

光ピンセット法と蛍光観察を用いた極べん毛 モーターの回転計測

TAKAI, Ryotaro / 高井, 亮太郎

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学研究科編

(巻 / Volume)

63

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2022-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00025416>

光ピンセット法と蛍光観察を用いた 極べん毛モーターの回転計測

POLAR FLAGELLAR ROTATION MEASURED BY
OPTICAL TWEEZERS AND FLUORESCENCE OBSERVATION

高井亮太郎

Ryotaro TAKAI

指導教員 曾和義幸

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

Many bacteria swim in aqueous environments, propelled by rotating their flagella. The shape of the flagellum is known to be unique to each type of bacteria. The shape and the location of the flagellum is known to be unique to each type of bacterial species. Some bacteria, such as *Vibrio alginolyticus* and *Actinoplanes missouriensis*, have their flagella at the cell pole. It is important to measure polar flagellar rotation to understand their function, however, only a few results of speed measurements of polar flagella have been published due to the difficulty of rotation measurements because of their location. In this study, we aimed to observe the polar flagellar rotation in *Actinoplanes missouriensis*, which has many short polar flagella and can swim at up to 200 $\mu\text{m/s}$. We first attempted to apply optical tweezers to a single polar flagellum of *V. alginolyticus*, and confirmed that we could estimate its motor speed from the periodic fluctuations of the trapped cell body position. We then applied the same method to the motor of *A. missouriensis*, and found that the optical tweezers were not suitable for measuring the motor speed of *A. missouriensis* because there was no correlation between the periodic fluctuation of cell position and swimming speed. Therefore, we labeled the flagella of *A. missouriensis* by fluorescent dyes and directly observed the motor rotation by fluorescence microscopy, and found that the motor rotation speed was much slower than expected from the swimming speed.

Key Words : flagellar motor, polar flagellum, optical tweezers

1. 緒言

多くの細菌は、べん毛とよばれる細長いらせん構造をした繊維を回転させて、水中を遊泳するための推進力を生み出す。べん毛の形状や本数は、細菌種ごとに異なる。例えば、大腸菌やサルモネラ菌は、菌体の周囲にべん毛をもつ周毛性であり、ビブリオ属細菌は、細胞の極にべん毛をもつ極毛性である。べん毛の根元の細胞膜に埋まるべん毛モーターは、 H^+ や Na^+ などの共役イオンの電気化学的ポテンシャル差を利用して回転力を生み出す直径 45 nm ほどの回転分子モーターである[1]。

べん毛モーターの機能を解明するために、モーターの回転速度を計測することは重要である。これまでの研究では、主に大腸菌やサルモネラ菌の周毛性べん毛について、顕微鏡の試料ガラスに1本のべん毛を固定して菌体回転を観察するテザードセル法や、付着させた微小なビーズの回転を観察するビーズ法でモーター回転計測が報告されてきた。一方、モーターの回転軸と菌体の長軸が一致している極毛べん毛をもつ細菌では、その幾何学的な制約からテザード

セル法やビーズ法を適用することが困難である。そのため、極べん毛をもつ細菌には、光ピンセットを用いた回転計測がしばしば用いられる。

本研究ではまず、極に1本のべん毛をもつ *Vibrio alginolyticus* を用いて光ピンセット回転計測法の条件検討をおこなった。次に、極に複数のべん毛をもつ放線菌 *Actinoplanes missouriensis* に光ピンセットによる回転計測が適用可能であるか検討した[2]。さらに、放線菌べん毛の蛍光染色によるもべん毛回転の計測をおこない、複数の極べん毛がどのように細菌の遊泳推進力を生み出すのか解明することを目的とした。

2. 実験方法

(1) 光ピンセットを用いた極べん毛の計測

極べん毛モーターの回転計測は光ピンセットを用いておこなった。遊泳する菌体をレーザーで光捕捉し、その重心位置の周期的な変化をもとにモーター回転速度を算出した(図1)。好気条件下ではレーザーの照射により発生

する光損傷を無視することができないため、長時間の回転計測をおこなう場合には嫌気条件下でおこなった。

また、計測時に特異的阻害剤6-Iodoamilorideを添加して、紫外線照射による固定子機能の不可逆的な阻害によっておこるモーター回転速度の段階的な減少を計測した。この段階的な速度減少から固定子1つが生み出す回転速度を算出した。

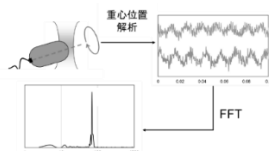


図1 光ピンセットを用いたモーター回転速度計測

(2) 放線菌遊走子のべん毛モーター回転計測

べん毛を1つの極に十数本もつ放線菌 *A. missouriensis* で、光ピンセット法と蛍光観察を用いた回転計測をおこなった。放線菌は野生型 (WT) と *Che1*, *Che2*, *pil* 欠失株 (*FliC*(wt)), *FliC* (wt) 株の *FliC* にシステイン残基を導入した株 (S260C) の3種の菌株を用いて計測をおこなった。

光ピンセット計測法では好気条件下で数秒の計測をおこなった。蛍光を用いた回転計測法では、S260C 株のべん毛フィラメントを Alexa488-maleimide で染色して観察し、その周期的な運動からモーター回転速度を算出した。

3. 結果と考察

(1) モーター回転速度変化による固定子数の定量

光ピンセット計測法では、近赤外レーザーが菌体へ光損傷を与える。そのため、光損傷を軽減できる嫌気条件下での実験を検討した。好気条件下では十数秒でモーターの回転速度減少がみられたのに対し、嫌気条件下では15分もの回転計測を可能にした (図2)。

阻害剤を用いた計測では、47例の段階的な回転速度変化を計測した (図3)。平均的な速度変化は21.4 Hz であり、固定子1個が生み出す回転に相当すると考えられた。また、モーターの初期回転速度は平均132.1 Hz であったことから、モーターあたり6個の固定子が組み込まれていたと見積もられた (図4)。

V. alginolyticus のモーターは、固定子が安定して13個組み込まれる可能性が示唆されていたが、今回の結果から、低負荷時では高負荷時の半分ほどの固定子が組み込まれることが分かった。

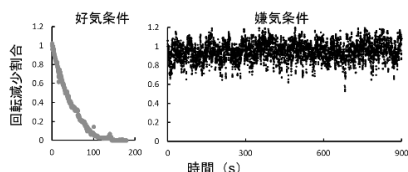


図2 好気条件下と嫌気条件下での長時間回転計測

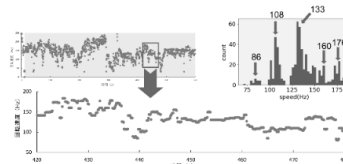


図3 段階的速度変化の解析

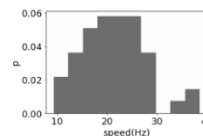


図4 固定子1個が生み出す回転速度の分布

(2) 極に複数べん毛をもつ放線菌の回転計測

光ピンセット計測法を用いてモーター回転速度を算出したところ、WT では平均46.5 Hz, *FliC* (S260C) 変異体では平均100.1 Hz であった。遊泳速度に関してはWTの方が速いため、モーター回転速度が速い方が低速度で泳ぐという結果となった。一方、蛍光を用いた回転速度計測法ではS260Cのモーター回転速度は平均27.2 Hz であり、光ピンセット計測法と異なる結果となった (図5)。

A. missouriensis の遊走子は平均15本のべん毛をもつため、計測された重心位置変化は複数のモーター回転に起因する細胞本体の振動である。*V. alginolyticus* ように極に1本のべん毛を持つ場合や、大腸菌のように複数べん毛を束にする場合は、光ピンセットで計測される重心位置変化がべん毛モーター1個の回転または複数個の回転の平均値を反映する。今回の結果から、*A. missouriensis* の遊走子のべん毛は、複数のべん毛を同期させることなく回転していることが示唆され、光ピンセットによる回転計測には適さないことが明らかとなった。

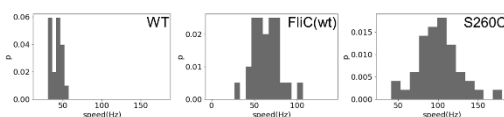


図5 光捕捉した放線菌遊走子の振動分布

4. 結言

以上の結果より、*V. alginolyticus* のもつNa⁺駆動型べん毛モーターでは低負荷環境下で6個程度の固定子が組み込まれることが示唆された。また、*A. missouriensis* の遊走子の複数本のべん毛回転は同期していないことが示唆された。

参考文献

- 1) Santiveri M. *et al.* : Structure and function of stator units of the bacterial flagellar motor, bioRxiv The Preprint Server For Biology, 2020
- 2) Uchida K. *et al.* : Characterization of *Actinoplanes missouriensis* spore flagella, Microbiology, 77, 2559-2562, 2011