

バクテリアべん毛モーターの回転を測る

曾和 義幸^{1*}・笠井 大司²

はじめに

プラスミドの構築, 目的タンパク質の精製をはじめとする生命科学の日常的な実験で大活躍してくれる生物といえば大腸菌であろう。ところで, 彼らが水中を自由に泳ぎ回り, より良い環境に移動することに注目されたことがあるだろうか? 大腸菌をはじめとする多くのバクテリアは, 「べん毛」とよばれる運動器官を利用して遊泳の推進力を生み出す。菌体から生えるらせん型べん毛繊維は, その根元の細胞膜に埋まる直径50 nmほどのべん毛モーターによって回転駆動され, スクリューとして機能する(図1)。バクテリアは, 細胞外の情報を処理してモーター回転を調節することで細胞行動を制御する。べん毛モーターは生物界で初めて見つかった回転運動超分子マシナリーであり, 多くの研究者が回転メカニズムの解明に挑戦してきた¹⁾。

モーターの構造と回転

大腸菌は長さ2 μm, 直径1 μm程度の俵型の細胞であり, 数本のべん毛が細胞の周囲から生えている(図1)。グラム陰性菌である大腸菌は, 細胞膜の外側にペプチドグリカン層と外膜をもつ。大腸菌べん毛は, これら3層

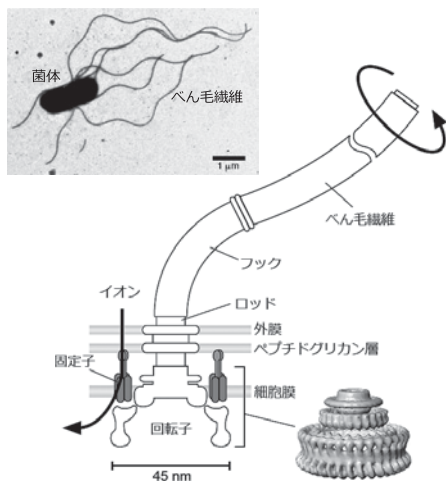


図1. バクテリアべん毛モーター。(左上) 大腸菌の電子顕微鏡像。(中央) べん毛モーターの模式図。固定子ユニットにイオンが流れ, モーターは回転する。(右下) 電子顕微鏡単粒子解析によるモーター回転子の三次元再構成像 (EMDB-1887)。

構造に複数枚のリングを配置し, ロッドで貫いて細胞外にらせん状のべん毛繊維を構築する。べん毛繊維と細胞膜に埋まるモーターの間には, 自在継手として機能するフックによって連結されて, モーター回転を滑らかにべん毛繊維へ伝える。この複雑な超分子マシナリーは, 多くの調節遺伝子によってダイナミックに制御されながら, 20種類以上のタンパク質が自己集合して構築される²⁾。バクテリアの形状, サイズは種によってさまざまであるが, べん毛にも驚くほどの多様性がみられる。たとえば, 1本だけ極から生えるもの, 多数のべん毛が極から生えているもの, べん毛繊維がペプチドグリカン層と外膜の間で回転するもの³⁾など, バクテリアの棲息環境に最適化するように進化させてきたのであろう⁴⁾。

また, その回転を生み出すモーター部分の構造もバクテリアの種によって多様性があることが, クライオ電子顕微鏡による観察で近年明らかにされてきた^{5,6)}。ただし, 回転を生み出す中心部分である回転子(回転する部品)と固定子(回転子を保持する部品)の間に相対的な滑りが起こることで, モーターが回転するという点では共通している(図1)。モーターのエネルギー源は, 細胞膜内外に形成された電気化学ポテンシャルにしたがって流入するイオンである。共役イオンが, 膜タンパク質複合体である固定子に形成されるイオンチャネルを通過すると, 固定子の細胞内ドメインは構造変化して, 回転子と相互作用すると考えられている⁷⁾。水素イオンやナトリウムイオンなどの一価カチオンが多くのバクテリアで共役イオンとして利用されており, 機能解析が進められた¹⁾。最近, 二価カチオンを利用するべん毛モーターが発見され, モーターのイオン認識機構についての研究の進展が待たれる^{8,9)}。

モーター回転メカニズムを知るためには, モーターの入力に対する回転特性を知ることが必要である。モーターの回転特性は私たちが普段使う車のエンジンと同じく, 発生するトルクと速度の関係で記述される。トルク M は回転中心からの距離 L の作用点で回転方向に力 F が発生すると $M = L \times F$ で定義される。ここからは, ナノスケールの回転モーターが生み出す回転とトルクを計測する取組みを紹介しよう。

* 著者紹介 ¹法政大学生命科学部生命機能学科(准教授) E-mail: ysowa@hosei.ac.jp

²法政大学マイクロ・ナノテクノロジー研究センター(研究員)

モーター回転の顕微解析

べん毛モーターはサイズが非常に小さく、回転子と固定子間の滑りを分子レベルで直接的に観察することは難しいが、大きな目印をつけることでモーター回転の観察が可能となる。また、モーターが発生するトルクは、目印が溶液から受ける粘性抵抗と釣り合うため、系の粘性抵抗係数と回転速度の積で求めることもできる。べん毛モーターが回転することを1974年に実験的に証明した“テザードセル法”では、1本のべん毛を顕微鏡のカバーガラスに抗体などを介して付着させて、菌体本体が回転する様子を観察する¹⁰⁾(図2a)。ただし、回転の目印となる菌体の形状、回転軸の位置などを制御することができないため、定量的な解析は容易ではない。近年は、菌体本体をカバーガラスに固定し、べん毛繊維に付着させた1 μm程度ガラスやラテックスの球体の動きを高速カメラや光検出器などを用いて追跡する“ビーズアッセイ”がよく利用される¹¹⁻¹³⁾(図2b)。テザードセル法と比較して、ビーズアッセイはモーターにかかる負荷を均一にすることができるため、粘性抵抗から求める回転トルク解析に適している。

図3は1 μmのビーズをべん毛繊維に付着させて、ビーズアッセイで計測されたモーター回転速度の例である。この実験で用いた大腸菌*ΔmotA motB*株は、固定子として機能するタンパク質MotA MotBを発現しないため、モーターは回転を生み出すことができない。そのため、ビーズはべん毛の軸を中心にフラフラとした回転ブラウン運動を示す。この細胞にMotA MotBの発現を誘導すると、固定子のユニットが順次モーターに組み込まれて回転子と相互作用し、モーター回転速度が段階的に上昇

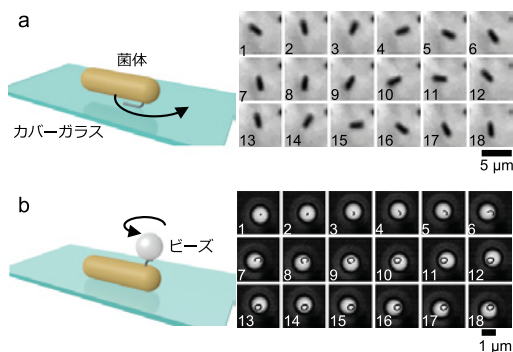


図2. モーター回転計測法と計測例。(a) テザードセル法。連続写真は16 ms/フレームで撮影した。(b) ビーズアッセイ。連続写真はべん毛繊維に付着した1 μmのポリスチレンビーズの像を高速カメラで1.5 ms/フレームで撮影した例を示す。*学会HPのPDFではカラーで表示されます。

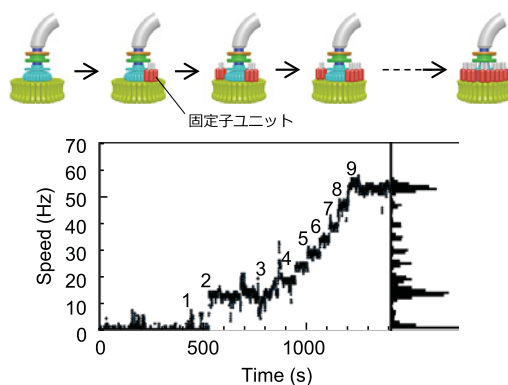


図3. モーター固定子ユニットの集合過程の計測例。大腸菌*ΔmotA motB*株に、プラスミドからMotA MotBタンパク質を発現させた時のモーター回転速度の変化を示す。回転速度の段階的な増加は、固定子ユニットが組み込まれる過程を反映している。*学会HPのPDFではカラーで表示されます。

する。この例では、9段階の速度上昇がみられる、つまり、モーターに9個のユニットが同時に相互作用して回転トルクを発生している。Berryらのグループは、最大11個のユニットがモーター内に集合して、1260 pN·nmの最大トルクを発生すると報告している¹⁴⁾。

光ピンセットを用いたトルクの直接測定

光ピンセットは、近赤外光などのレーザーを顕微鏡対物レンズに入射し、その集光点でマイクロメートル程度の物体を捕捉する技術である。捕捉された物体が集光点からずれると、元に戻そうとする復元力がはたらく。つまり、微小なばね秤のようにも利用でき、生体分子が発生するピコニュートン (10^{-12} N) 程度の力を計測するのに適している。1990年代以降、光ピンセットはナノメートル精度の計測と組み合わせることで、分子モーター、特にミオシンやキネシンについての研究に威力を発揮した。

大腸菌べん毛モーターについても、1997年にBerryとBergによって光ピンセットが応用された。彼らは光ピンセットで捕捉した1 μmのビーズを、回転するテザードセルに接触させることで、ビーズに働く力を計測した¹⁵⁾(図4a, b)。ビーズと菌体の接点と回転中心からの距離もビデオ解析で得られるので、回転トルクを定義の通り直接測定が可能である。その結果、モーターはあらゆる角度で4500 pN·nm程度の回転トルクを発生することを示した。ただし、論文では、光ピンセットが菌体に与える影響を補正していないことが言及されている(詳細は後述)。

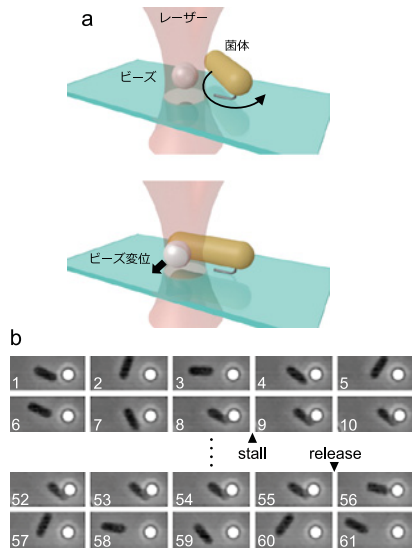


図4. 光ピンセットによるトルク計測. (a) 光ピンセットによるトルク計測の模式図. 捕捉したビーズを回転する菌体に近づけ、菌体とビーズが接触すると捕捉位置からずれる. このビーズの変位からトルクを見積もる. (b) 計測例. 連続写真は40 ms/フレームで撮影し、画像内の数字はフレーム番号を示す. 菌体が反時計回りに回転しており、▲ (stall) の位置でビーズと菌体を接触させ、▼ (release) の位置で解放すると再び反時計回りに回転を始める. ※学会HPのPDFではカラーで表示されます.

真のモーター回転の出力は？

これまで述べたように、過去に報告された大腸菌べん毛モーターの発生トルクは、1260 pN·nmから4500 pN·nmと大きな開きがあった. この乖離の原因が、実験で使用された菌株や培養条件の違いによるものか、それとも計測手法によるシステマティックな違いによるものかは明らかではないが、モーター回転モデルの検証、エネルギー変換効率の議論をするうえで解決すべき重要な課題である.

そこで、ある一つの大腸菌株について、ビーズアッセイと光ピンセットのトルク計測法を適用することにした(投稿準備中). まず、1 μm のビーズを用いたビーズアッセイによる回転計測をおこなうと、 ~ 1400 pN·nmと過去の報告とほぼ一致する結果が得られた. つぎに、光ピンセットで1 μm のビーズを捕捉して、過去の報告と同様に実験をおこなうと ~ 4500 pN·nmの値が得られた(図4). つまり、過去に報告された実験方法に従うと、両実験ともに再現する値を得た. そこで、光ピンセットの実験において、菌体自体が計測に与える影響を検討した. 図3でも利用したモーター固定子を発現しない大腸菌 $\Delta\text{motAmotB}$ 株に、光ピンセットで捕捉したビーズを近づけてトルク計測の時と同様に実験をおこなうと、

モーターはトルクを発生することがないにも関わらず、ビーズに変位が見られた. 光ピンセットは、ビーズだけではなく菌体に対しても作用して集光点に引き込んだのであろう. その結果、ビーズと菌体が同時に捕捉されて新たな安定点へと落ち着き、ビーズの位置が光ピンセットの集光点からずれて変位したと解釈される. この影響は実際にトルクの計測をしている際にも作用しているはずである. 光ピンセットによるトルク計測の結果は、大腸菌 $\Delta\text{motAmotB}$ 株で計測されたビーズの位置のずれに、モーターが生み出すトルクが加算された値を観察していたと考えるのが妥当であろう. このずれを差し引くことで見積もった回転トルクの値は ~ 1800 pN·nmとなり、ビーズアッセイで得られた結果との差は20%程度となった.

最近の研究では、モーターにかかる負荷が高い時ほど多くの固定子ユニットがモーターに集合することが知られている^{16,17}. 光ピンセットによる計測においてわずかに高いトルクが計測されたのは、モーターへの負荷が高いため固定子ユニットが多く組み込まれている可能性がある. 固定子タンパク質にGFPなどの蛍光タンパク質を融合させて、モーターに組み込まれた固定子数をカウントすること¹⁸、または、図3で示したような固定子ユニットの組み込み過程を光ピンセットで観察して、ユニット1個が生み出す回転トルクを比較することで、検証を進める必要がある.

まとめ

本稿ではモーターが生み出す回転出力の解析法に絞って紹介した. 多くの研究者が観察技術の改善の努力を積み重ね、モーター回転特性の情報はかなり蓄積されてきている. 一方、モーター回転メカニズムの解明に必須であるイオン透過の情報は圧倒的に不足している. 生きている細胞の中で機能するモーターにのみ流入するイオン透過を計測することは困難を極める. イオン透過を担う固定子を人工脂質膜へ再構成する系の構築から始めなければならないだろう. べん毛モーターの回転機構の解明には、まだまだ多くの技術革新が必要である.

謝 辞

本稿の執筆に際しまして、大腸菌の電子顕微鏡写真をご提供いただいた宮田知子博士(大阪大学)、有益なコメントをいただいた川岸郁朗博士(法政大学)に感謝いたします. 本稿で紹介した研究の一部は、MEXT科研費JP15H01332、JSPS科研費JP15K07034、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(2013-2017年度)の助成を受けて達成されたものです.

文 献

- 1) Sowa, Y. and Berry, R. M.: *Q. Rev. Biophys.*, **41**, 103 (2008).
- 2) Macnab, R. M.: *Annu. Rev. Microbiol.*, **57**, 77 (2003).
- 3) 中村修一：生物工学, **96**, 195 (2018).
- 4) 西山雅祥ら：生物工学, **96**, 191 (2018).
- 5) Minamino, T. and Imada, K.: *Trends Microbiol.*, **23**, 267 (2015).
- 6) Chen, S. *et al.*: *EMBO J.*, **30**, 2972 (2011).
- 7) Kojima, S. and Blair, D. F.: *Biochemistry*, **40**, 13041 (2001).
- 8) Imazawa, R. *et al.*: *Sci. Rep.*, **6**, 19773 (2016).
- 9) 伊藤政博：生物工学, **96**, 187 (2018).
- 10) Silverman, M. and Simon, M.: *Nature*, **249**, 73 (1974).
- 11) Ryu, W. S. *et al.*: *Nature*, **403**, 444 (2000).
- 12) Sowa, Y. *et al.*: *Nature*, **437**, 916 (2005).
- 13) Kasai, T. and Sowa, Y.: *Methods Mol. Biol.*, **1593**, 185 (2017).
- 14) Reid, S. W. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 8066 (2006).
- 15) Berry, R. M. and Berg, H. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 14433 (1997).
- 16) Lele, P. P. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 11839 (2013).
- 17) Tipping, M. J. *et al.*: *MBio*, **4**, e00551-13 (2013).
- 18) Leake, M. C. *et al.*: *Nature*, **443**, 355 (2006).