

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06073

研究課題名（和文）べん毛モーターにおけるイオン流から回転力へのエネルギー変換メカニズムの解明

研究課題名（英文）Energy conversion from ion motive force to torque in the flagellar motor

研究代表者

寺原 直矢（Terahara, Naoya）

中央大学・理工学部・助教

研究者番号：40554738

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：細菌べん毛モーターは、 H^+ または Na^+ の細胞内外の濃度差および膜電位によって決定される電気化学ポテンシャルを回転力に変換する。モーターは固定子と回転子から構成され、固定子内部にイオンが流れることでこれらの中で相互作用が生じ、回転力を発生する。その回転はステップ状に変位しており、固定子と回転子の相互作用素過程がステップとして反映されていると考えられる。そこで、生理条件下でゆっくり回るモーターの回転ステップを様々な条件下で解析し、イオンの流れと力の発生の関係性を調べた。その結果、イオン濃度差および膜電位、それぞれ個々の成分がモーターに与える影響に違いが見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

固定子がどのようにイオンの流れを回転力に変換しているのか不明である。本研究は、生理条件下で「イオンの流れをトルクに変換する」一連の反応サイクルが遅い固定子によって駆動するモーターの入出力を解析することで、べん毛モーターのエネルギー変換メカニズムを明らかにする手がかりとなる。さらに、これらの情報はべん毛モーター研究だけでなく、生物分子モーターの動作原理の解明の一端を担う重要な研究課題として位置づけられる。そして、それらの知見は人工的な分子マシンを構築する際に多くの知見をもたらすと期待される。

研究成果の概要（英文）：Bacterial flagellar motors convert the electrochemical potential formed by the intracellular and extracellular concentration differences of protons or sodium ions and the membrane potential into the torque. The motor consists of a stator and a rotor, and the ion-influx through the channels of the stator complex causes an interaction between them, generating the torque. A stepwise displacement is detected in the motor rotating, which is thought to reflect the interaction processing between the stator and the rotor. Therefore, we analyzed the steps of a slowly rotating motor under physiological conditions to investigate the relationship between the ion flow and the torque generation. As a result, differences in the effects of ion concentration differences and membrane potential on the motor were observed.

研究分野：生物物理

キーワード：生体分子モーター 一分子計測 イオンチャネル

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌は、べん毛と呼ばれる細胞外に伸びたらせん状のフィラメントを回転させることで様々な環境を移動することができる。べん毛の根元には基部体と呼ばれる回転モーターが存在し、回転子と固定子から構成される(図1)。特に固定子は、陽イオンチャンネルとして機能する膜タンパク質である。細胞膜を隔てて形成される陽イオンの電気化学的ポテンシャル勾配に沿って陽イオンが固定子のイオンチャンネルを流れることで、固定子と回転子の間で相互作用が生じ、回転力が発生すると考えられている。固定子は利用する共役イオンに基づいて分類されており、大腸菌などの多くの細菌のべん毛モーターは、MotAB 複合体が H^+ を共役イオンとして利用する固定子として働く。また、 H^+ 駆動力を効率よく利用することができない高アルカリ性環境を好んで生育する好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌や、比較的 Na^+ が豊富に存在する海洋環境に生育する海洋性 *Vibrio* 属細菌のべん毛モーターでは、それぞれ MotPS や PomAB と呼ばれる Na^+ を共役イオンとして利用する固定子が回転力を発生させる。一方、回転子は FliG、FliM、FliN の3つのタンパク質から構成されており、特に FliG は C 末端側領域に高度に保存された多数の荷電アミノ酸残基を有する。これらの残基と相互作用する固定子の領域は MotA サブユニットの細胞質側にある大きな親水性領域で、FliG の C 末端側領域と同様、多くの荷電アミノ酸残基が高度に保存されている。これら FliG - MotA 間の荷電アミノ酸残基を介した静電的相互作用によって、イオンの流れと共役してトルクを発生させると考えられている。しかし、1つのモーターに対して固定子が10個前後組み込まれることやモーターに組み込まれている固定子と細胞膜中にプールされている固定子がおよそ2~3秒毎に1個の固定子が入れ替わることなどから、イオンの流れがどのように回転力に変換されているのかが明らかになっていない。

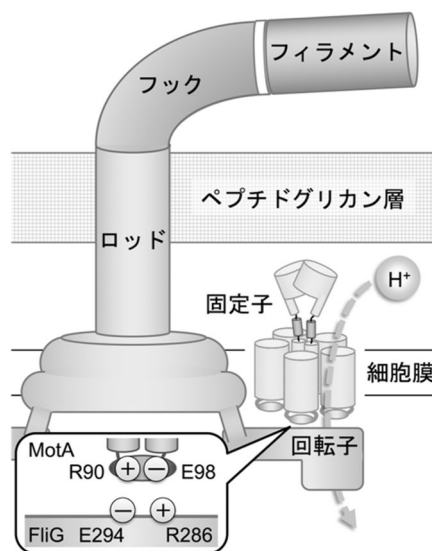


図1. べん毛モーターの模式図

2. 研究の目的

べん毛モーターの回転力は、MotA - FliG 間の荷電アミノ酸残基を介した静電的相互作用によって生み出されている。しかし、回転速度が速いこと、1つのモーターに対して複数の固定子が組み込まれることから解析が困難である。そのため、どのようにイオンの流れを回転力に変換しているのかが不明である。そこで本研究では、申請者が発見した「生理条件下でゆっくり回る」枯草菌べん毛モーターのステップ解析を行った。これまで、このような表現型を有する菌株は人工的に作られた変異株のみで、野生型のモーターでは全く見つかってない。さらに、この「ゆっくり回る」性質によって、回転力を発生させる一連の素早い反応を「スローモーション」にして捉えることができると期待され、モーターに流れる共役イオンが回転力に変換されるメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

べん毛モーターが生み出すトルクは、ビーズアッセイ法によって解析した。ビーズアッセイ法は、スライドガラス上に接着させた菌体の1本のべん毛フィラメントにポリスチレンビーズで標識し、べん毛の回転をビーズの回転軌道として計測する方法である(図2)。高速回転しているビーズの位相差像から重心位置を求め、ビーズの重心位置を示すXY座標とビーズの回転速度を求めた。さらに、得られたXY座標を回転楕円補正することで回転半径を求めた。これらの計測結果および測定時の溶液の粘度から発生トルクを算出した。このビーズアッセイ法は、これまで大腸菌やサルモネラ菌などのグラム陰性細菌のモーターに対して確立された系であったが、申請者は枯草菌で代表されるグラム陽性細菌のモーターの測定を可能とする系を構築し、そのモーターの出力特性について報告した。モーターで発生した力は、ロッド、フックを経由してフィラメントへと伝達されるが、フィラメントおよびフックは曲げに対して非常に柔軟な構造をしているため、回転ステップの精度を落とす要因と考えられた。そこで、モーターにより近いロッドが長く伸びた変異株を作製し、そのロッドにビーズを接着させて計測する系を構築した。

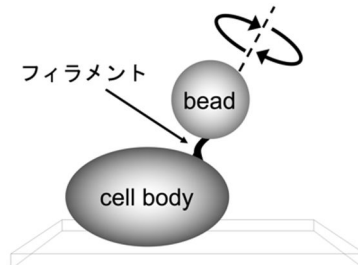


図2. ビーズアッセイ法によるべん毛モーターの1分子回転計測

べん毛モーターは連続的に回転しているように見えるが、1回転あたり26回のステップ状変位が観測されている。しかし、回転速度が非常に速い上、10分子程度の固定子が同時にモーターに組み込まれているため、固定子1個が寄与するエネルギー変換の素過程を捉えるのが大変困難である。そこで本研究では、生理条件下で1~3分子しか組み込まれない枯草菌由来のNa⁺駆動型固定子MotPSを利用し、ビーズアッセイ法により回転計測を行うことでモーターの回転ステップ数を明らかにするとともに、Na⁺の濃度変化すなわちエネルギー入力変化に伴うステップの変化を詳細に解析した。MotPSを利用することの利点としては、共役イオンとしてNa⁺が制御しやすいというエネルギー入力の操作が非常に簡便であること、回転速度が遅いため観察時の高時間分解能を要求しないことが挙げられる。本実験では、エネルギー入力であるNa⁺駆動力を変化させることで、ステップの動作と停止がどのように変化するかを詳細に解析し、入力の变化が出力にどのように影響するかを明らかにすることを目標とした。さらに、モーターにかかる負荷によって、固定子-回転子の相互作用様式が変化すると考えられている。そこで、ビーズの大きさを変えることでモーターにかかる負荷を変化させ、高負荷および低負荷条件下で動作と停止がどのように変化するかを詳細に解析した。以上の測定結果から、べん毛モーターのステップ特性を明らかにすることが目標である。さらに、モーターの出力を計測するとともにエネルギー入力、すなわちNa⁺駆動力を解析するため、膜電位および細胞内Na⁺濃度を調べた。膜電位は膜電位感受性色素TMRMで染めた細胞を、細胞内Na⁺濃度はNa⁺指示薬であるCoroNaGreenで染めた細胞をそれぞれ全反射照明蛍光顕微鏡によって観察し、その蛍光強度から算出した。これらの測定結果から、各測定条件下におけるエネルギー状態を調べ、モーターのエネルギー入力を明らかにすることを旨とした。

4. 研究成果

これまで申請者のグループでは、枯草菌においてMotPSを大量に発現させても1~3分子しかモーターに組み込まれないことを明らかにした。Na⁺駆動型固定子は通常、外環境のNa⁺濃度が増加するにつれて固定子がモーターに集合し、組み込まれると考えられている。そこで、MotPSについても同様な特徴が見られるのか、回転計測時のNa⁺濃度を変化させ、回転速度の変化を調べた。その結果、0から5mMとNa⁺をわずかに添加すると10Hz程度の回転が観察されたが、それ以上Na⁺濃度を増加させても速度はほとんど変化しなかった。この速度はいくつかのモーターの平均速度で評価したものであるため、次にモーター1つ1つの回転速度に注目し、その速度分布を調べた。そのヒストグラムから、いくつかのピークを含むことが分かった(図3)。Na⁺濃度が5mMの場合、およそ6Hzと12Hzでメインピークを持つが、Na⁺濃度が増加するにつれて新たに18Hz前後のピークが見られた。これらの結果は、以前申請者のグループが報告した固定子の発現誘導によるモーターの回転実験による結果と一致した。このことから、これらのピークはモーターに組み込まれた固定子の数を反映していると強く示唆される。

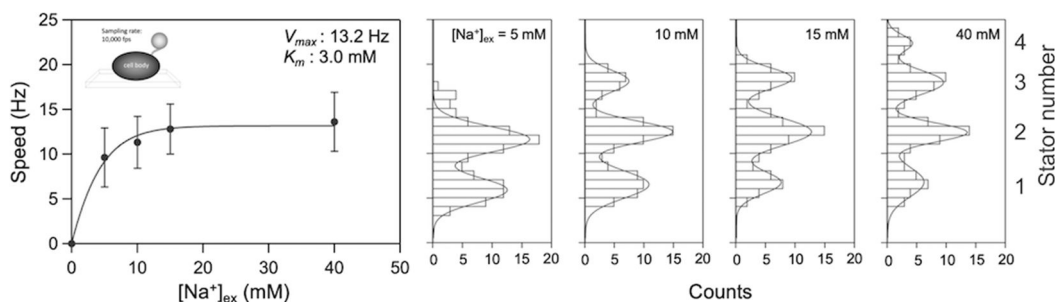


図3. Na⁺イオンと回転速度の関係

1分子の固定子が組み込まれたモーターに関して、今回構築した回転計測系において観察した結果、先行研究で報告された大腸菌やサルモネラ菌と同様に、枯草菌のべん毛モーターの回転も動作と停止を繰り返すステップ変位として観察することができた(図4)。そこで、Na⁺駆動力を変化させることで、ステップ変位がどのように変化するか調べた。Na⁺駆動力は細胞内外のNa⁺濃度差と膜電位から構成されるため、それぞれを単独で制御する必要がある。Na⁺濃度差はNa⁺指示薬であるCoroNaGreenで染めた細胞の蛍光強度から細胞内Na⁺濃度を、膜電位は膜電位感受性色素TMRMで染めた細胞の蛍光強度からそれぞれ測定した。これらの結果から、Na⁺濃度差は測定時のNa⁺濃度を変化させることで、膜電位は測定時のpHを変化させることで操作できることが分かった。そこで、それぞれの成分を操作し、ステップ解析を行った結果、モーターのステップ変位が前方に進むには、膜電位よりNa⁺濃度勾配が大きく寄与していることが分かった。今後さらに様々な条件下で計測し、べん毛モーターの回転メカニズムを提唱できるよう引き続き研究を続けていく。

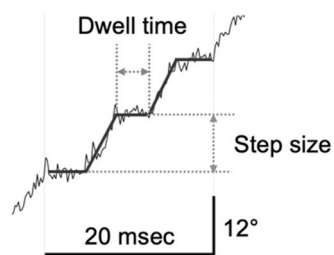


図4. べん毛回転のステップ解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 edited by Tohru Minamino, Makoto Miyata, and Keiichi Namba	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 402
3. 書名 Bacterial and Archaeal Motility	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------