運動メカニズム解明を目指して、本研究では、モーター機能誕生の瞬間、すなわち固定子1個が取り込まれ、回転運動が始める過程を解析することを目的とする。具体的には

(1) 固定子タンパクの低濃度発現における回転トルクの計測

- (2) 新しい温度制御システムを用いた回転トルク応答の計測
- (3) GFP 融合タンパクを用いた固定子の細胞内イメージングなどを行う。

3. 研究の方法

べん毛モーターを発現させた大腸菌細胞をガラス上に結合させ、ビーズをプローブとして、回転運動を光学顕微鏡下で計測した。計測には4分割フォトダイオードによる1モーター計測（下図右上）と、高速カメラを用いた複数モーター計測（下図右下）のいずれかを用いた。



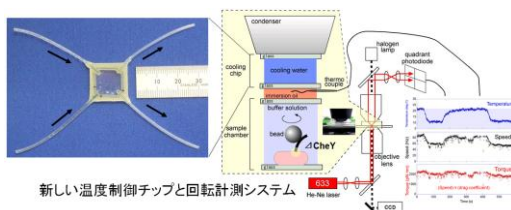
4. 研究成果

(1) 固定子1個による回転トルク計測

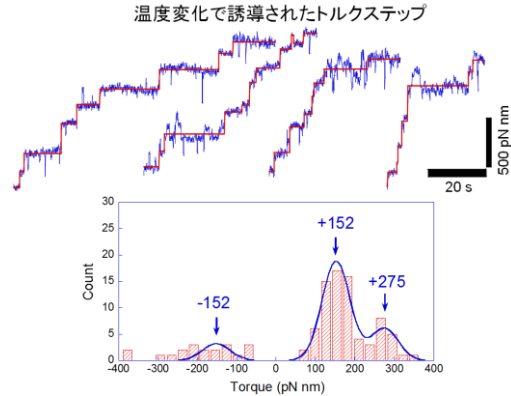
固定子タンパクの細胞内発現を、遺伝子工学的手法を用いて制御し、ゆっくりとモーターに取り込まれるようにすると、回転速度がステップ状に増加することが知られている。これを利用して、固定子数が1個、さらには次々と取り込まれる条件下におけるトルク計測を行った。直径 $1\mu\text{m}$ を用いた高負荷条件での計測では、トルクは、ステップ状に増加し、トルクステップは約 180 pN nm 、最大トルクは約 2000 pN nm であった (Inoue et al., 2008)。この結果は、1モーター中の固定子数の最大値が11個程度であることを示唆しており、既報とよく一致した。

(2) 新しい温度制御システムを用いて計測したトルクステップ

モータータンパク以外の1分子計測に汎用的に使用できる高性能、かつ簡単・安価な温度制御システムとして水流式温度制御チップを開発した (Matthew et al., 2011)。この温度制御チップを回転計測システムに組み込み、モーター1個の温度依存性を計測し、高負荷でのトルクは 40°C までほぼ一定となった (下図)。



ところが、 40°C 以上の高温にすると、トルクがステップ状に減少し、その後、室温に戻すとステップ状に回復することを発見した。このときの単位ステップは約 150 pN nm であった (下図)。これらの結果は、個々の固定子が回転機能中に結合解離する構成的ダイナミクスを示唆しており、細胞内の熱的応答とも関連すると考えられる。



(3) GFP 融合タンパクの細胞内観察

GFP 融合タンパクとして細胞内発現させた固定子タンパクを、全反射照明による蛍光観察を行った。観察された輝点の蛍光強度は、ステップ状変化を示したため、固定子の結合解離、または GFP 1分子の退色を反映していると考えられる。今後、温度制御下での定量化、さらには回転運動との同時計測を進めることで、モーターの構成的ダイナミクスに関する新発見が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

1. Shun Terasawa, Hajime Fukuoka, Yuichi Inoue, Takashi Sagawa, Hiroto Takahashi, and Akihiko Ishijima, Coordinated Reversal of Flagellar Motors on a Single Escherichia coli Cell, 査読有, Biophysical Journal, vol 100, p2193-2200, 2011.

2. Matthew A. B. Baker, Yuichi Inoue, Kuniaki Takeda, Akihiko Ishijima, Richard M. Berry, Two methods of temperature control for single-molecule measurements, 査読有, European Biophysics Journal, vol 40, p651-660, 2011.

3. Kou Okuro, Kazushi Kinbara, Kuniaki Takeda, Yuichi Inoue, Akihiko Ishijima, Takuzo Aida, Adhesion Effects of a Guanidinium Ion Appended Dendritic "Molecular Glue" on the ATP-Driven Sliding Motion of Actomyosin, 査読有, Angewandte Chemie, International Edition, vol

49, p3030-3033, 2010.

4. Hajime Fukuoka, Yuichi Inoue, Shun Terasawa, Hiroto Takahashi, Akihiko Ishijima, Exchange of rotor components in functioning bacterial flagellar motor, 査読有, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol 394, p130-135, 2010.

5. So-ichiro Nishiyama, Shinji Ohno, Noriko Ohta, Yuichi Inoue, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima, Ikuro Kawagishi, Thermosensing Function of the Escherichia coli Redox Sensor Aer, 査読有, Journal of Bacteriology, vol 192, p1740-1743, 2010.

6. Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka, Yuichi Inoue, Verification of Single-Molecule Imaging and Single-Molecule Measurements, 査読有, Journal of Robotics and Mechatronics, vol 22, p568-578, 2010.

7. Yuichi Inoue, Chien-Jung Lo, Hajime Fukuoka, Hiroto Takahashi, Yoshiyuki Sowa, Teuta Pilizota, George H. Wadhams, Michio Homma, Richard M. Berry, Akihiko Ishijima, Torque-Speed Relationships of Na⁺-driven Chimeric Flagellar Motors in Escherichia coli, 査読有, Journal of Molecular Biology, vol 376, p1251-1259, 2008.

〔学会発表〕(計 22 件)

学会発表

1. 井上 裕一、バクテリアべん毛モーター運動の光制御, FIRST 川合プロジェクト 2010 年度末報告会, 2011 年 2 月 18 日, 東京

2. Yuichi Inoue, Torque steps of the bacterial flagellar motor induced by temperature control. International Symposium: Advanced Science and Technology for Single Molecular Analysis of DNA and Related Molecules, 2011 年 1 月 25 日、京都

3. Yuichi Inoue, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima, Torque steps of the bacterial flagellar motor induced by heating. BLAST XI meeting (Bacterial Locomotion and Signal Transduction, 2011 年 1 月 21 日, USA, New Orleans

4. 井上裕一, 福岡 創, 石島秋彦, 生体分子モ

ーター活性の局所的熱変調, 第 36 回日本生体エネルギー研究会・特定領域研究「革新的ナノバイオ」合同シンポジウム, 2010 年 11 月 18 日, 吹田市

5. Yuichi Inoue, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima, Analysis of torque steps of the bacterial flagellar motor induced by heating. 第 48 回日本生物物理学会年会, 2010 年 9 月 22 日, 仙台市

6. 井上裕一, 生物物理にとっての高速カメラ革新, 第 48 回日本生物物理学会年会ランチョンセミナー, 2010 年 9 月 20 日, 仙台市

7. 井上裕一, 福岡創, 石島秋彦, バクテリアべん毛モーターの温度応答解析と局所的熱変調, 特定領域研究「膜超分子モーターの革新的ナノサイエンス」第 5 回班会議, 2010 年 6 月 24 日, 東京

8. Yuichi Inoue, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima, Torque steps in the temperature response of the chimeric bacterial flagellar motor. International Symposium of Joint Research Network on Advanced Materials and Devices 「彫」, 2010 年 3 月 25 日, 苫小牧市

9. 井上裕一, キメラべん毛モーターの温度応答トルクステップ解析, べん毛研究交流会, 2010 年 3 月 16 日, 愛知県蒲郡市

10. Yuichi Inoue, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima, Torque response of bacterial flagellar motor induced by transient heating, 生物物理学会 第 47 回年会, 2009 年 11 月 1 日, 徳島市

11. Yuichi Inoue, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima, Torque response of bacterial flagellar motor induced by reversible temperature change, Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins Working in Biomembranes, 2009 年 9 月 8 日, 京都市

12. Yuichi Inoue, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima, Torque response of bacterial flagellar motor induced by reversible temperature change, International Symposium of post-silicon materials and devices research alliance project, 2009 年 9 月 5 日、吹田市

13. 井上裕一, 福岡創, 石島秋彦, 生体モーター運動活性の局所的熱変調, 特定領域研究

膜超分子モーターの革新的ナノサイエンス
第4回班会議, 2009年6月19日, 沖縄県名
護市

14. Yuichi Inoue, Kuniaki Takeda, Hajime Fukuoka, Hiroto Takahashi, Akihiko Ishijima, Torque response of the Na⁺-driven chimeric flagellar motor in E. coli induced by reversible temperature change, 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 第7回公開シンポジウム, 2009年3月6日, 仙台市

15. Akihiko Ishijima, Yuichi Inoue, Hajime Fukuoka, Temperature-dependence of torque generation of the Na⁺-driven chimeric flagellar motor and visualization of the stator proteins in E. coli, Biophysical Society 53rd Annual Meeting, 2009年3月4日, U.S.A., Boston

16. Yuichi Inoue, Kuniaki Takeda, Hajime Fukuoka, Hiroto Takahashi, Akihiko Ishijima, Torque response of the sodium-driven chimeric flagellar motor in E. coli induced by reversible temperature change, BLAST X (Bacterial Locomotion and Signal Transduction X), 2009年1月18日, Cuernavaca, Mexico.

17. 井上裕一, 武田訓昌, 福岡創, 高橋泰人, 石島秋彦, 温度変化によるキメラペン毛モーターの回転トルク応答, 2009年 生体運動研究合同班会議, 2009年1月11日, 東京

18. 井上裕一, 武田訓昌, 福岡創, 高橋泰人, 石島秋彦, ナトリウム駆動型キメラペン毛モーターの温度依存性, 「ポストシリコン物質・デバイス創製基盤技術アライアンス」平成20年度成果報告会, 2008年12月25日, 札幌市

19. Yuichi Inoue, Kuniaki Takeda, Hajime Fukuoka, Hiroto Takahashi, Akihiko Ishijima, Torque response of the Na⁺-driven chimeric flagellar motor in E. coli induced by reversible temperature change, 第46回日本生物物理学会年会, 2008年12月5日, 博多市

20. Yuichi Inoue, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima, Torque response of the Na⁺-driven chimeric motor induced by reversible temperature change, The Fourth Workshop of the UK-Japan Bionanotechnology Collaboration, 2008年9月17日, 神戸市

21. 井上裕一, ナトリウム駆動型キメラペン毛モーターの温度依存性, 生物物理学会・東北支部会シンポジウム, 2008年8月30日, 仙台市

22. 井上裕一, Chien-Jung Lo, 福岡創, 高橋泰人, 曾和義幸, 本間道夫, Richard M. Berry, 石島秋彦, ナトリウム駆動型キメラペン毛モーター変異体の運動性, 第5回 東北大バイオサイエンスシンポジウム, 2008年5月19日, 仙台市

〔図書〕(計4件)

1. 石島秋彦, 井上裕一, 福岡創, 丸善社, 「現代界面コロイド科学の辞典, GFPの基本的原理とその発展系, p120-121, 2010,

2. 井上裕一, 福岡創, 石島秋彦, 生物物理, 「ナトリウム駆動型キメラペン毛モーターのトルク-スピード関係」. vol 49, p292-293, 2009.

3. 石島秋彦, 井上裕一, 福岡創, 田中裕人, エヌ・ティエス社, 「ナノイメージング」, 第5章, 2008.

4. 石島秋彦, 井上裕一, 福岡創, 田中裕人, 曾和義幸, 産業技術サービスセンター, 「実用 精密位置決め技術事典」 p639-645, 2008.

〔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

<http://www.tagen.tohoku.ac.jp/labo/ishijima/paper.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 裕一 (INOUE YUICHI)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号: 50323499

(2) 研究分担者

()

(3) 連携研究者

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

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