

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：63903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02454

研究課題名(和文)バクテリアべん毛モーター固定子複合体の「回転モデル」を1分子計測で実証する

研究課題名(英文)Verification of "rotation model" of bacterial flagellar rotor with single-molecule analysis

研究代表者

飯野 亮太 (IINO, Ryota)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・教授

研究者番号：70403003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：バクテリアのべん毛モーターの固定子PomAB複合体の「回転モデル」を実証することを目的とし、光学顕微鏡を用いた1分子計測に適用可能なガラス基板固定タグ、金ナノ粒子プローブ結合タグを持つ変異体の作製を達成した。さらに、PomBのプラグ領域にシステイン変異を導入することで、PomAB複合体によるNaイオン輸送の低分子化合物による可逆的な活性化を達成した。本研究成果は、バクテリアのべん毛を固定子複合体が回転させて推進力を発生する仕組みの理解に向けた重要な一歩と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

べん毛モーター固定子複合体の構造から提案された「回転モデル」がもし正しい場合、マクロな人工機械で汎用されているトルク増大機構である「減速機」をナノサイズの回転分子モーターも持っていることになり、べん毛モーターが非常に大きなトルクを発生できる仕組みが明らかとなる。また、スケールが大きく異なるナノモーター、マクロモーターが持つ仕組みの共通性や独自性を明らかにすることで、これまでない人工モーターの創製が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：With the aim of verifying a "rotational model" of the stator PomAB complex of the bacterial flagellar motor, we have achieved the generation of mutants with glass substrate-anchoring and gold nanoparticle probe-binding tags that are applicable to single-molecule measurement under an optical microscope. Furthermore, by introducing a cysteine mutation in the plug region of PomB, reversible activation of Na ion transport by the PomAB complex was achieved by a low molecular weight compound. We believe that these results are an important step toward understanding how the stator complex rotates the bacterial flagellum to generate propulsive force.

研究分野：生物物理学

キーワード：1分子計測 分子モーター

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バクテリアのべん毛モーターは自然界で最初に発見された回転分子モーターである。回転を駆動するのは、脂質二重膜を介するイオンの電気化学ポテンシャルであり、固定子をイオンが通過する際に発生する回転力で回転子リングに繋がったべん毛が回転し、バクテリアは生育に適した環境を求めて遊泳する。べん毛モーターの固定子は、プロトン駆動型では MotA と MotB、Na イオン駆動型では PomA と PomB の複合体 (MotAB, PomAB) で構成される。MotAB (PomAB) 固定子複合体が回転力を発生する機構には、イオン透過に伴い複合体の構造が大きく変化する「構造変化モデル」と、MotA (PomA) が MotB (PomB) に対して回転する「回転モデル」の2つが提案されていた。構造が明らかになる前は構造変化モデルが優勢であったが、2020年に固定子複合体の構造がクライオ電子顕微鏡単粒子解析で解明されて以降 (図1)、回転モデルが優勢となっている。しかしながら、べん毛モーターの固定子複合体が本当に回転するかは実証されていなかった。

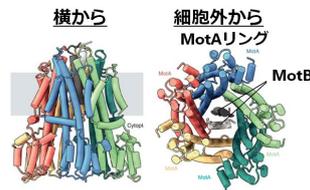


図1. MotAB 複合体の構造

2. 研究の目的

本課題は、光学顕微鏡1分子計測でバクテリアべん毛モーターの固定子複合体の「回転モデル」を実証することを目的とした。より具体的には、固定子複合体の回転運動を直接可視化し、回転方向、回転速度、回転の可逆性、回転ステップ等、その特性の詳細を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Na イオンを輸送するビブリオ菌由来の PomAB 複合体を試料として利用した。PomAB 複合体の1分子計測を推進する上で重要な3項目として以下を設定し、研究を遂行した。

(1) PomAB 複合体の機能を保持したまま基板固定タグ、プローブ結合タグを導入する
1分子計測用のタグとして、PomAB 複体にポリヒスチジンタグ、ビオチン標識用システイン残基、StrepTag を導入した。PomA、PomB のどこにタグを導入するか、PomA、PomB のどちらを基板に固定するか、報告された構造を参考に様々な変異体をデザインして試した。

(2) PomAB 複体の配向をできるだけ揃えて脂質二重膜に再構成する
界面活性剤で可溶化・精製した PomAB 変異体からバイオビーズを用いて界面活性剤の除去を行うことで、脂質膜小胞 (リポソーム) への再構成を試み、さらにリポソーム内に封入した蛍光指示薬による Na イオンの輸送計測を試みた。

(3) PomAB 複体を再構成した脂質二重膜に電気化学ポテンシャルを安定に形成させる
リポソーム内外の Na イオンの濃度差、および K イオンとバリノマイシンで生じる拡散電位による膜電位の印加を試みた。予備実験として、ATP 加水分解により Na イオンを能動輸送する回転型イオンポンプ V-ATPase を再構成したリポソームへの電気化学ポテンシャルの印加を試みた。

4. 研究成果

(1) PomAB 複合体の機能を保持したまま基板固定タグ、プローブ結合タグを導入する

ビブリオ属菌由来の Na イオン駆動型 PomAB を用い、完全な複合体の効率的な精製と1分子計測に必要なタグの導入の検討に取り組んだ。初めに、PomA の C 末に精製用 His₁₀ タグ、PomB の N 末付近の天然変性領域に金ナノ粒子プローブ結合用 Spy-tag を挿入したコンストラクトを試みたが、PomB の発現量が低く、PomAB 複合体の精製は困難であった。次に、PomA の C 末に His₁₀ タグのみを導入したコンストラクトで詳細に検討し、PomA に導入したタグで精製すると、PomB を含まない PomA のみのリングの混入が多くなることが判明した。そこで、PomB にも精製用タグを導入したコンストラクトを作製して検討を行った。その結果、PomA の C 末に His₁₀ タグ、PomB の C 末に StrepTagII を導入したコンストラクトで StrepTagII を用いて精製を行うことで、PomA と PomB の化学量論比の大幅な改善を達成した。

また、1分子計測の予備実験として、精製 PomAB 複合体の His₁₀ タグによる Ni-NTA 修飾ガラス基板への特異的固定、および Streptactin コート金ナノ粒子の特異的結合の有無を検証した。その結果、PomAB 複

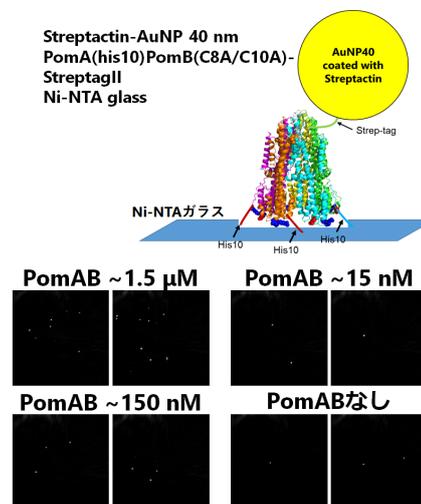


図2. 1分子計測用 PomAB 変異体のガラス基板および金ナノ粒子への特異的結合. PomAB を介してガラス基板に結合した金ナノ粒子をレーザー暗視野顕微鏡で観察.

合体の濃度依存的に、金ナノ粒子のガラス基板への結合数が増加することが確認された(図2)。他方、結合の絶対数はポジティブコントロールとして用いた His タグビオチン化 V-ATPase とストレプトアビジン修飾金ナノ粒子の系と比較し 1/10 程度であった。

そこで、研究協力者の錦野達郎博士(名古屋工業大学助教)が明らかにした PomAB 複合体の構造を参考に、精製用タグや金ナノ粒子プローブ導入位置のさらなる検討を行った。特に、Ni-NTA 修飾ガラス基板への結合数を増加させるため、AlphaFold2 を用いてモデリングを行って His₁₀ タグの前に αヘリックスを形成するアミノ酸をさらに追加し、Ni-NTA 修飾ガラス基板への His₁₀ タグのアクセスを改善した。

また、PomAB は、ペプチドグリカンやべん毛の回転子リングに結合していない状態では、回転とイオン輸送が阻害されると考えられている。この阻害は、PomB のプラグ領域が PomA リングと相互作用することで回転を物理的に阻害することで起こり、活性化にはプラグ領域が PomA リングから解離する必要があると考えられている。よって、単離した PomAB の 1 分子回転計測においても、このプラグ領域を解離させる必要があると考えられた。そこで、プラグ領域に位置するイソロイシン残基にシステイン変異を導入し(I50C)、負電荷をもつ低分子化合物 2-[(methylsulfonyl)thio]-ethansulfonic acid (MTSES) と反応させることで強制的に解離させる系を構築した(図3)。

上記の系が機能することを確認するため、高濃度の NaCl を加えた培地での大腸菌の増殖を調べる実験を行った。その結果、野生型の PomAB を発現させた大腸菌の増殖は MTSES の添加で阻害されないのに対し、変異体では MTSES 処理により増殖が阻害されることが確認された。また、還元剤の DTT を加えることで増殖が回復することも確認された。これらの結果から、PomB の I50C 残基に MTSES が反応して PomB のプラグ領域が PomA から解離して回転運動が可能となり、細胞外から Na イオンが流入して細胞内 Na イオン濃度が増加に繋がり、細胞毒性により増殖が可逆的に阻害されたと結論した。

さらに、PomB は二次構造を取らない天然変性領域を持ち、構造が大きく揺らいでいると考えられている。天然変性領域の揺らぎは金ナノ粒子プローブを用いた 1 分子回転計測の障害となると予想される。そこで、天然変性領域を削った PomB Δ71-150 変異体を新たに作製した。精製した PomB Δ71-150 変異体の I50C 残基を蛍光色素 Cy3 マレイミドで標識して 1 分子蛍光観察を行い、PomA の C 末にリンカーを介して導入した His₁₀ タグと Ni-NTA 修飾したガラス基板の相互作用により、濃度依存的に特異的に結合することを確認した。また、上述したように、精製した PomAB 複合体の PomA と PomB の化学量論比の改善を目的として、PomB の C 末には StrepTagII が導入されている。そこで、金ナノ粒子の表面をストレプトタクチンで修飾することで、この StrepTagII に特異的に結合させることを試みた。しかしながら現時点では、明確な特異的結合は見られていない。現在、StrepTagII をタンデムに 2 つ繋いだ変異体を作製して改善を試みている。



図3. MTSES による PomAB 複合体の活性化、および蛍光性 Na イオン指示薬 Sodium Green による Na イオン輸送計測の模式図。

(2) PomAB 複合体の配向をできるだけ揃えて脂質二重膜に再構成する

精製した PomAB 複合体をバイオビーズを用いて脂質二重膜小胞(リポソーム)に再構成し、Na イオン輸送活性の測定を試みた。Na イオンの蛍光性指示薬である Soduim Green を PomAB 再構成リポソームに内包させ、外部溶液に Na イオンを加えることで蛍光強度の増加を蛍光分光光度計で計測した。しかしながらこれまでのところ、明確かつ有意な蛍光強度の増加が確認されていない。現在、PomAB 複合体のリポソームへの再構成法(凍結融解法、透析法等)や内包させる Soduim Green の濃度等、実験条件の改善を試みている。また、Na イオン輸送性回転型イオンポンプ V-ATPase もコントロール実験の試料として用い実験を継続している。

(3) PomAB 複合体を再構成した脂質二重膜に電気化学ポテンシャルを安定に形成させる

予備実験としてまず、Na イオン輸送性回転型イオンポンプ V-ATPase を再構成したリポソームへの電気化学ポテンシャルの印加を試みた。その結果、電気化学ポテンシャル依存的な ATP 合成を検出することに成功した。印加する電気化学ポテンシャルの増加により ATP 合成速度が増加することも明らかとなり、リポソームに電気化学ポテンシャルを安定かつ定量的に形成させることが可能であることが確認された。

本課題は、大友章裕博士(分子研助教)、小嶋誠司博士(名古屋大教授)、錦野達郎博士(名古屋工業大助教)、本間道夫博士(名古屋大名誉教授)、寺島浩行博士(長崎大助教)、内橋貴之博士(名古屋大教授)を共同研究者として緊密な連携の下で推進し、現在も継続中である。共同研究者の皆様にご心より感謝する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 David A. Leigh, 金原数, 飯野亮太	4. 巻 -
2. 論文標題 インタビュー：分子マシン研究をリードするDavid A. Leigh博士	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 現代化学	6. 最初と最後の頁 28-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 飯野亮太	4. 巻 -
2. 論文標題 はたらく分子マシン10：生体分子モーターの予想外の動きを観る	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 現代化学	6. 最初と最後の頁 19-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 14件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Ryota Iino
2. 発表標題 Single-molecule imaging and engineering of biological and synthetic molecular motors
3. 学会等名 CU-MU-IMS Faculty Exchange Meeting 2024（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 飯野亮太
2. 発表標題 生体発動分子の展望と課題
3. 学会等名 シンポジウム「発動分子科学の展望と課題」（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryota Iino
2. 発表標題 Autonomous unidirectional motions of biomolecular motors: the roles of structures and chemical fuels
3. 学会等名 Okazaki Workshop on Molecular Machines 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryota Iino
2. 発表標題 Single-molecule imaging and engineering of molecular motors
3. 学会等名 The symposium "The molecular organization of living systems" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryota Iino
2. 発表標題 Single-molecule imaging and engineering of molecular motors
3. 学会等名 61th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryota Iino
2. 発表標題 Single-molecule analysis and engineering of molecular motor proteins
3. 学会等名 The TSRC Workshop on Protein Dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryota Iino
2. 発表標題 Single-molecule analysis and engineering of molecular motor proteins
3. 学会等名 Sendai 2022, An Update on Molecular Machines: Open Challenges and New Perspectives (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯野亮太
2. 発表標題 分子モーターの動きをみる、動きをつくる
3. 学会等名 第36回分子シミュレーション討論会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryota Iino
2. 発表標題 Single-molecule analysis and engineering of motor proteins
3. 学会等名 iNANO-IMS-ExCELLS Interdisciplinary Nanoscience Joint Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryota Iino
2. 発表標題 Engineering rotary and linear molecular motor proteins
3. 学会等名 The 3rd NINS-Princeton Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯野亮太
2. 発表標題 生体・人工ハイブリッド分子モーターの創出と特性解析
3. 学会等名 分子研研究会 「生体分子材料を探る：発動分子のさらなる理解と設計に向けて」（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯野亮太
2. 発表標題 バクテリアのべん毛モーターは減速機を持つか？
3. 学会等名 令和3年度日本生物物理学会中部支部講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯野亮太
2. 発表標題 話題提供：生命科学の立場から
3. 学会等名 アト秒レーザー科学研究施設（ALFA）計画の現状と展望（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯野亮太
2. 発表標題 生体分子モーターを観る、壊す、創る
3. 学会等名 新学術「生命金属科学」領域会議（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryota Iino
2. 発表標題 Watching dynamic motions of natural and engineered molecular motor proteins
3. 学会等名 Seminar on single-molecule biophysics, the School of Pharmacy, Huazhong University of Science and Technology (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

分子科学研究所飯野グループ https://groups.ims.ac.jp/organization/iino_g/index.html
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------