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

PDF issue: 2024-12-29

蛍光１分子追跡による細菌べん毛モーターの回転計測

SOWA, Yoshiyuki / 曽和, 義幸

(雑誌名 / Journal or Publication Title)
科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書
(開始ページ / Start Page)
1
(終了ページ / End Page)
4
(発行年 / Year)
2013-05

Hosei University Repository

様式Ｆ－１９

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成２５年　５月２３日現在

機関番号：３２６７５
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：２３７７０１８３
研究課題名（和文）　蛍光１分子追跡による細菌べん毛モーターの回転計測

研究課題名（英文）　Tracking of the bacterial flagellar rotation using single fluorescent microscopy

研究代表者
曽和　義幸（YOSHIYUKI SOWA）
法政大学・生命科学部・専任講師
研究者番号：１０５１９４４０

研究成果の概要（和文）：細菌べん毛モーターは，細胞膜を介したイオンの流れによって駆動され，両方向に回転できるナノマシンである．このモーターは，高速駆動や回転制御機構などの興味深い特徴をもつ．従来のモーター回転計測はモーター本体の動きを直接的に追跡するものではなく，フィラメントを介した間接的なものであった．本研究では，分子レベルでモーター本体の回転を直接的に観察するために，1 分子蛍光顕微鏡やモーター蛍光標識の手法を開発した．

研究成果の概要（英文）：The bacterial flagellar motor is a reversible rotary nano-machine, which is powered by ion flux across the cell membrane. The motor has several interesting features as fast rotation, regulation system of torque generation and so on. Their rotation, however, have been measured via flagellar filaments extend from cell body, rather than via the motor basal body directly. To track its rotation directly at molecular level, we have developed single molecule fluorescent microscopy and methods to label the motor basal body.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物物理学
科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学
キーワード：細菌べん毛モーター

１．研究開始当初の背景

(1) 細菌べん毛モーターの回転計測

①細菌べん毛モーターについて

大腸菌やビブリオ菌などの原核生物の多くは，運動器官である「細菌べん毛」をスクリューのように回転させて水中を遊泳する．細菌べん毛モーターは，スクリューとして機能するべん毛フィラメントを回転させる超分子回転ナノマシンである．その大きさは直径約50 nmであり，1秒間に100回転以上の高速回転や瞬時に回転方向を変換する機構を備えるなど，現在の我々のテクノロジーでは実現できない特徴をもっており，ナノスケールのアクチュエータ創造に関して多くの知見を与えてくれると期待される．

モーターの本体は，人工の回転モーターと同様に，回転子と固定子から構成される．それらは，細菌の細胞膜に埋まっており，特定の共役イオン（水素イオンまたはナトリウムイオン）が固定子の中を流れる際に得られるエネルギーを回転トルク発生へと変換する．しかしながら，モーター自体が非常に小さいこと，使用しているエネルギー源がイオン流であることなどから，モーターの機能解析が難しく，その回転メカニズムは未だに明らかとなっていない．

Hosei University Repository

②べん毛モーターの機能解析手法

従来の機能計測法は大きく分けて，テザードセル法，レーザー暗視野照明法，ビーズアッセイ法の3つが用いられてきた．テザードセル法は，細胞外につきだしたフィラメントをカバーガラスに固定し，モーターそのものの回転ではなく，細胞の回転からモーターの回転を計測する方法である．次に，レーザー暗視野照明法は，べん毛フィラメントに強力なレーザーを照明し，その散乱光からモーターの回転を計測する方法である．最後にビーズアッセイ法は，細胞外構造物体であるフィラメントなどに目印となるマーカーを結合させて，モーターそのものではなく，マーカーの動きをナノメートルの精度で計測し，モーターの動きを追跡していた．これらの手法によって，モーターの力学特性など重要な知見が得られてきた．

(2) べん毛モーター本体の動態解析

(1)-②で示した細菌べん毛モーターの回転計測手法については，細胞外構造物であるフィラメントなどを介してモーター回転を計測していることに注意しなければならない．つまり，モーターの軸構造，ユニバーサルジョイント，スクリューなどの多くの構造物を介した間接的な計測方法であるため，実際にモーターが分子レベルでどのように動いて最終的にトルクを発生しているのか？という疑問は未解決である．この問題点を解決するために，研究代表者は，細胞内のモーター本体を蛍光標識し，その動きからモーター回転を計測することで，より直接的にべん毛モーターの動態を明らかにすることを目標に研究を推進してきた．これまでに，細菌べん毛モーターを構成するあるタンパク質と Halo-tag とよばれるタグタンパク質との融合体を作成し，Halo-tag を介してモーター本体を蛍光標識する手法の開発に成功した．

２．研究の目的

本研究では，モーターが実際にトルクを発生している細胞内部位を蛍光標識し，全反射照明または斜光照明による細胞内蛍光１分子観察によって，モーター本体の回転を直接的に検出する基盤技術の開発を目的としている．これまで，トルクが細胞質側で発生しているにもかかわらず，モーターの回転は常に細胞外構造物であるフィラメントを通して間接的に検出されてきた．そのため，モーターの力学特性の情報は集まるものの回転の分子機構については明らかでない点が多い．本研究の推進により，これまでアプローチすることができなかった細胞内で機能するモーターの動態を明らかにすることが期待される．

３．研究の方法

本研究では，モーター本体の回転を蛍光観察によって直接的に検出する基盤技術の開発するために，以下の３点について研究を遂行した．

(1) モータータンパク質を蛍光標識する手法の確立

トルク発生に特に重要な役割を果たす回転子(FliG)および固定子(MotB)に

・蛍光タンパク質(mCherry など)

・タグタンパク質（Halo-tag，テトラシステインタグなど)

を融合させて，蛍光標識の選択肢を増やし，最適な組み合わせを見出す．

(2) 蛍光分子１個をナノメートル精度で追跡する技術の確立

蛍光顕微鏡に組み込んだピエゾステージを外部信号で駆動することにより，装置の安定性を評価する．また，サンプル上の蛍光１分子が観察できる最適な観察条件を設定する．

(3)べん毛モーターの速度制御

蛍光分子の動きを追跡するためには時間分解能を犠牲にする必要がある．そのため，べん毛モーターの回転速度を任意に制御するための方法を確立する．

４．研究成果

(1) モータータンパク質を蛍光標識する手法の確立

回転子(FliG)および固定子(MotB)と mCherry の融合体が機能を保持していることを確認できた（図１）．これ以外にも tagRFP との融合体の構築もおこなったが，これは期待通りには発現せずに機能解析に利用するには至っていない．また，GFP と mCherry で標識したモータータンパク質を同時に発現させてモーターに集合する様子を観察するために，それぞれの融合体の発現量を独立に調整できるような細胞も構築し，二色同時観察に適する組み合わせを見出した．

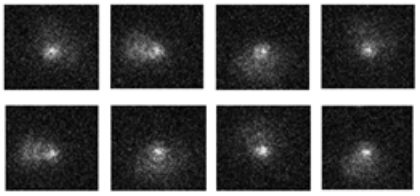

図１．mCherry で標識したモータータンパク質が機能している様子．全反射蛍光顕微鏡システムで観察をおこなった．

つぎに，テトラシステイン（TC）モチーフ

Hosei University Repository

Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys を含むように MotB の新規融合タンパク質を構築した．この融合タンパク質を発現させたところ，野生型のモーターとほぼ遜色なく機能を保持していることが確認できた．TC タグは１分子蛍光観察が可能である ReAsH が特異的に結合して発色することが知られており，従来モーターの蛍光観察に利用されてきた GFP-MotB よりも，より生理的な条件に近いモーターの機能の解析ができる可能性を見出した．現在のところ，ReAsH や FlAsH によって，TC タグ融合モータータンパク質を特異的に染色できる最適な条件を検討している段階である．

(2) 蛍光分子１個をナノメートル精度で追跡する技術の確立

これまでに研究室で構築してきた全反射蛍光顕微鏡システムによって，蛍光分子を観察した．図１a にみられるように高 S/N 比で輝点を観察することができ，それぞれの輝点の強度は段階的に褪色したため，構築した装置で蛍光１分子が観察できることを確認できた．

この顕微鏡システムの安定性を調べるために，サンプル上に固定した蛍光ビーズを追跡した．その結果，ｘ，ｙ軸方向にそれぞれ１～２ nm 程度のノイズで装置を構築できていることが確認でき，今後，蛍光標識したモーターの追跡をおこなうのに十分な安定性を備えていることを確認できた．

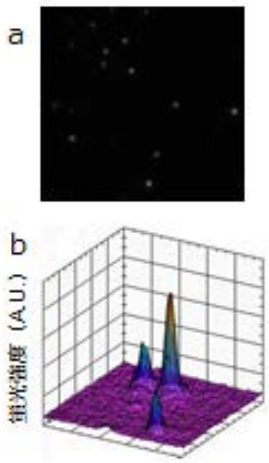

図１　全反射蛍光顕微鏡による蛍光観察
a. カバーガラス表面上に固定した蛍光分子.
b. 蛍光強度の分布.

(3)べん毛モーターの速度制御

べん毛モーターの回転速度を人為的に制御するために，外液の粘度やエネルギー源となるイオン濃度などの溶液条件を任意に短時間で変更できる流路チャンバーを導入した．また，より自在に外力制御をすることができる光ピンセットについても検討するために，顕微鏡に近赤外レーザーを導入する光路の組み込みが完了した．

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計１件）

(1) Masayoshi Nishiyama & Yoshiyuki Sowa. Microscopic analysis of bacterial motility at high pressure. Biophys. J. 102, 1872-1880 (2012)
DOI: 10.1016/j.bpj.2012.03.033

〔学会発表〕（計１７件）

①冨永将大，嶋村陽，曽和義幸，川岸郁朗，斎藤恭一，梅野太輔，液体ハンドリングのみによって行う微生物ゲノムの連続編集，第 6 回日本ゲノム微生物学会年会，長浜バイオ大学（滋賀県），2013 年 3 月 10-12 日

② Nishiyama, M. & Sowa, Y. Dynamic conformational changes of flagellar filament observed by high-pressure microscopy, 57th Annual Meeting of Biophysical Society, Philadelphia（アメリカ），2013 年 2 月 6 日

③ Nishiyama, M. & Sowa, Y. Bacterial motility measured by a high-pressure microscope, 7th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2012), ピアザ淡海（滋賀県），2012 年 10 月 31 日

④ Inui, T., Tajima, H., Sowa, Y. & Kawagishi, I. Exploring the mechanism underlying sensing of the repellent Ni2+ by the aspartate chemoreceptor Tar of Escherichia coli. 第 50 回生物物理学会年会，名古屋大学（愛知県），2012 年 9 月 24 日

⑤ Umemura, T., Hara, C., Sowa, Y. & Kawagishi, I. Control of bacterial flagellar rotation via crosstalk from a non-cognate histidine kinase to the response regulator CheY. 第 50 回生物物理学会年会，名古屋大学（愛知県），2012 年 9 月 24 日

⑥ Yamamoto, K., Inaba, T., Sowa, Y. & Kawagishi, I. Intracellular dynamics of xenobiotic efflux proteins in Escherichia coli. 第 50 回生物物理学会年会，名古屋大学（愛知県），2012 年 9 月 24 日

Hosei University Repository

⑦ Sowa, Y. & Che, Y-S. Imaging of fluorescently-tagged motor components of bacterial flagella. 第 50 回生物物理学会年会，名古屋大学（愛知県），2012 年 9 月 23 日

⑧ Che, Y-S & Sowa, Y. Rotational measurement of Na+-driven chimeric flagellar motor with tandem PomA. 第 50 回生物物理学会年会，名古屋大学（愛知県），2012 年 9 月 23 日

⑨ Nishiyama, M. & Sowa, Y. Dynamic conformational changes of flagellar filament observed by high-pressure microscopy. 第 50 回生物物理学会年会，名古屋大学（愛知県），2012 年 9 月 22 日

⑩Lo, C-J., Sowa, Y., Pilizota, T. & Berry, R. Sodium dynamics of the bacterial flagellar motor. 第 50 回生物物理学会年会，名古屋大学（愛知県），2012 年 9 月 22 日

⑪M. Nishiyama and Y. Sowa. Microscopic analysis of bacterial motility at high pressure (Platform). 56th Annual Meeting of Biophysical Society, Boston（アメリカ），2012 年 2 月 25-29 日

⑫Sowa, Y. A new setup for tracking of bacterial flagellar rotation in 3-dimensionally. 2012 Gordon Research Conference on Sensory Transduction in Microorganisms, Ventura（アメリカ），2012 年 1 月 15-21 日

⑬西山雅祥，曽和義幸 高圧力下にあるバクテリア遊泳運動の阻害機構 . 2012 年 生体運動研究合同班会議，筑波大学（茨城県），2012 年 1 月 6-8 日

⑭Sowa, Y. Three-dimensinal tracking of bacterial flagellar rotation. 日本生物物理学会，兵庫県立大学（兵庫県），2011 年 9 月 16 日

⑮蔡栄淑，曽和義幸. Na+駆動型キメラべん毛モーターにおける固定子 PomA 融合タンデムダイマーの機能解析. 日本生物物理学会第 49 回生物物理学会年会，兵庫県立大学（兵庫県），2011 年 9 月 16-18 日

⑯西山雅祥，曽和義幸. 高圧力下にあるバクテリア運動能の顕微解析. 日本生物物理学会 第 49 回生物物理学会年会，兵庫県立大学（兵庫県），2011 年 9 月 16-18 日

⑰藤畑将理，高橋浩一，曽和義幸. 大腸菌走化性応答のビデオ解析. 21 世紀大腸菌研究会，ホテル木曽路（長野県），2011 年 5 月 19 日

〔図書〕（計 1 件）

(1) Yoshiyuki Sowa & Richard M. Berry. The Rotary Bacterial Flagellar Motor. Comprehensive Biphysics (edited by Edward Egelman), Academic Press, vol. 8, 50-71 (2012)

〔産業財産権〕
○出願状況（計 1 件）

名称：高速かつ高効率なゲノム改変法
発明者：梅野太輔，冨永将大，田代洋平，川岸郁朗，曽和義幸，稲葉岳彦，蔡栄淑
権利者：国立大学法人　千葉大学，　学校法人　法政大学
種類：特許
番号：特願 2012-113083
出願年月日：24 年 5 月 17 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
http://sowalab.ws.hosei.ac.jp

６．研究組織
(1)研究代表者
曽和　義幸（SOWA YOSHIYUKI）
法政大学・生命科学部・講師
研究者番号：10519440