法政大学学術機関リポジトリ
HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

PDF issue: 2025-07-13

外環境に応じて特性を変える大腸菌べん毛モーターの回転制御機構

石田, 翼 / ISHIDA, Tsubasa

(開始ページ / Start Page)
1
(終了ページ / End Page)
89
(発行年 / Year)
2022-03-24
(学位授与番号 / Degree Number)
32675甲第543号
(学位授与年月日 / Date of Granted)
2022-03-24
(学位名 / Degree Name)
博士(生命科学)
(学位授与機関 / Degree Grantor)
法政大学 (Hosei University)
(URL)
https://doi.org/10.15002/00025236

博士学位論文
論文内容の要旨および審査結果の要旨

論文題目	外環境に応じて特性を変える大腸菌べん毛モーターの回転制御機構
氏名	石田　翼
学位の種類	博士（生命科学）
学位番号	第 543 号
学位授与年月日	2022 年 3 月 24 日
学位授与の要件	法政大学学位規則第 5 条第 1 項第 1 号該当者（甲）
論文審査委員	主　査　曽和　義幸　教授
	副　査　廣野　雅文　教授
	副　査　川岸　郁朗　教授
	副　査　南野　徹　准教授（大阪大学）

１．論文内容の要旨

大腸菌などの運動性細菌の多くは，べん毛繊維を回転させて水中を遊泳する．その回転を駆動するべん毛モーターは，回転子と複数の固定子ユニットによって構成される直径約 45 nm のナノマシンである．固定子ユニットはイオンチャネルとしての機能を持ち，細胞膜を介した共役イオンの流入をべん毛モーターの回転トルクに変換する．固定子ユニットが使用する共役イオンは主に H^+もしくは Na^+であり，その選択性は固定子タンパク質に依存する．モーター回転時の負荷や入力エネルギーなどの環境変化に応じ，モーターに組み込まれて同時に機能するユニット数はダイナミックに変化し，モーターの出力が調整される．モーター回転機能を自律的に制御する機構を理解するには，幅広い環境条件下でモーターの回転を計測することが必要である．

本論文は 5 章から構成される．第 1 章では，本研究の背景と目的を述べている．細菌べん毛モーターの構造研究および機能研究について，歴史的経緯から説き起こし，現在までの知見が簡潔にまとめられている．

第 2 章では，本研究で構築した計測装置の評価およびモーター調節タンパク質 FliL がモーターの出力特性に与える影響について述べている．べん毛モーターは外環境の粘度などの物理的な刺激に応じて回転子の周りに配置される固定子ユニットの組み込み数を調節し，自律的にその機能を制御する仕組みをもつ．そのため，モーターに様々な負荷が課された条件下での特性評価がモーター機能解析に重要である．しかし，低負荷条件下での回転計測は，モーターの動きを可視化するために使用するマーカーのサイズを小さくしなければ精緻な計測は困難である．本研究では，直径 60 nm の金ナノ粒子からの散乱光を集め，粒子の動きを高時空間分解能で計測が可能なレーザー暗視野顕微鏡を構築した．大腸菌のべん毛繊維を欠失させ，モーターとべん毛繊維をつなぐフックに金ナノ粒子を直接結合させて回転計測をおこなうことで，モーターへの負荷を実効的に無視できる．さらに金ナノ粒子と細胞表面との接触を最小限にするため，通常は大きく湾曲した形状が直線形状になる

ような変異型フックに，さらにシステイン残基を導入し，そのチオール基に金ナノ粒子を直接結合させた．このような工夫により，極低負荷条件下での大腸菌べん毛モーター回転計測系を最適化することに成功している．

機械刺激に対するモーターの調節機構には，細胞膜に局在する FliL タンパク質が関わるとされている．近年，ビブリオ菌 FliL のペリプラズミックドメインの構造が解明され，ヒトを含め様々な生物種で広く保存されているストマチンと類似した構造をもつことが報告された．ストマチン様タンパク質には，膜ストレスなどの機械刺激を感知してイオンチャネルの開口を制御する機能をもつものがある．また，サルモネラ菌やビブリオ菌がもつ FliL は，粘性の高い環境下でのべん毛の回転を支える機能があると報告されている．大腸菌 FliL の機能については複数の報告はあるものの，それぞれが異なる条件で実験がされているため，その機能は明らかとなっていなかった．そこで本研究では，構築した金ナノ粒子アッセイと従来の解析システムであるテザードセルアッセイやビーズアッセイを組み合わせ，幅広い負荷条件下で FliL がモーター回転へ与える影響を調べた．その結果，*fliL* 欠失株のべん毛モーターは高負荷条件下において，野生株や FliL 発現を相補した株(FliL+)と同程度かそれ以上の速度で回転した．これに対して低負荷条件下では，*fliL* 欠失株のモーターの最大回転速度は約 200 Hz に留まり，FliL+モーターの約 300 Hz に達することはなかった．つまり，大腸菌における FliL は，低負荷条件下で駆動するべん毛モーターの回転速度を上昇させる機能をもつことが示された．さらに，回転モーターの特性を示すトルク-速度関係は FliL の有無によって大きく異なり，その特徴を元に FliL の機能モデルを提唱した．

第三章では，入力エネルギーを制御した環境下におけるべん毛モーターの振る舞いについて述べている．自然界の大腸菌は H^+を共役イオンとして利用する固定子タンパク質 MotAMotB をもつが，入力エネルギーを容易に操作することができない．そこで本研究では，大腸菌内で機能する Na^+駆動型キメラ固定子ユニット PomAPotB を用い，外環境の Na^+濃度の変化や阻害剤の添加によってモーター入力の制御を試みている．まず，Na^+をほとんど含まない環境で細胞を継代することで得られた変異型 PotB(G20V)の基本特性を詳細に調べている．モーター回転解析の結果，PomAPotB(G20V)モーターは Na^+だけでなく H^+も共役イオンとして使用可能であることを証明した．細菌が棲息する環境下で効率よくモーターを機能させるため，固定子ユニットの共役イオン選択性を比較的容易に変化させる可能性が高いことを指摘している．また，PomAPotB(G20V)が H^+を入力エネルギーとして使用する条件において，共役イオンとして利用できない K^+が，固定子の組み込みに必要であることが初めて示された．これにより K^+が PomAPotB(G20V)固定子ユニットの活性型構造の安定に寄与することが示唆された．つぎに，Na^+チャネル阻害剤アミロライドの誘導体であるフェナミルに対する耐性をもつ固定子について調べた．フェナミル存在下での運動性保持を指標に選択して得られたフェナミル耐性変異型 PomAPotB の中には，モーターへの組み込みに関与するペプチドグリカン結合ドメインに変異をもつものがあっ

た．モーター1 分子計測の結果，この変異をもつ固定子ユニットは，通常よりも低濃度の Na^+でモーターを回転させることを見出した．つまり，この変異をもつ固定子ユニットは，入力エネルギーの低い条件下でもペプチドグリカンへの結合が野生型よりも強くなり，平均として多くのユニットがモーターに組み込まれると考えられる．さらに，新規アミロライド誘導体が大腸菌の遊泳機能を阻害する作用機序の解明を試みている．当初，この新規薬剤は PomAPotB モーターの運動を阻害すると予想して研究を開始したが，テザードセルアッセイ，ビーズアッセイ，金ナノ粒子アッセイを組み合わせて包括的に解析することで，薬剤はモーターそのものに直接作用するものではないことを明らかにした．詳細な作用機序については今後の研究が待たれるが，現在までに見つかっている阻害剤とは異なり，べん毛等の細胞外構造物に作用することが示唆された．

第四章では，大腸菌 K12 株の基準株（最初の単離クローン）が非運動性ではあるものの，モーターの発生トルクやスイッチ頻度の特性は運動性野生株と同等であることを述べている．人体内から単離された K12 株（ATCC10798 株）は，軟寒天培地上で運動をもたないことが知られており，細胞遊泳を観察すると前後運動をしている．遊泳の推進力を生み出すスクリューとしてはたらくべん毛繊維は，モーターの回転方向が反時計回りであればノーマル型，時計回りになるとカーリー型へとらせん形状を変化させる多型変換能を示すが，蛍光観察の結果から ATCC10798 株のべん毛繊維は常にカーリー型を示していた．この原因として，モーター特性の変化，べん毛繊維の変異，またはその両方が予想された．本研究ではモーター特性について，1 個のモーターの回転速度，反時計回りに回転する割合，回転方向の切り換え頻度を定量化し，ATCC10798 株と運動性野生株の W3110 と有意な差は見られないことを示した．結果として，べん毛繊維を構成するタンパク質 FliC に見つかった N87K が ATCC10798 の特異な運動の要因であった．

第五章では，本研究で得られた結論をまとめている．

２．審査結果の要旨

本学位請求論文は，大腸菌が自身にとって有利な環境に移動するために用いる運動器官であるべん毛を，外環境の変化に応じて柔軟にその機能を調節することを示したものである．また本研究を通して確立させた極低負荷領域におけるモーター回転観察の技術は，その回転機構の理解に発展に寄与すると期待される．さらに，国内外の研究グループと積極的に共同研究をおこない，成果を挙げていることも特筆すべき点である．審査の結果，以下の点について，学術的な新規性が優れていることが認められた．

（１） 極めて低い負荷条件下で駆動する大腸菌べん毛モーターの回転計測システムを構築した．従来の計測方法を組み合わせることで，幅広い負荷条件でモーターの出力特性を正確に計測できるようになった．

（２） 大腸菌 FliL は低負荷条件下で効果的に機能し，モーターが広い速度領域で安定に

トルクを発生するにはFliLが必須であることを初めて明らかにした．さらに，高負荷条件下においても，FliLが固定子の負荷感受性を巧みに制御していることを明らかにした．このようなFliLの働きにより，回転子の周りに配置している個々の固定子が環境変化に応じて効率よく協働的に機能できる．これらの重要な発見は，将来の人工ナノマシン設計において重要な礎になると考えられる．

（３） 大腸菌内で Na^+駆動型として機能する固定子 PomAPotB を用い，入力エネルギーを制限した条件や阻害剤存在下において生じた変異によって新しく獲得した機能を回転解析によって明らかにした．

（４） 大腸菌 K12 株の最初の単離クローンが示す非運動性は，べん毛繊維の変異のみに由来し，モーターの特性変化ではないことを明らかにした．

よって，本審査小委員会は，全会一致をもって提出論文が博士（生命科学）の学位に値するという結論に達した。

（報告様式Ⅲ）