

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840035

研究課題名(和文) ハイブリッド型バクテリアべん毛モーターの環境変化感知と回転力発生の分子基盤

研究課題名(英文) Torque-speed relationship of the flagellar motor driven by two distinct coupled ions

研究代表者

寺原 直矢 (TERAHARA, Naoya)

大阪大学・生命機能研究科・招聘研究員

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)：モデル微生物である枯草菌は、プロトン駆動型MotABとナトリウムイオン駆動型MotPSの異なる2種類の固定子を持つ。本研究では、性能の異なる2種類の固定子がどのように外環境の変化に反応してべん毛モーターに組み込まれ、駆動力を発生するのかを明らかにすることを目的とした。極小のビーズを用いたナノ顕微計測法による1分子回転計測を行った結果、枯草菌のべん毛モーターは外環境にナトリウムイオンが存在しないときはMotABのみが組み込まれたモーターであるのに対し、ナトリウムイオンが存在するとMotPSが組み込まれ、MotABとMotPSの両方が同一のモーターに共存することがトルク特性から明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The rotational energy of flagellar motor is mediated by inward ion flux through the channel of the stator complexes. *Bacillus subtilis* has not only H⁺-channel MotAB but also Na⁺-channel MotPS as the stator. It is unknown that how the torque is generated by two distinct stators. Here, we measured the rotation speed of single motor by attaching the bead to flagellar filament under various conditions to see whether these two stators actually work together in a motor. In wild-type motors co-expressing MotAB and MotPS, the torque-speed curve was very similar to that of MotAB motors under Na⁺-free condition. However, the maximum speed was decreased with an increase in Na⁺ concentration, while the zero-speed torque was almost constant value. These observations indicate that functional incorporation of MotPS into the motor depend on the Na⁺ causes the speed reduction under low-load condition, but MotPS is capable of coordinately generating the torque with MotAB under high-load condition.

研究分野：生物物理

キーワード：生体分子モーター 1分子計測

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中を移動できる。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、大まかに回転子と固定子から構成される。特に固定子は、陽イオンチャ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ネルを流れると、固定子と回転子が相互作用して回転力(トルク)が発生すると考えられている。大腸菌などの多くの細菌のべん毛モーターは、 H^+ を共役イオンとして利用する固定子 MotAB によって駆動するのに対し、 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トルクを発生させる。さらに我々は、比較的 K^+ が豊富に存在する環境から単離された微生物が持つ固定子は、 Na^+ だけでなく K^+ も共役イオンとして利用できることを明らかにした。このように、細菌のべん毛モーターは生育環境に応じて利用しやすい共役イオンをエネルギー源にするように進化してきたと考えられる。

興味深いことに、モデル微生物として知られている枯草菌は H^+ を共役イオンとする MotAB と Na^+ を共役イオンとする MotPS の性能の異なる 2 種類の固定子を持つ。複数の固定子を持つ細菌はいくつか報告されているが、どれも固定子の数に対応して複数の回転子およびべん毛構成タンパク質も併せ持つ。例えば、*Vibrio* 属細菌は極べん毛と側べん毛の 2 種類のべん毛を持ち、極べん毛は Na^+ 駆動型 PomAB が、側べん毛は H^+ 駆動型 MotAB が機能する。つまり、1 種類のモーターに機能する固定子は 1 種類と決まっている。しかし、枯草菌は他の細菌とは異なり、回転子およびべん毛構成タンパク質は 1 種類しか持っていない。すなわち、1 種類のモーターに対して 2 種類の固定子が機能することになる。これまで我々は、枯草菌の菌体内で MotAB および MotPS の 2 種類の固定子が常時発現し、両者ともが運動に寄与することを示した。しかし、個々の固定子がどのように外環境の変化に応答してべん毛モーターに組み込まれ、回転力を発生しているのかは明らかではなかった。さらに、単一モーター内で性能が異なる 2 種類の固定子が同時に働く場合、個々の固定子のトルク発生サイクル反応がどのような影響を受けるのかは不明であった。

2. 研究の目的

枯草菌は生育環境に適応するための戦略として、1 種類のべん毛に対して性能が異なる 2 種類の固定子を獲得し進化してきたと考

えられる。そこで本研究では、性能の異なる 2 種類の固定子が、どのように外環境の変化にตอบสนองしてべん毛モーターに組み込まれ、駆動力を発生するのかを明らかにすることを目的とした。さらに、 H^+ 駆動時と Na^+ 駆動時のそれぞれの場合でトルク発生に違いはあるのか、異なる 2 種類の固定子が協調し合っ(もしくは反発し合っ)トルクを生み出しているのか、エネルギー変換メカニズムの詳細な解析を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、ビーズアッセイ法と呼ばれる極小のビーズを用いたナノ顕微計測法による 1 分子回転計測を行った(図 1)。スライドガラス上に菌体を接着させ、1 本のべん毛フィラメントをビーズで標識し、べん毛の回転をビーズの回転軌跡として計測する方法である。高速回転しているビーズの位相差像を高速カメラで捉え、ビーズの重心位置の動きを検出した。得られた XY 座標から、回転半径および回転速度を求めた。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。この方法によって、MotAB および MotPS がそれぞれ発生するトルクを計測するとともに、これらの固定子が共存した場合のべん毛モーターの出力特性を詳細に解析した。

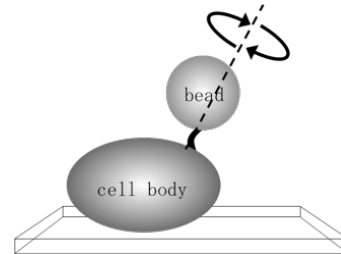


図 1. ビーズアッセイ法

次に、固定子の外環境に対する応答メカニズムを調べるために、MotAB および MotPS の特徴ある領域を交換した改変型 MotAB および MotPS を作製した(図 2)。MotR (もしくは MotA) タンパク質は、4 回膜貫通領域を持つ膜タンパク質で、2 番目と 3 番目の膜貫通領域の間に比較的大きな細胞質側ドメイン(loop)を持つ。このドメインは、モーターの回転子に相当する FliG タンパク質と静電的相互作用する領域であり、べん毛の回転と固定子のモーターへの組み込みに重要であると考えられている。一方、MotS (もしくは MotB) タンパク質は、1 回膜貫通領域を持つ膜タンパク質で、C 末端側のペリプラズム側領域にペプチドグリカン結合ドメイン(PG)を持つ。このドメインも固定子のモーターへの組み込みに重要であると考えられている。これらの領域を MotAB および MotPS 間で交換した改変型固定子を作製し、同様にビーズアッセイ法を行い、トルク特性の変化を調べることで、これらの領域がどのように固定子の組み込みとトルクの発生に関与しているのか解析を試みた。

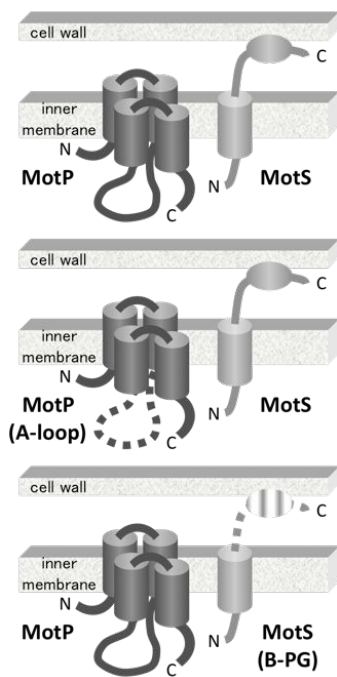


図 2. 改変型固定子の作製

4. 研究成果

まず、MotAB および MotPS のそれぞれの固定子が発生するトルクを見積もるために、それぞれの固定子のみを同一のプロモーターで発現させた株を用いて計測を行った。200 mM の Na^+ を含む条件では、MotAB 単独発現株の最大トルクおよび速度はそれぞれ約 2200 pN nm、200 Hz に対し、MotPS 単独発現株は約 200 pN nm、50 Hz とその性能に大きな差があった。最大トルクは固定子の数に大きく依存し、最大速度は固定子チャンネル内を移動するイオンの透過速度に大きく依存することから、MotPS は MotAB に比べ、モーターに組み込まれる数が少なく、イオンチャンネル活性が低いことが推察された。これを検証するためには、固定子 1 個あたりが出力するトルクを明らかにする必要がある。そこで、IPTG による発現誘導が可能なプロモーター制御下で固定子を徐々に発現させ、停止状態のモーターが徐々に回転し始める様子を解析した。この実験方法は「resurrection」と呼ばれ、回転速度のステップ状の増加はモーターに組み込まれた固定子の数を反映し、固定子 1 個の出力を知ることができる。高負荷時の MotAB 1 個あたりの出力は 220 pN nm、6.8 Hz で、MotPS は 212 pN nm、6.6 Hz であり、固定子 1 個の出力はほとんど一緒であることが分かった。このことから、MotAB と MotPS の最大トルクの大きな違いは、固定子のモーターに対する親和性の違いに起因し、MotPS は MotAB に比べ、モーターに組み込まれにくいことが明らかとなった。

次に、MotAB と MotPS の両方を発現している野生株を測定した。 Na^+ を添加しない条件では、MotAB 単独発現株と同程度の最大トルクおよび最高速度を示すのに対し、200 mM の

Na^+ を添加すると、低負荷領域における回転速度が MotPS 単独発現株と同程度まで著しく減少した。このことから、 Na^+ の添加によってべん毛モーターは MotAB 単独型から MotAB および MotPS の両方が同一のモーターに組み込まれたハイブリッドモーターにスイッチすることが示唆された(図 3)。さらに、このハイブリッドモーター 1 分子に注目し、速度揺らぎを詳細に解析したところ、高負荷時には揺らぎが小さく、低負荷時には揺らぎが大きかった。すなわち、高負荷時には MotAB と MotPS は互いに協調し合ってトルクを発生させるに対して、低負荷時には MotPS のイオンチャンネル活性が低いことがために、速度の減少(ブレーキ?)が引き起こされたことが明らかとなった。

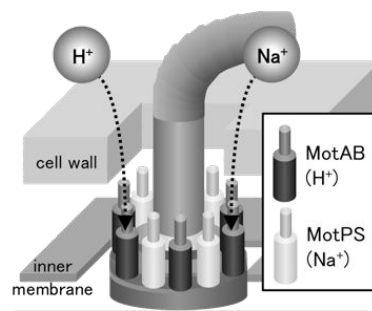


図 3. 枯草菌のべん毛モーター

固定子の外環境に対する応答メカニズムを調べるために、各種ドメインを入れ替えた改変型固定子を発現させた菌株の 1 分子回転計測を行った。まず、FliG タンパク質と静電的相互作用する領域である MotP の細胞質側ドメインを MotA のドメインに入れ替えた変異株は、野生型 MotPS とほぼ同じトルク特性を示した。このことから、MotPS がモーターに組み込まれにくく、イオンチャンネル活性が低いのは、FliG タンパク質との相互作用が原因ではないことが明らかとなった。一方、MotS のペリプラズム側領域のペプチドグリカン結合ドメインを MotB のドメインに入れ替えた変異株は、野生型 MotPS よりも最大トルクがおおよそ 5-6 倍大きくなった。これは、モーターに組み込まれる固定子の数が増加したことを意味し、ペリプラズム側領域のペプチドグリカン結合ドメインが固定子の安定な組み込みに重要であることが明らかとなった。さらに、MotB のペプチドグリカン結合ドメインを MotS のドメインに入れ替えた変異株は、 Na^+ を添加しない条件では野生型 MotAB よりも最大トルクが 75%程度減少するのに対し、200 mM の Na^+ を添加すると、ほぼ同じ最大トルクを発揮することが分かった。このことから、MotS のペプチドグリカン結合ドメインを持つ固定子がモーターに安定に組み込まれるためには Na^+ が必須であり、このドメインが外環境の Na^+ を感知している可能性が示唆された。枯草菌のべん毛モーターは、生育環境に応じて利用しやすい共役イオンをエネルギー源とするため、2 種類の固定子を獲得したと考えられる。

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)

[学会発表](計9件)

寺原直矢、古寺哲幸、内橋貴之、安藤敏夫、難波啓一、南野徹 べん毛モーター固定子複合体の構造ダイナミクスを高速AFMで見る 第21回べん毛研究交流会 2016年3月6日「滝の湯(山形県)」

寺原直矢、古寺哲幸、内橋貴之、安藤敏夫、難波啓一、南野徹 高速AFMによるべん毛モーター固定子複合体 MotPS の動的構造解析 2016年生体運動研究合同班会議 2016年1月10日「キャンパスプラザ京都(京都府)」

寺原直矢、加藤貴之、南野徹、難波啓一 High-resolution cryoEM structural analysis of MotPS stator of the bacterial flagellar motor 日本生物物理学会第53回年会 2015年9月13日「金沢大学(石川県)」

寺原直矢、加藤貴之、南野徹、難波啓一 クライオ電子顕微鏡法によるべん毛モーター固定子 MotPS 複合体の高分解構造解析 新学術領域「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」第3回領域全体会議 2015年6月10日「金沢商工会議所会館(石川県)」

寺原直矢、加藤貴之、南野徹、難波啓一 クライオ電子顕微鏡法によるべん毛モーター固定子 MotPS 複合体の高分解構造解析 第12回21世紀大腸菌研究会 2015年6月4日「琵琶湖グランドホテル・京近江(滋賀県)」

寺原直矢、加藤貴之、南野徹、難波啓一 クライオ電子顕微鏡法によるNa⁺駆動型べん毛モーター固定子 MotPS 複合体の高分解能構造解析 分子研研究会膜タンパク質内部のプロトン透過を考える 2015年4月20日「岡崎コンファレンスセンター(愛知県)」

寺原直矢、加藤貴之、南野徹、難波啓一 固定子複合体 MotPS のクライオ電子顕微鏡による構造解析 第20回べん毛研究交流会 2015年3月2日「合歓の郷リゾートホテル(三重県)」

寺原直矢、加藤貴之、南野徹、難波啓一 Na⁺駆動型べん毛モーター固定子 MotPS 複合体の高分解能構造解析 新学術領域「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」第2回領域全体会議 2014年6月16日「大雪クリスタルホール(北海道)」

寺原直矢、野口有希奈、中村修一、上池伸徳、南野徹、伊藤政博、難波啓一 枯草菌べん毛モーターの性能は異なる2種類の固定子によって調節される 第11回21世紀大腸菌研究会 2014年6月4日「ホテル大観(岩手県)」

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺原 直矢 (TERAHARA, Naoya)

大阪大学・生命機能研究科・招聘研究員

研究者番号: 40554738