

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32675

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840054

研究課題名(和文)細菌べん毛モーターの発生トルク制御機構の力学解析

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanisms in torque generation of the bacterial flagellar motor

研究代表者

曾和 義幸 (SOWA, Yoshiyuki)

法政大学・生命科学部・准教授

研究者番号：10519440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細菌べん毛モーターの出力制御について1分子機能解析をおこなった。自然界の大腸菌は水素イオン駆動型のべん毛モーターを持つが、我々は水素イオンとナトリウムイオンの両方を同時に利用できるハイブリッドエネルギー型を作り出すことに成功した。また、このモーターは外環境に応じてモーター素子を入れ替えることで、自動的に出力を制御していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to reveal regulatory mechanisms in torque generation of the bacterial flagellar motor at single molecule level. We have demonstrated that a genetically engineered hybrid-fuel flagellar motor in *Escherichia coli* that runs on both types of ion gradient, protons and sodium ions, although natural *E. coli* cells have only proton-driven one. We also found that the hybrid motors regulate the generated torque automatically and dynamically in response to external conditions, by swapping the motor components.

研究分野：生物物理学

キーワード：細菌べん毛モーター

1. 研究開始当初の背景

(1) 細菌べん毛モーター

細菌べん毛モーターは、直径約 50 nm の超分子回転ナノマシンである。モーターは細胞構造物であるらせん状のべん毛フィラメントをスクリューのように回転させて細菌遊泳の原動力を生み出す。膜に結合した固定子 (Mot 複合体) と回転子 (FliG/MN リング) が相互作用して、細胞膜を介したイオンの流れを回転トルクへとエネルギー変換する。

(2) モーター回転方向の制御

モーターは時計回り・反時計回りと両方向に回転することができ、細胞の走化性応答に重要な役割を果たす。情報伝達タンパク質 CheY がリン酸化された CheY-P のモーター回転子への結合によって回転方向が制御される。この回転制御システムは従来から知られており、細胞内の CheY-P 濃度と回転方向の相関を計測するなど、分子レベルでの解析が行われてきた。

(3) モーター出力制御の解析

モーターの発生トルク・回転速度については、入力エネルギーであるイオン駆動力との相関は詳細な研究が行われてきたものの、他の制御因子による出力制御についての研究はあまり進んでいない。近年、外環境の栄養分減少にともなう細胞内 c-di-GMP 濃度上昇によって、YcgR がモーターのトルク発生部位へ結合して回転速度を低下させることや、生理学的意義は不明であるが DNA 結合タンパク H-NS がモーター回転子に直接結合して回転速度を上昇させることが報告されている。

2. 研究の目的

モーターの回転機構を明らかにするために、回転速度・発生トルクの計測をおこなってきた。しかし、従来の回転計測結果に対しては、本来考慮されるべき制御因子のモーターへの影響については議論できていない。つまり、制御因子による出力変調の定量化は、回転機構を考察するうえで重要な情報となると期待される。また、制御因子による変調を含め、モーターを人為的に制御できれば、将来重要な研究ツールとなるであろう。

そこで本研究では、モーターの出力制御を中心に 1 分子機能計測をおこない、モーター回転制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、モーター制御機構を 1 分子レベルで明らかにするために、テザードセルアッセイおよびビーズアッセイを利用して回転速度の計測をおこなった。また、大きく分けて 3 つのアプローチによって出力制御方法を模索した。

(1) 固定子操作による出力制御

特性の異なる固定子複合体がモーターに組み込まれた時、モーターはどのような振

舞いをするのか調べた。大腸菌が本来持つ固定子複合体はプロトン流を利用する MotA/MotB である。ここに、ナトリウムイオン流を利用するキメラ固定子複合体 PomA/PotB を同時に相互作用させ、その回転速度を計測した。

(2) 回転子操作による出力制御

FliG はモータートルク発生および回転方向制御に中心的な役割を果たす。FliG の 3 アミノ酸欠損変異体 (FliG( $\Delta$ PAA)) は、モーター回転方向が時計回りにロックされることが知られている。そこで、FliG と FliG( $\Delta$ PAA) を同時にモーターに組み込むことで、トルク発生および回転方向に与える影響を調べた。

(3) 速度制御因子による出力制御

遺伝子発現を調節する DNA 結合タンパク H-NS はモーター回転子 FliG に結合して、モーター構造を安定化して、モーター速度の上昇をもたらすと他のグループから近年報告された。そこでこの結果を元に、様々な H-NS 変異体を作成し、それらの発現量を制御して、モーター速度を計測することにした。

4. 研究成果

研究方法で示したそれぞれのアプローチについて成果を記載する。

(1) 固定子操作による出力制御

自然界の大腸菌が持つ固定子はプロトンを透過させる MotA/MotB 複合体である。過去にナトリウムイオンを透過させる遺伝子改変型キメラ固定子 PomA/PotB が報告されている。今回、これらを同時にモーターに組み込み、その速度制御機構を解析した。その結果、モーターは 2 種類のイオンを同時に利用したハイブリッドエネルギー型モーターとして、高速回転することが明らかとなった。また、外環境のイオン強度に応じて、モーター固定子数を柔軟に変化させて出力制御していることが明らかとなった。

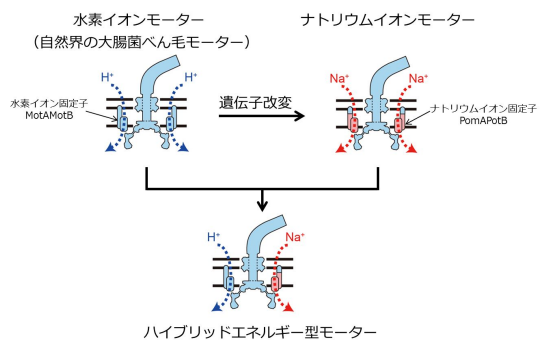


図 1. ハイブリッドエネルギー型モーター

(2) 回転子操作による出力制御

FliG と FliG( $\Delta$ PAA) を同時に回転子に組み込み、その比率を確率的ではあるが制御できる系を確立した。モデルによるシミュレーションで FliG( $\Delta$ PAA) の比率が高くなるにしたがって、回転方向が制御されると同時に速度の低下が予測されることを報告した。1 モーター機能解析でもシミュレーション結果を

定性的ではあるが支持するような結果を得られつつある。

(3) 速度制御因子による出力制御

研究協力者とともに、H-NS 変異体シリーズを作製し、FliG との相互作用及びモーター機能への影響を詳細に調べた。しかし、H-NS が直接的に FliG と相互作用してモーター速度制御をしている実験結果は得られず、他の研究グループと異なる結果が得られた。その後、H-NS と FliG の相互作用を報告した研究グループから、H-NS の FliG への相互作用を否定する、つまり我々が今回得た結果と一致する内容が発表された。

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 4 件)

Ma, Q., Sowa, Y., Baker, M. A. & Bai, F. Bacterial Flagellar Motor Switch in Response to CheY-P Regulation and Motor Structural Alterations. *Biophys. J.* 110, 1411-1420 (2016) 査読有 doi: 10.1016/j.bpj.2016.02.023

Tominaga, M., Kawai-Noma, S., Kawagishi, I., Sowa, Y., Saito, K. & Umeno D. Liquid-based iterative recombineering method tolerant to counter-selection escapes. *PLoS One* 10, e0119818 (2015) 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0119818

Sowa, Y., Homma, M., Ishijima, A. & Berry, R. M. Hybrid-fuel bacterial flagellar motors in *Escherichia coli*. *PNAS* 111, 3436-41 (2014) 査読有 doi: 10.1073/pnas.1317741111

Bai, F., Che, Y-S., Kami-ike, N., Ma, Q., Minamino, T., Sowa, Y. & Namba, K. Populational Heterogeneity vs. Temporal Fluctuation in *Escherichia coli* Flagellar Motor Switching. *Biophys. J.* 105, 2123-2129 (2013) 査読有 doi: 10.1016/j.bpj.2013.09.043

〔学会発表〕(計 11 件)

曾和 義幸. 細菌べん毛モーターの顕微解析, 日本顕微鏡学会-微生物の超微形態解析研究部会主催 2015 年研究会, 帝京平成大学池袋キャンパス(東京都・豊島区), 2015 年 11 月 20 日

曾和 義幸, Dynamics of the nano-rotary motor of bacterial flagella, 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢大学(石川県・金沢市), 2015 年 9 月 13 日

荒居 謙太, 高橋 優嘉, 伊藤 政博, 曾和 義幸, 2 種類のイオンで駆動するべん毛モーターのエネルギー変換機構の解析, 第 12 回 21 世紀大腸菌研究会, 琵琶湖グランドホテル・京近江(滋賀県・大津市), 2015 年 6 月 4 日~5 日

曾和 義幸. 細菌べん毛モーターの 1 分子機能解析. 日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会, 国立京都国際会館(京都府・京都市), 2015 年 5 月 15 日

梅村 徹, 小林 真弓, 原 千穂, 曾和 義幸, 川岸 郁朗. Control of the bacterial flagellar motor by cross regulation between non-cognate two-component regulatory systems, 第 52 回生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市), 2014 年 9 月 27 日

曾和 義幸, 蔡 栄叔. Visualization of functional components of the bacterial flagellar motor, 第 52 回生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市), 2014 年 9 月 27 日

西山 雅祥, 曾和 義幸. 高圧力下で見られるべん毛繊維の動的多型性. 第 51 回生物物理学会年会, 京都国際会館(京都府・京都市), 2013 年 10 月 30 日

曾和 義幸, 蔡 栄叔. Tracking of bacterial flagellar motor rotation by fluorescent microscopy. 第 51 回生物物理学会年会, 京都国際会館(京都府・京都市), 2013 年 10 月 29 日

蔡 栄叔, 曾和 義幸. タンデム PomA 変異体を固定子とする Na<sup>+</sup>駆動型キメラべん毛モーターの回転計測. 第 51 回生物物理学会年会, 京都国際会館(京都府・京都市), 2013 年 10 月 29 日

田中 裕人, 松川 忠司, 富成 征弘, 小川 修平, 曾和 義幸, 川岸 郁朗, 田中 秀吉, 大岩 和弘, 小嶋 寛明. ビデオ解析による大腸菌回転特性の大量測定. 第 51 回生物物理学会年会, 京都国際会館(京都府・京都市), 2013 年 10 月 29 日

梅村 徹, 小林 真弓, 原 千穂, 曾和 義幸, 川岸 郁朗. シグナル伝達分子間のクロストークを使った鞭毛の回転方向制御. 第 51 回生物物理学会年会, 京都国際会館(京都府・京都市), 2013 年 10 月 28 日

〔図書〕(計 3 件)

曾和 義幸. バクテリアべん毛モーター. 1 分子生物学, 原田慶恵・石渡信一編, 化学同人, 総ページ数 292, 75-86 (2014)

曾和 義幸. エネルギーを使い分けるハイブリッド型べん毛モーター - 環境に適応するナノマシンの実現に向けて. 化学 69(9), 化学同人, 総ページ数 80, 37-40 (2014)

西山 雅祥, 曾和 義幸. 細胞内の水で生命活動を操る! - 高圧力下で観るタンパク質水和変調イメージング. 化学 68(9), 化学同人, 総ページ数 80, 33-38 (2013)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

該当なし

○取得状況（計 0件）  
該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://sowalab.ws.hosei.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

曾和 義幸 (SOWA, Yoshiyuki)

法政大学・生命科学部・准教授

研究者番号：10519440

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

該当なし

### (4)研究協力者

川岸 郁朗 (KAWAGISHI, Ikuro)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：80234037

山本 兼由 (YAMAMOTO, Kaneyoshi)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：40351580