

### 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>

法政大学審査学位論文

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

法政大学大学院 理工学研究科 生命機能学専攻

石田 翼

2021年度



## 目次

要旨 .....	ii
略語一覧 .....	vi
第一章 序論 .....	1
第二章 大腸菌べん毛モーターの負荷依存的なトルク制御機構を支えるFliL .....	17
1. 背景および目的 .....	17
2. 実験材料と方法 .....	20
3. 結果 .....	27
4. 考察 .....	44
第三章 入力エネルギー変化やNa <sup>+</sup> チャネル阻害剤が PomAPotBモーターに与える影響 .....	48
1. 背景および目的 .....	48
2. 実験材料と方法 .....	51
3. 結果 .....	55
4. 考察 .....	68
第四章 べん毛の多型変換と運動様式 .....	72
1. 背景および目的 .....	72
2. 結果および考察 .....	74
第五章 結論 .....	77
謝辞 .....	78
参考文献 .....	79
目録 .....	89



## 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。その回転は、自在継手としてはたらくフックを介して、根本のモーターによって駆動される。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。また、固定子ユニットは独立に機能し、モーター回転時の負荷や入力エネルギーの変化を感知して、同時に機能するユニット数をダイナミックに変化させる特性がある。様々な環境に応じて自律的に機能を調節することが可能なべん毛モーターの回転制御機構を理解するためには、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。

本論文は五章から構成される。第一章では、本研究の背景と目的について述べた。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、現在までの知見を記述した。

第二章では、本研究で構築した極低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系について評価し、負荷依存的なモータートルク調節機構に重要な因子と考えられる細胞膜タンパク質FliLの機能を解析した結果について述べた。

べん毛モーターには、外環境に応じて自律的に機能を調節する仕組みがある。固定子ユニットは、複数個が同時にモーターに組み込まれてトルクを生み出すが、その数は環境の負荷などの機械的な刺激や入力エネルギーの変化に応じて調節される。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する必要があり、精緻な計測が困難である。低負荷領域での回転速度や固定子数の調節機構は、モーター機能解明に重要な情報であるため注目が集まっているにもかかわらず、その研究報告例は少ない。そこで本研究では、金ナノ粒子の位置を高精度に計測できる顕微鏡を構築し、モーター回転の金ナノ粒子標識法を確立した。金ナノ粒子をべん毛繊維ではなく、よりモーターに近いフックに結合させて回転計測をおこなった。このとき、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、モーターへの負荷を実効的に無視できる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た。

機械刺激へのモーターの応答には、細胞膜に局在するFliLタンパク質が関わりとされている。一方、大腸菌*fliL*遺伝子は、モーター回転子を構成するタンパク質をコードする遺伝子と同一オペロンの最初の遺伝子であるにもかかわらず、べん毛モーターの自己集合や回転自体には必須ではないことがわかっている。近年、ビブリオ菌FliL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ン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などのFliLは、粘性の高い環境下でべん毛の回転を支える機能があると報告されている。大腸菌のFliLについては複数の研究報告はあるものの、それぞれが異なる条件で実験されているため、その機能は明らかとなっていない。そこで本研究では、構築した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生かして、これまでの報告よりも広い負荷領域でFliLがモーター回転に与える影響を調べた。その結果、高負荷条件下では*fliL*欠失株のべん毛モーターは、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、大腸菌がもつ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唆された。さらに、回転モーターの特性を示すトルク-速度関係がFliLの有無によって大きく異なることから、その特徴を元にFliLの機能モデルを提唱した。

第三章では、Na<sup>+</sup>駆動型キメラ固定子ユニットPomAPotBを実験室内で進化させることによって単離された変異や、新規アミロライド誘導体によるべん毛モーター回転阻害効果について述べた。

べん毛モーターを駆動する固定子ユニットへの入力エネルギーは、細胞内外の共役イオンの濃度勾配と膜電位差の和で定義される。大腸菌はH<sup>+</sup>駆動型固定子ユニットMotAMotBをもつため、入力エネルギーを制御した条件下でのモーターの特性評価には限界がある。そこで本研究では、大腸菌内で機能するNa<sup>+</sup>駆動型キメラ固定子ユニットPomAPotBを使用して、Na<sup>+</sup>濃度を調節することによる入力エネルギー制御をおこなった。まず、固定子タンパク質PotBの一残基置換体PotB(G20V)の基本特性を調べた。この変異体は、Na<sup>+</sup>をほとんど含まない環境下での細胞の継代培養によって遊泳機能を回復させたものを選択することで、実験的に進化を誘導して単離されたものである。モー

ター回転解析の結果、PomAPotB(G20V)モーターはNa<sup>+</sup>だけでなく、H<sup>+</sup>も共役イオンとして使用可能であることがわかった。固定子ユニットが使用する共役イオンの選択性は、細菌が棲息する環境下で効率よく機能するように適応してきたものである。今回得られた変異体のように、細菌は進化によって自発的に固定子ユニットの共役イオンを比較的容易に変化させることができると考えられる。また、PomAPotB(G20V)がH<sup>+</sup>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<sup>+</sup>が、固定子の組み込みに必要であることを示した。これは、K<sup>+</sup>がPomAPotB(G20V)固定子ユニットの活性化型構造の安定化に寄与することを示唆する。つぎに、Na<sup>+</sup>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ユニットについて調べた。フェナミルは、これまでに報告されている中で最も低い濃度でNa<sup>+</sup>駆動型固定子ユニットの機能を完全に阻害する薬剤である。当研究室で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、フェナミルが作用するチャネル部位ではなく、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つた。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<sup>+</sup>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、チャネルとしての機能ではなく、ペプチドグリカン層への結合機能を強化させたことによって、モーターへの組み込み効率を上昇させ、低い入力エネルギー条件下においても効率よく機能したと考えられる。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た。この新規アミロライド誘導体はフェナミルと同程度の濃度で、PomAPotBモーターをもつ大腸菌の遊泳機能を十分に阻害することがわかっている。そこで、大腸菌べん毛モーターの回転速度に対する阻害効果を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る包括的に調べた。その結果、この新規薬剤はPomAPotBモーターだけでなくMotAMotBモーターの回転も阻害し、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。したがって、この新規薬剤はイオンチャネルへの特異性を失い、べん毛繊維等の細胞外構造物に作用することが推定された。

第四章では、大腸菌の走化性(化学物質に対する走性)に関与するべん毛繊維の多型変換の概要を記述するとともに、現在実験室でモデルとして使用されているK12株の初期単離株の走化性及びモーター特性の基本特性を調査した結果をまとめた。

人体内から単離されたK12株(ATCC10798株)は、軟寒天培地上で運動能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通常、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すことがわかった。この原因として、モーター回転特性の変化や、べん毛繊維の変異などが予想された。本研究ではモーター回転特性について、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株とでは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変異が、ATCC10798の特異な運動の要因であった。

第五章では、本研究で得られた主となる結論をまとめ、べん毛モーターは機械刺激や共役イオン濃度といった外環境に応じて適切に回転出力を制御していることを示した。

## 略語一覽

Amp	ampicillin
CCCP	carbonyl cyanide <i>m</i> -chlorophenylhydrazone
CCW	counterclockwise
Cm	chloramphenicol
CW	clockwise
DMSO	dimethyl sulfoxide
fps	frames per second
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
Km	kanamycin
MCP	methyl-accepting chemotaxis protein
MTB	motility buffer
OD	optical density
PGB	peptidoglycan binding
PLL	poly-L-lysine
QPD	quadrant photodiode
RCD	rate of change of direction
ROI	region of interest
rpm	rotations per minute
TB	tryptone broth
TIRF	total internal reflection fluorescence
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
T-S	torque-speed
WT	wild type



## 第一章

### 序論

生物は、めまぐるしく変わる外環境に対して柔軟に適応しながら生存する。この環境変化は、比較的短い秒や分といった単位で起こることもあれば、年やそれ以上の長い単位で起こる場合もある。前者であれば、生物はタンパク質に内包した機能制御や遺伝子の発現制御で対応するが、後者であれば遺伝子の配列自体の変化、すなわち進化で対応することになる。さらに、生物が有利に生存するためには、自身にとってより好ましい環境を探索するための運動性が重要になってくる。本研究では、モデル生物である大腸菌がもつ運動器官、べん毛モーターについて着目し、モーターの回転を制御するタンパク質の有無がモーターの回転特性に与える影響や、人為的もしくは自然発生的に生じた遺伝子配列の変化がモーターの機能に与える影響について解析した。この章では、べん毛モーターの基本的な性質について、歴史的な経緯を含めて簡潔に述べる。

### 細菌運動を司るべん毛モーター

運動性細菌の多くは、べん毛とよばれるらせん状の細長い繊維を持ち、それらを回転させることで水中を遊泳する(Berg & Anderson, 1973; Larsen et al., 1974; Silverman & Simon, 1974)。大腸菌は、左巻きらせん状のべん毛を5~6本菌体外に伸ばし、それらをべん毛側から見て反時計回り(CCW)方向に回転させることで繊維を束ねて、菌体の長軸方向に推進する力を生み出す("run"とよぶ) (Macnab, 1977)。一方、1本から数本のべん毛が時計回り(CW)方向に回転するとべん毛の束が解けて、菌体はその場でランダムに方向転換する("tumble"とよぶ) (Macnab, 1976)。この回転方向のスイッチングは、走化性シグナル伝達機構によって制御されており、細菌は環境刺激に迅速に応答して運動機能を調節することができる(Alon et al., 1998; Parkinson, 1978; Parkinson & Houts, 1982)。べん毛繊維の回転は、その根元の細胞膜中に存在するべん毛モーターによって駆動される(Berg & Anderson, 1973)。繊維とモーターはユニバーサルジョイントとしてはたらくフックによって連結されており、モーターの回転は損失を最小限にして繊維へと伝えられる(Samatey et al., 2004)。べん毛モーターは、MSリング、Cリング、Pリング、Lリングおよびロッドとよばれる軸構造からなり、回転子を構成するCリングとモーター

のトルクを発生させる固定子ユニットとの相互作用によって回転モーターとして機能する、直径約45 nmのナノマシンである(Fig. 1-1, 1-2) (Francis et al., 1994; Fujii et al., 2017; Kawamoto et al., 2013; Tan et al., 2021; Thomas et al., 1999). 大腸菌の固定子ユニットは、5分子のMotAと2分子のMotBからなる膜タンパク質複合体である(Fig. 1-3) (Deme et al., 2020; Santiveri et al., 2020). MotAMotB複合体は、細胞膜を介した電気化学ポテンシャル差に従ってプロトンを細胞内に流入させるイオンチャネルとしても機能し、その際に得られる自由エネルギーをモーターの回転力に変換するトルク発生ユニットである(Blair & Berg, 1990; Manson et al., 1977; Matsuura et al., 1977). それぞれの固定子ユニットは1つで独立に機能することもできるが、複数個のユニットがモーターに組み込まれて同時に機能することで、より大きなトルクを生み出すことができる(Blair & Berg, 1988; Block & Berg, 1984). Cリングは、FliG, FliMおよびFliNから構成されており、このうちFliGが固定子ユニットのMotAと直接相互作用することによりモーターのトルクが発生する(Lloyd et al., 1996; Zhou et al., 1998).

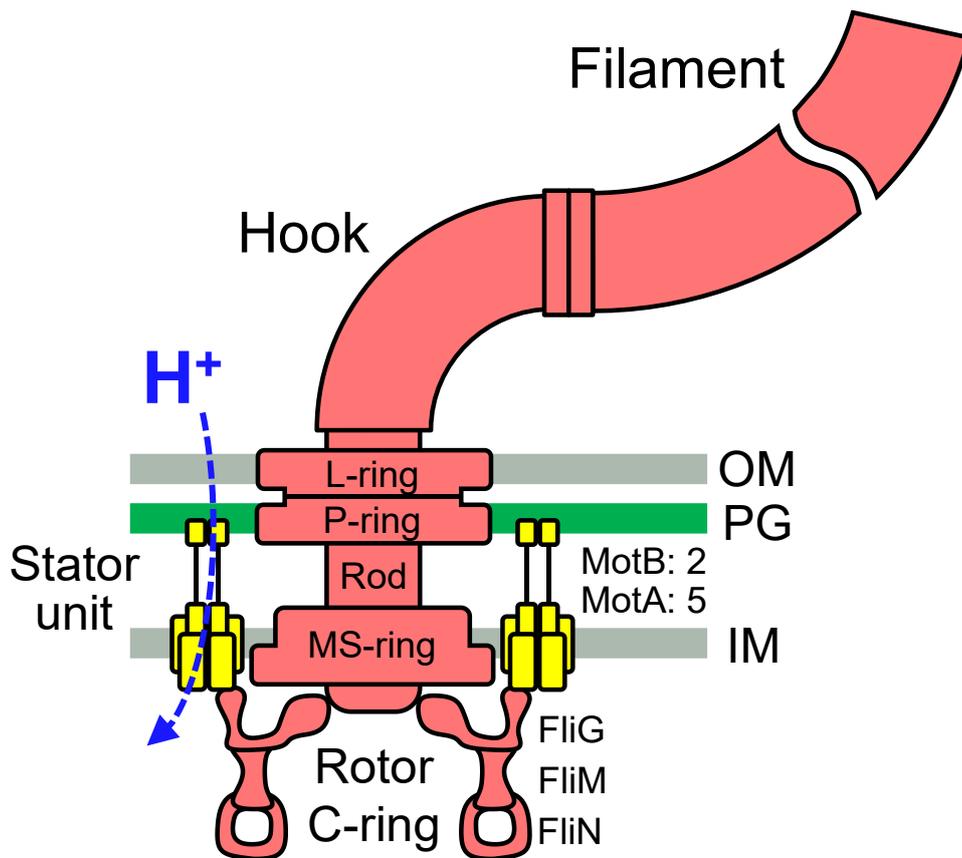


Fig. 1-1. べん毛モーターの模式図

べん毛モーターは細胞膜を貫通する軸構造からなり、回転子を構成するCリングと固定子ユニットの相互作用によって、回転モーターとして機能する。固定子ユニットは、細胞膜を介した共役イオンの流れを利用して回転トルクを生み出す。モーターの回転は、ユニバーサルジョイントとして機能するフックによって繊維へと伝えられる。OM, PG, IMはそれぞれ、外膜(outer membrane), ペプチドグリカン層(peptidoglycan), 内膜(inner membrane)を表す。

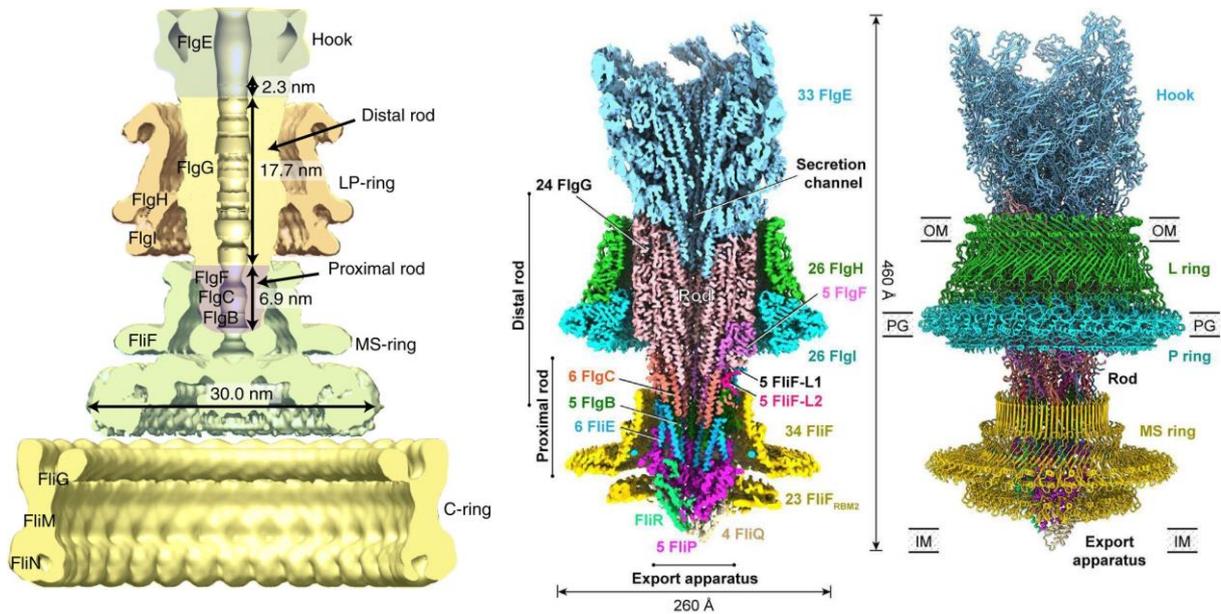


Fig. 1-2 ベン毛モーターのリング構造とロッド・フックの構造

電子顕微鏡観察技術の発達により、ベン毛モーターのリング構造を構成する各タンパク質の分子数といった、詳細な構造情報が近年明らかになってきている。

(左) Fujii et al. (2017)より引用 (右) Tan et al. (2021)より引用

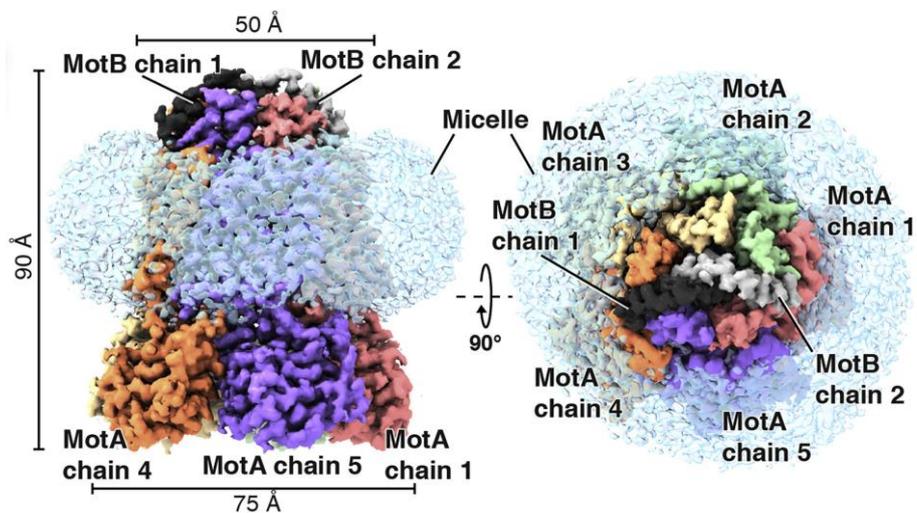


Fig. 1-3. 固定子ユニットの構造

クライオ電子顕微鏡を用いて解明された、固定子ユニットの構造。5分子のMotAと2分子のMotBが1つのユニットを構成する。また、この構造情報をもとに、共役イオンの結合によりMotBを軸としてMotAが回転することで、モーターの回転が駆動されるという"固定子ユニット回転モデル"が提唱されている。Santiveri et al. (2020)より引用

## べん毛モーターの入力エネルギー

べん毛モーターの駆動力である細胞膜を介した電気化学ポテンシャル差は、共役イオンの濃度勾配と膜電位差の和で定義される(Sowa & Berry, 2008). 固定子ユニットが使用する共役イオンの選択性は非常に厳密であり、大腸菌が持つ固定子ユニットMotAMotBはプロトン( $H^+$ )のみを透過させる $H^+$ 駆動型である. モーターの機能を評価するためには、入力エネルギーを制御できると都合が良いが、環境中の $H^+$ 濃度を変化させることはpHを変えることを意味する. pHの変化は、べん毛モーターのみならず細胞自体への様々な影響があるため、モーター駆動力の制御には適さない. そこで、べん毛モーターに対する入力エネルギーの制御には、ナトリウムイオン( $Na^+$ )駆動型モーターを持つ好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌や *Vibrio* 属細菌がよく用いられてきた(Yorimitsu & Homma, 2001).

海洋細菌 *Vibrio alginolyticus* は、片側の細胞極に一本のみの極べん毛と、細胞の側面に多数の側べん毛をもつ. 極べん毛モーターは $Na^+$ 駆動型であるが、側べん毛モーターは $H^+$ 駆動型である(Atsumi et al., 1992). 極べん毛モーターの回転を駆動するのは $Na^+$ 駆動型固定子ユニットPomAPomBであり、溶液中の $Na^+$ 濃度依存的に発生トルクが変化する(Asai et al., 1997; Liu et al., 1990; Sowa et al., 2003). また、 $Na^+$ チャネルの阻害剤であるアミロライドやフェナミルなどが作用することが知られている(Atsumi et al., 1990; Kojima et al., 1999). さらに、本来 $H^+$ 駆動型の固定子ユニットMotAMotBをもつ大腸菌から *motAmotB* 遺伝子を欠失させ、*V. alginolyticus* のPomBと大腸菌のMotBとのキメラタンパク質PotBをPomAと同時に菌体内で発現させると、 $Na^+$ 駆動型の固定子ユニットとして大腸菌べん毛モーターに組み込まれて機能することが報告されている(Fig. 1-4) (Asai et al., 2003). このPomAPotBモーターは、大腸菌べん毛モーターへの入力エネルギーを制御することが可能なツールとして有用であり、後述する大腸菌を用いて構築されてきた様々なモーター回転アッセイ法を組み合わせることで、べん毛モーターの機能解析において重要な役割を担うものである(Lo et al., 2013; Sowa et al., 2014; Sowa et al., 2005).

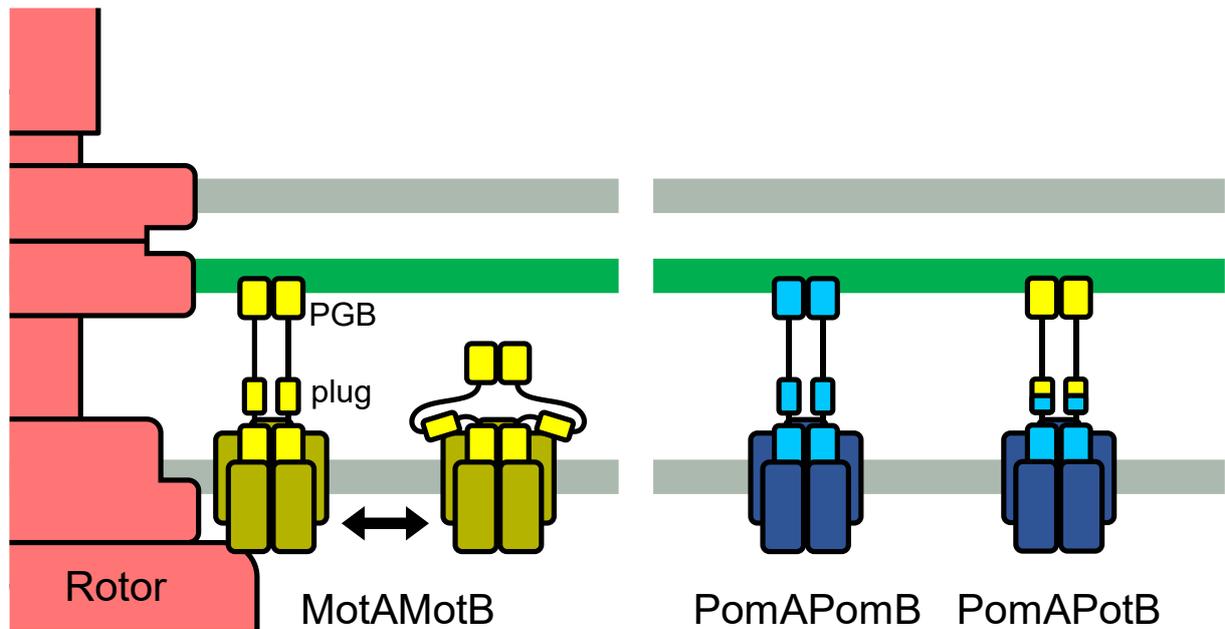


Fig. 1-4. 固定子ユニットの構造変化と種類

大腸菌は、 $H^+$ 駆動型固定子ユニットMotAMotBをもつ。固定子ユニットはモーターに組み込まれる際に、MotBのPGBドメインがペプチドグリカン層に結合して固定される。この構造変化によりMotBのplug領域が引き伸ばされて、固定子ユニットはイオンチャネルとして機能する。モーターから解離する際は、plug領域が折りたたまれてMotAと結合し、チャネルとしての機能が失われて細胞膜上を拡散する。

*V. alginolyticus*がもつ固定子ユニットPomAPomBは $Na^+$ 駆動型であるが、これをそのまま大腸菌体内で発現させても機能しない。PotBは、MotBのPGBドメインとPomBの膜貫通(TM)ドメインをもつキメラタンパク質であり、これを大腸菌体内でPomAと共発現させることで、PomAPotB複合体が形成され $Na^+$ 駆動型固定子ユニットとして機能する。

## べん毛回転の制御と走化性

べん毛モーターの回転スイッチングは、回転子のスイッチ複合体 FliMN とシグナル伝達タンパク質 CheY の結合によって、FliG の構造が変化することで起こる (Fig. 1-5) (Dyer et al., 2009; Sarkar et al., 2010). CheY 非結合時にはモーターは CCW 方向に回転し、菌体は直進運動 (run) をする. CheY が細胞内走化性シグナル伝達によりリン酸化されると FliMN との親和性が上昇するため、モーターが CW 方向に回転して菌体は方向転換 (tumble) をおこなう. この時、細菌はグルコースやアミノ酸などの誘引物質や、グリセロールやニッケルイオンなどの忌避物質の時間的な濃度変化を感知し、CheY のリン酸化レベルを調節することにより、方向転換頻度 (tumble frequency) を制御する (Cluzel et al., 2000). 具体的には、MCP とよばれる膜タンパク質が細胞外の忌避物質を受容すると、CheW を介して MCP と結合しているヒスチジンキナーゼ CheA が自己リン酸化し、そのリン酸基はレスポンスレギュレーター CheY に転移され、細胞内のリン酸化型 CheY (CheY-P) の濃度が上昇する (Borkovich et al., 1989; Borkovich & Simon, 1990; Hess et al., 1988a; Ninfa et al., 1991; Oosawa et al., 1988). 一方、誘引物質を受容すると CheY はリン酸化を受けないため、CheZ による CheY-P の脱リン酸化が進行する (Hess et al., 1988b; Wolfe et al., 1987). また、さまざまな濃度条件下における誘引物質や忌避物質のわずかな濃度変化に迅速に応答するため、細菌は環境の条件に徐々に適応することでそれを実現する. 適応は、メチル化酵素 CheR と脱メチル化酵素 CheB による MCP の感度調節である (Duntzen & Koshland, 1991; Kort et al., 1975). MCP にはメチル化を受ける部位が 4 つ存在し、メチル化された数に応じて感度が増加する (Borkovich et al., 1992). リン酸化された CheA は、CheY だけでなく CheB にもリン酸基を転移させる (Hess et al., 1988a). CheB はリン酸化を受けると活性が増し、MCP のメチル化レベルを低下させる. すると、MCP は誘引刺激に対する感度を増させる. 反対に忌避刺激の少ない環境では CheB はリン酸化を受けず、CheR の活性の方が優位となるため、MCP のメチル化レベルが増し、誘引刺激に対する感度が低下する.

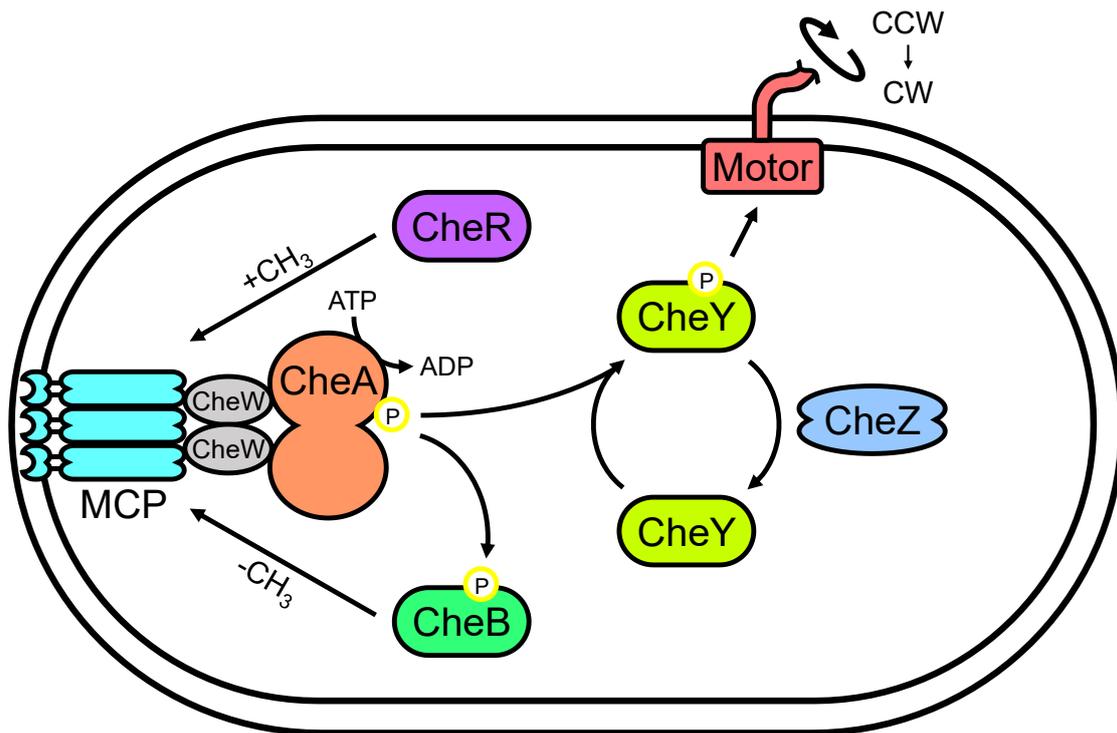


Fig. 1-5. 大腸菌走化性シグナル伝達機構の模式図

MCPが忌避物質を受容すると、CheAが自己リン酸化し、CheYにリン酸基を転移する。CheY-Pは、べん毛モーターの回転子 FliMN に結合し、モーターの回転をCCW方向からCW方向へとスイッチさせる。MCPが誘引物質を受容すると、CheAは不活性化するためCheZによりCheYの脱リン酸化が進行する。また、CheAはCheBにもリン酸基を転移させる。CheB-PはMCPの脱メチル化酵素としてはたらき、MCPの誘引刺激への感度を上昇させる。CheA不活性化時は、CheRによるMCPのメチル化が進行し、誘引刺激への感度を低下させる。

## べん毛モーターの回転計測

直径20 nm程度のべん毛繊維の回転は、通常の光学顕微鏡では観察できない。1個のモーターの回転速度を求める方法として、テザードセルアッセイとビーズアッセイが主に用いられる(Fig. 1-6)。テザードセルアッセイとは、1本のべん毛をガラスなどの固体表面に付着させると、モーターのトルクにより菌体が回転するため、その回転を計測するものであり、べん毛モーターが回転モーターであることの直接的な証拠となった(Silverman & Simon, 1974)。ビーズアッセイとは、菌体を固体表面に接着させて、べん毛回転のマーカースとして1  $\mu\text{m}$ 程度のサイズのプラスチックビーズをべん毛繊維に付着させ、ビーズの動きを顕微鏡下で捉えるものである(Ryu et al., 2000)。通常、このようにガラスや粒子をべん毛に付着させて固定するためには抗体等を使用する必要があるが、stickyフィラメントとよばれる変異型べん毛繊維を用いると実験操作を容易にすることができる。全長498残基の大腸菌FliCのうち、べん毛繊維の親水性表面を構成する245~301残基を欠失させることにより、疎水性残基が表面に露出したstickyフィラメントは、さまざまな表面に自発的に付着する(Berg & Turner, 1993; Kuwajima, 1988)。本研究においても、このstickyフィラメントを利用してテザードセルアッセイとビーズアッセイをおこなった。

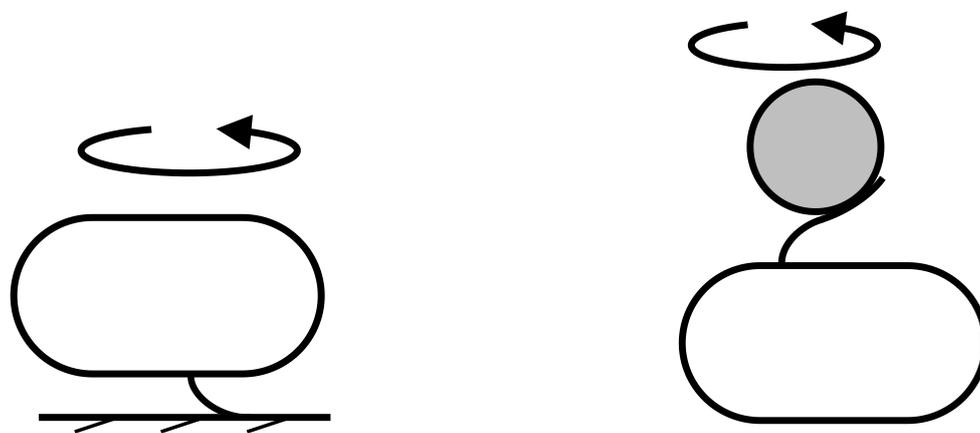


Fig. 1-6. テザードセルアッセイとビーズアッセイ

微小なモーターの回転を簡便に観察することが可能な、従来の研究で利用されてきた代表的な手法。(左) 1本のべん毛をガラスに付着させ、モーターによって駆動される菌体の回転を観察するテザードセルアッセイ。(右) 菌体をガラスに固定し、べん毛繊維に直径1  $\mu\text{m}$ 程度のプラスチックビーズを付着させ、その回転を観察するビーズアッセイ。使用するビーズの大きさを変えることで、モーター回転時の負荷を制御することができる。

## べん毛モーター回転トルクの制御

細菌は様々な環境を探索するため、化学物質に対する走化性応答だけでなく、粘性等に起因する機械刺激に対しても、べん毛モーターは応答する。このようなメカノセンシングの仕組みのひとつに、べん毛の回転にかかる負荷を感知して、モーターに組み込まれる固定子ユニットの数を調整する機能がある(Lele et al., 2013; Tipping et al., 2013). 固定子ユニットMotAMotB複合体がべん毛モーターに組み込まれると、MotBのplug領域とよばれる折りたたまれた領域が伸長し、ペプチドグリカン結合ドメイン(PGBドメイン)がペプチドグリカン層と結合する(Fig. 1-4) (Kojima et al., 2018). この構造変化によって、固定子ユニットの共役イオンの透過経路が露出するため、イオンチャネルとしての機能を果たせるようになる(Hosking et al., 2006). 固定子ユニットがモーターから外れ解離する時は、このplug領域が再び折りたたまれ、PGBドメインがペプチドグリカンから外れることによって固定子ユニットの機能がオフになり、細胞膜上を拡散するようになる(Leake et al., 2006). このように固定子ユニットを交換することによって、べん毛モーターは自身のトルクを調節することが可能であり、さらにその交換レートを環境に応じて変化させることで、同時に機能する固定子ユニットの数を変化させる。固定子ユニットがモーターに組み込まれるレートは、細胞膜上を拡散する固定子ユニットの濃度に依存するためほぼ一定であるが、モーターから解離するレートは、独立に機能する固定子ユニットが生み出すトルクに依存するCatch bond機構が提案されている(Nord et al., 2017a). したがって、宿主体内のような高粘度の環境下では、より多くの固定子ユニットがひとつのべん毛モーターに組み込まれ、大きなトルクを生み出すことによって効率よく遊泳することができる。反対に、水中のような低粘度の環境下では、同時に機能する固定子ユニットの数は少なく調節される。

## べん毛モーター固定子ユニット数の定量

大腸菌べん毛モーターに組み込まれる固定子ユニットの数は、電子顕微鏡による観察では10~12個であると報告されている(Khan et al., 1988). しかし、実際に回転しているべん毛モーターにおいても、この観察結果と同様に10個程度の固定子ユニットが同時に機能しているのかどうかを明らかにするためには、べん毛モーターの回転を顕微鏡で観察しながら固定子数を定量する必要がある。これを実験的に定量するための手法に

は、固定子ユニットに蛍光タンパク質を融合させて蛍光強度を計測する方法と、1分子のモーターの回転計測をしながら固定子ユニット組み込み数を制御する方法がある。

蛍光観察によるモーター構成素子数の定量には、主にテザードセルアッセイと全反射照明蛍光法(TIRF)を組み合わせた方法が用いられる。その理由は、菌体の回転中心にモーターが存在することが明確であり、さらにTIRFを使用することで、べん毛を付着させたガラスから100 nm程度のモーターが位置する距離までに限定した励起光の照射が可能なことである(Funatsu et al., 1995; Tokunaga et al., 1997)。これにより、大腸菌べん毛モーターが回転する際には、約11個の固定子ユニットが同時に組み込まれて機能することが報告されている(Leake et al., 2006)。

べん毛モーターの回転計測中に固定子ユニットの組み込み数を変化させる実験手法には、遺伝的制御による固定子タンパク質の発現量の調節と、モーター入力エネルギーの制御、モーター回転にかかる負荷の急激な変化の3つが主に挙げられる。遺伝的制御による固定子発現量の調節は、大腸菌のゲノムから固定子タンパク質をコードする*motAmotB*遺伝子を欠失させ、*motAmotB*遺伝子をコードする発現調節可能なプラスミドで形質転換した株を使用する。モーター回転計測中に固定子ユニットの発現を誘導することで、徐々にユニットがモーターに組み込まれ、その数に応じて回転速度が段階的に上昇する様子を観察する(Fig. 1-7)。固定子ユニットは独立に機能するため、回転速度の1つの段階的上昇は、1つのユニットが組み込まれたことを意味する。回転速度が徐々に復帰していく様子から、この実験手法はリザレクションとよばれる。リザレクションとビーズアッセイを組み合わせると、使用するビーズの大きさを変えてモーター回転時の負荷を制御できるため、負荷に応じた固定子ユニットの組み込み効率を解析することが可能である。実際に、直径1  $\mu\text{m}$ のビーズを使用した研究では蛍光観察による結果と同様に、最大で少なくとも11個の固定子ユニットが段階的に組み込まれたことが報告された(Reid et al., 2006)。また、入力エネルギーによる制御については、主に $\text{Na}^+$ 駆動型固定子ユニットの組み込み過程が解析されてきた(Fukuoka et al., 2009)。共役イオンである $\text{Na}^+$ を含まない溶液から $\text{Na}^+$ を含む溶液に交換すると、リザレクションと同様の速度変化を見ることができる(Sowa et al., 2014)。さらに、モーターにかかる負荷を急激に大きくすることによっても、リザレクションと同様の速度変化を記録することができる。すなわち、モーター回転時の負荷が低い条件下では、組み込まれる固定子ユニットの最大数は少なく調節される(Lele et al., 2013; Tipping et al., 2013)。

*V. alginolyticus*の極べん毛モーターについては、13個の固定子ユニットが安定に組み込まれていることが、クライオ電子顕微鏡で観察されている(Zhu et al., 2017). しかし、前述のように大腸菌べん毛モーターは固定子数を10~12個と変化させることが示されている(Khan et al., 1988). これは、*Vibrio*菌の極モーターは遊泳中でも安定して最大数の固定子ユニットを組み込むが、大腸菌べん毛モーターは柔軟に固定子数を変化させることを反映している可能性がある.

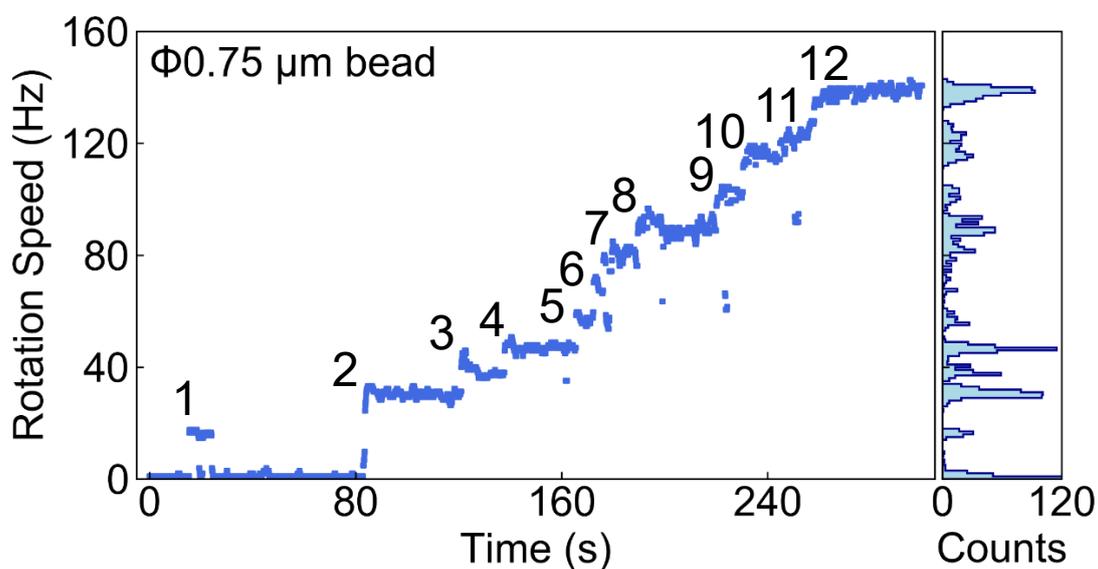


Fig. 1-7. リザレクション実験による固定子ユニット数の定量

モーター回転計測中に固定子ユニットの発現を誘導することで、段階的な速度変化を観察することができる. 1段階の速度レベル上昇は、1個の固定子ユニットが組み込まれたことを意味する. また、ヒストグラム上のピークは各速度レベルを反映しており、ピークの数のカウントすることで固定子数を見積もることができる.

## モーター基本特性

回転モーターの特性は、Torque-Speed curve (T-S curve)とよばれるトルクと回転速度の関係で決定される。大腸菌べん毛モーターは、高負荷低速領域からある程度の速度領域までは緩やかにトルクを減少させていくが、あるポイントを超えると急激にトルクが減少し、約300 Hzでゼロトルクとなる関係が示されている(Berg & Turner, 1993; Chen & Berg, 2000)。この変曲点は"knee" speedとよばれる。さらに、このようなトルクと速度の関係から、べん毛モーターはパワーストローク機構によって回転しているというモデルが提案されている(Berry & Berg, 1999)。さらに、リザレクション実験と組み合わせることで、組み込まれた固定子ユニット数ごとのT-S curveを計測し、パワーストローク機構を仮定してモデル計算したところ、モーターのduty ratioは1に近く、1つのユニットのみで最大速度を生み出すことが可能であると予想された(Ryu et al., 2000)。

近年、直径100 nm以下のサイズの金ナノ粒子をモーター回転のマーカーとして使用した、極めて低い負荷条件下でのべん毛モーター回転計測系が確立された。べん毛モーター回転時の負荷の減少に伴い、組み込まれる固定子ユニットの数は減少するという、それまでの研究結果を元にしたモデルでは、大腸菌べん毛モーターはほぼ無負荷条件下において、1つの固定子ユニットのみで最大300 Hzの速度を生み出すことが可能であり、組み込まれたユニットの数に依存しないと考えられていた。しかし、そのような条件下での固定子ユニットの数についての議論は分かれており、1つのユニットのみで最大速度を生み出すことができるという報告(Wang et al., 2017; Yuan & Berg, 2008)と、最大速度を生み出すためには複数の固定子ユニットが同時に機能する必要があるという報告がある(Lo et al., 2013; Nirody et al., 2016; Nord et al., 2017b)。また、従来の系では懸念があった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、金ナノ粒子を抗体を介さず直接的に結合させる手法がサルモネラ菌のモーターで報告された(Nakamura et al., 2020)。具体的には、べん毛フックを長く伸長させるようなFliKの変異に加えて、直線的なフックを構成する変異型フックタンパク質FlgEにCys残基を挿入し、Cys残基のチオール基に直接金ナノ粒子を結合させる(Fig. 1-8)。この報告では、極低負荷条件下ではモーターの回転速度は不安定であり、段階的な速度変化が起こることや、固定子ユニットを菌体内で過剰発現させることで速度が安定することが示されている。これは、最大速度を生み出すには複数の固定子ユニットが必要であり、固定子ユニットの結合解離によって段階的な

速度変化が起こっていると説明されている。さらに近年、回転するテザードセルに対して外部からトルクをかけることのできる回転電場法を用いて、モーター回転時の負荷を低減させた条件下で、組み込まれた固定子ユニットの数に応じたT-S curveが計測された(Sato et al., 2019)。この報告においても、無負荷条件下でのモーターの回転速度は固定子の数に依存し、最大速度付近で回転するモーターのduty ratioは低いことが示されている。

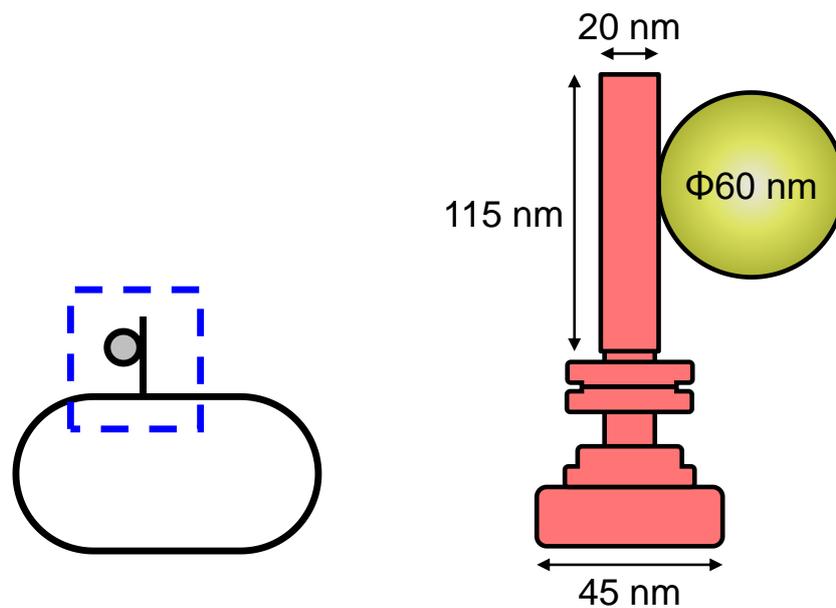


Fig. 1-8. ストレートフックシステムによる極低負荷条件下モーター回転計測系

長く伸ばさせた直線形状のフックをもたせ、さらにフックの表面にシステイン残基が挿入された大腸菌変異体を作製した。このシステインのチオール基に直径60 nmの金ナノ粒子を共有結合させた。この手法は従来のビーズアッセイ法と比較して、細胞外構造体の回転によるモーターへの負荷が極限まで低減されており、モーター回転子と固定子ユニットの相互作用によるモーターのダイナミクスをより直接的に評価することができる。(左) ストレートフックに微小な粒子を結合させた模式図。(右) 左の青い点線部分の拡大図。サルモネラ菌から単離されたこの変異型フックの長さは約115 nmであることが電子顕微鏡で観察されている(Nakamura et al., 2020)。

## モーター制御因子

べん毛モーターのトルクは、同時に機能する固定子ユニットの数だけではなく、FliLやYcgR(Hou et al., 2020; Paul et al., 2010; Suchanek et al., 2020; Wang et al., 2018)といった制御因子にも依存していることが近年明らかとなってきた。fliL遺伝子は大腸菌やサルモネラ菌のゲノムにおいて、モーター回転子を構成するタンパク質をコードするfliMやfliNと同一オペロンの最初の遺伝子である(Raha et al., 1994)。にもかかわらず、FliLの詳細な機能については明らかとなっていない。これまでのFliLについての主な報告を以下に挙げる。

FliLがメカノセンサータンパク質であることは、*Proteus mirabilis*を用いた研究で最初に示された。*P. mirabilis*は高粘度条件下での培養時に細胞を伸長させるが、fliL遺伝子を欠失させた菌株は培養時の粘度条件によらず一定の割合で伸長した細胞が観察される(Belas & Suvanasuthi, 2005)。また、FliLは運動機能に必須ではないが、培養時の表面粘度や温度を感知して運動機能を調節することや、べん毛繊維を形成するFlaAの発現を正に制御する可能性が示されている(Cusick et al., 2012; Lee & Belas, 2015)。サルモネラ菌では、べん毛構築には不要であるが、モーターが高いトルクを発生させた際のロッドの構造安定性を支えていることがわかっている(Attmannspacher et al., 2008; Schoenhals & Macnab, 1999)。また、ビーズアッセイでのモーター回転速度に影響を与えることや、生化学的なアッセイによりMSリングを構成するFliFや固定子のMotBと強く相互作用することが示されている(Partridge et al., 2015)。*Caulobacter*や*Rhodobacter*においては、運動性に必須であることが示されている(Jenal et al., 1994; Suaste-Olmos et al., 2010)。*Borrelia*では、固定子ユニットと回転子の間にFliLが位置していることがクライオ電子顕微鏡で観察され、FliLがべん毛モーターの構成要素のひとつであることが示されている(Motaleb et al., 2011)。*V. alginolyticus*では、固定子タンパク質PomBのplug領域周辺に結合することや、高粘度環境下でのトルク発生に重要であることが示されている(Lin et al., 2018; Zhu et al., 2015)。一方大腸菌においては、ビーズアッセイで計測されたモーターのトルクにはFliLは影響を与えていないことが報告されている(Chawla et al., 2017)。2019年に、*V. alginolyticus*でFliLの結晶構造解析がおこなわれ、広い生物種で保存されたメカノセンシングに関与するストマチンと類似した構造をもつ膜タンパク質であることが報告された(Takekawa et al., 2019)。また、結晶中で10分子のFliLがリング状の構造をとっており、その内径が固定子ユニットの直径と一致すること

から、固定子ユニットを構成する2分子のBサブユニットの周囲をFliLリングが取り囲んで機能するモデルが提唱されている。さらに最近では、*Helicobacter pylori*においてもFliLの構造が解かれ、9分子のFliLがそれぞれの固定子ユニットを取り囲んで機能しているようであり、運動性に必須であることが報告された(Tachiyama et al., 2022)。以上のように、FliLはべん毛モーター構成要素として多くの菌種で普遍的であり、その機能に関する情報も蓄積されつつある。FliLはメカノセンシングに関わることは確かなようであるが、その詳細な機能は明らかとなっていない。

## 本研究の目的

本研究の目的は、細菌べん毛モーターがどのようにして外環境に応じて機能を調節しているのかを解明することである。その一環として、大腸菌べん毛モーターのメカノセンシングにFliLが果たす役割を決定することや、入力エネルギーが制限された条件下で機能できるように変異を獲得した固定子ユニットの特性の解明を目指した。

べん毛モーターの機能解析をおこなうため、本研究では主にモーターにかかる負荷や入力エネルギーを変化させた条件で、モーターの回転を計測した。大腸菌FliLについては、様々な負荷条件下で計測されたモーター回転速度にFliLが与える影響を解析し、その機能を明らかにした。また、キメラ固定子ユニットPomAPotBを実験室内で人為的に進化させた変異体や新規アミロライド誘導体を用いた解析により、固定子ユニットの共役イオン選択や組み込み効率を柔軟に制御していることを明らかにした。

## 第二章

### 大腸菌べん毛モーターの負荷依存的なトルク制御機構を支えるFliL

#### 1. 背景および目的

べん毛モーターの負荷依存的なトルク制御機構を理解するためには、様々な負荷条件下でべん毛モーターの回転を計測する必要がある(Chen & Berg, 2000; Ryu et al., 2000; Sowa et al., 2003). モーターへの負荷が大きい条件の計測は、モーター回転の観察に使用する目印を大きくすることや、溶液の粘度を高くすることなどによって、比較的容易に達成できる。一方、モーターへの負荷が小さい条件を満たすような計測には工夫が必要である(Yuan & Berg, 2008). 本研究では、学部と修士で構築した極低負荷条件下で大腸菌べん毛モーター回転計測を可能にする実験系を、さらに効率的に実験できるように改良した。本研究で用いた具体的なシステムを以下に簡潔に述べる。まず、長く伸長した直線形状のべん毛フックに、Cys残基のチオール基を介して金ナノ粒子を結合させるという、本稿の序論でも紹介したサルモネラ菌でのシステムを大腸菌に導入した(Nakamura et al., 2020). これにより、金ナノ粒子を効率よくフックに結合することが可能となり、べん毛繊維などの細胞外構造物がモーター回転時の負荷に与える影響を最小限にした。また、通常の位相差顕微鏡では観察することが困難な金ナノ粒子を高感度に検出するために、本研究ではレーザー暗視野顕微鏡を構築した(Sowa et al., 2010; Ueno et al., 2010). これは、金ナノ粒子が緑色光を後方に強く散乱させるという特性を生かしたものであり、べん毛フックに結合させた金ナノ粒子の動きを高速カメラで撮影することによって、高時空間分解能でモーターの回転を計測することが可能である。

FliLはストマチンと相同性をもつことが、ビブリオ菌FliLの結晶構造解析により報告された(Fig. 2-1) (Takekawa et al., 2019). ストマチンはヒト赤血球の膜タンパク質であり、チャンネルの活性を制御してカチオンの過度の流れを防ぐ機能をもつ(Lapatsina et al., 2012). マウスの神経細胞に存在するストマチン様タンパク質STOML3は、触覚を感知するイオンチャンネルであるPiezoタンパク質の必須サブユニットである(Poole et al., 2014; Wetzel et al., 2007). 線虫 *Caenorhabditis elegans* がもつストマチン様タンパク質Mec-2

は、軸索に分布するメカノセンサーチャンネルと結合して機能し、微小管にかかる力を感知してチャンネル開口を引き起こす機能があると報告されている(Huang et al., 1995). このように、ストマチンファミリーに属するタンパク質は、メカノセンシングによりチャンネルの開閉を制御する機能をもつと考えられている. 実際に、サルモネラ菌やビブリオ菌などでは、高負荷条件下でべん毛モーターのトルク発生を支援すると報告されており、イオンチャンネルである固定子ユニットの機能を補助していると考えられている(Attmannspacher et al., 2008; Partridge et al., 2015; Takekawa et al., 2019; Zhu et al., 2015). しかし、大腸菌 FliLの機能は、複数の報告はあるものの未解明である. ビーズアッセイを用いて高負荷条件下で計測されたモーターの回転速度は、FliLを欠損させた株でもほとんど変化しないことが報告されている(Chawla et al., 2017). また、モーターにかかる負荷を急激に上昇させることでリザレクション実験をおこなった研究においても、固定子ユニットの組み込みに相当する回転速度の段階的な上昇の幅は、FliL欠損株でも変化しないと報告されている(Lele et al., 2013). 一方で、液中での菌体の遊泳速度にはわずかに差があることが示されている. このように、FliLはべん毛モーター構成要素として普遍的であるにもかかわらず、菌種間で異なる機能をもち、その実態は未解明である. FliLの機能を決定することは、他のストマチン様タンパク質の機能理解にもつながるだけでなく、生体分子がもつメカノセンシング機構への理解に大きく寄与すると考えられる.

本研究では、大腸菌べん毛モーターにおけるFliLの機能を明らかにするため、*fliL*遺伝子を欠失した株を作製し、高負荷から低負荷までの広い負荷条件下でモーターの回転を計測した. 過去の報告では、高負荷低速領域から中程度の負荷の"knee" speed 周辺までの領域におけるT-Sカーブが示されているが、本研究で構築された金ナノ粒子の観察系とストレートフックのシステムを用いることで、より低い負荷領域までの計測が可能である. 本章では、極低負荷条件下でモーターの回転を計測する実験系の評価と、FliLの有無によるモーター回転トルクへの影響について述べる.

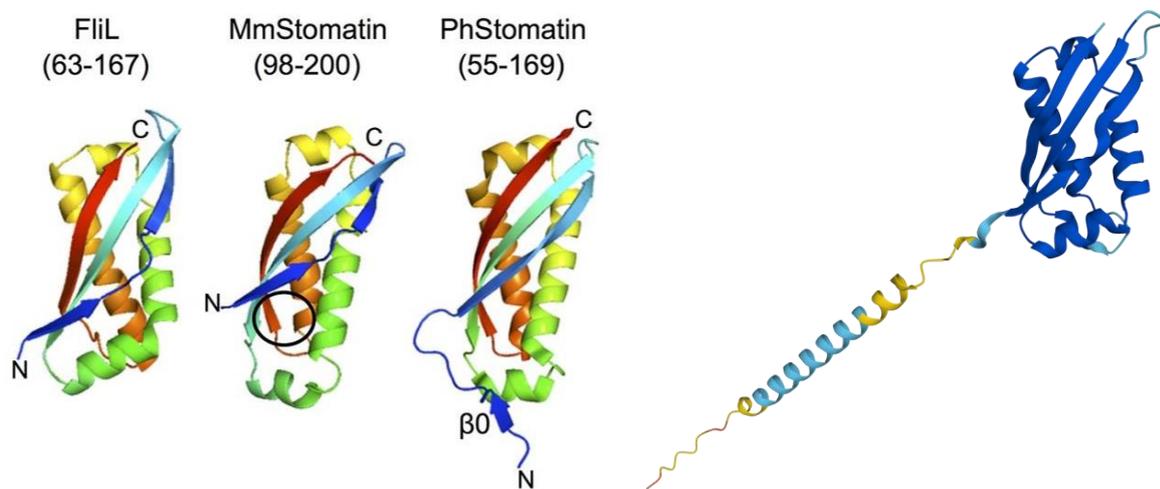


Fig. 2-1. FliLタンパク質の構造

(左) *V. alginolyticus*極べん毛モーターのFliL C末端ドメインの構造。ストマチンファミリータンパク質と類似した構造をもつ。Takekawa et al. (2019) から引用。

(右) AlphaFold2[DeepMind]が予測した、大腸菌FliLの構造。AlphaFold2は、AIを利用した構造予測プログラムであり、アミノ酸配列情報からタンパク質の立体構造を精度よく推定することが可能である。色は予測の信頼性を表しており、青、水色、黄色、赤の順で、それぞれ90%以上、70%以上、50%以上、50%以下の信頼度を意味する。

## 2. 実験材料と方法

### 菌株とプラスミド, 培養条件

本研究で使用した菌株をTable 2-1, プラスミドをTable 2-2, DNAプライマーをTable 2-3, 培地をTable 2-4, バッファーをTable 2-5に示した. 菌株作製目的以外の計測実験に用いた菌株は, すべて大腸菌RP437株由来である. プラスミドの調製やコンピテントセル作製, フロースンストック作製時はLB培地を使用し, 計測実験時はTB培地を使用した. 培地には必要に応じて, 50 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Chloramphenicol, 50 µg/ml Kanamycin, 1 mM Arabinose, 300 µM IPTGを加えた. 菌の生育状況は, 分光光度計(GeneQuant 1300 [Biochrom])を用いて波長600 nmの菌液の光学濃度(OD<sub>600</sub>)を測定して確認した.

Table 2-1. 本研究で使用した菌株

Strain	Genotype or Description	Reference
RP437	wild type for motility	Parkinson & Houts, 1982
SYC9	$\Delta cheY$	Lab stock
SYC33	$\Delta cheY fliC$ -sticky	Lab stock
SHU172	$\Delta cheY fliK2798 flgE_{+GSS+3Cys} fliC::tetRA$	This study
SHU174	$\Delta cheY fliK2798 flgE_{+GSS+3Cys} \Delta fliC \Delta motAmotB$	This study
SHU181	SYC33 $\Delta fliL$	This study
SHU292	SHU172 $\Delta fliL$	This study
SHU348	$\Delta fliL$	This study
SHU350	$\Delta cheY \Delta fliL$	This study
JHC36	$\Delta motAmotB \Delta cheY \Delta pila fliC$ -sticky	Inoue et al., 2008
SHU354	JHC36 $\Delta fliL$	This study
DH5 $\alpha$	host for cloning	Grant et al., 1990

Table 2-2. 本研究で使用したプラスミド

Plasmid	Genotype or Description	Reference
pBAD24	cloning vector, Amp <sup>r</sup> , P <sub>BAD</sub>	Guzman et al., 1995
pSHU216	pBAD24- <i>fliL</i>	Lab stock
pMMB206	cloning vector carrying <i>lacI</i> gene, Cm <sup>r</sup> , P <sub>tac</sub>	Morales et al., 1991
pSYC28	pMMB206- <i>motAmotB</i>	Lab stock
pKD13	FRT-Km <sup>r</sup> -FRT	Datsenko & Wanner, 2000
pKD46	encodes $\lambda$ -red recombinase, Amp <sup>r</sup>	Datsenko & Wanner, 2000
pCP20	encodes FLP, Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	Cherepanov & Wackernagel, 1995

Table 2-3. 本研究で使用したDNAプライマー

ID	5' > 3'	Purpose
Strain construction		
0200	GTGCCGGACAGGCGATACGTATTTAAATCAGGA GTGTGAATTAAGACCCACTTTTCACATTT	<i>cheY-tetRA-F</i>
0201	AGGTTTGATTGATGGTTGCATCATAGTCGCATCC TCACATCTAAGCACTTGTCTCCTG	<i>cheY-tetRA-R</i>
0202	GTGCCGGACAGGCGATACGTATTTAAATCAGGA GTGTGAAATGTGAGGATGCGACTATGATGCAAC CATCAATCAAACCT	<i>cheY-Fillin-F</i>
0203	AGGTTTGATTGATGGTTG	<i>cheY-Fillin-R</i>
0196	CAATATAGGATAACGAATCATGGCACAAGTCAT TAATACCTTAAGACCCACTTTTCACATTT	<i>fliC-tetRA-F</i>
0197	ACCCTGCAGCAGAGACAGAACCTGCTGCGGTAC CTGGTTACTAAGCACTTGTCTCCTG	<i>fliC-tetRA-R</i>
1295	TGAGTTCGCCAGCGCGCCGCGCCATGAGGAAACC TGAATGATTAAGACCCACTTTTCACATT	<i>fliK-tetRA-F</i>
1296	AAGCGGGGAAAAGACGCGGATTACGGTGCTACC TCTGACGCTAAGCACTTGTCTCCTG	<i>fliK-tetRA-R</i>

1301 TGAGTTCGCCAGCGCGCCGCCATGAGGAAACC *fliK*-F for swap (LT2)  
TGAATGATCACCTGCCCAACTGATC

1302 AAGCGGGGAAAAGACGCGGATTACGGTGCTACC *fliK*-R for swap (LT2)  
TCTGACGTTAGGCGAAGATATCCACTG

1293 ACGGCAGATAATTTAAGCCTTCACATTTTCAGGA *flgE-tetRA*-F  
GTCAGTCTTAAGACCCACTTTTCACATT

1294 GGTATAAATTGCGTGATCCATTGAGCTATCCCGT *flgE-tetRA*-R  
CAGCGACTAAGCACTTGTCTCCTG

1303 TGAGTTCGCCAGCGCGCCGCCATGAGGAAACC *flgE*-F for swap (LT2)  
TGAATGATTAAGACCCACTTTTCACATT

1304 AAGCGGGGAAAAGACGCGGATTACGGTGCTACC *flgE*-R for swap (LT2)  
TCTGACGCTAAGCACTTGTCTCCTG

1442 CGCAGGATAATTAGCCGATAAGCAGTAGCGACA *fliL*-Km-F  
CAGGAAGACCGCAACACATTCCGGGGATCCGTC  
GACC

1443 CTTGAGAAAGAATACTATCGCCCATGTCGTTATC *fliL*-Km-R  
GCAGAATAAAAGCGGTTGTAGGCTGGAGCTGCT  
TCG

---

Colony PCR & Sequencing

---

0210	GGCAAGACTGGCATGATAAGGCC	<i>tetRA</i> -785-R
0211	GTGAAGTGGTTCGGTTGGTTAGGG	<i>tetRA</i> -1090-F
1179	GGATTGCACGCAGGTTCTC	Km <sup>r</sup> -F
1180	CACGGGTAGCCAACGCTATG	Km <sup>r</sup> -R
0147	GCGGGAATGTTGGCGATGCGT	<i>cheY</i> -(-200)-F
0148	GCAACTGGCGTTCGATCTCCT	<i>cheY</i> -(+500)-R
0219	ATAGCGGGAATAAGGGGCAGA	<i>fliC</i> -(-175)-F
0220	GGTGGCGGGGAAGCACGTTGC	<i>fliC</i> -(+250)-R
1411	TTGCCATCATCTCCGCCAG	<i>fliC</i> -1100-R
1297	CCGCCTCGATCAGAAAAAGATGGATGAGTT	<i>fliK</i> -F (K-12)
1298	TAATGAATACCAGAATCGGGATCCAAAGCG	<i>fliK</i> -R (K-12)

1289	AACCTTACAGGACCGACAAACCGCGGCAGC	<i>fliK</i> -(-105)-F (LT2)
1290	TCGCGGAGTCAGTCATCTGATACGGGCTTC	<i>fliK</i> -(+120)-R (LT2)
1307	GCGCCGATGGCATGTCGCCG	<i>fliK</i> -538-R (LT2)
1299	CTGGATCTCGGCACTTACGG	<i>flgE</i> -F (K-12)
1300	AGCGGGCGCGAGGTGTAATCCATTT	<i>flgE</i> -R (K-12)
1269	CCGAATGGTTCTTACAACAT	<i>flgE</i> -F (LT2)
1270	CGACGCCGTAACCAGCGTGC	<i>flgE</i> -R (LT2)
1620	ATCCGCGTCTTTTCCCGCT	<i>fliL</i> -(-85)-F
1445	TCGCGCACAACCCGTCGTTGGGTATTCGGA	<i>fliL</i> -(+150)-R

Table 2-4. 本研究で使用した培地

名称	組成
LB培地	2% LB Broth Lennox [Becton, Dickinson and Company]
TB培地	1% Bacto Tryptone [Becton, Dickinson and Company], 0.5% NaCl [Wako]

Table 2-5. 本研究で使用したバッファー

名称	組成
MTB	10 mM KPi, 0.1 mM EDTA・2K, pH = 7.0 (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [Wako], KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [Wako], EDTA・2K [Wako])
85Na MTB	10 mM KPi, 0.1 mM EDTA・2K, 85 mM NaCl, pH = 7.0 (NaCl [Wako])
67Na MTB	10 mM KPi, 0.1 mM EDTA・2K, 67 mM NaCl, 10 mM Lactate・Na, pH = 7.0 (Lactate [Wako], NaOH [Wako]) + 0~15% Ficoll (Ficoll® PM 400 [Sigma-Aldrich])
リザレクション用MTB	95% 67Na MTB + 5% TB + 1 mM IPTG (IPTG [nacalai tesque])

## 菌株の構築

*fliL*遺伝子の欠失は、 $\lambda$ -red recombinaseの発現調節が可能なプラスミドpKD46を使った相同組換え法でおこなった(Datsenko & Wanner, 2000). 両端にFRT配列をもたせたKanamycin耐性遺伝子を選択マーカーとして目的の部位を置き換え、pCP20が発現するFLP酵素でFRT配列に挟まれた選択マーカーを除去することによって、遺伝子の欠失を完了した. 遺伝子組換えの各段階で、変異箇所のDNA長が目的通りであることをcolony PCR法(EmeraldAmp PCR Master Mix [Takara Bio])により確認した. *fliK2798*と*flgE<sub>GSS+3Cys</sub>*遺伝子は、*Salmonella Typhimurium* LT2 MMK2798iC株から抽出したゲノム由来である. 欠失した*fliL*の相補は、プラスミドベクターpBAD24がもつ*BAD*プロモーターの下流に*fliL*遺伝子が挿入されたpSHU216を使用した. モーター固定子タンパク質を発現させる実験では、プラスミドベクターpMMB206の*tac*プロモーター支配下に*motA**motB*遺伝子が挿入されたpSYC28を使用した.

## 遊泳速度の計測

1.5% Agarを含むLBプレート上に形成させた各菌株のシングルコロニーを3 mlのLB培地に植菌し、37°C, 180 rpmで17時間振盪培養した. 培養液の10%量である300  $\mu$ lのDMSOを加え、100  $\mu$ lずつ分注して-80°Cで保存し、フローゼンストックとした. 計測実験の前日に、2 mlのTB培地にフローゼンストックを加え、30°C, 180 rpmで17時間振盪培養し、これを1次培養液とした. その翌日、新しい2 mlのTBに40  $\mu$ lの1次培養液を加え、30°C, 180 rpmでOD<sub>600</sub> = 0.6~0.8になるまで5時間程度振盪培養し、これを2次培養液とした.

スライドガラス上に細く切った2本の両面テープを幅約1 cmで貼り付け、その上からカバーガラスを被せて固定することにより、フローチャンバーを作成した. 67Na MTBで2次培養液を1/20に希釈した細胞懸濁液を、フローチャンバー内に流し入れて顕微鏡で観察した. このとき、0, 5, 10, 15%のFicollを含む67Na MTBを使用することで、観察時の溶液の粘度を調節した. 20倍対物レンズで顕微鏡観察をおこない、CCDカメラ(DMK 21AU618 [The Imaging Source])を用いて60 fpsで10秒間撮影した. 遊泳速度は、LabVIEWで構築されたプログラムを用いて解析をおこなった.

この実験を含め、本研究のすべての計測実験は、23°Cの室温でおこなった.

## ビーズアッセイ

細胞の培養は遊泳速度の実験と同様におこなった。マイクロチューブに1 mlの2次培養液を分注し、シリンジを使用して細い注射針(NN-2613S [テルモ])の中を20~35回繰り返し往復させることで、stickyフィラメントのシェアリングをおこなった。細胞の洗浄は、 $3,300 \times g$ で2分間の遠心分離をしたあと上清を除去して1 mlの85Na MTBで再懸濁するという工程を3回繰り返しておこない、3回目の洗浄時のみOD値 $\times$ 1 mlの85Na MTBで再懸濁することで細胞濃度を調節した。フローチャンバー内を0.01% PLLで満たすことでカバーガラスを処理し、85Na MTBで洗浄した後、細胞懸濁液を流し入れて細胞をガラスに固定した。その後、ポリスチレンビーズ溶液を適当な濃度に85Na MTBで希釈してチャンバー内に流し込み、stickyフィラメントにビーズを付着させた。最後に67Na MTBでチャンバー内を洗い流して、顕微鏡で観察した。

ビーズの動きは、顕微鏡に取り付けた4分割フォトダイオード(QPD) (OP711 [センテック])もしくは高速カメラ(ICL-B0620M-KC0 [IMPREX])を使用して、1分間記録した。どちらの場合も、1 kHzのレートでビーズの重心位置を求め、Window sizeを1秒に設定した高速フーリエ変換によるパワースペクトル解析をおこなった。Windowにおける最頻値をモーター回転速度として記録し、Windowを0.1秒ずつずらして回転速度の時間変化を求め、中央値フィルター(median rank = 4)で処理した。これらの解析は、LabVIEWもしくはPythonで構築されたプログラムを用いておこなった。

## 金ナノ粒子とストレートフックシステムによる極低負荷モーター回転計測

この実験では2次培養の際に、5 mlのTB培地に100~200  $\mu$ lの1次培養液を加え、三角フラスコを使用して30°C, 200 rpmでOD<sub>600</sub> = 0.8~1.0になるまで5~6時間程度振盪培養した。金ナノ粒子は塩強度が高い溶液中で凝集してしまうため、細胞の洗浄はNaClを含まないMTBを使用して、ビーズアッセイと同様におこなった。直径60 nmの金ナノ粒子溶液(EM.GC60 [BBI Solutions])を50  $\mu$ l分注し、 $12,000 \times g$ で2分間の遠心分離したのち上清を除去した。これを100  $\mu$ lのDDWで再懸濁し、再度遠心分離と上清の除去をおこなって金ナノ粒子の洗浄をおこなった。この粒子の沈殿に100  $\mu$ lの細胞懸濁液を加えて、べん毛フックに挿入したCys残基のチオール基に金ナノ粒子を結合させるために10分間室温で静置した。その後、NaClを含まないMTBで細胞を2回洗浄したのち、

PLL処理したフローチャンバーに流し入れてカバーガラスに細胞を固定した。最後に67Na MTBでチャンバー内を洗い流して、顕微鏡で観察した。

金ナノ粒子の動きを高感度に検出するため、波長532 nmのレーザー(MGL-III-532-100 mW [CNI])を照射し、金ナノ粒子からの後方散乱光を高速カメラに導入することで暗視野観察をおこなった。レーザー光は、NDフィルターで約10  $\mu$ Wの強度に調節して顕微鏡に導入した。1 kHzのレートで1分間録画し、各フレームにおける粒子の重心位置をPythonで構築したプログラムを用いて2次元ガウスフィットにより求めた。モーターの回転速度はビーズアッセイと同様に解析した。

固定子ユニットの発現量を制御する実験では、*motAmotB* 遺伝子をコードするpSYC28の誘導物質であるIPTG濃度を変化させた。2次培養時に加えるIPTG濃度が[IPTG] = 5~10  $\mu$ Mの条件を固定子低発現時、300  $\mu$ Mの条件を高発現時としてサンプルを作製し、モーター回転速度を比較した。

## リザレクション実験

この実験では、ゲノムから*motAmotB*遺伝子を欠失し、pSYC28で形質転換した菌株を使用した。pSYC28からの*motAmotB*遺伝子の発現誘導物質であるIPTGを加えずに培養して、ビーズアッセイと同様に細胞を準備した。ブラウン回転をしているビーズにピントを合わせ、IPTGと炭素源としてTB培地を混ぜたリザレクション用MTBを、チャンバー内に流し入れて計測を開始した。計測中に菌体内で固定子ユニットが発現されると、モーターの段階的な速度上昇が観察できるため、これを記録した。各速度レベルに対してガウスフィットを適用し、固定子ユニット数に対応したモーター回転速度を解析した。

### 3. 結果

#### 極低負荷モーター回転計測系の評価

まず、本研究で構築したレーザー暗視野顕微鏡の性能評価をおこなった。顕微鏡システムの模式図をFig. 2-2に示す。使用した菌株は、SHU172 pBAD24である。ストレートフックに結合させた直径60 nmの金ナノ粒子は、多くの場合楕円軌道を描くように動いた(Fig. 2-3)。これは、計測対象のべん毛モーターの細胞上の位置に依存しており、観察面に対して斜めにべん毛フックが伸びていることを反映している。すなわち、観察された楕円軌道の長軸方向の半径が、粒子の本来の回転半径である。得られた粒子の回転半径データをまとめてヒストグラムを作成し、ガウスフィッティングをおこなった結果、回転半径の平均は約40 nmであった。本研究で使用したストレートフックは、サルモネラ菌で構築された変異型FlgEをそのまま大腸菌体内で発現させたものであり、その直径は20 nmであると報告されている(Hiraoka et al., 2017; Nakamura et al., 2020)。本研究で使用した金ナノ粒子は60 nmであることから、予想される回転半径は40 nmであり、計測結果はこれとよく一致している。つまり、本研究で使用した回転計測系は、期待した通りに実現されていると考えられる。

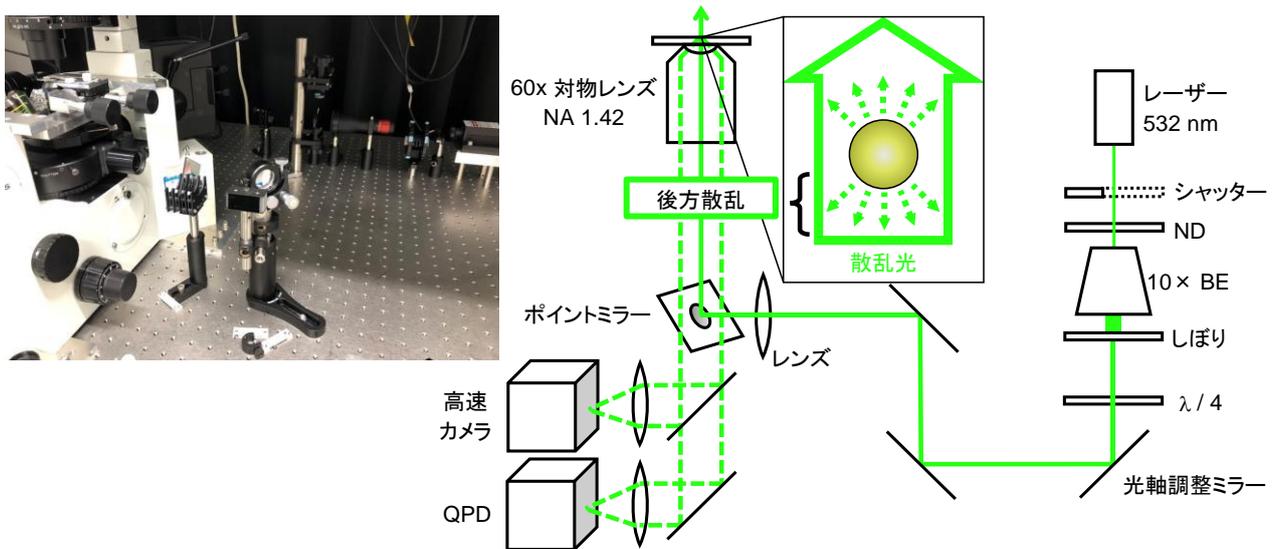


Fig. 2-2 金ナノ粒子を高感度に検出する顕微鏡システム

本研究で使用した直径 60 nm の金ナノ粒子は緑色光を強く散乱する特性をもつため、波長 532 nm のレーザーを顕微鏡に導入した。10 倍のビームエキスパンダー (BE) としぼりを使用してレーザー中央部分のみを導入することで、観察視野内に均一の強度で光を照射した。λ/4 板は、直線偏光のレーザーを円偏光に変換するために使用した。NA 1.42 の 60 倍対物レンズの後焦点面に  $f = 180 \text{ mm}$  のレンズで集光するように、ポイントミラーを用いてレーザー光を導入した。レーザー光の直径が約 3 mm となるようにしぼりを調節したため、試料面上では直径約 50 μm の範囲を照射することに相当する。金ナノ粒子からの後方散乱光は、ミラー部分の外側を通過させて検出し、粒子の動きは高速カメラによるビデオ撮影か、QPD を使用した位置検出プログラムで記録した。装置の構築は、Ueno et al. (2010), Sowa et al. (2010) を参考にしておこなった。

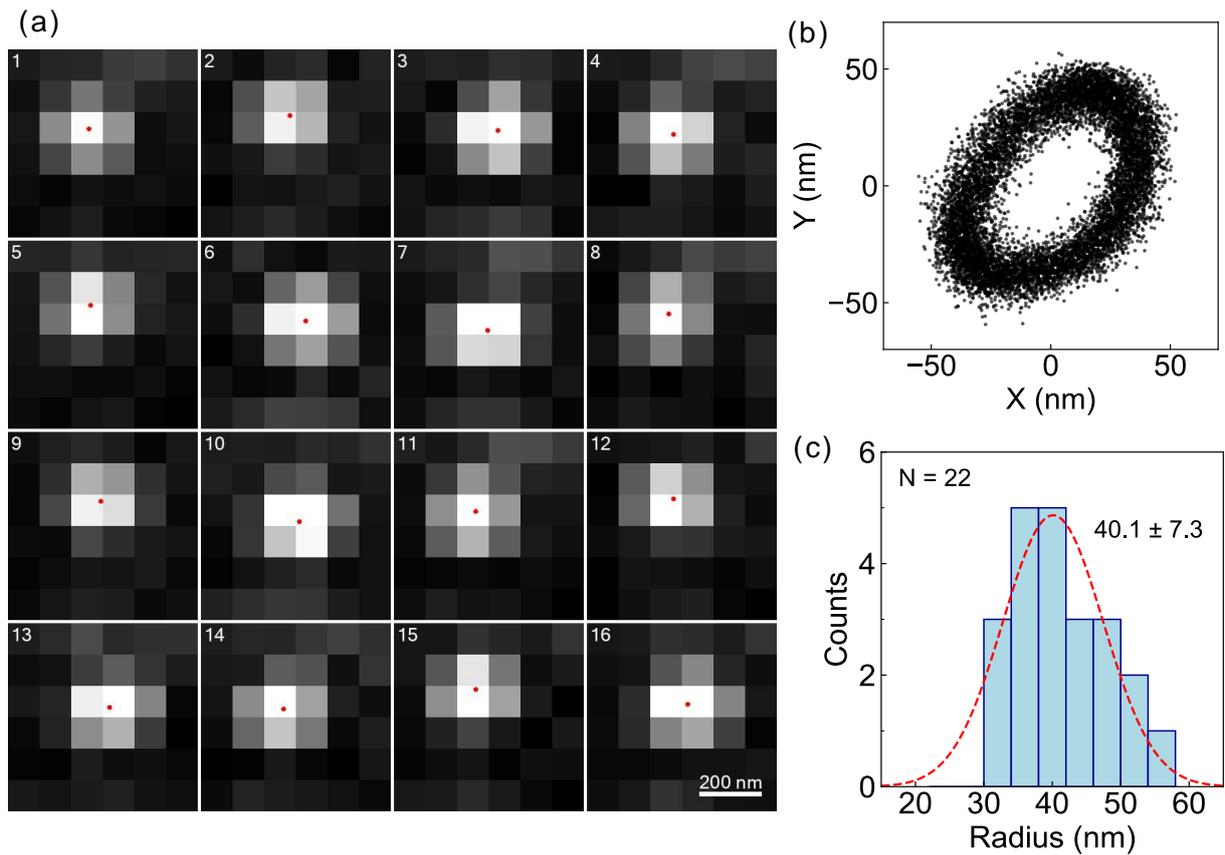


Fig. 2-3 金ナノ粒子の回転軌跡

SHU172 pBAD24株のべん毛フックに取り付けた直径 60 nm の金ナノ粒子の動きを、レーザー暗視野顕微鏡で観察し、高速カメラで撮影した。(a) 1 kHz のフレームレートで撮影した、代表的な粒子の動きの様子。左上の数字はフレームの順番を示す。赤い点は2次元ガウスフィットにより求めた粒子の重心位置である。(b) 10秒間の粒子の重心位置の軌跡。楕円軌道を描くように粒子は回転した。楕円フィッティングにより楕円の半径を算出し、長軸方向の半径を粒子の回転半径とした。(c) 金ナノ粒子の回転半径のヒストグラム。Nは計測したモーターの数を表す。ヒストグラムに対するガウスフィットの結果を、平均±標準偏差の値と赤の点線で示した。

## 固定子ユニット発現量に依存した極低負荷モーターの回転速度

この実験では、*motA**motB*遺伝子を欠失した菌株SHU174に、IPTGでMotAMotBの発現誘導が可能なプラスミドpSYC28で形質転換した株を使用した。2次培養時に加えるIPTG濃度を調節して、固定子ユニット発現量の違いによるモーター回転速度への影響を調べた。その結果、固定子ユニットを過剰に発現させた際のモーター回転速度は約300 Hzで安定した(Fig. 2-4)。一方、固定子ユニットの発現を低下させると、回転速度のゆらぎが頻繁に観察された。この速度のゆらぎにはいくつかのレベルがあり、最大速度である300 Hzと、それよりも低い200 Hzや150 Hz付近の速度レベルがみられた。モーター回転速度は、これらの複数のレベル間を急激に行き来しており、時折回転のポーリングも観察された。これらの速度レベルは、モーターに組み込まれて同時に機能する固定子ユニットの数を反映していると考えられる。

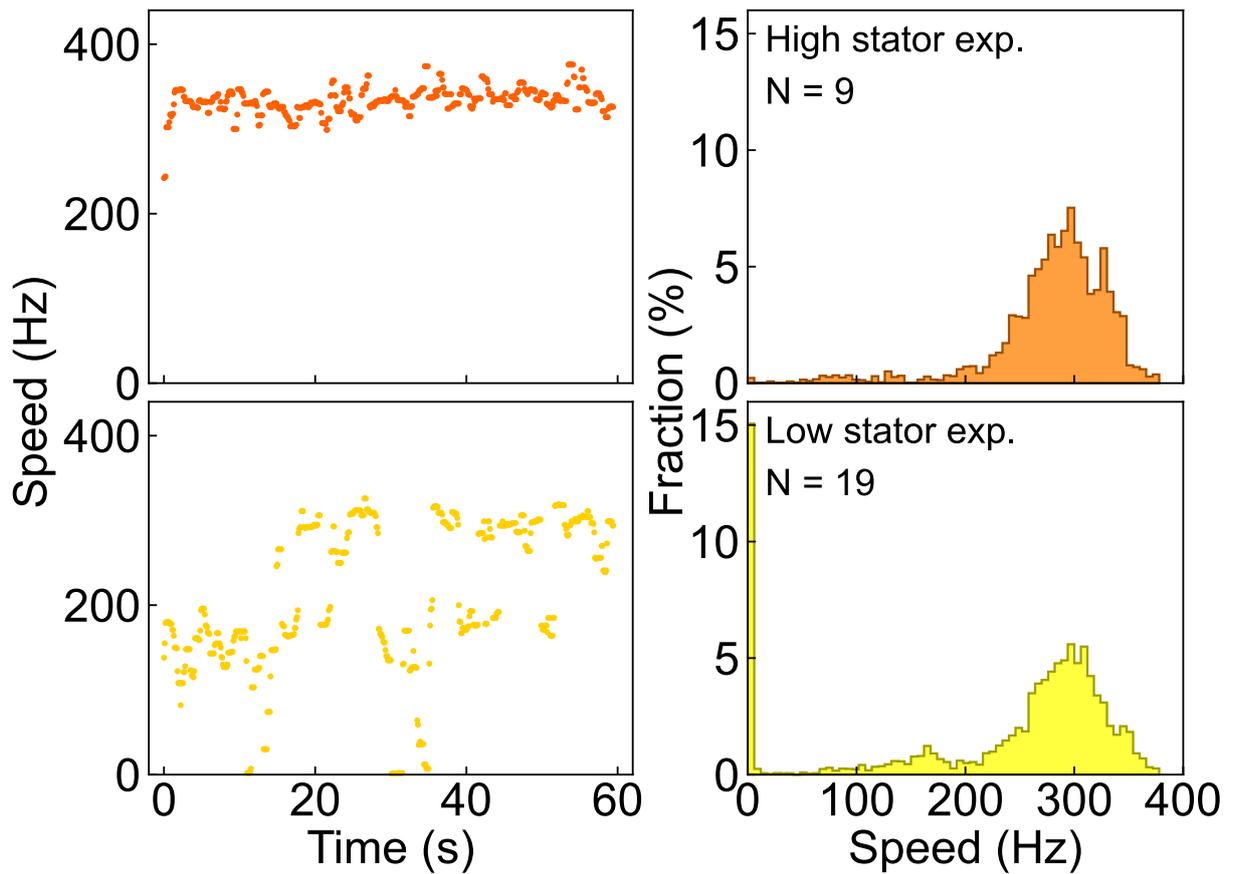


Fig. 2-4. 固定子発現量に応じた極低負荷モーター回転速度の安定性

SHU174 pSYC28株を使用して、2次培養時に加えるIPTG濃度の制御により固定子ユニットの発現量を調節した。(左) 固定子ユニット高発現時と低発現時のモーター回転速度の代表例。(右) 複数モーターの計測によって得られた速度をまとめたヒストグラム。固定子ユニット高発現時には約300 Hzの速度で安定したため、ヒストグラム上でも300 Hz付近にデータが集まっているが、低発現時には段階的な速度レベルを反映した複数のピークが見られた。

## FliLが遊泳速度に与える影響

この実験では、FliLが遊泳時の推進力に与える影響について単純に比較するために、常に直進運動をする*cheY*を欠失した菌株SYC9 (*fliL*<sup>+</sup>: WT)を使用した。この菌株から*fliL*遺伝子を欠失した菌株SHU350 ( $\Delta$ *fliL*)を作製した。また、FliLの欠損を相補するため、*fliL*遺伝子をコードするpSHU216を使用した。

SYC9 pBAD24 (WT), SHU350 pBAD24 ( $\Delta$ *fliL*), SHU350 pSHU216 (FliL<sup>+</sup>)の遊泳速度を計測した。2次培養液は、1 mM Arabinoseを含むTB培地でおこなった。Ficollを含まない67Na MTB中で遊泳速度を比較した結果、WTとFliL<sup>+</sup>株は約30  $\mu\text{m/s}$ で遊泳したのに対して、 $\Delta$ *fliL*株は約20  $\mu\text{m/s}$ で遊泳した(Fig. 2-5)。FliL<sup>+</sup>株の遊泳速度がWTと同速度程度まで回復したことから、pSHU216からのFliL発現により、十分に遊泳機能が相補されたと考えられる。また、サルモネラ菌やビブリオ菌では高負荷条件下でのべん毛の機能にFliLが必須であることが報告されているため(Partridge et al., 2015; Zhu et al., 2015), Ficollを含む67Na MTBを用いて、溶液の粘度を調節して観察をおこなった。15%のFicollを含む条件では、水と比較して粘性が10倍高くなることが報告されている(Chen & Berg, 2000)。しかし、サルモネラ菌やビブリオ菌とは対照的に、緩衝液に加えたFicollの濃度上昇につれて、FliLの有無による遊泳速度の差は徐々に小さくなり、15%のFicollを含む条件ではその差がほとんどなくなった。つまり、大腸菌の遊泳において、低粘度の溶液中での最適な遊泳にFliLが寄与していることが示唆された。

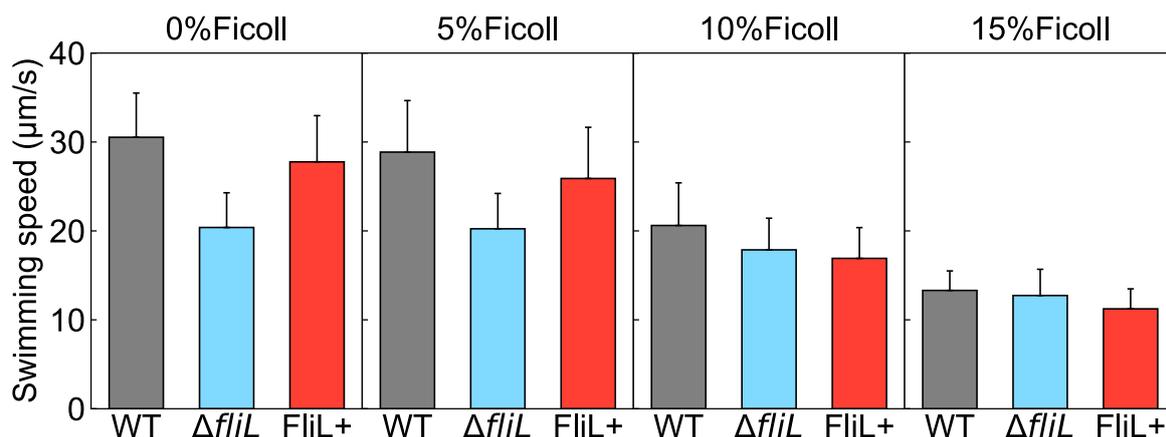


Fig. 2-5. FliLの遊泳速度への影響

FliLの有無による遊泳速度への影響を調べた。4つのプロットエリアはそれぞれ、上に示した濃度のFicollを含む条件で遊泳を計測したことを表している。使用した菌株は、それぞれゲノムレベルのFliLをもつWT (灰色: SYC9 pBAD24), *fliL*遺伝子を欠失した $\Delta fliL$  (水色: SHU350 pBAD24), プラスミドからFliLを相補したFliL+ (赤色: SHU350 pSHU216)である。棒グラフは各条件での平均遊泳速度を示し、エラーバーはSDを示す。観察した細胞数は、左から順に74, 152, 138, 111, 98, 122, 115, 141, 153, 212, 198である。

## 高負荷から中程度の負荷領域におけるモーター回転速度

ビーズアッセイを用いて、1分子のべん毛モーター回転速度を計測した。この実験では、通常のべん毛繊維の代わりにstickyフィラメントを発現し、*cheY*を欠失した菌株SYC33と、SYC33から*fliL*遺伝子を欠失した菌株SHU181を使用した。SYC33 pBAD24 (WT), SHU181 pBAD24 ( $\Delta fliL$ ), SHU181 pSHU216 (FliL+)を同じ条件で培養して比較対象とした。遊泳速度の計測結果より、pSHU216からのFliLの発現量は2次培養時に1 mM Arabinoseを加えることで、モーター機能が十分相補可能であることがわかったため、同様の条件で培養した。

直径1.5, 1.0, 0.75, 0.5  $\mu\text{m}$ のビーズをstickyフィラメントに付着させ、1つのモーターにつき回転速度の変化を1分間ずつ計測した。また、直径0.5 $\mu\text{m}$ のビーズを使用した条件では、67Na MTBに5%のFicollを含む条件でも計測をおこなった。

ビーズアッセイの結果は、Fig. 2-6にまとめた。まず、WTモーターと $\Delta fliL$ モーターの結果を比較すると、直径1.5  $\mu\text{m}$ のビーズを用いた場合、 $\Delta fliL$ モーターの速度は約30 Hzであり、WTモーターの約20 Hzと比較して有意に高いことがわかった。この差は、遊泳速度を高粘度条件下で計測した実験では見られなかったものであり、FliLは高負荷条件下では単一モーターの回転速度を低下させることがわかった。直径1.0  $\mu\text{m}$ のビーズでは、WT,  $\Delta fliL$ モーターはいずれも約60 Hzの速度で回転し、 $\Delta fliL$ モーターの速度がわずかに高かった。一方、直径0.75  $\mu\text{m}$ ビーズを使用した場合、WT,  $\Delta fliL$ モーター速度はそれぞれ120Hz, 100Hz程度となり、速度の優劣が逆転して $\Delta fliL$ モーターの方が低いという結果となった。直径0.5  $\mu\text{m}$ ビーズを使用して、溶液中に5% Ficollを含む条件では、WTモーターが約190 Hzの速度であったのに対して、 $\Delta fliL$ モーターでは約135 Hzであり、FliLの有無によってモーター速度の分布が大きく異なっていた。直径0.5  $\mu\text{m}$ ビーズでFicollなしの条件では、WTモーター速度は約220Hzであり、 $\Delta fliL$ モーターは180 Hzの速度までしか生み出せないことがわかった。また、FliL+モーター速度は、FliL欠損が相補されたことにより、基本的にはWTモーターと同程度であることがわかった。直径0.75  $\mu\text{m}$ ビーズを使用した場合、FliL+モーターの速度分布はそれぞれWTと $\Delta fliL$ の速度分布のピークと一致する位置に2つのピークをもつような分布であるように見えた。直径0.5  $\mu\text{m}$ ビーズを使用した条件では、FliLの発現量がWTと比べて過剰であるFliL+株のモーター速度は約260 Hzであり、WTモーターよりも高速であった。つまり、大腸菌FliLはモ

ーター速度に対して、高負荷条件下ではネガティブな制御、低負荷条件下ではポジティブな制御をしていることが示された。

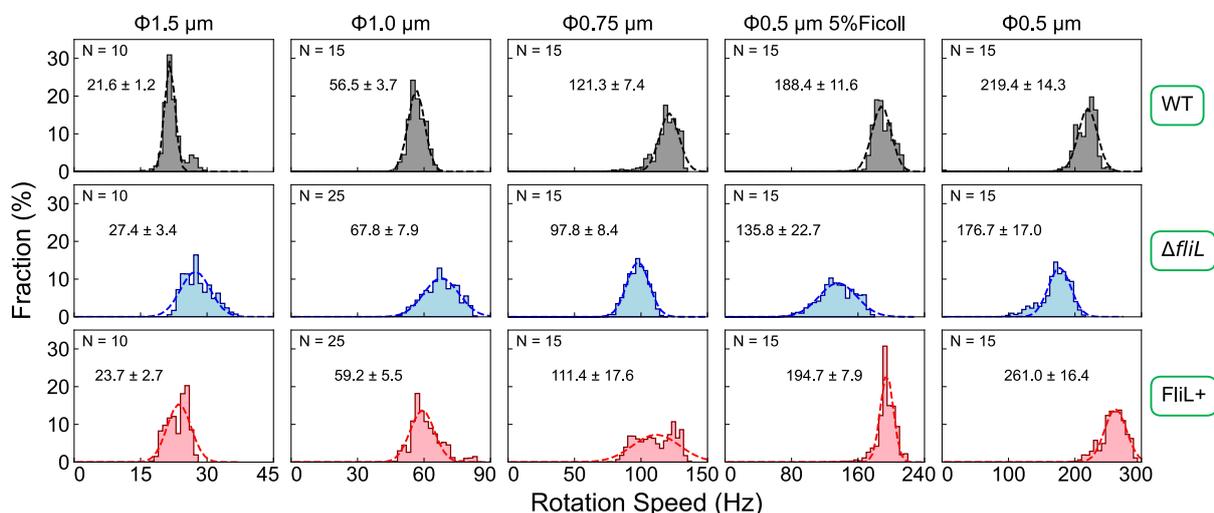


Fig. 2-6. 様々な負荷条件におけるFliL存在下および非存在下のモーター速度

ビーズアッセイを用いて計測したモーター回転速度をまとめたヒストグラムを示す。使用した菌株はそれぞれ、SYC33 pBAD24 (WT), SHU181 pBAD24 ( $\Delta$ *fliL*), SHU181 pSHU216 (FliL+)である。それぞれのグラフエリアの一番上に示した条件は、使用したビーズの大きさや溶液中に加えたFicollの濃度を示しており、これによってモーター回転時の負荷を制御した。Nは、各条件で計測したモーターの数を表している。ヒストグラムのビンの幅は、左から順に1, 2, 3, 5, 6Hzである。また、各ヒストグラムにガウスフィッティングをおこなった結果を、平均±標準偏差の数値と点線で示した。

## FliLが極低負荷条件下で駆動するモーター回転速度に与える影響

ビーズアッセイの結果より、大腸菌がもつFliLは低負荷条件下でモーターの回転速度を上昇させる機能があることがわかったため、より低い負荷領域で駆動するモーターへの影響を調べた。本研究で構築したレーザー暗視野顕微鏡と、ストレートフックのシステムを用いることで、モーター回転時の負荷を極限まで下げた条件でFliLの機能を評価することが可能となる。そこで、ストレートフックをもち*cheY*遺伝子を欠失した菌株SHU172から*fliL*遺伝子を欠失させたSHU292を作製した。

この実験では、SHU172 pBAD24 (WT), SHU292 pBAD24 ( $\Delta fliL$ ), SHU292 pSHU216 (FliL+)を比較した。ビーズアッセイと同様に、2次培養時に1 mM Arabinoseを添加した。計測の結果、WTやFliL+モーターと比較して $\Delta fliL$ モーターの回転速度は非常に不安定であり、回転が停止している時間が長いことがわかった(Fig. 2-7)。計測時間全体に対する回転停止イベントの割合は、複数のモーターの計測結果をまとめたヒストグラム上に表れており、この停止イベント中はすべての固定子ユニットがモーターから解離していることを意味する。 $\Delta fliL$ モーターでは、全体の約60%の割合で回転停止イベントが発生していたのに対して、FliL+モーターでは約30%であり、 $\Delta fliL$ モーターの半分程度であった。つまりFliLは、低負荷回転時に固定子ユニットのモーターへの組み込みを安定化させる機能があることが示された。また、モーターの回転速度を比較すると、WTとFliL+のモーターの最大速度はそれぞれ約300Hzであるのに対して、 $\Delta fliL$ モーターでは約200 Hzであった。さらに、モーター速度の急激な段階的変化が観察され、ヒストグラム上にもそれらの段階を反映した複数の速度レベルが見られた。

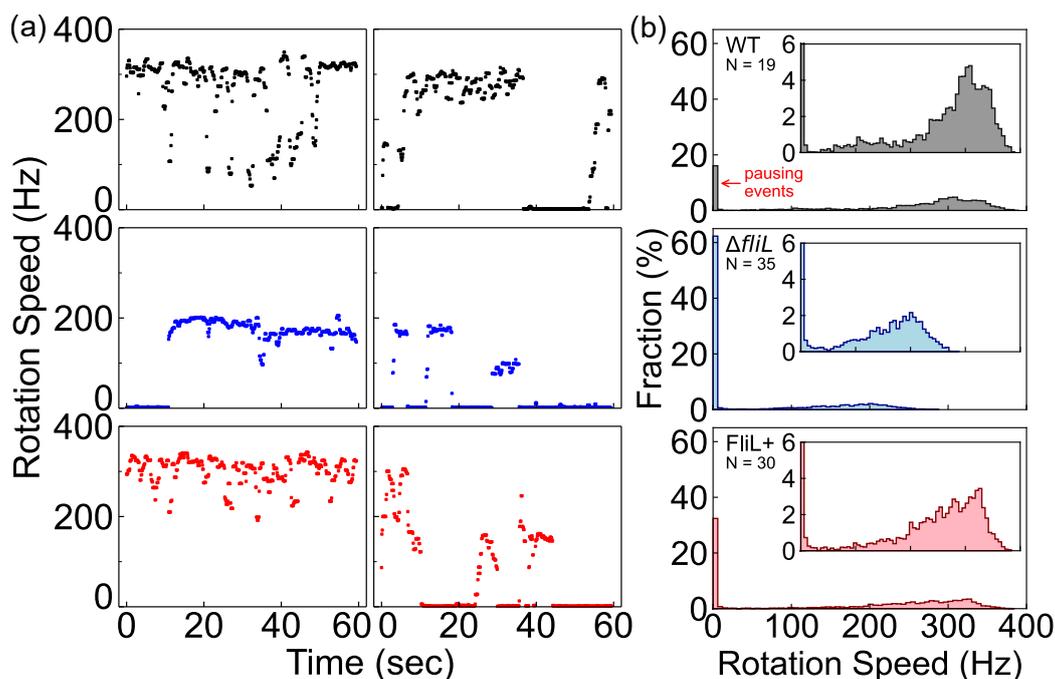


Fig. 2-7. 極低負荷条件下でのモーター速度のFliL依存性

FliLの有無が極低負荷条件下でのモーター速度に与える影響を調べた。直径 60 nm の金ナノ粒子をストレートフックに結合させ、レーザー暗視野顕微鏡でその回転を計測した。使用した菌株は、SHU172 pBAD24 (WT), SHU292 pBAD24 ( $\Delta fliL$ ), SHU292 pSHU216 (FliL+)である。

(a) 各菌株の代表的なモーター速度の時間的な変化。60秒間の計測時間のうち、最高速度付近で比較的安定であったものや、回転速度が急激に変化して複数の速度レベルが見られたもの、回転停止が見られたものがあった。(b) それぞれの菌株のモーター速度をまとめたヒストグラム。どの菌株においても最大のピークは0 Hzの部分であり、これは計測時間全体における回転停止の割合に相当する。insetは、回転停止イベント以外のピークがわかりやすいように拡大した図である。Nは計測したモーターの数を示しており、ビンの幅は6 Hzで作成した。

サルモネラ菌でストレートフックシステムを用いてモーター回転計測をおこなった研究では、固定子タンパク質の発現量が野生レベルの場合は速度が段階的に変化するが、固定子タンパク質を過剰に発現させると、最大速度付近で安定することが報告されている(Nakamura et al., 2020). これは、細胞膜上を拡散する固定子ユニット数が増加することにより、モーターへの組み込み効率が上昇することを反映している. そこで本研究においても、プラスミドpSYC28からMotAMotBを過剰発現させ、固定子ユニットの組み込み効率を強制的に上昇させて同様の実験を行った. SHU172 pBAD24 pSYC28 (WT AB+), SHU292 pBAD24 pSYC28 ( $\Delta fliL$  AB+), SHU292 pSHU216 pSYC28 (FliL+ AB+)を使用し、2次培養時に300  $\mu$ M IPTGを加えることでpSYC28から固定子タンパク質MotAMotBの発現を誘導した.

計測の結果、WT AB+とFliL+ AB+のモーターの回転停止イベントはほとんど見られなくなり、速度も300 Hz付近で安定した(Fig. 2-8). これに対して、 $\Delta fliL$  AB+モーターの速度は依然として不安定なものが多く、回転停止イベントが全体の約9%の割合で見られ、最大速度も約200 Hzのままであった. これらの結果から、*fliL*の欠失は固定子ユニットの過剰発現では相補されず、低負荷条件下でモーターが最大速度を発生させるためにはFliLが必須であることがわかった.

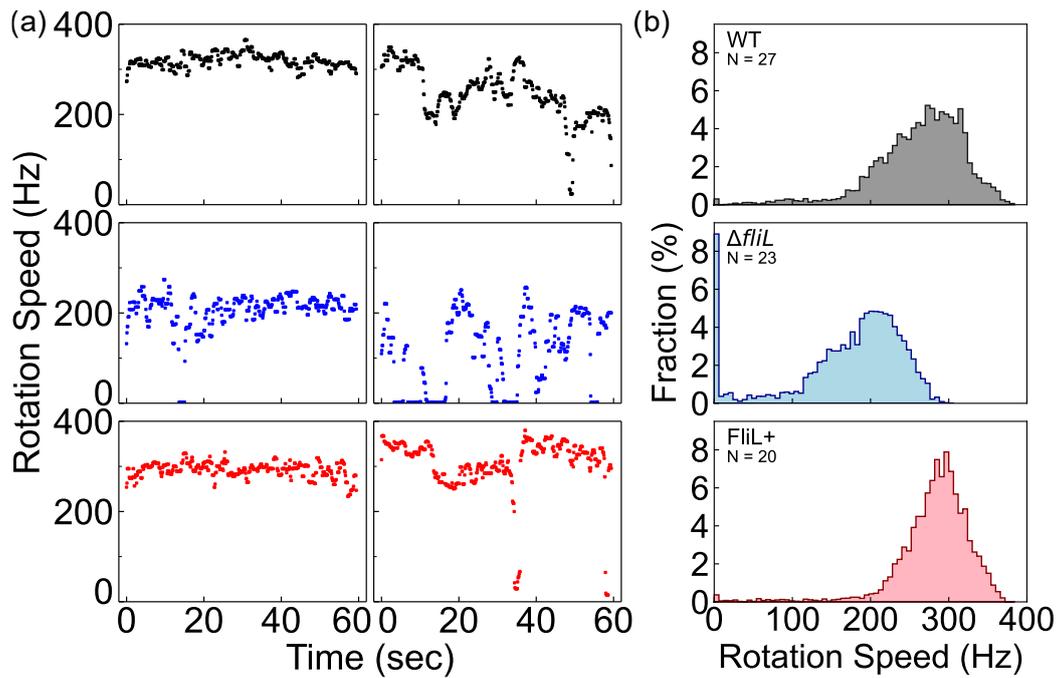


Fig. 2-8. 固定子ユニット過剰発現時の極低負荷モーター回転速度

MotAMotB過剰発現により、モーターへの固定子組み込み効率を上昇させた条件下で回転計測をおこなった。使用菌株は、SHU172 pBAD24 pSYC28 (WT), SHU292 pBAD24 pSYC28 ( $\Delta fliL$ ), SHU292 pSHU216 pSYC28 (FliL+)である。

(a) 各菌株の代表的なモーター速度。ほとんどのモーターは最高速度付近で60秒間安定して回転したが、複数の速度レベルが見られるものもあった。(b) それぞれの菌株のモーター速度をまとめたヒストグラム。WTとFliL+モーターの回転停止イベントはほとんど見られなくなったが、 $\Delta fliL$ モーターのみ約9%の頻度で回転停止が見られた。Nは計測したモーターの数であり、ビンの幅は6 Hzである。

## Torque-Speedの関係

本研究では、広い負荷条件下でのモーター回転速度を計測した。ここまでのビーズアッセイの結果と、金ナノ粒子を用いた低負荷条件下での計測結果より、T-S curveを作成した(Fig. 2-9)。なお、野生レベルの固定子発現量ではモーター速度のゆらぎが大きく、最高速度を維持する確率が低いため、T-S curveの中で最も高速側、すなわち極低負荷条件下での計測結果を反映したプロットは、固定子タンパク質を過剰に発現させて計測したデータを使用した。Fig. 2-8aに示したような、固定子過剰発現時の各モーター速度からヒストグラムを作成し、最大のピークに合わせて(速度レベルが複数ある場合には最高速度付近のピークを選択して)ガウスフィットを適用し、それぞれのモーター速度の平均を算出した。

モーターの回転トルクは、流体による粘性抵抗と釣り合うため、回転速度と粘性抵抗の積で算出される。各観察条件における粘性抵抗は、過去に報告された方法を参考に算出した。モーターの回転に対する粘性抵抗係数は、粒子の回転による抵抗と、べん毛繊維やフックの回転による抵抗の和で表される。粒子の回転運動に対する粘性抵抗 $\gamma$ は、 $\gamma = 8\pi\mu r_b^3 + 6\pi\mu r_b r_r^2$  の式で求めることができる。ここで、 $\mu$ は水の粘度、 $r_b$ は粒子の半径、 $r_r$ は回転半径を表す。粒子の回転半径は、ビデオ撮影によって得られた粒子の回転軌跡から求めた。stickyフィラメントの粘性抵抗は、Inoue et al. (2008)で示された0.80 pN nm sの値を使用し、ストレートフックの粘性抵抗は、Nakamura et al. (2020)で示された0.001 pN nm sの値を使用した。

WTモーターのT-S curveは、これまでに報告されている形状とよく一致した。FliL+モーターもWTと同様であり、プラスミドからのFliL発現により回転トルクの調節機能が十分に相補されていることがわかった。しかし、驚くべきことに、 $\Delta fliL$ モーターのトルクと速度の関係は直線的であり、"knee" speedとなる変曲点は見られなかった。この直線の傾きは、WTの高速領域における傾きとほぼ一致しており、その傾きのまま低速領域まで伸びているように見える。さらに、 $\Delta fliL$ モーターの回転トルクは低速領域ではWTよりも高く、速度の上昇にともなってWTよりも低くなっていた。つまり、大腸菌べん毛モーターの負荷感受性が、FliLの機能によって大きく変化していることがわかった。したがって、モーターが環境の負荷を感知して回転トルクを最適化する機能には、FliLが必須の因子であることが示された。

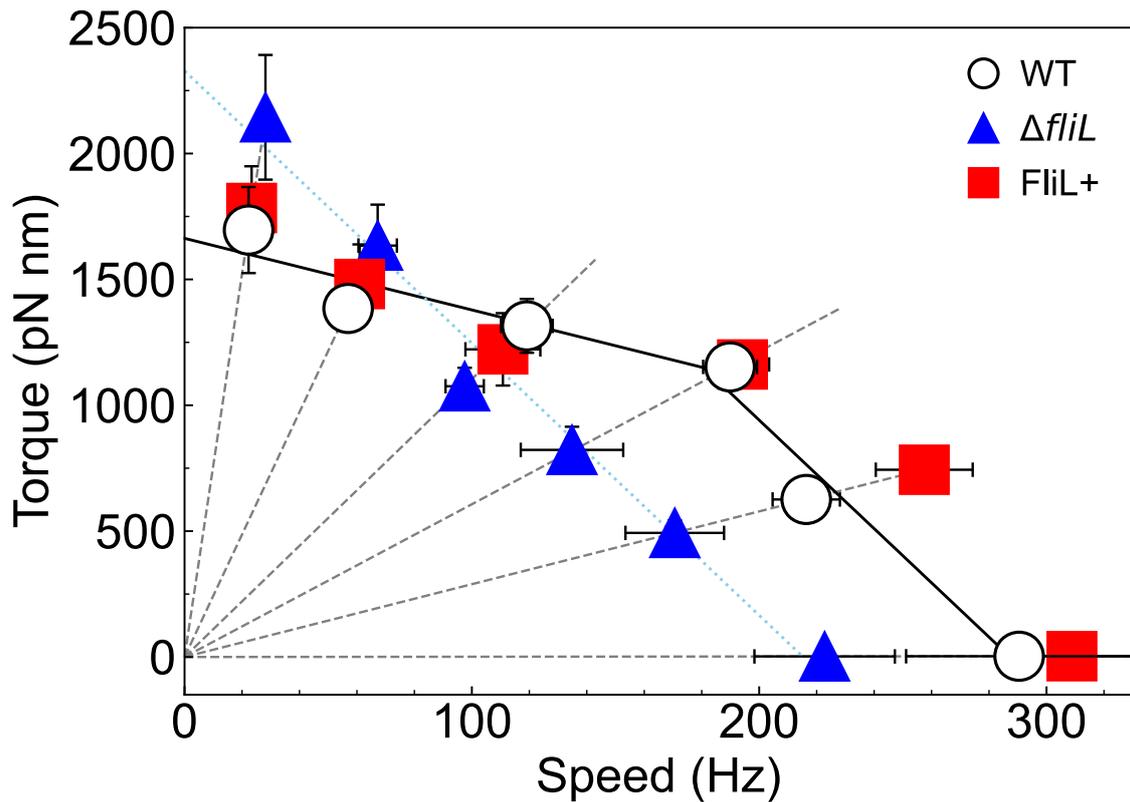


Fig. 2-9. Torque-Speed curve

ビーズアッセイ(Fig. 2-6)と、金ナノ粒子を使用した極低負荷モーター計測(Fig. 2-8)の結果を使用して、平均速度に対する回転トルクをプロットした。実線は、WTモーターのプロットのうち約200 Hzのプロットを中心として、低速領域の4点と高速領域の3点に対して線形フィットをおこなった結果である。青い点線は、 $\Delta fliL$ モーターのプロットに対する線形フィットの結果を示す。灰色の点線は、それぞれの負荷条件を意味する。エラーバーはSDを示す。

## リザレクション実験による速度上昇率とFliLの関係

直径1.5  $\mu\text{m}$ のビーズを使用した回転計測の結果、 $\Delta fliL$ モーターの方がWTよりも高速に回転できることがわかった。これをもとに作成したT-S curveを見ると、高負荷低速領域では $\Delta fliL$ モーターのトルクがWTよりも高いことがわかる。

*V. alginolyticus*でFliLの構造を解析した報告によると、複数のFliL分子が固定子ユニットを取り囲んで機能するモデルが提唱されている(Takekawa et al., 2019)。これを考慮すると、FliL非存在下では固定子ユニットの直径が小さくなり、高負荷条件下ではより多くのユニットがモーターに組み込まれる可能性がある。これを検証するため、*motA motB*遺伝子をもたないJHC36株を元にして*fliL*遺伝子を欠失させたSHU354株を作製し、リザレクション実験により高負荷条件下でモーターに組み込まれる固定子ユニット数を定量した。SHU354 pSYC28 pBAD24 ( $\Delta fliL$ )と、SHU354 pSYC28 pSHU216 (FliL+)をIPTGを含まない条件で培養してMotAMotB発現を抑えた状態でサンプルを準備し、直径1.5  $\mu\text{m}$ のビーズを使用したビーズアッセイをおこなった。回転計測中にIPTGとTBを含むリザレクション用MTBをフローチャンバーに流し入れることでpSYC28からのMotAMotBの発現を誘導し、モーター回転速度の段階的上昇を記録した。その結果は予想に反して、FliLの有無は固定子ユニットの最大数には影響せず、速度の上昇率に影響することが示された(Fig. 2-10)。 $\Delta fliL$ とFliL+モーターはどちらも、少なくとも9~12個の固定子ユニットを組み込むことが可能であるが、 $\Delta fliL$ モーターの方が多くのユニットを組み込んだ際の速度上昇の幅が大きく、結果として最大数のユニットを組み込んだモーターの速度が高くなることがわかった。つまり、FliLは複数の固定子ユニット間の協同性に関与しており、多くの固定子ユニットがモーターに組み込まれた際にトルク発生機能をわずかに妨げていると考えられる。

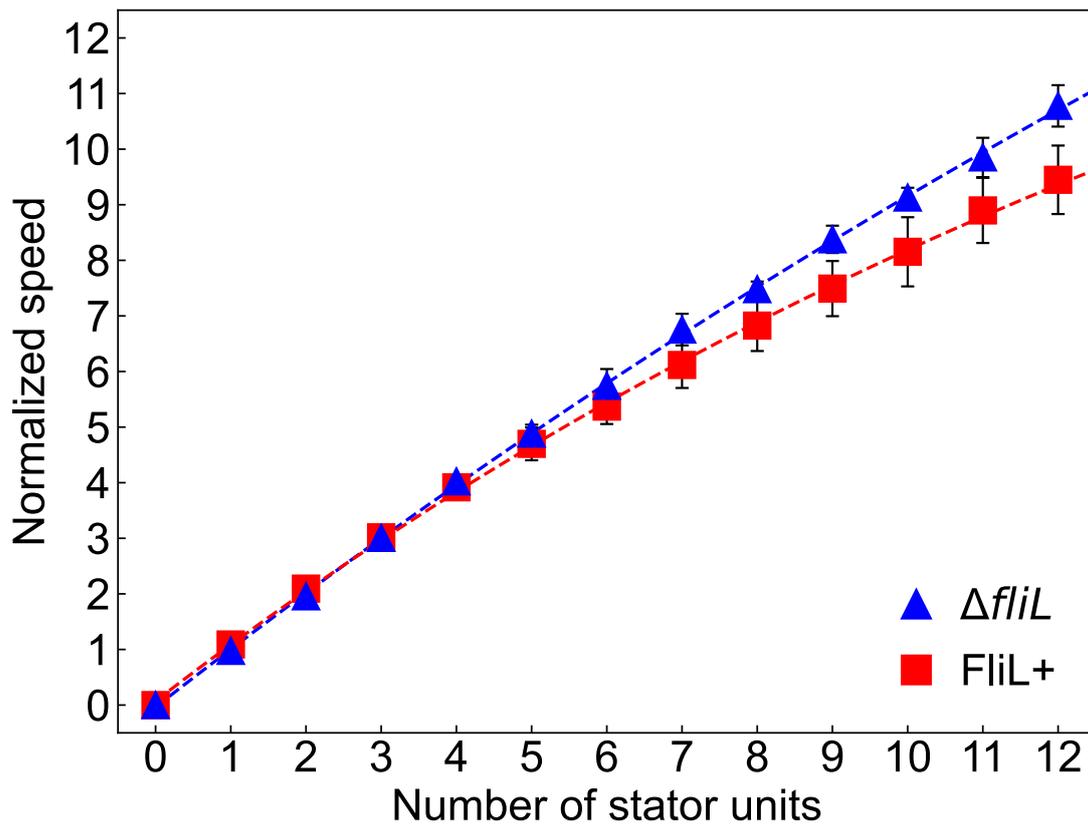


Fig. 2-10. 高負荷条件下における固定子ユニット数とモーター回転速度の関係

直径1.5  $\mu\text{m}$ のビーズを用いたリザレクション実験の結果から、各固定子ユニットの数に応じたモーター速度の上昇率を求めた。使用菌株はSHU354 pSYC28 pBAD24 ( $\Delta fliL$ )と、SHU354 pSYC28 pSHU216 (FliL+)である。モーターごとに、0から4つ目までの速度上昇のステップサイズに対して線形フィットをおこない、その傾きの値を用いて全体のステップサイズを正規化した。計測したモーターの数は、 $\Delta fliL$ とFliL+でそれぞれ5個と7個である。点線は指数関数フィット( $y = a \times \exp(-bx) + c$ )の結果である。エラーバーはSDを示す。

#### 4. 考察

大腸菌やサルモネラ菌のべん毛モーターは、環境の負荷に応じて回転トルクを自律的に制御するため、固定子ユニットの組み込み数を変化させる。高負荷条件下では最大で10個程度の固定子ユニットが組み込まれて同時に機能するが(Blair & Berg, 1988; Block & Berg, 1984; Leake et al., 2006; Reid et al., 2006), モーター回転時の負荷を感知して固定子ユニットの離合集散が起こり、低負荷条件下では2~3個までに減ることが示されている(Castillo et al., 2013; Lele et al., 2013; Tipping et al., 2013). また、回転モーターの基本特性を表すT-S curveの固定子数への依存性を見ると、高負荷低速度領域での最大トルクは固定子ユニットの数に比例するが、低負荷高速度領域になるにつれて固定子ユニット数の依存性が小さくなった(Inoue et al., 2008; Ryu et al., 2000). このT-S curveを低負荷領域まで外挿すると、モーターがトルクをほぼ発生しない最大速度付近では、速度は固定子数に依存しないことが予想された(Ryu et al., 2000). この予想は、ほぼ無負荷条件での計測によって実験的にも示されたため(Yuan & Berg, 2008), 決着したように思われた。しかし、その後の複数の研究結果から、ほぼ無負荷に相当する低負荷条件下での最大速度も固定子ユニット数に依存することが示唆され(Lo et al., 2013; Nakamura et al., 2020; Nord et al., 2017b; Sato et al., 2019), べん毛モーター回転機構を知る上で明らかにすべき重要な事項と認識されている。

本研究では、現在最も安定にほぼ無負荷の条件を実現できると期待されるストレートフックの実験系を大腸菌に導入して回転計測をおこなった。その結果、固定子ユニットの過剰発現によって速度のゆらぎが見られなくなり、最大速度付近で回転が安定したため、べん毛モーターの最大回転速度は固定子ユニット数に依存するという結果を支持するものであった(Fig. 2-4).

べん毛モーターのT-S curveは、"knee" speedで区切られた最大トルクとほぼ同じトルクを示す低速度領域と、トルクが速度にともなって急激に減少する高速度領域の2つの領域から構成される(Chen & Berg, 2000; Nirody et al., 2016). ビーズアッセイと固定子過剰発現時の金ナノ粒子アッセイの結果をまとめたT-S curveを見ると、WTとFliL+株のモーターでは過去に報告された特性と一致したのに対して、 $\Delta fliL$ 株ではknee speedが見られず全領域で単調にトルクは減少した(Fig. 2-9). これは、FliLの欠損によってべん毛モーターの負荷感受性が大きく変化したことを意味しており、負荷に応じた固定子ユニット

数の調節機能が損なわれていると考えられる。つまり、FliLの補助がない条件では、モーター回転子と固定子ユニットは本来の親和性で機能しており、低速度領域からknee speedの領域までの範囲においても機能する固定子ユニットの数が安定ではなくなっていると推察される。また、大腸菌べん毛モーターは、遊泳時に165~175 Hzで回転することがわかっており、これはknee speedの位置に近い速度である(Chawla et al., 2017; Darnton et al., 2007)。したがって、大腸菌べん毛モーターが低粘度の環境下で効率よく遊泳するためにも、FliLは必須の因子であるといえる。

このT-S curveの違いは、人工的な電気モーターのフィードバック制御の有無で見られる違いと類似している。一般に、オープンループ制御のモーターは高負荷領域で大きなトルクを生み出すことができるが、高速度領域での性能が低い。一方、現在の角度情報等をフィードバックして補正するようなクローズドループ制御を組み込んだモーターでは、角度情報をモニターする過程で最大トルクに制限がかかるが、高速度領域まで発生トルクを維持することが可能である。本来、低速度領域からknee speedの領域まで安定したトルクを生み出すべん毛モーターの特性が、FliLの欠損によって失われてT-S curveが直線的になったことから、FliLはべん毛モーター内でクローズドループ制御をおこなっている可能性が考えられる。つまり、FliLもモーターの位置情報(たとえばMotAとFliGの相対的な位置関係)をモニターして、イオンの流れに共役したトルク発生を制御しているのではないだろうか。実際に、FliLの欠損によって高負荷条件下でのモータートルクはわずかに上昇した(Fig. 2-9)。リザレクション実験の結果を見ると、 $\Delta fliL$ 株のモーターでは組み込まれた固定子の数に対してほぼ完全に直線的に速度が上昇しているのに対して、FliL+株では固定子数が増えるにしたがって速度上昇の幅が小さくなった(Fig. 2-10)。すなわち、複数の固定子ユニットによるトルク発生の協同性がFliLの機能によって上昇していることがわかる。つまり、FliLは各ユニットのトルク発生の機能のある程度制限しており、別のユニットのはたらきによって駆動されたモーターの回転を感知して、イオンの流れと共役したトルク発生のメカノケミカルサイクルを進めていると考えられる。このモデルを本研究ではFliLの機能モデルとして提唱する(Fig. 2-11)。

モーター回転時の負荷に応じた固定子ユニットの機械的な刺激に対する感受性は、Catch bond機構として知られている(Nord et al., 2017a)。固定子ユニットが高負荷条件下でトルクを生み出すと、固定子ユニットのBサブユニットのplug領域周辺が強く引っ張られる(Hosking et al., 2006; Kojima et al., 2018)。これによって、固定子ユニットのPGB

ドメインとペプチドグリカン層の親和性が上昇し、結果として固定子ユニットはモーターに安定して組み込まれる。また、plug領域周辺を欠損させると、モーターの負荷感受性が大きく変わることや(Castillo et al., 2013), FliLが固定子ユニットから解離することが報告されている(Lin et al., 2018). つまりFliLは、固定子ユニットがモーターに組み込まれて機能する際、固定子ユニットのplug領域周辺に結合し、plug領域の伸びた構造を安定化させていると考えられる。Fig. 2-7で示されたように、低負荷条件下でFliLをもたない固定子ユニットの解離レートが高い理由として、FliLの欠損によってplug領域周辺の構造が不安定になる可能性がある。最近の報告では、固定子ユニットの結合・解離の速度は、トルクの発生量によって決定されることが示されている(Wadhwa et al., 2021). これを考慮すると、FliLはモーター内で協同的にはたらく固定子ユニットが生み出すトルクを上昇させることによって、ペプチドグリカン層への結合を強化している可能性がある。

近年、クライオ電子顕微鏡を用いて固定子ユニットの構造を決定した報告では、2分子のMotBを5分子のMotAが取り囲んでおり、プロトン流に応じた固定子ユニットの回転が回転子に伝わることでトルクを発生させるというモデルが提唱されている(Deme et al., 2020; Santiveri et al., 2020). このモデルでは、1個のプロトンの結合解離にともなって、2分子のMotBを軸として5分子のMotAは平均36°ずつ回転することが予想されている。すなわち、固定子を取り囲む10分子のFliLは、常に同じ角度でMotAが回転するように制御している可能性がある。

大腸菌べん毛モーターのT-S curveが直線的になる条件は、いくつか報告されている。例えば、サルモネラ菌のMotB(D33E)変異によってプロトンの透過に異常が生じ、負荷感受性を失って直線的なT-S curveを示すことが報告されている(Che et al., 2014). つまり、本来のkneeをもつT-S curveとなるためには、プロトンの透過が正常におこなわれており、さらにこれをFliLが制御している必要があると考えられる。また、CCW回転時のT-S curveは曲がっているが、CW回転時は直線的であることも知られている(Yuan et al., 2010). 本研究では、すべてCCW方向のみに回転するモーターを用いてFliLの機能を調査したため、今後モーターの回転方向とFliLの機能との関係を調べることは興味深いことである。さらに、PGBドメインに変異をもち、ペプチドグリカンと強く結合する固定子ユニットも発見されている(詳細は第三章で述べる)。これを利用して、固定子ユニットとペプチドグリカン層との結合強度に対するFliLの効果を検証することも可能であろう。

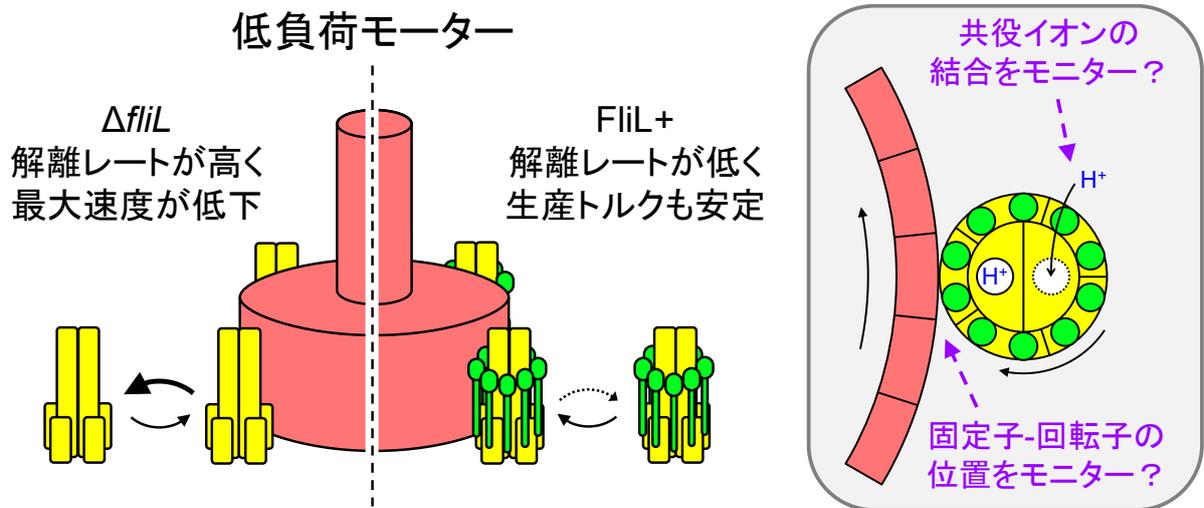


Fig. 2-11. FliLの機能モデル

(左) FliLの有無による固定子ユニットの組み込み効率の変化を示す模式図。FliLは結晶中で10回対称性のリング構造をとり、その内径は固定子ユニットの大きさと一致しているため、FliLが固定子ユニットを取り囲むように機能するモデルが提唱されている。低負荷時には、FliL欠損により固定子ユニットの結合安定性が低下してモーターからの解離率が高くなり、モーター最大回転速度は低下する。矢印は、固定子ユニットの回転子への結合率と解離率の違いを示している。

(右) 回転子と固定子の相互作用をFliLが調節するモデル。回転子の各ボックスはFliG分子を示す。2分子のMotBが5分子のMotAに囲まれ、さらに10分子のFliLがMotBのplug領域を取り囲む形で、固定子ユニットが安定に存在する。FliLは、MotBへのプロトンの結合や、MotAとFliGの相対的な位置関係をモニターし、固定子ユニットの回転を制御する。このFliLによるフィードバック制御により、固定子ユニットは幅広い負荷に対して安定したトルクを発生させる。

### 第三章

## 入力エネルギー変化やNa<sup>+</sup>チャンネル阻害剤がPomAPotBモーターに与える影響

### 1. 背景および目的

入力エネルギーの変化に対するべん毛モーター回転トルクの制御機構は、主にNa<sup>+</sup>駆動型モーターをもつビブリオ菌などを用いて精力的に研究されてきた(Atsumi et al., 1992; Atsumi et al., 1990; Hirota & Imae, 1983; Muramoto et al., 1995; Sowa et al., 2003). 本研究では、大腸菌べん毛モーターの回転計測において、入力エネルギーを容易に制御できるNa<sup>+</sup>駆動型キメラモーターを利用しようと考えた。大腸菌が本来もつ野生型固定子ユニットMotAMotBはH<sup>+</sup>駆動型であるため、入力エネルギーの制御には不向きである。一方、ビブリオ菌がもつPomAPomBはNa<sup>+</sup>を共役イオンとして利用するものの、大腸菌内では機能しない。そこで本研究では、大腸菌体内でNa<sup>+</sup>駆動型固定子ユニットとして機能するPomAPotBを使用した。PotBは、PomBのN末端側とMotBのC末端側を融合したキメラタンパク質である(Fig. 3-1) (Asai et al., 2003)。PomAPotBモーターは、ビブリオ菌の極べん毛モーターと同様に、環境中のNa<sup>+</sup>濃度の変化に応答する性質をもつほか、アミロライドやフェナミルなどのNa<sup>+</sup>チャンネル特異的阻害剤が作用するため、容易に入力エネルギーを制御することが可能である(Inoue et al., 2008; Lo et al., 2013)。フェナミルは、アミロライド誘導体の中で最も強力にNa<sup>+</sup>駆動型モーターの回転を阻害する薬剤である。また、フェナミルによる阻害はNa<sup>+</sup>に対して非競合的であることや、フェナミルの相互作用部位はNa<sup>+</sup>結合部位と同一ではなく、Na<sup>+</sup>チャンネル形成部分の内部にフェナミル結合部位が存在することが示唆されている(Kojima et al., 1999)。

PomAPotBモーターをもつ大腸菌は、PomAPotBの発現量を適切に制御するとNa<sup>+</sup>を含む軟寒天培地上でスウォーム能をもつ。スウォームとは、細菌が走化性とべん毛運動を発揮することによって、培地上でコロニーが円形状に広がる現象である。そのため、Na<sup>+</sup>をほとんど含まない軟寒天培地上ではNa<sup>+</sup>駆動型モーターは機能しないため、固体培地上でよく見られるような小さなコロニーを形成する。このような条件下で、少しでも広がった集団を継代培養して選択圧をかけるという手法により実験室内での進化を誘導させると、モーター回転を駆動できる変異体を単離することができる。このようにしてスウォ

ーム能を回復させた変異株の全ゲノム解析がおこなわれ、PotBへの点変異G20Vが独立に複数単離されたことが明らかとなった。本研究ではこの変異型固定子ユニットPomAPotB(G20V)をもつモーターの回転解析をおこない、固定子ユニットがもつ共役イオン選択の柔軟性について考察した。

また、エラーを誘発する特殊なPCR法で*potB*遺伝子に対してランダムな変異を導入し、フェナミルを含む培地上でスウォーム能を発揮できるような変異体を選択することで、フェナミルに耐性をもつ変異型PomAPotBがいくつか単離された。本研究ではこの変異型PomAPomBモーターについても、入力エネルギーを変化させた条件やフェナミルを含む条件下でのモーター回転速度を解析し、固定子ユニットがもつ特性について考察した。

さらに、最近報告された新規アミロライド誘導体の中で、PomAPotBモーターをもつ大腸菌の遊泳機能の阻害剤として新たに特徴づけられた2種類の薬剤BB2-50FとHM2-16Fについての研究をおこなった(Fig. 3-2) (Buckley et al., 2018; Buckley et al., 2019)。これまでに報告されているアミロライド誘導体の中で、フェナミルが最も低濃度でNa<sup>+</sup>駆動型モーターの回転を阻害することが可能な薬剤として知られているが、これらの薬剤はフェナミルと同程度の濃度で十分な阻害効果をもつ。本研究では、従来のビーズアッセイと、ストレートフックに金ナノ粒子を結合させるシステムを使用したモーター回転計測をおこない、これらの新規薬剤がモーター回転に与える影響を解析した。

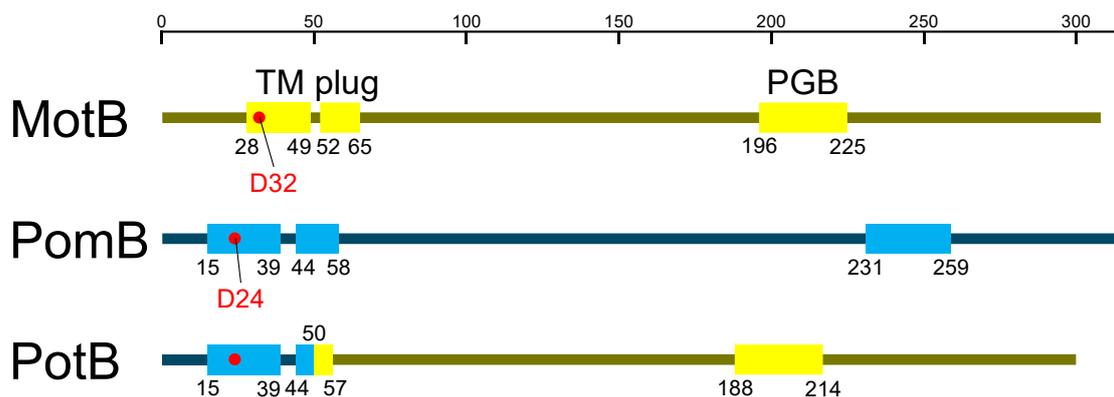


Fig. 3-1. キメラ固定子タンパク質PotBの配列

PotBは、*V. alginolyticus*のPomBの1~50残基と大腸菌MotBの59~308残基からなる全長300残基のタンパク質であり、plug領域の途中で配列が置き換わっている。このPotBと*V. alginolyticus*のPomAを大腸菌体内で発現させることで、 $\text{Na}^+$ 駆動型固定子ユニットとして機能する。MotB D32とPomB D24は、それぞれ共役イオンである $\text{H}^+$ と $\text{Na}^+$ の結合部位である。アミノ酸配列上の膜貫通(TM)ドメイン、plug領域、ペプチド結合(PGB)ドメインの位置をそれぞれ模式的に示した。

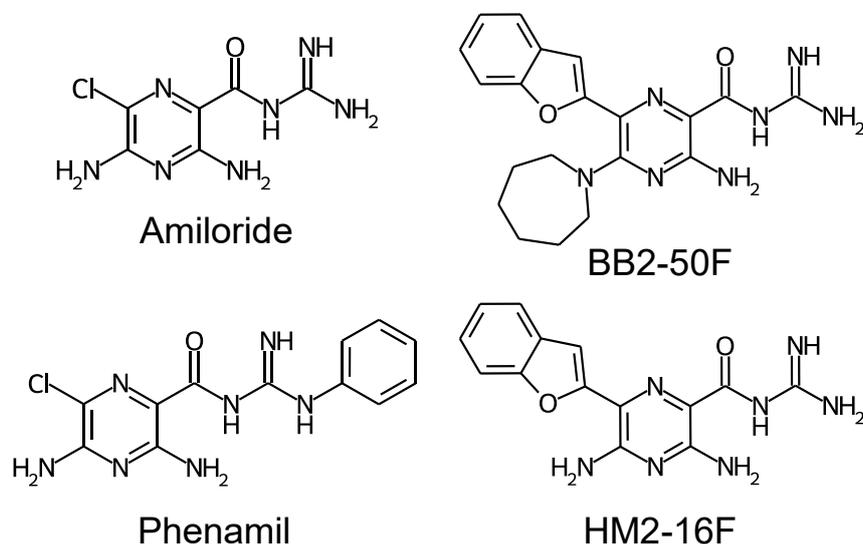


Fig. 3-2.  $\text{Na}^+$ チャネル阻害剤アミロライドとその誘導体の構造

アミロライドは代表的な $\text{Na}^+$ チャネル阻害剤である。フェナミルは、これまでに報告された中で最低の濃度で $\text{Na}^+$ 駆動型モーターの回転を十分に阻害できるアミロライド誘導体である。本研究で使用した新規アミロライド誘導体BB2-50FとHM2-16Fは、ベンゾフランやヘキサヒドロ-1H-アゼピンを有する(Buckley et al., 2018; Buckley et al., 2019)。

## 2. 実験材料と方法

### 菌株とプラスミド, 培養条件

本研究で使用した菌株をTable 3-1, プラスミドをTable 3-2, バッファーをTable 3-3に示した. 培地の組成は, Table 2-4に示したものを使用した. 培養は第二章で述べた方法と同様におこなった.

Table 3-1. 本研究で使用した菌株

Strain	Genotype or Description	Reference
JHC36	$\Delta motAmotB \Delta cheY \Delta pilA fliC$ -sticky	Inoue et al., 2008
SHU174	$\Delta motAmotB \Delta cheY \Delta fliC fliK2798 flgE_{+GSS+3Cys}$	This study

Table 3-2. 本研究で使用したプラスミド

Plasmid	Genotype or Description	Reference
pBAD33	cloning vector, $Cm^r$ , $P_{BAD}$	Guzman et al., 1995
pSYC409	pBAD33- <i>motAmotB</i>	Lab stock
pSHU1234	pBAD33- <i>pomApotB</i>	This study
pSHU146	pBAD33- <i>pomApotB</i> (Y163F/M164V)	This study
pSHU149	pBAD33- <i>pomApotB</i> (F22Y/L28Q)	This study
pSHU378	pBAD33- <i>pomApotB</i> (G20V)	This study
pSYC28	pMMB206- <i>motAmotB</i>	Lab stock

Table 3-3. 本研究で使用したバッファー

名称	組成
MTB	10 mM KPi, 0.1 mM EDTA・2K, pH = 7.0
85Na MTB	10 mM KPi, 0.1 mM EDTA・2K, 85 mM NaCl, pH = 7.0
85K MTB	10 mM KPi, 0.1 mM EDTA・2K, 85 mM KCl, pH = 7.0 (KCl [Wako])
85Li MTB	10 mM KPi, 0.1 mM EDTA・2K, 85 mM LiCl, pH = 7.0 (LiCl [Wako])
85Choline MTB	10 mM KPi, 0.1 mM EDTA・2K, 85 mM Choline-Cl, pH = 7.0 (Choline chloride [Sigma-Aldrich])
67Na MTB	10 mM KPi, 0.1 mM EDTA・2K, 67 mM NaCl, 10 mM Lactate・Na, pH = 7.0
HEPES-Tris	100 mM HEPES-Tris, pH = 7.0 + 0~85 mM KCl or NaCl

## テザードセルアッセイ

パスツールピペットを使用し、細い管の中を20~30回往復させることで、2次培養液に含まれる菌体がつstickyフィラメントのシェアリングをおこなった。85K MTBを使用して、遠心分離による2次培養液の洗浄を2回おこなったあと、フローチャンバー内にサンプルを流し入れて静置した。この操作により、stickyフィラメントをチャンバー内でカバーガラスに付着させた。観察前に、各条件に合わせたバッファーをチャンバー内に流し入れることで、ガラスに付着しなかった浮遊した細胞を洗い流した。

Na<sup>+</sup>濃度の調節は、85K MTBと85Na MTBを混ぜ合わせるによりおこなった(例えば、Na<sup>+</sup>濃度を30 mMに調節する場合は、85Na MTB : 85K MTB = 30 : 55で混合した)。フェナミルや新規アミロライド誘導体の阻害剤は、DMSOに懸濁して10 mMに調節したストックを用意して、-30℃のフリーザーに保存した。阻害剤溶液は、アッセイの直前に必要な濃度の100倍になるようにDMSOで希釈した後、実験用バッファーに1/100量を添加して使用した。阻害剤を含まない条件での計測結果を比較する場合にも、条件を揃えるために常にバッファーに1%のDMSOを添加して使用した。

HEPES-Trisを使用した実験においては、細胞培養液後のサンプル調製時もすべてHEPES-Trisを用いておこなった。85 mM KClもしくはNaClを含むHEPES-Trisを作製し、塩濃度を調節する場合は、KClとNaClのどちらも含まないHEPES-Trisと混ぜ合わせて観察時に使用した。

カバーガラスにべん毛が付着し、モーターの回転によって菌体が回転する様子を顕微鏡で観察した。20倍の対物レンズを使用して観察をおこない、CCDカメラ(DMK 21AU618 [The Imaging Source])を用いて60 fpsで10秒間撮影した。動画の解析は、LabVIEWで構築されたプログラムを用いておこなった。ROIを設定して菌体を選択し、各フレームの重心位置を算出した。回転速度は、以下の式に表す角速度RCDを計算することで求めた。
$$RCD = \frac{|A_x V_y - V_x A_y|}{(V_x^2 + V_y^2)}$$
ここで、 $V_x$ と $V_y$ はそれぞれ速度のx, y成分で、 $A_x$ と $A_y$ はそれぞれ加速度のx, y成分である。その後、中央値フィルター(median rank = 4)で処理した(Alon et al., 1998)。

K<sup>+</sup>が共役イオンである可能性を考慮して、PomAPotB(G20V)変異型モーターの速度変化の様子を、フローチャンバー内に200 μlの85Choline MTBを流し入れた直後に計測を開始して解析した。この場合のみ、5分間の撮影をおこなった。また、細胞ごとのモーター速度変化の様子が捉えやすいように、median rankを20に設定した。

## ビーズアッセイ / 金ナノ粒子アッセイ

ビーズアッセイおよび金ナノ粒子を使用したストレートフックシステムによるモーター回転計測は、第二章で述べた方法と同様におこなった。Na<sup>+</sup>濃度を調節する実験の場合は、サンプルの洗浄をNa<sup>+</sup>を含まない85K MTBでおこなった。PomAPotB発現株の低負荷回転時の最大速度は1,000 Hzに近いため、この場合のみ高速カメラの撮影レートを2,000 fpsに設定した。フェナミルと新規薬剤は、テザードセルアッセイと同様にDMSOで懸濁したストックを希釈して使用した。このとき、観察中に使用するバッファーに含まれるDMSOの濃度が常に1%となるようにバッファーを適宜調製した。

### 3. 結果

#### PotB(G20V)モーターのNa<sup>+</sup>濃度依存性

Na<sup>+</sup>をほとんど含まない環境下で運動機能を回復させた、細胞継代による進化の誘導実験で単離されたPotB(G20V)の基本特性を調べるため、テザードセルアッセイを用いたモーター回転計測をおこなった。G20は、PotBの配列の中でTMドメインに位置する残基であり、特にNa<sup>+</sup>と最も強く相互作用する残基であるD24に近い。motAMotB遺伝子を欠失し、fliC-stickyをもつJHC36を、pSYC409(MotAMotB)、pSHU1234(PomAPotB)、pSHU378(PomAPotB(G20V))でそれぞれ形質転換した菌株を使用した。2次培養時に1 mM Arabinoseを加えて、それぞれの固定子ユニットを発現させた。溶液の塩濃度の変化に対するモーター回転速度の応答を計測するため、大腸菌のべん毛による運動性の評価実験でよく用いられるMTBだけでなく、塩を含まないHEPES-Trisを使用した実験もおこなった。

85Na MTBもしくは85Li MTBと85K MTBを混合させることで、Na<sup>+</sup>、Li<sup>+</sup>濃度をそれぞれ調節した条件下でテザードセル回転計測をおこなった。その結果、PotB(G20V)モーターはNa<sup>+</sup>もLi<sup>+</sup>も含まない環境中で回転可能であることがわかった(Fig. 3-3)。Na<sup>+</sup>もしくはLi<sup>+</sup>の濃度上昇に応じて回転速度が上昇する性質は失われておらず、PomAPotBモーターの傾向と同様であることが示された。また、85 mMのLi<sup>+</sup>を含む条件下での速度が、PotB(G20V)変異によって上昇した。これは、G20V変異によってD24への共役イオンの親和性が上昇したことを反映している可能性がある。MotAMotBモーターの回転速度は、いずれのカチオン濃度条件下でも変わらなかった。

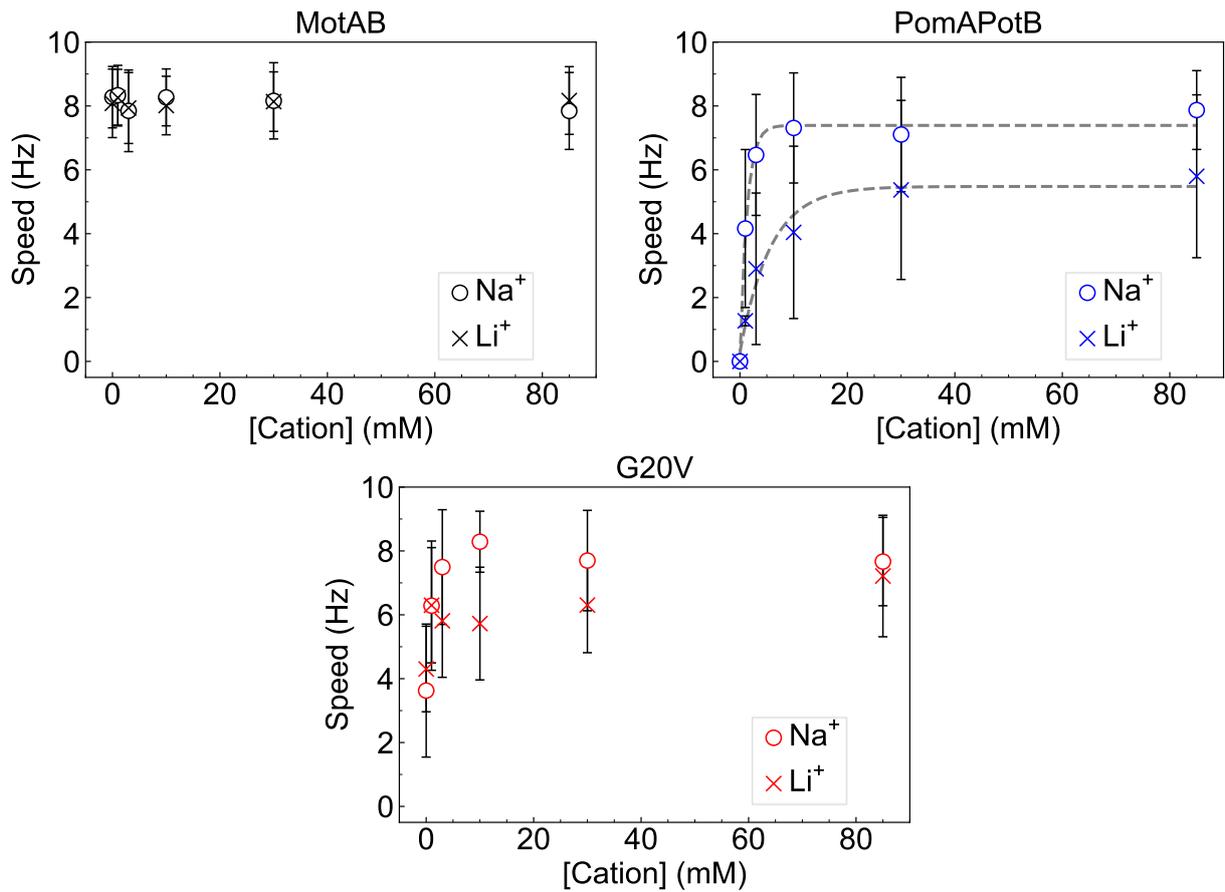


Fig. 3-3. PotB(G20V)モーター基本特性

テザードセルアッセイにより、Na<sup>+</sup>濃度に応じた変異型PomAPotBモーターの回転速度を計測した。バッファーに含まれる共役イオン濃度は、[NaCl or LiCl] + [KCl] = 85 mMとなるように調節することで、イオン強度を一定にした。MotAMotBモーターは、溶液に含まれるカチオンの種類によらず、8 Hz付近で回転した。PomAPotBモーターは、1 mMのNa<sup>+</sup>で回転し始め、Na<sup>+</sup>濃度に依存して指数関数的に速度が上昇し、最大7 Hz以上で安定した。カチオンをNa<sup>+</sup>からLi<sup>+</sup>に変更すると、速度の上昇率が低下したことから、Li<sup>+</sup>の利用効率が低いことがわかる。PotB(G20V)モーターは、Na<sup>+</sup>とLi<sup>+</sup>濃度上昇に対してPomAPotBモーターと同じ傾向の速度上昇を示したが、Na<sup>+</sup>またはLi<sup>+</sup>を含まない溶液中でも4 Hzの回転を示した。また、85 mM Li<sup>+</sup>条件下での速度が通常のPomAPotBモーターよりも高いことから、G20V変異によってD24への共役イオンの親和性が上昇した可能性が考えられる。

また、これらのモーターの回転特性にpHやCCCP濃度が与える影響を計測した(Fig. 3-4). pHが6~8の範囲では、どの固定子ユニットを使用した場合もモーター速度は変化しなかった. CCCPを用いて細胞内外の膜電位差とプロトンの濃度勾配を減少させたところ、固定子ユニットが利用する共役イオンの種類によらず、すべてのモーターでCCCP濃度に対して同様の傾向で速度が減少する様子が観察された.

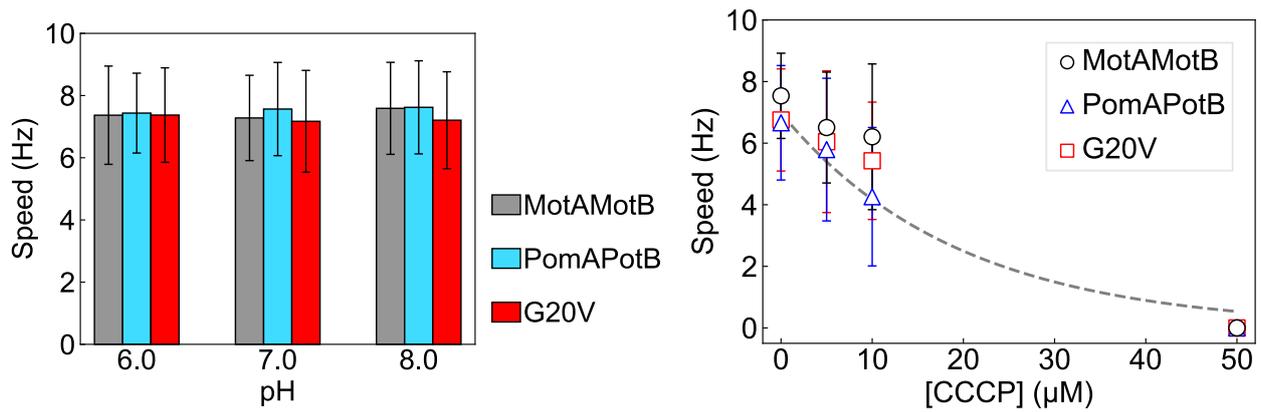


Fig. 3-4. テザードセル回転速度に対するpHおよびCCCPの影響

モーター回転速度は、固定子ユニットの種類によらず、pHが6~8の範囲で変化しなかった. CCCPによるモーター回転への影響についても、すべてのモーターで速度減少の程度がほぼ一致した.

PotB(G20V)モーターがNa<sup>+</sup>もLi<sup>+</sup>も含まない85K MTB中で回転したことから、K<sup>+</sup>を共役イオンとして使用している可能性が考えられた。そこで、塩を含まないHEPES-TrisにKClを添加することで、K<sup>+</sup>濃度依存的に回転速度が変化するか調査した。その結果、[K<sup>+</sup>] = 0~10 mMでは回転せず、30 mM以上で低速回転が見られた(Fig. 3-5)。[K<sup>+</sup>] = 85 mM条件下においても約1 Hzの回転速度であり、85K MTB条件下でのテザードセル回転速度(Fig. 3-3)と一致しなかった。30 mM以上という非常に高い閾値から、K<sup>+</sup>が共役イオンとして使用されている可能性は低いと考えられた。

さらに、85K MTB条件下から、85Choline MTBで洗浄した直後からのモーター回転速度変化を計測した。その結果、MotAMotBモーターの回転速度は少なくとも5分間安定したのに対して、PotB(G20V)モーターの速度は徐々に減少し、1~5分程度で回転が停止した(Fig. 3-6)。もしPotB(G20V)モーターがK<sup>+</sup>を共役イオンとして利用しているなら、K<sup>+</sup>濃度の急激な減少に反応して回転速度も急激に減少するはずであるため、この結果からもK<sup>+</sup>が共役イオンとして使用されている可能性は低いと考えられた。また、回転速度が段階的に減少したことから、この速度減少は固定子ユニットの解離によるものである可能性がある。つまり、K<sup>+</sup>濃度はPomAPotB(G20V)複合体のモーターへの組み込みに関与していると考えられるが、これについてはさらなる検証が必要である。

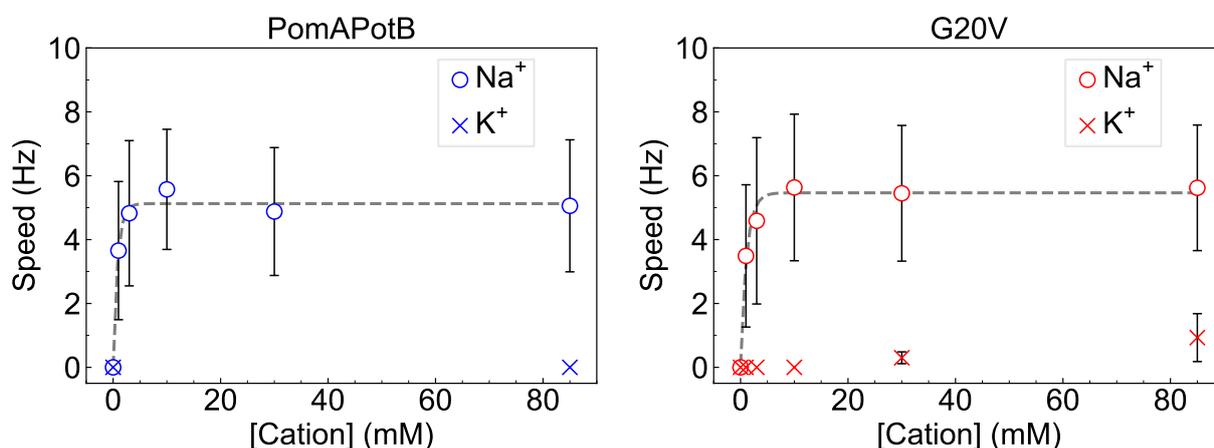


Fig. 3-5. HEPES-Trisを使用した条件下のテザードセル回転速度

PomAPotBモーターは、MTB使用時と同様のNa<sup>+</sup>濃度依存的な速度上昇を示し、最大で5 Hz以上の速度で安定した。PotB(G20V)モーターも同様の傾向であり、Na<sup>+</sup>を含まない条件下では回転しなかった。30 mM以上のK<sup>+</sup>を含む条件下でPotB(G20V)モーターは非常に低速の回転を示したが、最大でも1 Hz程度であった。

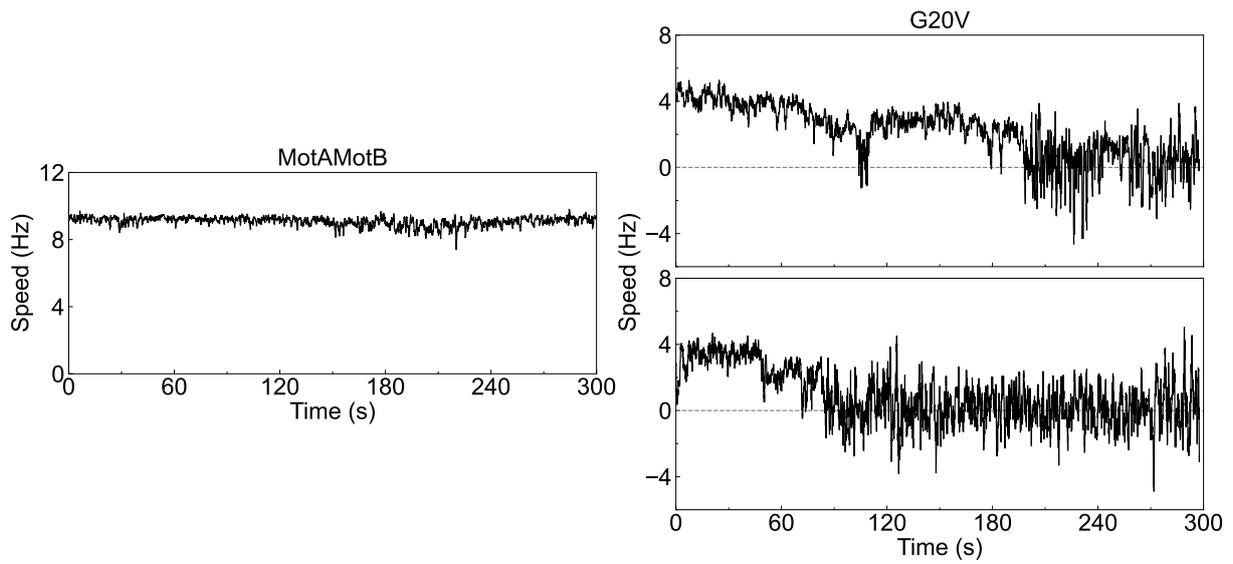


Fig. 3-6. K<sup>+</sup>除去後の細胞ごとのモーター速度変化

85K MTB条件下から、85Choline MTBで洗浄した直後からのモーター回転速度変化。(左) MotAMotBモーターは5分間安定した速度で回転した。(右) PotB(G20V)モーターは1~5分程度で回転が停止した。速度が段階的に減少したことから、この速度減少は固定子ユニットの解離を反映している可能性がある。

## フェナミル耐性を獲得した変異型 PomAPotB モーターの Na<sup>+</sup>濃度依存性

pSHU1234(pBAD33-*pomA*potB)の*potB*部分にランダムに変異を導入したプラスミドを *motA**motB* 遺伝子欠失株に移入したところ、フェナミルを含む軟寒天培地上でスウォーム能を示したいくつかの変異体が単離された。本研究ではこのうち、Y163F M164Vと、F22Y L28Qに着目した。Y163, M164は固定子ユニットBサブユニットにおいて、回転子に組み込まれる際にペプチドグリカン層と結合するPGBドメインに位置する残基であり、フェナミル結合部位とは離れている。F22, L28は、PotBのTMドメインに位置する残基であり、Na<sup>+</sup>チャンネル部位のD24に近い。F22Yについては、ビブリオ菌を用いた研究においてフェナミル耐性を獲得した変異型 PomBのうちの1つとしてすでに報告されており、チロシンだけでなく、トリプトファン、セリン、アスパラギンへの置換によってもフェナミル耐性を示すことがわかっている(Terauchi et al., 2011)。

pSHU1234から発現される通常のPotBをもつ菌株のモーター回転特性と比較して、pSHU146が発現するPotB(Y163F M164V)、もしくはpSHU149が発現するPotB(F22Y L28Q)をもつモーターの機能を評価した。JHC36をpSHU1234, pSHU146, pSHU149のいずれかで形質転換した菌株を使用した。2次培養時に1 mM Arabinoseを加えて、それぞれの固定子ユニットを発現させた。テザードセル回転計測の結果、PotB(Y163F M164V)を発現する菌株のモーター回転速度は、PomAPotBモーターと比較して、低いNa<sup>+</sup>条件下で高い速度を生み出せることがわかった(Fig. 3-7)。0.3 mMのNa<sup>+</sup>条件下で、PomAPotB株は2 Hz程度の回転速度であったのに対して、この変異体は約6 Hzで回転した。これに対してPotB(F22Y L28Q)モーターは、1 mM Na<sup>+</sup>以下の濃度では回転せず、最大速度も低く、Na<sup>+</sup>濃度上昇に対する応答が遅かった。これは、TMドメインの変異によってD24へのNa<sup>+</sup>の結合親和性が低下したためであると考えられる。

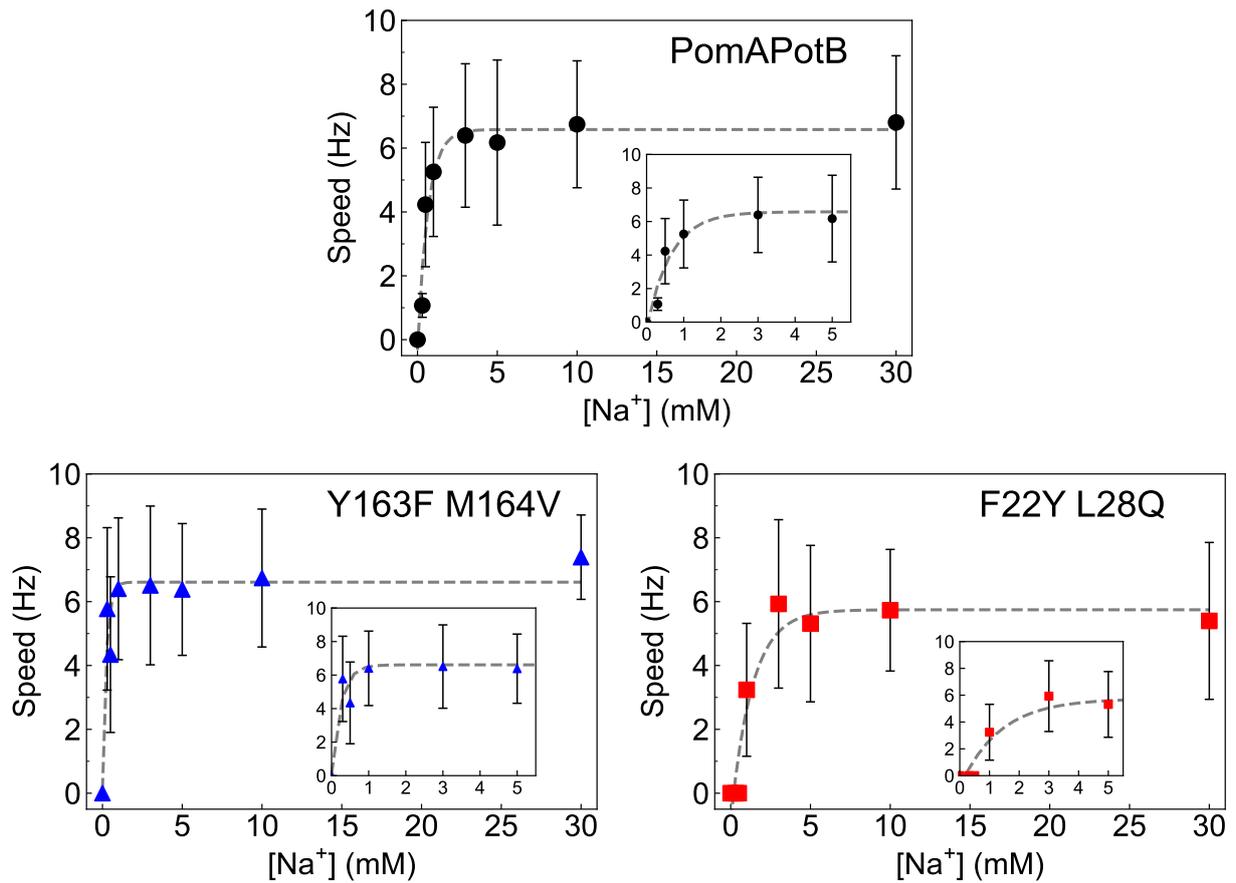


Fig. 3-7. フェナミル耐性変異型PomAPotBモーターのNa<sup>+</sup>濃度に応じた回転速度

テザードセルアッセイにより、Na<sup>+</sup>濃度に応じた変異型PomAPotBモーターの回転速度を計測した。PomAPotBモーターは、[Na<sup>+</sup>] = 0.3 mM以上で回転が見られ、指数関数的に速度が上昇し、最大6 Hz付近で安定した。PotB(Y163F M164V)モーターは、[Na<sup>+</sup>] = 0.3 mMですでに6 Hz付近の速度で回転した。PotB(F22Y/L28Q)モーターは、[Na<sup>+</sup>] = 1 mM以上から回転し始め、速度の上昇率も緩やかであり、最大速度は6 Hz以下であった。図のinsetは、[Na<sup>+</sup>] = 0~5 mMの範囲を拡大した。点線は指数関数フィット ( $y = a \times \exp(-bx) + c$ )の結果であり、時定数( $b$ の逆数)はそれぞれPomAPotB: 0.65 mM, Y163F M164V : 0.25 mM, F22Y L28Q : 1.33 mMであった。

## フェナミルによる変異型 PomAPotB モーター回転阻害効果

単離された2種類のフェナミル耐性 PotB がフェナミル存在下でモーター回転を駆動する能力を測るために、フェナミル濃度がモーター回転速度に与える影響を調べた。通常の PomAPotB モーターは、1  $\mu\text{M}$  のフェナミルの添加のみで速度が半減し、5  $\mu\text{M}$  でほとんど停止した (Fig. 3-8)。PotB (Y163F M164V) モーターは、フェナミル濃度の上昇に対して同じように速度を減少させる応答が見られたが、その減少は緩やかであった。速度の減少率を指数関数フィットにより算出したところ、野生型 PomAPotB と Y163F M164V 変異型で回転速度を半減させるフェナミル濃度は、それぞれ約 1  $\mu\text{M}$  と 3  $\mu\text{M}$  であった。一方で、TMドメインの変異体 PotB (F22Y L28Q) モーターでは、20  $\mu\text{M}$  フェナミル条件下でも回転速度は減少せず、100  $\mu\text{M}$  で半減した。これは、フェナミルの強力な Na<sup>+</sup> イオンチャネル阻害効果をほとんど受け付けていないことを示している。

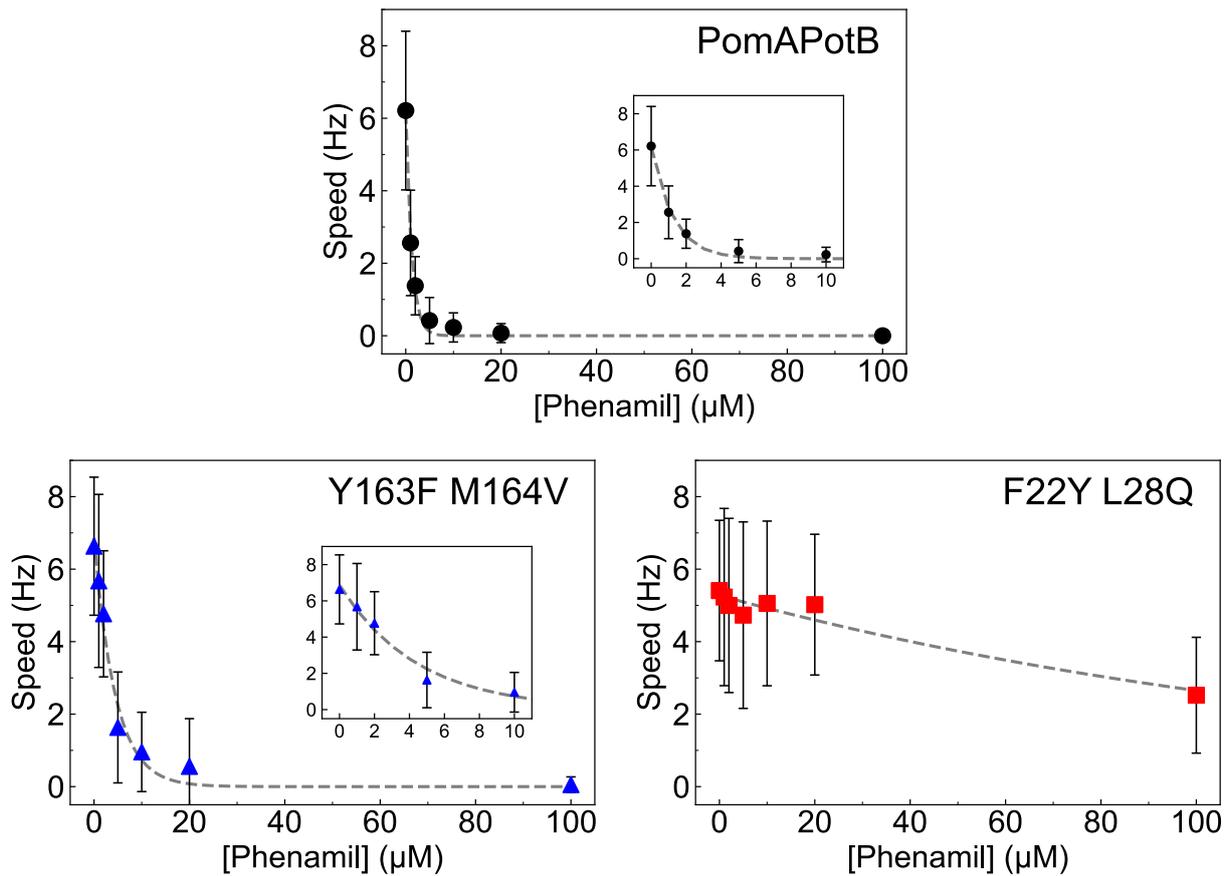


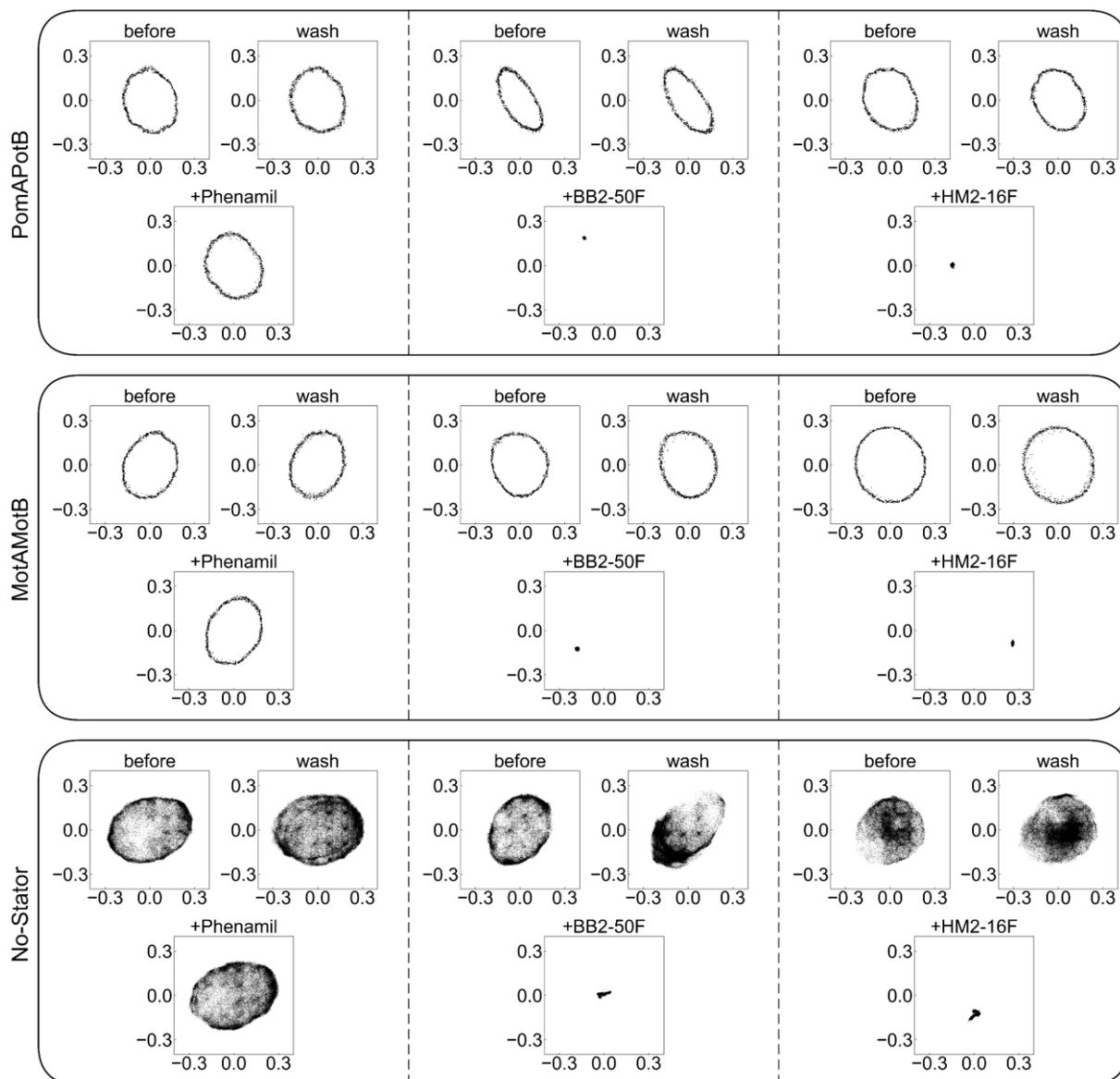
Fig. 3-8. フェナミル耐性変異型PomAPotBモーターのNa<sup>+</sup>濃度に応じた回転速度

フェナミルによるPomAPotBモーターの回転阻害効果をテザードセルアッセイで計測した。PotB(Y163F M164V)モーターは、フェナミル濃度増加に対する速度減少の割合がPomAPotBモーターよりも緩やかであった。PotB(F22Y L28Q)モーターは、20 μMまでのフェナミルでは回転が阻害されず、100 μMでも運動することが可能であった。フェナミル濃度に対する速度の減少を指数関数( $y = a \times \exp(-bx)$ )に当てはめ、時定数を算出した(PomAPotB : 1.2 mM, Y163F M164V : 4.5 mM, F22Y L28Q : 145 mM)。

## 新規アミロライド誘導体がべん毛モーター回転に与える影響

本研究で使用したアミロライド誘導体は、BB2-50FとHM2-16Fの2種類である。これらは、遊泳速度の計測やテザードセルアッセイを用いた最初のテストにおいて、10  $\mu$ Mの濃度でPomAPotBモーターの運動を完全に阻害した。しかし、この方法では細胞表面の接着性など、べん毛の回転機能以外の部分でテザードセルの回転に影響を与える可能性が考えられたため、本研究ではこれらの薬剤を用いて、ビーズアッセイにより1分子のべん毛モーターの回転阻害効果を検証した。

この実験で使用した菌株は、JHC36 pSHU1234である。また、MotAMotBモーターでの計測実験時は、この菌株とプラスミドベクターに合わせてJHC36 pSYC409(pBAD33-*motAmotB*)を使用した。固定子欠損株での実験は、固定子ユニットを発現するプラスミドを持たないJHC36を使用した。ビーズアッセイによるモーター回転軌道を計測した結果、BB2-50FとHM2-16Fの存在下でモーターの回転拡散が小さく抑えられていることがわかった(Fig. 3-9)。これは予想に反した結果であり、フェナミルを用いて同様の実験をおこなった場合にはPomAPotBモーターの速度は低下するものの、ビーズの空間的な拡散は阻害しないという結果とは異なるものであった。そこで、H<sup>+</sup>駆動型であるMotAMotBを発現させた株と、固定子ユニットを欠損した株を使用して同様の実験をおこなったところ、PomAPotBモーターの結果と同じく、新規薬剤はビーズの回転拡散を阻害した。



(単位:  $\mu\text{m}$ )

Fig. 3-9. アミロライド誘導体によるビーズアッセイの回転阻害効果

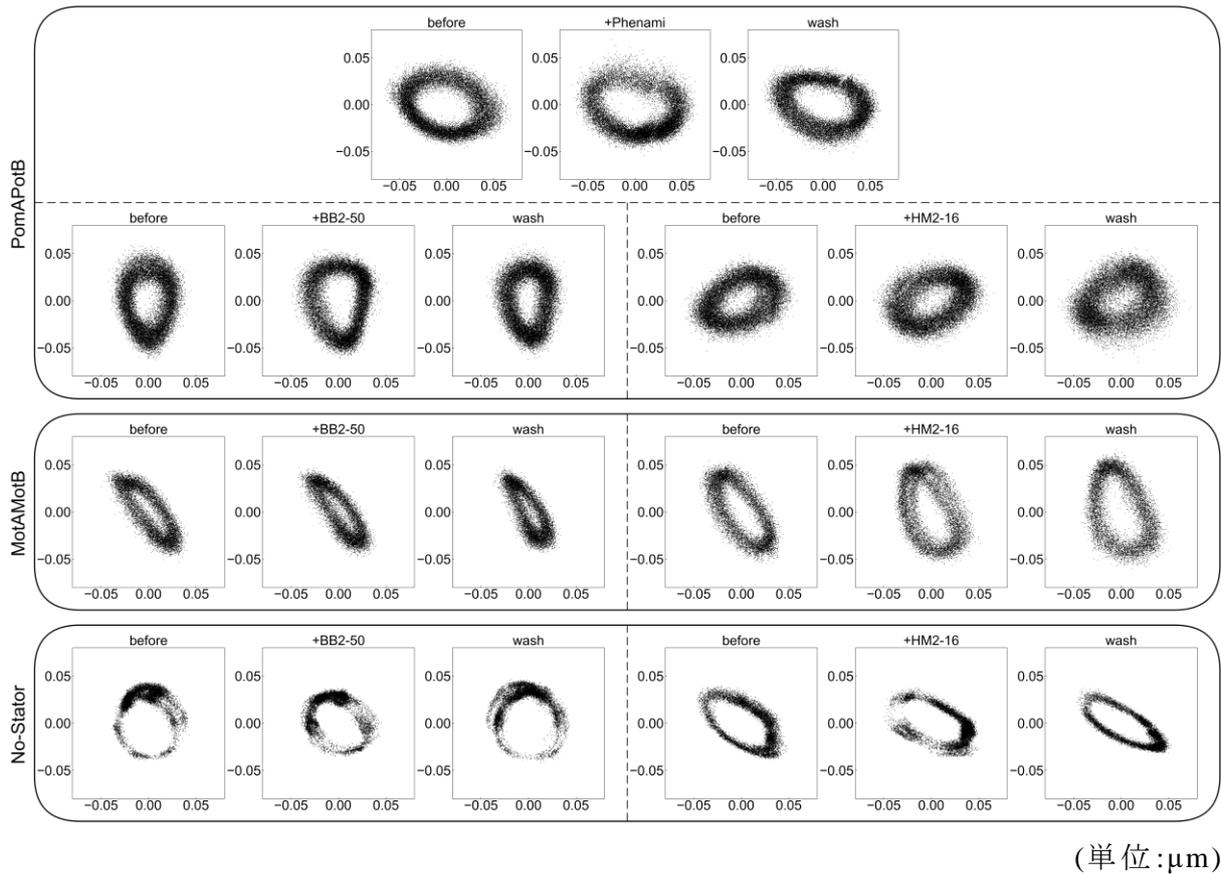
(上) PomA PotBモーター回転を直径  $1 \mu\text{m}$  のビーズアッセイで計測した. それぞれフェナミル, BB2-50F, HM2-16Fを添加する前,  $10 \mu\text{M}$  の濃度で添加した後, 薬剤洗浄後のビーズの動きを記録し, そのx-y座標を示した.  $1 \text{ kHz}$  のレートで計測し, 1秒間に相当する1,000個のデータポイントを使用して作図した. (中) MotA MotBモーターの場合. BB2-50FとHM2-16Fによる阻害効果はPomA PotBに対する効果と相違なく,  $\text{Na}^+$ チャネル特異的ではないことがわかった. (下) 固定子ユニットを持たないモーターの回転拡散運動. 1分間以上のデータポイントから作図した.

すべての薬剤について,  $10 \mu\text{M}$  の濃度で調整し, フローチャンバー内に  $50 \mu\text{l}$  流し入れることで添加した後,  $200 \mu\text{l}$  の  $85\text{Na MTB}$  で洗浄した.

## 金ナノ粒子アッセイによるアミロライド誘導体のモーター回転阻害の検証

ビーズアッセイでは直径1  $\mu\text{m}$ のビーズを使用したため、テザードセルアッセイでのテストでも考慮された表面効果が測定結果に与える影響を否定できない。その可能性を低減させるため、本研究で構築した金ナノ粒子を用いたモーター回転アッセイ法を応用した。この方法では、ストレートフックに直径60 nmの粒子を付着させるため、粒子が菌体表面と相互作用する可能性を極力排除することができる。また、この方法は極低負荷条件下でモーターの回転を計測するものであり、薬剤の添加による粘性抵抗の上昇やモーター回転時の負荷などの要因による信号の減衰がなく、回転子と固定子の相互作用によるモーターのダイナミクスを直接測定することができる。

この実験では、SHU174をpSYC28, pSYC409, pSHU1234または空ベクターpBAD33で形質転換した菌株を使用した。IPTGでMotAMotBの発現誘導が可能なpSYC28を初期のテスト実験で使用したが、ビーズアッセイの実験と発現ベクターや培養条件を一致させるため、pSYC409を使用したテストをおこない、結果に相違が無いことを確認した。金ナノ粒子アッセイをおこなった結果、PomAPotBモーター、MotAMotBモーター、固定子欠損モーターのどの条件においても、10  $\mu\text{M}$ のBB2-50FおよびHM2-16Fは金ナノ粒子の回転拡散に影響を与えないことがわかった(Fig. 3-10)。



(単位:  $\mu\text{m}$ )

Fig. 3-10. 金ナノ粒子アッセイを利用したモーター回転に薬剤が与える効果の測定

金ナノ粒子アッセイを利用して、PomAPotBモーターとMotAMotBモーターの回転に対する10  $\mu\text{M}$ の各薬剤が与える影響を解析した。PomAPotBモーターへのフェナミルの作用をポジティブコントロールとして、両固定子ユニットをもつモーターへのBB2-50FとHM2-16Fの作用を調べた。PomAPotBモーターは2 kHzのレートで、MotAMotBモーターと固定子ユニットを持たないモーターは1 kHzのレートで計測をおこなった。各プロットは、10秒間の金ナノ粒子のx-y座標の軌跡である。

10  $\mu\text{M}$ のフェナミルは、PomAPotBモーターの回転速度は低下させたが、回転拡散には影響しなかった。10  $\mu\text{M}$ のBB2-50FとHM2-16Fは、固定子の種類によらず、金ナノ粒子の回転を阻害しなかった。固定子ユニットを持たないモーターの回転拡散についても、10  $\mu\text{M}$ のBB2-50FとHM2-16Fは阻害効果を示さなかった。

#### 4. 考察

本研究では、Na<sup>+</sup>駆動型キメラ固定子ユニットPomAPotBを実験室内で進化させることによって単離された変異や、新規アミロライド誘導体によるべん毛モーター回転阻害効果を解析した。

PotB(G20V)の機能解析の結果は、周囲の環境の変化によってNa<sup>+</sup>駆動型モーターが自律的に共役イオン選択性を変化させたことを示している。今回単離された変異では、Na<sup>+</sup>もしくはLi<sup>+</sup>で駆動可能な固定子ユニットが、H<sup>+</sup>でも駆動できるように進化した可能性が高く、本来の共役イオンを含まない緩衝液中で十分に機能を発揮していた。Na<sup>+</sup>やLi<sup>+</sup>に対する親和性も上昇しているようであることから、G20V変異によってチャンネル内部の構造が変化して、共役イオン結合部位であるD24がより自由に動けるようになり、様々なイオンを効率よく利用可能になったと考えられる。人為的な点変異によって、共役イオンを変える実験も報告されている(Terahara et al., 2008)。単一の点変異によって共役イオンを変化させることが可能であるならば、べん毛モーターは自然界においても比較的容易に共役イオンを変化させている可能性が高い。しかし、これまでに報告されている固定子ユニットの共役イオンは限られており、一部の好アルカリ性細菌ではK<sup>+</sup>やRb<sup>+</sup>を共役イオンとして使用可能なMotPSユニットも発見されているが(Terahara et al., 2012)、ほとんどの菌種でH<sup>+</sup>もしくはNa<sup>+</sup>駆動型である。恒常性により細胞内Na<sup>+</sup>濃度が低く保たれていることや、自然界においてH<sup>+</sup>やNa<sup>+</sup>が普遍的に存在することから、より効果的にモータートルクに変換できるように共役イオンの選択性が進化してきた可能性がある。今後、Na<sup>+</sup>だけでなくH<sup>+</sup>の流れを制限した条件下で運動機能の進化を誘導することができれば、まったく新しいタイプの固定子ユニットを単離できるかもしれない。

フェナミル耐性を獲得した変異型PotBについては、その変異の箇所の違いによって、耐性を獲得した機構が異なると考えられる(Fig. 3-11)。細胞膜を拡散する固定子ユニットがモーター周辺に留まるためには、モーターに組み込まれる際にPGBドメインがペプチドグリカン層に結合する必要がある。この時、PGBドメインはplug領域周辺を引っ張り上げる。これにより、TMドメインのイオンチャンネル部位が露出し、固定子ユニットとしての機能を獲得する(Kojima et al., 2018)。また、入力エネルギーの喪失によって機能しなくなった固定子ユニットは、モーターから解離して再び細胞膜を拡散するようになる(Fukuoka et al., 2009; Sowa et al., 2005; Tipping et al., 2013)。PGBドメインに位置するPotBの

Y163 M164への変異は、低Na<sup>+</sup>濃度条件下でモーター回転速度を上昇させた。つまりこれらの変異は、ペプチドグリカン層への結合親和性に影響を与えていると考えられる。ペプチドグリカンに強く結合した固定子ユニットは、モーター回転子に結合してトルク発生をおこなう時間にも影響を与え、固定子がモーターから解離する頻度が低下することによって、同時に組み込まれる固定子ユニットの数を上昇させる可能性がある。つまり、フェナミル存在下においても多くの固定子ユニットがモーターに組み込まれた状態を維持することで、モーターを回転させていると考えられる。フェナミル結合部位に近いTMドメインに位置するF22 L28の変異は、フェナミルの結合に影響を与えると考えられる。フェナミルはNa<sup>+</sup>の1/1,000程度の濃度でも十分にNa<sup>+</sup>駆動型モーターの機能を阻害する効果がある(Kojima et al., 1999)。つまり、Na<sup>+</sup>よりも優先して固定子ユニットのチャンネル部位に結合する。しかし、これらのTMドメインの変異がフェナミルの親和性を低下させたために、モーターはフェナミル存在下でも十分な速度で回転することができたと考えられる。

キメラ固定子タンパク質PotBは、大腸菌の本来の固定子ユニットのBサブユニットであるMotBのPGBドメインを由来としているため、今回単離されたPGBドメインの変異をMotBに移入することも可能である。これを使用すれば、H<sup>+</sup>駆動型モーターへの影響を調べることができる。この変異が本当に固定子ユニットの組み込み効率に影響を与えているとすれば、同時に機能する固定子ユニット数が低下する低負荷条件下でのモーター回転においても、ユニット数が通常よりも多くなる可能性がある(Lele et al., 2013; Tipping et al., 2013)。これを検証することは、本研究で考察したPGBドメインの変異による効果を裏付けるだけでなく、固定子ユニットの離合集散過程に影響を与える変異の発見に繋がるため、非常に興味深い。

新規アミロライド誘導体BB2-50FとHM2-16Fは、期待した通りの固定子ユニットの共役イオンの透過を妨げるフェナミルと同じような効果ではなく、共役イオンの種類に依存しないモーター回転阻害効果を示した(Fig. 3-9)。金ナノ粒子とストレートフックシステムを用いた計測では、ビーズアッセイでの解析と同じ濃度のBB2-50F, HM2-16Fは、モーターの回転を阻害しなかった(Fig. 3-10)。つまり、BB2-50FとHM2-16Fによる回転阻害効果は、モーターの回転軸やLPリングを標的にしたものではないことがわかった。本研究での検証では、詳細な作用機序は明らかとならなかったが、固定子ユニットの共役イオンのタイプによらず、広い細菌種の運動を阻害する効果があることは事実である。べん毛回転による細菌の遊泳は、多くの病原性細菌がもつ特性でもある。従来細菌感染

症に対する抗生物質は、ほとんどが細菌の生育や増殖を阻害する殺菌剤であり、人体に有用な常在菌にも影響を及ぼす。そのため、本研究で特徴づけられた細菌の運動性を阻害する薬剤の開発は、創薬の観点から有用であると考えられる。今後の研究では、今回使用した薬剤や他の阻害剤を基にした新規誘導体を合成し、細菌のべん毛運動や生育を阻害する効果を検証することで、抗菌剤の開発に役立つ創薬につなげることができよう。

本研究でおこなった固定子ユニットの変異による影響の解析は、べん毛モーターを回転させる機能を解析するものであり、共役イオンの透過レートなどを1分子レベルで計測することは今後の課題である。1つのチャンネルの機能を評価する手法には、生体膜チップを人工的に形成するマイクロアレイデバイスが挙げられ、 $\alpha$ -ヘモリシンなどの膜タンパク質の基質輸送能を1分子レベルでハイスループットに測定可能であることが報告されている(Watanabe et al., 2018; Watanabe et al., 2014)。もしこれを固定子ユニットの機能解析に利用することができれば、より直接的に固定子ユニットの共役イオン輸送能を計測することが可能となり、新たなチャンネル阻害剤や変異型ユニットのスクリーニングへの応用が期待される。

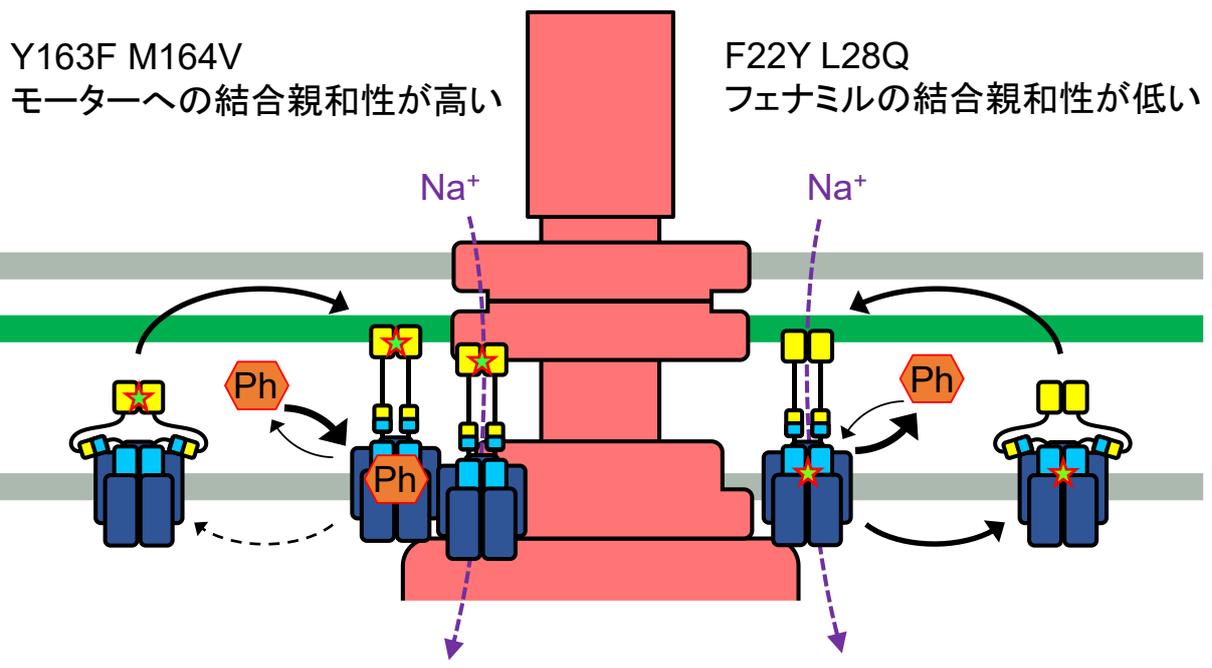


Fig. 3-11. フェナミル耐性ユニットの機能モデル

フェナミルの結合親和性と、固定子ユニットのモーターへの結合・解離レートを模式的に表した。(左) PGBドメインへの変異 Y163F M164V は、ペプチドグリカン層への結合親和性を上昇させ、フェナミルの効果によりトルクを発生できなくなった固定子ユニットがモーターから解離するレートを低下させる。その結果、入力エネルギーが制御された条件下でも多くの固定子ユニットが組み込まれた状態を維持する。(右) TMドメインの変異 F22Y L28Q は、フェナミルの結合親和性を低下させる。フェナミルがチャネル部位から放出されやすくなり、低濃度のフェナミル条件下では Na<sup>+</sup> 透過の阻害効果は失われた。

## 第四章

### べん毛の多型変換と運動様式

#### 1. 背景および目的

大腸菌は直進的な遊泳(run)と方向転換(tumble)を繰り返し、その頻度を調節することでより良い環境へと移動する走化性を示す。このrun-tumble運動様式は、W3110株などのK12株から派生した運動性野生株から見出された特性である(Fig. 4-1) (Berg & Brown, 1972)。大腸菌やサルモネラ菌がもつべん毛繊維は、1種類のフラジェリンタンパク質が素繊維をつくり、11本の素繊維が重合してらせん構造をとる。べん毛繊維のらせん形状は、わずかに異なる構造(L型とR型)をもつ素繊維の配合割合で決定され、ノーマル型、コイル型、カーリー型などの特徴的な形状を示す(Hasegawa et al., 1998; Yamashita et al., 1998)。べん毛繊維の形状は、モーターの回転方向がCCW方向のときは左巻きらせん(ノーマル)型であるが、CW回転になるとらせんピッチの短い右巻きらせん(カーリー)型へとする。このような超らせん構造の変化は、べん毛繊維の多型変換とよばれる。大腸菌が遊泳(run)するとき、モーターはCCW方向に回転し、複数のべん毛繊維を束にして推進力を得る。一方、モーターの回転がCW方向にスイッチすると繊維の多型変換がおこり、繊維の束がほどけることで推進力を生み出せないtumbleモードとなる(Macnab, 1976)。このべん毛繊維の挙動は、1970年代から高輝度暗視野顕微鏡を使って多くの研究がされてきたが(Hotani, 1976; Macnab & Koshland, 1974)、近年ではべん毛繊維を蛍光標識した蛍光観察法によっても可視化されている(Darnton et al., 2007; Turner et al., 2000)。

ところで、人体内から最初に単離されたK12株のオリジナルクローンであるATCC10798株は、軟寒天培地上で運動能を示さないことが以前から知られていた(Barker et al., 2004)。現在、基準株として用いられているW3110株などは、オリジナルクローンの系統から運動性を保持することを指標にして選択された。では、ATCC10798株が軟寒天培地上で運動性を示さないのは、どこに原因があるのだろうか。一般的に軟寒天培地で運動性を示す、すなわちスウォームリングが広がるためには、大腸菌はべん毛を形成し、モーターを回転させ、走化性能をもつことが必要である。共同研究者の木下

佳昭博士(現・理化学研究所)は、べん毛繊維を蛍光染色して観察し、ATCC10798株は常にカーリー型の右巻きらせん状繊維をもち、その形状はモーターの回転方向に依存しないことを発見した。また、通常のrun-tumble運動様式とは異なり、液体中で前後運動を繰り返す様子も観察した。この原因として、ATCC10798株がもつべん毛モーターの回転特性の変化や、べん毛繊維の変異などが予想された。本研究では、モーター回転特性について調査するため、回転計測をおこなった。

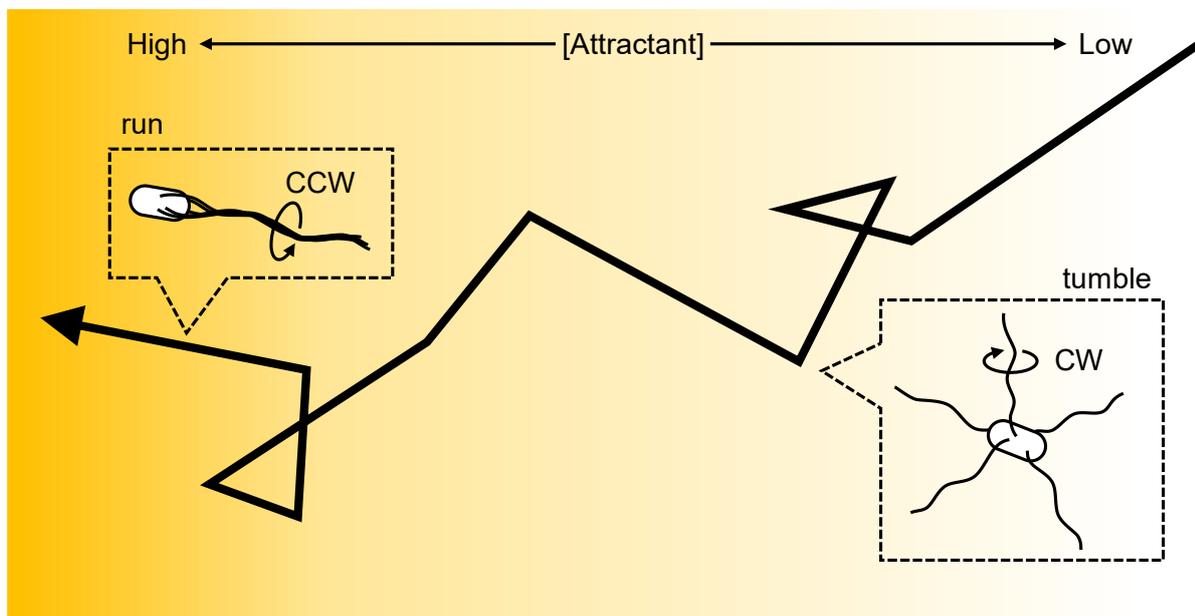


Fig. 4-1. 大腸菌のrun-tumble運動様式

大腸菌運動性野生株は、5~6本のべん毛をもち、それらをCCW方向に回転させることで繊維を束ねて推進力を生み出し、水中を遊泳する(run)。べん毛繊維は多型変換能をもち、回転方向がCCWからCWへと切り替わると、ノーマル型からカーリー型へとらせん構造を変化させる。1本から数本のべん毛がCW方向に回転すると、繊維の形状変化によって束が解かれ、菌体は推進力を失ってその場でランダムに方向転換する(tumble)。大腸菌は、環境中の誘引物質や忌避物質の濃度に応じて、走化性シグナル伝達により細胞内CheY-P濃度を調節し、tumbleを起こす頻度を制御することで、自身がより良い方向へと進むバイアスをかけている。

## 2. 結果および考察

### 菌株とプラスミド, 培養条件

本研究で使用した菌株をTable 4-1, バッファーをTable 4-2に示した. 培地の組成は, Table 2-4に示したものを使用した. 培養は第二章で述べた方法と同様におこなった.

Table 4-1. 本研究で使用した菌株

Strain	Genotype	Reference
ATCC10798	F+ $\lambda$ +	American Type Culture Collection
W3110	F- $\lambda$ - IN(rrnD-rrnE)1 rph-1	Lab stock
SHU155	W3110 <i>fliC</i> (N87K)	This study

Table 4-2. 本研究で使用したバッファー

名称	組成
85Na MTB	10 mM KPi, 0.1 mM EDTA $\cdot$ 2K, 85 mM NaCl, pH = 7.0
67Na MTB	10 mM KPi, 0.1 mM EDTA $\cdot$ 2K, 67 mM NaCl, 10 mM Lactate $\cdot$ Na, pH = 7.0

### テザードセルアッセイ

まず, ATCC10798株とW3110株がもつべん毛モーターの回転特性をテザードセルアッセイで計測した. これらの菌株のべん毛はstickyフィラメントではないため, 抗FliC抗体を使用してべん毛をガラス表面に固定した. 計測の結果, これらの菌株がもつべん毛モーターの回転速度, CWバイアス(モーターがCW方向に回転する時間的割合), 回転方向のスイッチング頻度には, 有意な差が見られないことがわかった(Fig. 4-2). すなわち, モーターそのものの特性および細胞内の情報伝達タンパク質の濃度等は, ATCC10798株とW3110株に違いがないことが明らかとなった.

この実験と並行しておこなわれた木下博士らの実験により, ATCC10798株の*fliC*遺伝子には, 運動性野生株であるW3110株と比較して, N87Kという点変異があることがわかった. つまり, ATCC10798株がもつ特徴的な運動様式は, べん毛モーターの特性の

違いではなく、*fliC*遺伝子の変異に起因するべん毛繊維の形状の変化のみによるものであることが示唆された。そして、べん毛繊維の多型変換は、固体表面上でのスウォーム能に必須であることが示された。そこで、W3110株の*fliC*遺伝子をATCC10798株のものに入れ替えたSHU155株(*fliC*(N87K))を作製し、同様にモーター回転特性を調べたところ、やはり有意な差はなかった(Fig. 4-2)。

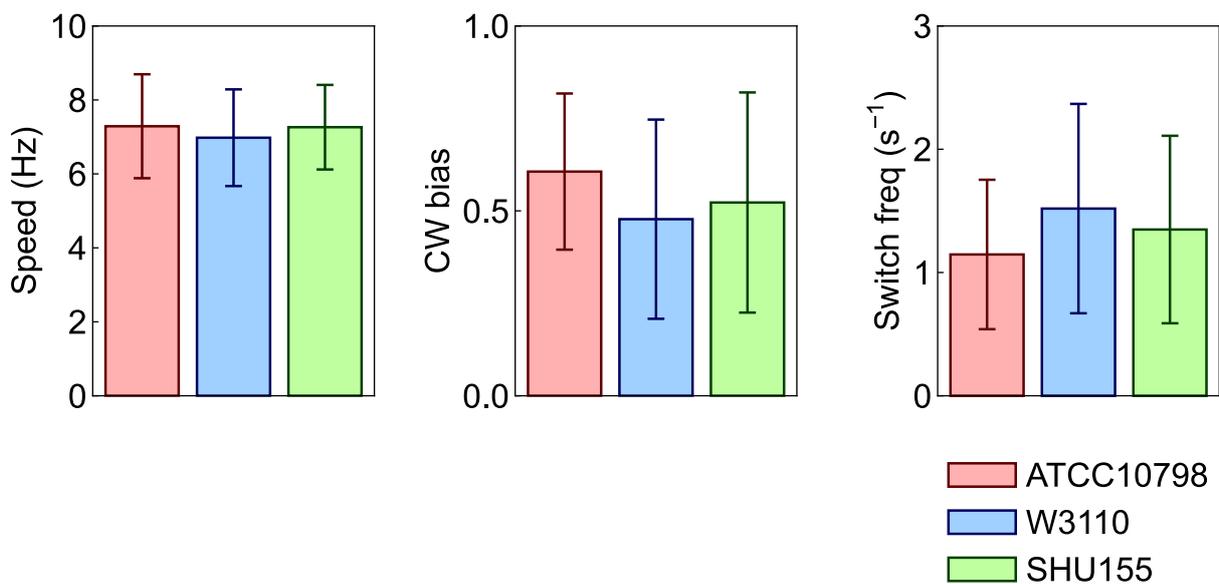


Fig. 4-2. ATCC10798株のモーター回転特性

テザードセルアッセイにより、ATCC10798株とW3110株、W3110株の*fliC*遺伝子をATCC10798株のものと置換したSHU155株(*fliC* (N87K))がもつべん毛モーター回転特性を評価した。モーターの回転速度、CWバイアス、回転スイッチング頻度は、すべての菌株で同程度であった。棒グラフはそれぞれの平均値を示し、エラーバーはSDを示す。計測されたモーターのサンプル数は、ATCC10798株、W3110株、SHU155株の順でそれぞれ99、53、67個である。

## ATCC10798株が多型変換を示さないべん毛繊維をもつ理由

ATCC10798株が多型変換を示さないべん毛繊維を有するという事は、特定の条件下で拡散することができないため、一見生存に不利であると考えられる。しかし、このようなべん毛繊維を有する理由として、いくつかの可能性が挙げられる。べん毛繊維は基本的に、細菌が細胞外部にもつ最も大きな構造体であるため、宿主免疫系のターゲットとなりやすい性質をもつ。これに対してサルモネラ菌は、宿主免疫系をかいくぐるために2種類のフラジェリンFliCとFljBを持っており、これらを使い分けている(べん毛繊維の相変異とよぶ) (Ikeda et al., 2001)。また、サルモネラ菌FliCの89~96番目の残基は、免疫系として機能するToll様受容体5からの認識に必須であり、さらにこの部分の変異によってスウォーム能を失うことが報告されている(Andersen-Nissen et al., 2005)。今回発見された点変異はこれに近い位置であり、表現型が一致していることから、べん毛繊維の形状の変化についても一致している可能性は高い。最近の研究においても、いくつかの病原性大腸菌株は液体培養時にべん毛遺伝子の発現を抑制していることが報告されている(Laganenka et al., 2020)。他にも、サルモネラ菌べん毛繊維の形状を変化させるFliC変異体はいくつか発見されており、 $\chi$ -ファージは左巻きらせん形状のべん毛繊維のみを認識して細菌に感染することが知られている(Samuel et al., 1999)。このように、右巻きらせん形状のべん毛繊維を有することは外敵から身を守るためには有用であり、ATCC10798株は生存戦略のひとつとしてこれを使用していたと考えられる。

## 第五章

### 結論

本研究は、大腸菌べん毛モーターがもつ特性のひとつである、機械刺激や入力エネルギーの変化に応じて回転を調節する機構を解明しようとするものである。本研究では、1個のべん毛モーターの回転を計測して定量的に評価することでモーターの機能の特徴づけた。

本研究で得られた主たる結論や成果を以下にまとめる。

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。従来の手法と組み合わせて、幅広い負荷条件下でモーターの回転計測を実現できるようになった。
2. 大腸菌べん毛モーターの回転負荷に応じたトルク制御に、FliLは必須の因子である。特に低負荷条件下で駆動するモーターについて、FliLは固定子ユニットの結合親和性を上昇させ、広い速度領域でトルクを安定化させるはたらきがある。
3. 大腸菌体内でNa<sup>+</sup>駆動型として機能する固定子ユニットPomAPotBを使用して、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獲得した固定子ユニットの新たな機能を、モーター回転解析によって明らかにした。
4. 大腸菌べん毛モーターの回転を阻害する薬剤の効果を検証することが可能なアッセイ系を構築した。新規アミロライド誘導体が、固定子ユニットの種類にかかわらず、べん毛モーターの回転運動を阻害することを見出した。
5. 大腸菌K12株のオリジナルクローンがもつ特徴的な運動性は、べん毛繊維の変異のみに由来し、モーターの回転特性の変化によるものではないことを示した。

## 謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、多くの方々にご指導ご鞭撻を賜りました。

本論文の主査であり、学部3年次から6年以上もの間、私の指導教員としてご尽力いただいた曾和義幸先生には、終始適切なご指導をいただきました。研究の進め方について助言をいただいたほか、様々な研究プロジェクトに挑戦する機会を与えてくださり、研究全体のまとめ方についても細部にわたってご指導をいただきました。深謝いたします。

本学の川岸郁朗先生、並びに廣野雅文先生には、副査として多くの助言をいただきました。心より感謝いたします。

大阪大学の南野徹先生には、菌株を提供していただいたほか、本論文の第二章の内容についての共同研究者として、さらに本論文の副査として多くの助言をいただきました。深く感謝いたします。

本論文の第三章と第四章についても、オーストラリアのニューサウスウェールズ大学のMatthew A. B. Baker博士とそのラボメンバー、理化学研究所の木下佳昭博士との共同研究です。ここに御礼申し上げます。

本研究の一部は、本学の若手研究者共同研究プロジェクトによる支援を受けました。ここに感謝の意を申し上げます。

本研究で使用した大腸菌変異株の一部は、吉多美祐博士や井藤理恵氏に作製していただきました。深く感謝を申し上げます。

最後に、本研究を進めるにあたって活発に議論を交わしてくださった川岸郁朗先生、西川正俊先生ならびに超分子機能学研究室のメンバーやグループミーティングのメンバー、日々の生活を支えてくださった家族、友人にも大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Alon U., Camarena L., Surette M.G., Aguera y Arcas B., Liu Y., Leibler S. and Stock J.B. (1998) Response regulator output in bacterial chemotaxis. *EMBO J.* **17**, 4238-4248.
2. Andersen-Nissen E., Smith K.D., Strobe K.L., Barrett S.L., Cookson B.T., Logan S.M. and Aderem A. (2005) Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 9247-9252.
3. Asai Y., Kojima S., Kato H., Nishioka N., Kawagishi I. and Homma M. (1997) Putative channel components for the fast-rotating sodium-driven flagellar motor of a marine bacterium. *J Bacteriol.* **179**, 5104-5110.
4. Asai Y., Yakushi T., Kawagishi I. and Homma M. (2003) Ion-coupling Determinants of Na<sup>+</sup>-driven and H<sup>+</sup>-driven Flagellar Motors. *J Mol Biol.* **327**, 453-463.
5. Atsumi T., McCarter L. and Imae Y. (1992) Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive forces. *Nature.* **355**, 182-184.
6. Atsumi T., Sugiyama S., Cragoe E.J., Jr. and Imae Y. (1990) Specific inhibition of the Na<sup>(+)</sup>-driven flagellar motors of alkalophilic *Bacillus* strains by the amiloride analog phenamil. *J Bacteriol.* **172**, 1634-1639.
7. Attmannspacher U., Scharf B.E. and Harshey R.M. (2008) FliL is essential for swarming: motor rotation in absence of FliL fractures the flagellar rod in swarmer cells of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* **68**, 328-341.
8. Barker C.S., Pruss B.M. and Matsumura P. (2004) Increased motility of *Escherichia coli* by insertion sequence element integration into the regulatory region of the *flhD* operon. *J Bacteriol.* **186**, 7529-7537.
9. Belas R. and Suvanasuthi R. (2005) The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein. *J Bacteriol.* **187**, 6789-6803.
10. Berg H.C. and Anderson R.A. (1973) Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature.* **245**, 380-382.
11. Berg H.C. and Brown D.A. (1972) Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature.* **239**, 500-504.
12. Berg H.C. and Turner L. (1993) Torque generated by the flagellar motor of *Escherichia coli*. *Biophys J.* **65**, 2201-2216.
13. Berry R.M. and Berg H.C. (1999) Torque Generated by the Flagellar Motor of *Escherichia coli* while Driven Backward. *Biophys J.* **76**, 580-587.

14. Blair D.F. and Berg H.C. (1988) Restoration of torque in defective flagellar motors. *Science*. **242**, 1678-1681.
15. Blair D.F. and Berg H.C. (1990) The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell*. **60**, 439-449.
16. Block S.M. and Berg H.C. (1984) Successive incorporation of force-generating units in the bacterial rotary motor. *Nature*. **309**, 470-472.
17. Borkovich K.A., Alex L.A. and Simon M.I. (1992) Attenuation of sensory receptor signaling by covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**, 6756-6760.
18. Borkovich K.A., Kaplan N., Hess J.F. and Simon M.I. (1989) Transmembrane signal transduction in bacterial chemotaxis involves ligand-dependent activation of phosphate group transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86**, 1208-1212.
19. Borkovich K.A. and Simon M.I. (1990) The dynamics of protein phosphorylation in bacterial chemotaxis. *Cell*. **63**, 1339-1348.
20. Buckley B.J., Aboelela A., Minaei E., Jiang L.X., Xu Z., Ali U., Fildes K., Cheung C.Y., Cook S.M., Johnson D.C., Bachovchin D.A., Cook G.M., Apte M., Huang M., Ranson M. and Kelso M.J. (2018) 6-Substituted Hexamethylene Amiloride (HMA) Derivatives as Potent and Selective Inhibitors of the Human Urokinase Plasminogen Activator for Use in Cancer. *J Med Chem*. **61**, 8299-8320.
21. Buckley B.J., Majed H., Aboelela A., Minaei E., Jiang L., Fildes K., Cheung C.Y., Johnson D., Bachovchin D., Cook G.M., Huang M., Ranson M. and Kelso M.J. (2019) 6-Substituted amiloride derivatives as inhibitors of the urokinase-type plasminogen activator for use in metastatic disease. *Bioorg Med Chem Lett*. **29**, 126753.
22. Castillo D.J., Nakamura S., Morimoto Y.V., Che Y.S., Kami-Ike N., Kudo S., Minamino T. and Namba K. (2013) The C-terminal periplasmic domain of MotB is responsible for load-dependent control of the number of stators of the bacterial flagellar motor. *Biophysics (Nagoya-shi)*. **9**, 173-181.
23. Chawla R., Ford K.M. and Lele P.P. (2017) Torque, but not FliL, regulates mechanosensitive flagellar motor-function. *Sci Rep*. **7**, 5565.
24. Che Y.S., Nakamura S., Morimoto Y.V., Kami-Ike N., Namba K. and Minamino T. (2014) Load-sensitive coupling of proton translocation and torque generation in the bacterial flagellar motor. *Mol Microbiol*. **91**, 175-184.
25. Chen X. and Berg H.C. (2000) Torque-Speed Relationship of the Flagellar Rotary Motor of *Escherichia coli*. *Biophys J*. **78**, 1036-1041.

26. Cherepanov P.P. and Wackernagel W. (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*. **158**, 9-14.
27. Cluzel P., Surette M. and Leibler S. (2000) An ultrasensitive bacterial motor revealed by monitoring signaling proteins in single cells. *Science*. **287**, 1652-1655.
28. Cusick K., Lee Y.Y., Youchak B. and Belas R. (2012) Perturbation of FliL interferes with *Proteus mirabilis* swarmer cell gene expression and differentiation. *J Bacteriol*. **194**, 437-447.
29. Darnton N.C., Turner L., Rojevsky S. and Berg H.C. (2007) On torque and tumbling in swimming *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **189**, 1756-1764.
30. Datsenko K.A. and Wanner B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 6640-6645.
31. Deme J.C., Johnson S., Vickery O., Aron A., Monkhouse H., Griffiths T., James R.H., Berks B.C., Coulton J.W., Stansfeld P.J. and Lea S.M. (2020) Structures of the stator complex that drives rotation of the bacterial flagellum. *Nat Microbiol*. **5**, 1553-1564.
32. Dunten P. and Koshland D.E. (1991) Tuning the responsiveness of a sensory receptor via covalent modification. *J Biol Chem*. **266**, 1491-1496.
33. Dyer C.M., Vartanian A.S., Zhou H. and Dahlquist F.W. (2009) A molecular mechanism of bacterial flagellar motor switching. *J Mol Biol*. **388**, 71-84.
34. Francis N.R., Sosinsky G.E., Thomas D. and DeRosier D.J. (1994) Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J Mol Biol*. **235**, 1261-1270.
35. Fujii T., Kato T., Hiraoka K.D., Miyata T., Minamino T., Chevance F.F., Hughes K.T. and Namba K. (2017) Identical folds used for distinct mechanical functions of the bacterial flagellar rod and hook. *Nat Commun*. **8**, 14276.
36. Fukuoka H., Wada T., Kojima S., Ishijima A. and Homma M. (2009) Sodium-dependent dynamic assembly of membrane complexes in sodium-driven flagellar motors. *Mol Microbiol*. **71**, 825-835.
37. Funatsu T., Harada Y., Tokunaga M., Saito K. and Yanagida T. (1995) Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature*. **374**, 555-559.
38. Grant S.G., Jessee J., Bloom F.R. and Hanahan D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**, 4645-4649.

39. Guzman L.M., Belin D., Carson M.J. and Beckwith J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol.* **177**, 4121-4130.
40. Hasegawa K., Yamashita I. and Namba K. (1998) Quasi- and Nonequivalence in the Structure of Bacterial Flagellar Filament. *Biophys J.* **74**, 569-575.
41. Hess J.F., Bourret R.B. and Simon M.I. (1988a) Histidine phosphorylation and phosphoryl group transfer in bacterial chemotaxis. *Nature.* **336**, 139-143.
42. Hess J.F., Oosawa K., Kaplan N. and Simon M.I. (1988b) Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell.* **53**, 79-87.
43. Hiraoka K.D., Morimoto Y.V., Inoue Y., Fujii T., Miyata T., Makino F., Minamino T. and Namba K. (2017) Straight and rigid flagellar hook made by insertion of the FlgG specific sequence into FlgE. *Sci Rep.* **7**, 46723.
44. Hirota N. and Imae Y. (1983) Na<sup>+</sup>-driven flagellar motors of an alkalophilic Bacillus strain YN-1. *J Biol Chem.* **258**, 10577-10581.
45. Hosking E.R., Vogt C., Bakker E.P. and Manson M.D. (2006) The Escherichia coli MotAB proton channel unplugged. *J Mol Biol.* **364**, 921-937.
46. Hotani H. (1976) Light microscope study of mixed helices in reconstituted Salmonella flagella. *J Mol Biol.* **106**, 151-166.
47. Hou Y.J., Yang W.S., Hong Y., Zhang Y., Wang D.C. and Li D.F. (2020) Structural insights into the mechanism of c-di-GMP-bound YcgR regulating flagellar motility in Escherichia coli. *J Biol Chem.* **295**, 808-821.
48. Huang M., Gu G., Ferguson E.L. and Chalfie M. (1995) A stomatin-like protein necessary for mechanosensation in *C. elegans*. *Nature.* **378**, 292-295.
49. Ikeda J.S., Schmitt C.K., Darnell S.C., Watson P.R., Bispham J., Wallis T.S., Weinstein D.L., Metcalf E.S., Adams P., O'Connor C.D. and O'Brien A.D. (2001) Flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contributes to virulence in the murine typhoid infection model but does not influence *Salmonella*-induced enteropathogenesis. *Infect Immun.* **69**, 3021-3030.
50. Inoue Y., Lo C.J., Fukuoka H., Takahashi H., Sowa Y., Pilizota T., Wadhams G.H., Homma M., Berry R.M. and Ishijima A. (2008) Torque-speed relationships of Na<sup>+</sup>-driven chimeric flagellar motors in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* **376**, 1251-1259.
51. Jenal U., White J. and Shapiro L. (1994) Caulobacter flagellar function, but not assembly, requires FliL, a non-polarly localized membrane protein present in all cell types. *J Mol Biol.* **243**, 227-244.

52. Kawamoto A., Morimoto Y.V., Miyata T., Minamino T., Hughes K.T., Kato T. and Namba K. (2013) Common and distinct structural features of Salmonella injectisome and flagellar basal body. *Sci Rep.* **3**, 3369.
53. Khan S., Dapice M. and Reese T.S. (1988) Effects of mot gene expression on the structure of the flagellar motor. *J Mol Biol.* **202**, 575-584.
54. Kojima S., Asai Y., Atsumi T., Kawagishi I. and Homma M. (1999) Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor resistant to phenamil, an amiloride analog, caused by mutations in putative channel components. *J Mol Biol.* **285**, 1537-1547.
55. Kojima S., Takao M., Almira G., Kawahara I., Sakuma M., Homma M., Kojima C. and Imada K. (2018) The Helix Rearrangement in the Periplasmic Domain of the Flagellar Stator B Subunit Activates Peptidoglycan Binding and Ion Influx. *Structure.* **26**, 590-598 e595.
56. Kort E.N., Goy M.F., Larsen S.H. and Adler J. (1975) Methylation of a membrane protein involved in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **72**, 3939-3943.
57. Kuwajima G. (1988) Construction of a minimum-size functional flagellin of Escherichia coli. *J Bacteriol.* **170**, 3305-3309.
58. Laganenka L., Lopez M.E., Colin R. and Sourjik V. (2020) Flagellum-Mediated Mechanosensing and RfIP Control Motility State of Pathogenic Escherichia coli. *mBio.* **11**, e02269-02219.
59. Lapatsina L., Brand J., Poole K., Daumke O. and Lewin G.R. (2012) Stomatin-domain proteins. *Eur J Cell Biol.* **91**, 240-245.
60. Larsen S.H., Reader R.W., Kort E.N., Tso W.W. and Adler J. (1974) Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in Escherichia coli. *Nature.* **249**, 74-77.
61. Leake M.C., Chandler J.H., Wadhams G.H., Bai F., Berry R.M. and Armitage J.P. (2006) Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. *Nature.* **443**, 355-358.
62. Lee Y.Y. and Belas R. (2015) Loss of FliL alters Proteus mirabilis surface sensing and temperature-dependent swarming. *J Bacteriol.* **197**, 159-173.
63. Lele P.P., Hosu B.G. and Berg H.C. (2013) Dynamics of mechanosensing in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**, 11839-11844.
64. Lin T.S., Zhu S., Kojima S., Homma M. and Lo C.J. (2018) FliL association with flagellar stator in the sodium-driven Vibrio motor characterized by the fluorescent microscopy. *Sci Rep.* **8**, 11172.
65. Liu J.Z., Dapice M. and Khan S. (1990) Ion selectivity of the Vibrio alginolyticus flagellar motor. *J Bacteriol.* **172**, 5236-5244.

66. Lloyd S.A., Tang H., Wang X., Billings S. and Blair D.F. (1996) Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence of a direct role for FliG but not for FliM or FliN. *J Bacteriol.* **178**, 223-231.
67. Lo C.J., Sowa Y., Pilizota T. and Berry R.M. (2013) Mechanism and kinetics of a sodium-driven bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**, E2544-2551.
68. Macnab R.M. (1976) Examination of bacterial flagellation by dark-field microscopy. *J Clin Microbiol.* **4**, 258-265.
69. Macnab R.M. (1977) Bacterial flagella rotating in bundles: a study in helical geometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**, 221-225.
70. Macnab R.M. and Koshland D.E. (1974) Bacterial motility and chemotaxis: Light-induced tumbling response and visualization of individual flagella. *J Mol Biol.* **84**, 399-406.
71. Manson M.D., Tedesco P., Berg H.C., Harold F.M. and Van der Drift C. (1977) A protonmotive force drives bacterial flagella. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**, 3060-3064.
72. Matsuura S., Shioi J.-i. and Imae Y. (1977) Motility in *Bacillus subtilis* driven by an artificial protonmotive force. *FEBS Lett.* **82**, 187-190.
73. Morales V.M., Bäckman A. and Bagdasarian M. (1991) A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene.* **97**, 39-47.
74. Motaleb M.A., Pitzer J.E., Sultan S.Z. and Liu J. (2011) A novel gene inactivation system reveals altered periplasmic flagellar orientation in a *Borrelia burgdorferi* fliL mutant. *J Bacteriol.* **193**, 3324-3331.
75. Muramoto K., Kawagishi I., Kudo S., Magariyama Y., Imae Y. and Homma M. (1995) High-speed rotation and speed stability of the sodium-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*. *J Mol Biol.* **251**, 50-58.
76. Nakamura S., Hanaizumi Y., Morimoto Y.V., Inoue Y., Erhardt M., Minamino T. and Namba K. (2020) Direct observation of speed fluctuations of flagellar motor rotation at extremely low load close to zero. *Mol Microbiol.* **113**, 755-765.
77. Ninfa E.G., Stock A., Mowbray S. and Stock J. (1991) Reconstitution of the bacterial chemotaxis signal transduction system from purified components. *J Biol Chem.* **266**, 9764-9770.
78. Nirody J.A., Berry R.M. and Oster G. (2016) The Limiting Speed of the Bacterial Flagellar Motor. *Biophys J.* **111**, 557-564.

79. Nord A.L., Gachon E., Perez-Carrasco R., Nirody J.A., Barducci A., Berry R.M. and Pedaci F. (2017a) Catch bond drives stator mechanosensitivity in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **114**, 12952-12957.
80. Nord A.L., Sowa Y., Steel B.C., Lo C.J. and Berry R.M. (2017b) Speed of the bacterial flagellar motor near zero load depends on the number of stator units. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **114**, 11603-11608.
81. Oosawa K., Hess J.F. and Simon M.I. (1988) Mutants defective in bacterial chemotaxis show modified protein phosphorylation. *Cell*. **53**, 89-96.
82. Parkinson J.S. (1978) Complementation analysis and deletion mapping of *Escherichia coli* mutants defective in chemotaxis. *J Bacteriol*. **135**, 45-53.
83. Parkinson J.S. and Houts S.E. (1982) Isolation and behavior of *Escherichia coli* deletion mutants lacking chemotaxis functions. *J Bacteriol*. **151**, 106-113.
84. Partridge J.D., Nieto V. and Harshey R.M. (2015) A new player at the flagellar motor: FliL controls both motor output and bias. *mBio*. **6**, e02367.
85. Paul K., Nieto V., Carlquist W.C., Blair D.F. and Harshey R.M. (2010) The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Mol Cell*. **38**, 128-139.
86. Poole K., Herget R., Lapatsina L., Ngo H.D. and Lewin G.R. (2014) Tuning Piezo ion channels to detect molecular-scale movements relevant for fine touch. *Nat Commun*. **5**, 3520.
87. Raha M., Sockett H. and Macnab R.M. (1994) Characterization of the *fliL* gene in the flagellar regulon of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*. **176**, 2308-2311.
88. Reid S.W., Leake M.C., Chandler J.H., Lo C.J., Armitage J.P. and Berry R.M. (2006) The maximum number of torque-generating units in the flagellar motor of *Escherichia coli* is at least 11. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**, 8066-8071.
89. Ryu W.S., Berry R.M. and Berg H.C. (2000) Torque-generating units of the flagellar motor of *Escherichia coli* have a high duty ratio. *Nature*. **403**, 444-447.
90. Samatey F.A., Matsunami H., Imada K., Nagashima S., Shaikh T.R., Thomas D.R., Chen J.Z., Derosier D.J., Kitao A. and Namba K. (2004) Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature*. **431**, 1062-1068.
91. Samuel A.D., Pitta T.P., Ryu W.S., Danese P.N., Leung E.C. and Berg H.C. (1999) Flagellar determinants of bacterial sensitivity to chi-phage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 9863-9866.

92. Santiveri M., Roa-Eguiara A., Kuhne C., Wadhwa N., Hu H., Berg H.C., Erhardt M. and Taylor N.M.I. (2020) Structure and Function of Stator Units of the Bacterial Flagellar Motor. *Cell*. **183**, 244-257 e216.
93. Sarkar M.K., Paul K. and Blair D. (2010) Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**, 9370-9375.
94. Sato K., Nakamura S., Kudo S. and Toyabe S. (2019) Evaluation of the Duty Ratio of the Bacterial Flagellar Motor by Dynamic Load Control. *Biophys J*. **116**, 1952-1959.
95. Schoenhals G.J. and Macnab R.M. (1999) FliL is a membrane-associated component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *Microbiology*. **145 ( Pt 7)**, 1769-1775.
96. Silverman M. and Simon M. (1974) Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature*. **249**, 73-74.
97. Sowa Y. and Berry R.M. (2008) Bacterial flagellar motor. *Q Rev Biophys*. **41**, 103-132.
98. Sowa Y., Homma M., Ishijima A. and Berry R.M. (2014) Hybrid-fuel bacterial flagellar motors in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **111**, 3436-3441.
99. Sowa Y., Hotta H., Homma M. and Ishijima A. (2003) Torque-speed relationship of the Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*. *J Mol Biol*. **327**, 1043-1051.
100. Sowa Y., Rowe A.D., Leake M.C., Yakushi T., Homma M., Ishijima A. and Berry R.M. (2005) Direct observation of steps in rotation of the bacterial flagellar motor. *Nature*. **437**, 916-919.
101. Sowa Y., Steel B.C. and Berry R.M. (2010) A simple backscattering microscope for fast tracking of biological molecules. *Rev Sci Instrum*. **81**, 113704.
102. Suaste-Olmos F., Domenzain C., Mireles-Rodriguez J.C., Poggio S., Osorio A., Dreyfus G. and Camarena L. (2010) The flagellar protein FliL is essential for swimming in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol*. **192**, 6230-6239.
103. Suchanek V.M., Esteban-Lopez M., Colin R., Besharova O., Fritz K. and Sourjik V. (2020) Chemotaxis and cyclic-di-GMP signalling control surface attachment of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **113**, 728-739.
104. Tachiyama S., Chan K.L., Liu X., Hathroubi S., Peterson B., Khan M.F., Ottemann K.M., Liu J. and Roujeinikova A. (2022) The flagellar motor protein FliL forms a scaffold of circumferentially positioned rings required for stator activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **119**.

105. Takekawa N., Isumi M., Terashima H., Zhu S., Nishino Y., Sakuma M., Kojima S., Homma M. and Imada K. (2019) Structure of Vibrio FliL, a New Stomatin-like Protein That Assists the Bacterial Flagellar Motor Function. *mBio*. **10**, e00292-00219.
106. Tan J., Zhang X., Wang X., Xu C., Chang S., Wu H., Wang T., Liang H., Gao H., Zhou Y. and Zhu Y. (2021) Structural basis of assembly and torque transmission of the bacterial flagellar motor. *Cell*. **184**, 2665-2679 e2619.
107. Terahara N., Krulwich T.A. and Ito M. (2008) Mutations alter the sodium versus proton use of a *Bacillus clausii* flagellar motor and confer dual ion use on *Bacillus subtilis* motors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**, 14359-14364.
108. Terahara N., Sano M. and Ito M. (2012) A *Bacillus* flagellar motor that can use both Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> as a coupling ion is converted by a single mutation to use only Na<sup>+</sup>. *PLoS One*. **7**, e46248.
109. Terauchi T., Terashima H., Kojima S. and Homma M. (2011) A conserved residue, PomB-F22, in the transmembrane segment of the flagellar stator complex, has a critical role in conducting ions and generating torque. *Microbiology (Reading)*. **157**, 2422-2432.
110. Thomas D.R., Morgan D.G. and DeRosier D.J. (1999) Rotational symmetry of the C ring and a mechanism for the flagellar rotary motor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 10134-10139.
111. Tipping M.J., Delalez N.J., Lim R., Berry R.M. and Armitage J.P. (2013) Load-dependent assembly of the bacterial flagellar motor. *mBio*. **4**, e00551-00513.
112. Tokunaga M., Kitamura K., Saito K., Iwane A.H. and Yanagida T. (1997) Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy. *Biochem Biophys Res Commun*. **235**, 47-53.
113. Turner L., Ryu W.S. and Berg H.C. (2000) Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments. *J Bacteriol*. **182**, 2793-2801.
114. Ueno H., Nishikawa S., Iino R., Tabata K.V., Sakakihara S., Yanagida T. and Noji H. (2010) Simple dark-field microscopy with nanometer spatial precision and microsecond temporal resolution. *Biophys J*. **98**, 2014-2023.
115. Wadhwa N., Tu Y. and Berg H.C. (2021) Mechanosensitive remodeling of the bacterial flagellar motor is independent of direction of rotation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **118**, e2024608118.
116. Wang B., Zhang R. and Yuan J. (2017) Limiting (zero-load) speed of the rotary motor of *Escherichia coli* is independent of the number of torque-generating units. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **114**, 12478-12482.

117. Wang R., Wang F., He R., Zhang R. and Yuan J. (2018) The Second Messenger c-di-GMP Adjusts Motility and Promotes Surface Aggregation of Bacteria. *Biophys J.* **115**, 2242-2249.
118. Watanabe R., Komatsu T., Sakamoto S., Urano Y. and Noji H. (2018) High-throughput single-molecule bioassay using micro-reactor arrays with a concentration gradient of target molecules. *Lab Chip.* **18**, 2849-2853.
119. Watanabe R., Soga N., Fujita D., Tabata K.V., Yamauchi L., Hyeon Kim S., Asanuma D., Kamiya M., Urano Y., Suga H. and Noji H. (2014) Arrayed lipid bilayer chambers allow single-molecule analysis of membrane transporter activity. *Nat Commun.* **5**, 4519.
120. Wetzel C., Hu J., Riethmacher D., Benckendorff A., Harder L., Eilers A., Moshourab R., Kozlenkov A., Labuz D., Caspani O., Erdmann B., Machelska H., Heppenstall P.A. and Lewin G.R. (2007) A stomatin-domain protein essential for touch sensation in the mouse. *Nature.* **445**, 206-209.
121. Wolfe A.J., Conley M.P., Kramer T.J. and Berg H.C. (1987) Reconstitution of signaling in bacterial chemotaxis. *J Bacteriol.* **169**, 1878-1885.
122. Yamashita I., Hasegawa K., Suzuki H., Vonderviszt F., Mimori-Kiyosue Y. and Namba K. (1998) Structure and switching of bacterial flagellar filaments studied by X-ray fiber diffraction. *Nat Struct Biol.* **5**, 125-132.
123. Yorimitsu T. and Homma M. (2001) Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor of *Vibrio*. *Biochim Biophys Acta.* **1505**, 82-93.
124. Yuan J. and Berg H.C. (2008) Resurrection of the flagellar rotary motor near zero load. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 1182-1185.
125. Yuan J., Fahrner K.A., Turner L. and Berg H.C. (2010) Asymmetry in the clockwise and counterclockwise rotation of the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 12846-12849.
126. Zhou J., Lloyd S.A. and Blair D.F. (1998) Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 6436-6441.
127. Zhu S., Kumar A., Kojima S. and Homma M. (2015) FliL associates with the stator to support torque generation of the sodium-driven polar flagellar motor of *Vibrio*. *Mol Microbiol.* **98**, 101-110.
128. Zhu S., Nishikino T., Hu B., Kojima S., Homma M. and Liu J. (2017) Molecular architecture of the sheathed polar flagellum in *Vibrio alginolyticus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **114**, 10966-10971.

## 目録

本学位論文における第二章の内容は、原著論文として学術誌に投稿予定である。

本学位論文における第三章の内容は、2本の原著論文として出版されているほか、プレプリントリポジトリに1本の論文が投稿されている。以下に順に示す。

Ishida T., Ito R., Clark J., Matzke N.J., Sowa Y. and Baker M.A.B. (2019) Sodium-powered stators of the bacterial flagellar motor can generate torque in the presence of phenamil with mutations near the peptidoglycan-binding region. *Mol Microbiol.* **111**, 1689-1699.

Islam M.I., Bae J.H., Ishida T., Ridone P., Lin J., Kelso M.J., Sowa Y., Buckley B.J. and Baker M.A.B. (2021) Novel Amiloride Derivatives That Inhibit Bacterial Motility across Multiple Strains and Stator Types. *J Bacteriol.* **203**, e0036721.

Ridone P., Ishida T., Sowa Y., and Baker M.A.B. (2021) Spontaneous adaptation of ion selectivity in a bacterial flagellar motor. *BioRxiv*, doi:10.1101/2021.01.26.427765

本学位論文における第四章の内容は、以下の原著論文として出版されている。

Kinosita Y., Ishida T., Yoshida M., Ito R., Morimoto Y.V., Goto K., Berry R.M., Nishizaka T. and Sowa Y. (2020) Distinct chemotactic behavior in the original *Escherichia coli* K-12 depending on forward-and-backward swimming, not on run-tumble movements. *Sci Rep.* **10**, 15887.