

大腸菌べん毛モーター回転に対する高圧力の影響

沢田, 孝 / SAWADA, Takashi

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学・工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編 / 法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

57

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2016-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00013456>

大腸菌べん毛モーター一回転に対する高圧力の影響

EFFECTS OF HIGH PRESSURE ON THE ROTATION OF THE *ESCHERICHIA COLI* FLAGELLAR MOTOR

沢田孝

Takashi SAWADA

指導教員 川岸郁朗

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻生命機能学領域修士課程

The flagellar motor of *Escherichia coli* is a molecular machine that rotates the helical filaments. The nucleoid protein H-NS is known as a global transcriptional regulator that silences many genes but it activates the flagellar regulon by silencing the transcription of the *hdfr* gene encoding the repressor of the *flhDC* operon encoding the flagellar master regulator. Previous reports showed that an *hns* mutant remains poorly motile even in the presence of FlhDC. In this study, an *hns hdfr* deletion strain was constructed and was shown to swim efficiently at prolonged incubation, arguing against that H-NS directly modulates the flagellar rotation speed. Next, I aimed at the directional control of the motor rotation. The flagellar motor rotates both counterclockwise (CCW) and clockwise (CW). CW rotation is triggered by binding of the phosphorylated form of the response regulator CheY (CheY-P). The detailed mechanism of switching remains unresolved. In this study, I demonstrate that high hydrostatic pressure can induce CCW rotation even in the presence of CheY-P. I then constructed CheY mutants that are constitutively active with the phosphorylation site substituted. The CW rotation bias of the strain overexpressing the CheY mutants was about 1 at normal pressure, and was lowered to almost 0 at about 80 MPa, suggesting that high hydrostatic pressure affects binding of CheY-P to the motor rather than phosphorylation of CheY. Furthermore, I constructed and characterized CheY-independent CW-locked mutants of the flagellar motor protein FliM, the target of CheY-P. Motors with those FliM mutants rotated CW even at 80 MPa. These results suggest that high pressure affects the interaction of CheY-P and FliM.

Key Words : chemotaxis, flagellar motor, high-pressure microscopy, motility, two-component system

1. 諸言

大腸菌は、べん毛を回転させることで、遊泳する。べん毛の根元には細胞膜を貫通する直径約 50 nm の蛋白質複合体であるモーターが存在する。大腸菌走化性において、菌の泳ぎのモード（直進か方向転換か）は、べん毛回転方向によって決まる。べん毛モーターはデフォルトでは反時計回り(CCW)に回転するが、リン酸化された応答調節因子 CheY が結合すると時計回り(CW)回転が引き起こされる。CheY 結合による回転方向転換は非常に短い時間で起こるが、そのメカニズムはわかっていない。これとは別に、べん毛モーターの回転速度を調節する因子 H-NS (histone-like nucleoid structuring protein)が報告された [1]。H-NS は、核様体を構成する主要ヒストン様蛋白質であり、グローバルな遺伝子発現抑制(silencing)を行う。転写因子である H-NS がべん毛モーターの回転速度を上昇させるメカニズムや生理的意義はわかっていない。本研究では、以上のような回転方向・速度制御のメカニズムの解明を目指した。まず、

H-NS による回転速度制御について検討した。H-NS は、べん毛レギュロンマスター転写因子をコードする *flhDC* の転写を正に調節する。この転写調節は、*flhDC* オペロンのリプレッサーをコードする *hdfr* の転写を抑制することによる間接的な作用である。そのため、*hns* 欠失株ではべん毛そのものが形成されず、べん毛回転の解析ができない。そこで、*hdfr* を欠失させ、H-NS 非依存的にべん毛が形成される株を構築し、そのふるまいを調べた。

つぎに、CheY による回転方向制御の解明を目指し、大腸菌に圧力という変調をかけ、その影響を調べた。

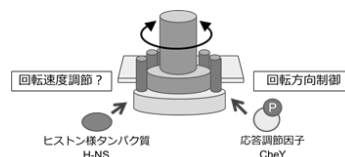


図 1 べん毛モーターとその制御因子

2. 実験方法

変異体・プラスミドの構築は標準的な手法によった。モーターの回転方向制御解析には、西山雅祥博士(京都大学)の開発した高圧力顕微鏡[2]を用いた。高圧力チャンバーに実験サンプルを封入しハンドポンプを用いて、圧力を増加させる簡単な仕様となっている。高圧力下でべん毛モーターの回転運動を測定するため、チャンバーの観測窓にべん毛繊維を吸着させ、モーターの回転運動を細胞本体の回転として観察するテザードセルの実験を行った。

3. 結果と考察

まずは、作製した $\Delta hns \Delta hdfR$ 株の泳ぎを顕微鏡観察した。 Δhns 株では生育阻害が起こったため、通常よりも長時間培養し、遊泳運動の経時変化を観察をした。 $\Delta hns \Delta hdfR$ 株では培養時間が6時間を超えたころから泳ぎだす菌が見られた。培養開始から10.5時間経過した菌は、遊泳速度の上昇、ジャンプの頻度の低下を示し、野生株のようなふるまいをみせた(図2)。したがって、H-NSはべん毛モーターの回転制御に関与していない可能性が高い。これは過去の論文の報告[1]とは矛盾するが、別のアプローチで解析を進めた最新の論文の主張[3]とは一致する。

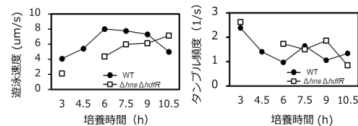


図2 $\Delta hns \Delta hdfR$ 株の遊泳速度とジャンプ頻度

つぎに、高圧力のべん毛モーターに対する影響を調べた。はじめに、大腸菌走化性野生株 RP437 の高圧力下でのべん毛回転を観察した。その結果、約 50 MPa 程度で回転は CCW に固定された(図3)。この CW 回転阻害の作用機序・作用点を決定することで、回転制御メカニズムに迫ると期待される。

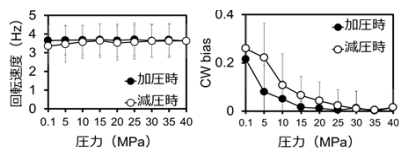


図3 走化性野生株のモーター回転に対する高圧力の影響

そこで、高圧力によって CheY のリン酸化が阻害されるのか、またはリン酸化型 CheY のモーターへの結合が阻害されるのかを検討した。そのために、構成的活性化変異 D13K とリン酸化部位変異 D57A を CheY に導入した。この変異型 CheY はリン酸化されないが、CW 回転を引き起こす。全走化性因子欠失株に変異型 CheY を発現させ、べん毛回転に対する圧力の影響を測定した。この菌の CW 回転バイアスは常圧でほぼ 1 だったが、80 MPa 程度ではほぼ 0 にまで下がった(図4)。この結果から、高圧力により CheY リン酸化レベルが低下するものではなく、CheY とモータ

ーとの相互作用が低下することが示唆された。

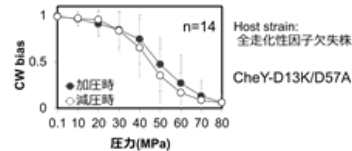


図4 変異 CheY 過剰発現菌のモーター回転に対する影響

さらに、CheY の標的となるモーター蛋白質 FliM に注目した。まず、CW 回転阻害は CheY の解離によるものなのか調べるため、CheY に依存せず CW 回転を引き起こす FliM 変異体 (R60C, R181H) を構築した。この変異体を発現させた菌では 80 MPa でも CCW 回転しなかった(図5)。したがって、高圧力はモーター自体の構造変化ではなく FliM とリン酸化型 CheY の親和性の低下を引き起こすという解釈がさらに支持された。また、高圧下でモーターが CCW 回転しているとき、すなわち CheY が働いていない条件でも、CheY があるときに限り回転速度が低下した。FliM は CheY の結合部位を 2 つもつ。CheY が N 末端配列に結合し、つぎに、ミドルドメインと相互作用することで CW 回転が起こるとされている[4]。この現象は、親和性の低いミドルドメインとの結合が圧力によって外れたが、N 末端配列には結合したままの CheY が回転を阻害したため、速度低下を引き起こしたのではないかと推測された。そこで、N 末端配列を欠失させた FliM Δ_{1-10} 変異体を作製した。この変異体では速度低下を起こさないと予測し高圧力の解析を行った。その結果、コントロールである CheY のない条件でも高圧力下で速度の低下が見られた。そのため、今回の実験系では、CheY によるブレーキの現象があるかどうかは判定できなかった。今後は実験系の改良を調べる必要がある。

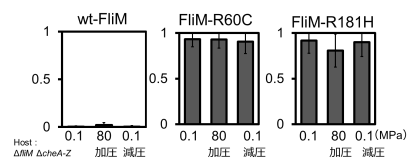


図5 FliM-CW ロック変異体発現菌の高圧力の影響

4. 結言

以上の結果より、H-NS はべん毛モーターの回転制御に必須ではないことが示唆された。また、高圧力下で野生株は CW 回転阻害を起こすこと、この現象は CheY と FliM との親和性の低下によって生じることが示唆された。

参考文献

- 1) Donato, G. and Kawula, T. ; J. Biol. Chem., Vol. 273, pp.24030-24036, 1998
- 2) 西山雅祥, 曾和義幸 ; 化学, Vol.68, pp.31-36, 2013
- 3) Kim, E. and Blair, D. ; J. Bacteriol., Vol. 197, pp. 3110-3120, 2015
- 4) Dyer, M. et al. ; J. Mol. Biol., Vol. 388, pp. 71-84, 2009