



バクテリアべん毛モーターの ステップ運動

オックスフォード大学クラレンドン研究所 曾和義幸
信州大学農学部応用生命科学科 薬師寿治
名古屋大学理学部生命理学科 本間道夫
東北大学多元物質科学研究所 石島秋彦

1. はじめに

バクテリアは体長1 μm 程度の単細胞生物であり、細胞本体から伸びた直径約20 nm、長さ10 μm 程度のべん毛とよばれるらせん状の運動器官を回転させて水中を自由に泳ぎ回っている。その回転は、細胞膜に埋まっている直径わずか50 nm程度のべん毛モーターとよばれる分子機械により数百Hzもの高速度で駆動されている¹⁾。モーターの構造は、多数のタンパク質分子がリング状に並び美しい回転対称性をもつ回転子とその周りを囲む約10個の固定子で構成される^{2),3)}。固定子タンパク質はイオンチャネルとして機能し、共役イオンの細胞内外の濃度差および膜電位によって決定する電気化学的勾配にしたがってイオンが流入する際に得られる自由エネルギーをトルクへ変換している。べん毛モーターは水中において機能するため陽イオンを利用しているものの、わたしたちが日常使っている回転モーターと同様に電気的なエネルギーを入力として動作し、生体内で多く見られるATP加水分解反応をエネルギー源とする分子モーターとは大きく異なる。

べん毛モーターが回転していることは、1974年にテザードセル法(べん毛をガラス表面に付着させ細胞本体の動きを見る手法)により、実験的に証明された⁴⁾。その直後から、モーターの回転は小さなステップ回転の繰り返しによるものと期待され、ステップ探しが始

まっている⁵⁾。しかし、実に30年もの間、べん毛モーターの回転からステップ状の動きが検出されることはなかった。一方、キネシン-微小管系、ミオシン-アクチンフィラメント系などのリニア型の分子モーターでは、1分子計測技術の発展に伴いレールタンパク質の構造周期性に由来するステップ運動が観察されている^{6),7)}。また、1997年に回転モーターであると証明された F_1 -ATPaseにおいてもATP加水分解に伴った回転ステップが見つかった^{8),9)}。

ATP駆動型分子モーターにおいて、ステップを直接観察することで初めて明らかになった情報が数多くあり、分子機械の動作原理の解明に向けて大きく貢献している。べん毛モーターを含めたイオン駆動型分子モーターにおいても、ステップ運動を検出し、分子レベルで素過程の議論を行いたい。では、これまでべん毛モーターのステップがなぜ検出されてこなかったのだろうか? まず、べん毛モーターは高速回転するため、装置の時間分解能の限界で検出されなかったことがあげられる。また、モーターと繊維をつなぐフックはバネのような作用をもつので(Fig. 1a)、もし仮にステップ運動をしていても、力学的な負荷がかかることによってダンピングが起り、ステップを検出することは難しい。さらに、1個のモーターには複数個の固定子がトルクの発生にかかわっているため、観察される出力が複雑になることが予想される。これらの問題はお互い密接に関連しているが、相互作用している固定子の数を減らし、モーターを低速度で回転させることで解決できると期待される。そこで、わたしたちは入力エネルギーと固定子の数を制御できる系を構築することから始め、ビーズを用いた高精度の計測を行うことで、べん毛モーターの回転からステップの検出を試みた¹⁰⁾。

2. 大腸菌内で機能する Na^+ 駆動型モーター

回転運動を生み出す自由エネルギーを決定する共役イオンには H^+ と Na^+ があり、それぞれ H^+ 駆動型モーター、 Na^+ 駆動型モーターとよばれている。それらのモーターは、共役イオンは異なっているものの、多くの共通点が見られる。たとえば、電子顕微鏡で観察された回転子の構造や大きさは似通っており、またそれらの固定子(H^+ 駆動型モーターに関してはMotAとMotB、

Steps of the Bacterial Flagellar Motor

Yoshiyuki SOWA¹, Toshiharu YAKUSHI², Michio HOMMA³ and Akihiko ISHIJIMA⁴

¹Clarendon Laboratory, University of Oxford

²Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shinshu University

³Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University

⁴Institute of Multidisciplinary, Research for Advanced Materials, Tohoku University

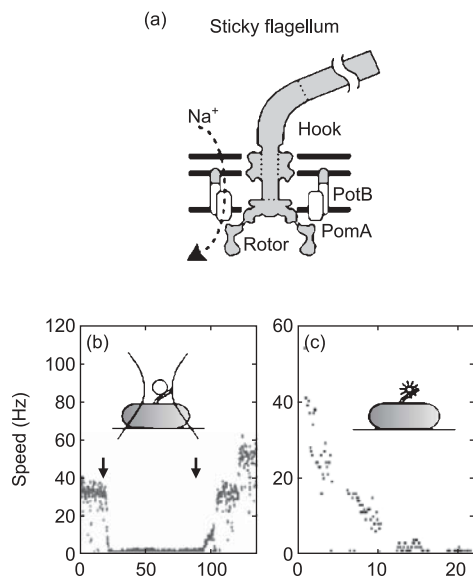


Fig. 1 (a) Schematic of the Na^+ -driven chimeric flagellar motor. Components derived from *V. alginolyticus* (stators: PomA, PotB) and *E. coli* (PotB, rotor) are indicated in white and grey respectively. (b), (c) Reducing sodium-motive force and motor speed: (b) by lowering external Na^+ concentration (5 mM to 0.1 mM and back, black arrows), with backfocal plane interferometry (BFP) detection, (c) by photodamage, with fluorescent detection.

Na^+ 駆動型モーターに関しては PomA と PomB を構成するタンパク質のアミノ酸配列に相同性が見られる。また、わたしたちのグループでは Na^+ 駆動型モーターのトルクとスピードの関係を計測し、本質的に H^+ 駆動型モーターと同じ出力特性をもつことを明らかにしている¹¹⁾。

ところが、モーターの機能を計測するという立場からは、 H^+ 駆動型モーターと Na^+ 駆動型モーターにはそれぞれ違った特徴が見えてくる。 Na^+ 駆動型モーターは、外液の Na^+ 濃度で入力エネルギーを制御できることや Na^+ チャネルへの特異的阻害剤が存在することなど、 H^+ 駆動型モーターにはない機能計測に適した特徴をもっている。ところが、これまでべん毛モーターの研究は H^+ 駆動型モーターを中心に進んできている。というのも、べん毛モーターを含めた多くの研究で用いられる大腸菌が、 H^+ 駆動型モーターをもち、 Na^+ 駆動型モーターをもたないためである。大腸菌を試料として採用する利点は、これまでに蓄えられた多くの情報を利用することができ、分子生物学的手法も確立していることである。

それぞれの特徴を利用したいという贅沢な希望を叶

えるために、わたしたちは大腸菌内で Na^+ 駆動型として機能するキメラモーター PomAPotB を用いることにした。PotB は H^+ 駆動型モーターの固定子タンパク質 MotB と Na^+ 駆動型モーターの固定子タンパク質 PomB を融合させたタンパク質である。 Na^+ 駆動型モーターの固定子タンパク質 PomA とキメラタンパク質 PotB を大腸菌に発現させると、大腸菌が本来もつ H^+ 駆動型の回転子と相互作用して Na^+ 駆動型として機能するという驚くべき結果が最近報告されている¹²⁾。わたしたちは大腸菌の H^+ 駆動型固定子タンパク質である MotAMotB の遺伝子を欠損させ、 Na^+ 駆動型として機能する PomAPotB を薬剤による発現誘導によってその数を制御できるように改変した。また、ここでは詳しく紹介しないが、他にも数カ所大腸菌の遺伝子を操作することで回転計測に最適化するように菌体を作製した (Fig. 1a)。

3. モーター回転の計測システム

モーターの回転運動を高精度に観測できるように、大腸菌のべん毛に目印としてポリスチレン製のビーズを付着させ、その重心位置の動きを、backfocal plane interferometry (BFP 法) と蛍光ビーズ法という2つの異なる手法で検出した。

BFP 計測では、対物レンズに平行に入射した 1064 nm のレーザーが作る集光点に検出したいビーズを配置する。リニア型の分子モーターの発生力を見積もるためによく用いられる光ピンセットと全く同じ光学系であるが、非常に弱いレーザー強度で用いているため、モーターの回転にほとんど影響を与えることはない。直径 500 nm のビーズから前方散乱される光強度は大きく、コンデンサレンズの後焦点面で形成される干渉像を4分割フォトダイオードに結像させることによって、ビーズの重心位置をナノメートルの精度で検出できる。BFP 計測では、チャンパー内の溶液を低い Na^+ 濃度のものに交換することで、入力エネルギーを下げた低速回転を作り出した。Fig. 1b は、溶液交換したときの典型的な速度変化を示しており、低濃度条件下では回転速度を数 Hz まで下げることができる。

蛍光ビーズ法では、直径 200 nm の蛍光ビーズの落射蛍光像を高速 CCD カメラで撮影する。CCD カメラで撮影した 16×16 ピクセルの画像を 2.4 kHz のフレームレートで読み出し、蛍光像の強度分布に対して 2 次元ガウス分布でフィッティングを行うことで、ビーズの重心位置を 5 nm の精度で決定することができる。蛍光ビーズ法では、励起光による積算的なダメージが誘導する膜電位の減少により、入力エネルギーを下げた低速回転を作り出した (Fig. 1c)。

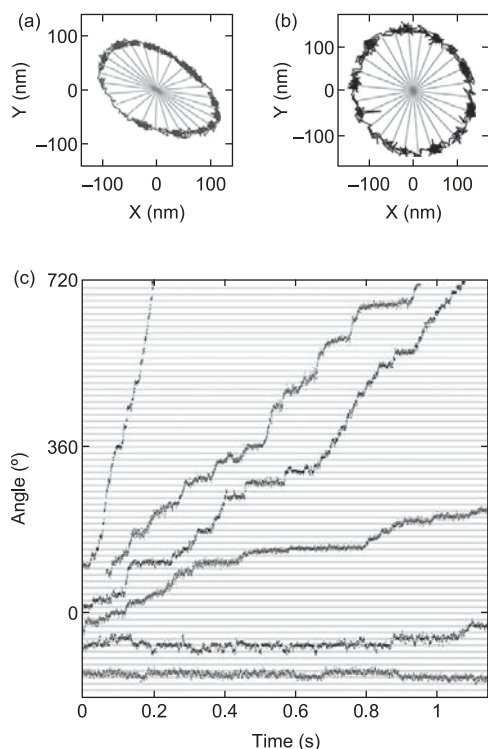


Fig. 2 Bead positions in slow rotation regime with bfp detection, (a) and fluorescent detection, (b). (c) Stepping rotation of flagellar motors with a range of average speeds. Grey and black traces are from BFP and fluorescence experiments, respectively.

4. ステップ回転の解析

BFP法および蛍光ビーズ法から得られたビーズの重心位置を示すXYプロットはFig. 2a, bである。低速度領域におけるビーズの重心位置は、どの角度も平均的に滞在しているわけではなく、滞在しやすい角度とそうでもない角度が見られた。次に、XYプロットを回転楕円軌道として補正し、回転中心から見たビーズの角度の時間変化を計算した結果がFig. 2cである。そのトレースは、滑らかな直線ではなく、ステップ状の角度変化をしていることがわかる。

Fig. 3a, bはFig. 2cのトレースの一部を拡大して示しており、それぞれ異なる時間スケールのデータを示している。これらのトレースを見ると、計測した手法や平均の回転速度に関係なく、約14°のステップ状の回転が見られる。ビーズの回転半径は約100 nmであるので、われわれの検出装置による角度検出能は、位置検出能が5 nmである蛍光ビーズ法でも少なくとも3°はあり、有意な角度変化と考えられる。また、ステップ状変位が確認されたすべてのトレースからステップの

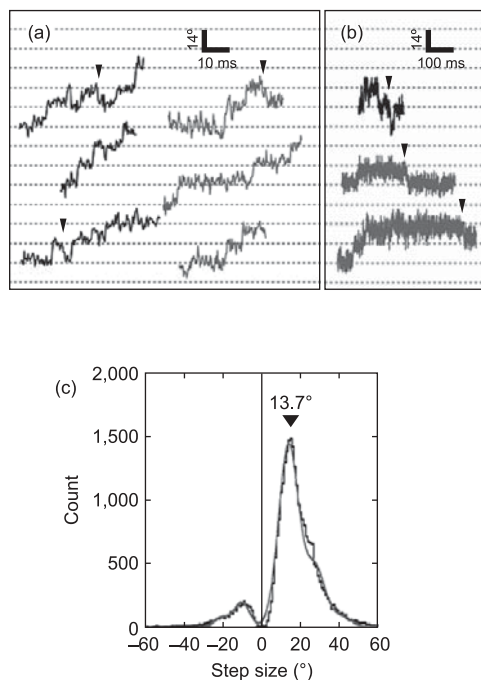


Fig. 3 (a), (b) Selected sections of the traces in Fig. 2c. Grey and black traces are from BFP and fluorescence experiments respectively, as in Fig. 2c. Arrow heads indicate backward (clockwise direction) steps. (c) A histogram of step-sizes found in all episodes. A multiple-Gaussian fit (grey line) gives step sizes of 13.7° for forward steps.

大きさをヒストグラムにしたものがFig. 3cである。その分布のピークにあたる角度は13.7°であり、ステップに基本単位があることが確認された。言い換えれば、べん毛モーターは平均26回ステップすることで1回転することを示している。

では、1回転26ステップという値は何に由来するのだろうか？ モーターの回転子は多くのタンパク質によって構成されているが、その中でもトルク発生に最も重要なタンパク質と考えられているFlhGが作るリングの対称性が26である¹³⁾。ATP駆動型分子モーターと同様に、モーターが沿って動くトラックの周期性を反映しているとわたしたちは考えている。

今回検出したステップと入力であるイオンの数の関係を直接的に計測することはできないだろうか？ 残念ながら、わたしたちは生きている大腸菌を用いているため、モーターのみに流れ込む電流をパッチクランプなどの技術を応用して計測することは技術的に困難であり、新しい技術の開発が必要であろう。そこで、定常状態で回転しているモーターの力学特性から入出力

関係について見積もってみる。まず、イオン駆動力が150 mVの時、固定子1ユニットあたり平均約280 pN.nm/radのトルクを発生すると計測されている¹⁴⁾。この条件下において、単一イオンが細胞膜を通過することによって得られる入力エネルギー ($6 k_B T$) を、全く損失することなく回転トルクに変換すると仮定しても、引き起こすことのできるステップの最大角度は約5°と見積もられる。これに対して、わたしたちが回転運動から実測したステップサイズは2-3倍大きい13.7°であった。少なくとも単一イオンの流入が、1ステップの角度変化を引き起こすような入出力関係ではなさそうである。

また、Fig. 3a, bの矢印に示す時折観察される逆ステップも興味深い現象である。自然界に存在するバクテリアの場合は、周囲の状況に応じてべん毛の回転方向を変化させ、より良い環境に向かう走性を示す。ところが、今回の実験でも用いている回転方向を切り替える制御タンパク質CheYをコードする遺伝子を欠損した大腸菌では、通常の条件では常に反時計回りであり、決して逆の時計回りに回転することはない。また、逆方向へのステップ出現頻度は回転速度に依存し、低速度ほど高いようであった。回転運動を発生させる入力エネルギーを小さくして素過程を検出する実験を行ったため、逆ステップの出現確率が上昇し、明瞭に捉えられたと考えられる。今後、入力エネルギーの正確な計測と前後比から求まるエネルギー差の関係を議論することが必要である。

5. おわりに

今回検出した回転ステップによって、イオン駆動型モーターにおいてもATP駆動型分子モーターと同様に1分子レベルでの素過程を議論できる段階になったと言える。バクテリアべん毛モーターは他のATP駆動型モーターのように顕微鏡下での再構成に成功しておらず、計測の条件設定など難しい点は多い。しかし、イオン濃

度を変えることで入力エネルギーを広範囲にわたって任意に設定できることから、化学-力学エネルギー変換にかかわる多くの情報をわたしたちに与えてくれると期待している。最後に、本研究はOxford大学のRichard Berry博士、Alexander Rowe博士、Mark Leake博士と共同で遂行されたものであり、心から感謝の意を表したい。

文 献

- 1) Berg, H. C. (2003) *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 19-54.
- 2) Thomas, D. R., Morgan, D. G. and DeRosier, D. J. (1999) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 10134-10139.
- 3) Blair, D.F. and Berg, H. C. (1988) *Science* **242**, 1678-1681.
- 4) Silverman, M. and Simon, M. (1974) *Nature* **249**, 73-74
- 5) Berg, H. C. (1976) *Cell Motility* vol. A (Goldman, R., Pollard, T. and Rosenbaum, J. eds.) 47-56, Cold Spring Harbor Press, New York.
- 6) Mehta, A. D., Rock, R. S., Rief, M., Spudich, J. A. Mooseker, M. S. and Cheney, R. E. (1999) *Nature* **400**, 590-593.
- 7) Schnitzer, M. J. and Block, S. M. (1997) *Nature* **388**, 386-390.
- 8) Noji H., Yasuda R., Yoshida M. and Kinosita, K., Jr. (1997) *Nature* **386**, 299-302
- 9) Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K., Jr and Yoshida, M. (1998) *Cell* **93**, 1117-1124.
- 10) Sowa, Y., Rowe, A. D., Leake, M. C., Yakushi, T., Homma, M., Ishijima, A. and Berry, R. M. (2005) *Nature* **437**, 916-919.
- 11) Sowa, Y., Hotta, H., Homma, M. and Ishijima, A. (2003) *J. Mol. Biol.* **327**, 1043-1051.
- 12) Asai, Y., Yakushi, T., Kawagishi, I. and Homma, M. (2003) *J. Mol. Biol.* **327**, 453-463.
- 13) Suzuki, H., Yonekura, K. and Namba, K. (2004) *J. Mol. Biol.* **337**, 105-113.
- 14) Ryu, W. S., Berry, R. M. and Berg, H. C. (2000) *Nature* **403**, 444-447.

バクテリアべん毛モーターのステップ運動

曾和義幸（そわ よしゆき）

オックスフォード大学クラレンドン研究所ポスドク研究員

連絡先：Clarendon Laboratory, University of Oxford, Parks Road, Oxford OX1 3PU, UK.

E-mail: y.sowal@physics.ox.ac.uk

薬師寿治（やくし としはる）

信州大学農学部応用生命科学科助教授

連絡先：〒399-4598 長野県上伊那郡南箕輪村 8304

E-mail: alfista@shinshu-u.ac.jp

本間道夫（ほんま みちお）

名古屋大学理学部生命理学科教授

連絡先：〒464-8602 名古屋市千種区不老町

E-mail: g44416a@cc.nagoya-u.ac.jp

石島秋彦（いしじま あきひこ）

東北大学多元物質科学研究所教授

連絡先：〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1

E-mail: ishijima@tagen.tohoku.ac.jp