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

PDF issue: 2025-07-12

光操作を用いたナトリウムイオン駆動力の動的変化の定量

TAKIURA, Ayato / 瀧浦, 彩人

(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/10.15002/00025417

光操作を用いたナトリウムイオン駆動力の動的変化の定量

QUANTIFICATION OF ION MOTIVE FORCE CONTROLED BY OPTPGENETICS

瀧浦彩人
Ayato TAKIURA
指導教員　曽和義幸

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

The bacterial flagellar motor generates the rotational torque by the interactions between a rotor and multiple stator units. Each stator unit translocates the coupling ions, driven by ion motive force (IMF). The coupling ions known to be either protons or sodium ions, depending on the stator complexes. In *Escherichia coli* cells, wild type stator units MotA/MotB couple proton flux to generate the rotational torque. Chimeric stator units, PomA/PotB, can interact with a rotor of *E. coli* and couple sodium ions for torque generation. In this study, we controlled and quantified the sodium ion motive force (SMF) of *E. coli* cells. The SMF of the cells was dynamically manipulated using a light-driven sodium ion pump KR2 with excitation by irradiation of green light. To quantify the SMF accurately, we measured cytoplasmic sodium ion concentration and membrane potential by observing sodium green and TMRM, respectively. As a result, we showed that the increase in the speed of the PomAPotB motor when KR2 was expressed in *E. coli* cells could be explained by an increase in SMF, indicating that the speed of the motor varies linearly with IMF over a wide range.

***Key Words** : flagellar motor, ion motive force, single-cell measurements*

１．諸言

多くのバクテリアは，細胞膜に埋め込まれたべん毛モーターを高速回転させることで遊泳する．べん毛モーターは，回転子と固定子ユニットが作用して回転力を生み出す．大腸菌がもつ H^+駆動型モーターは，5 分子の MotA と 2 分子の MotB が内膜で H^+チャネルを形成して，固定子ユニットとし機能する．一方，海洋細菌 *Vibrio alginolyticus* の固定子 PomA と PomB は，それぞれ MotA と MotB に相同性があり，Na^+チャネルとして機能する．MotB と PomB のキメラタンパク質である PotB と PomA の複合体は, 大腸菌内で Na^+チャネルの固定子ユニットとして機能することが知られている．これらの固定子ユニットは，それぞれのイオン駆動力（IMF）にしたがって流入した共役イオンから得られる自由エネルギーを回転の仕事へと変換する．一価のイオンに対する IMF は，

$$IMF = -\Delta\varphi + \frac{2.3RT}{F}\log\frac{[I]_{ex}}{[I]_{in}} \qquad (1)$$

と表すことができる[1]．ここで R は気体定数，T は絶対温度，F はファラデー定数を示し，$\Delta\varphi$ は膜電位差を，$[I]_{ex}$と$[I]_{in}$はそれぞれ細胞外と細胞内の共役イオンの濃度差を示す．

近年，多くの海洋細菌などが，光をエネルギー源や細胞内シグナル伝達に利用するために，7 つの膜貫通型 α ヘリックスモチーフをもつ光駆動型ロドプシンを利用することがわかってきた．分子内部のレチナールが特定波長の光を吸収し異性化することをトリガーとして，様々な機能を発現することができる．光駆動型 H^+ポンプを用いて H^+駆動力を制御し，べん毛モーターの回転速度を変化させる手法が確立された[2].

本研究では，光駆動型ロドプシンを用いて Na^+駆動力（SMF）を制御し，その結果として変化するモーター回転をビーズアッセイで計測した．ビーズアッセイとは，菌体をガラスに固定し，短くしたべん毛の先に 1 μm のビーズを付着させ，その回転の軌跡を解析する手法である．光駆動型 Na^+ポンプとして主に KR2 を用いて SMF を制御し，それに伴うべん毛モーターの回転速度と細胞内 Na^+濃度，膜電位を計測することを目的とした(図 1).

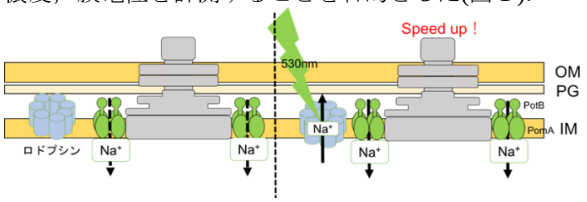

図 1　ロドプシンを用いた IMF の制御

２．実験方法

（１）ロドプシンと固定子を発現する大腸菌

本研究では，大腸菌 JHC36 株(Δ*motAB fliC::fliC*st Δ*cheY*)を用いた．KR2 を発現するプラスミドと固定子（MotA/MotB または PomA/PotB のいずれか）を発現するプラスミドを移入して，all-trans 型レチナールを添加した培地で培養した．

（２）膜電位計測

膜電位の計測には Tetramethyl rhodamine (TMRM)を用いた(図２)．TMRM はカチオン性蛍光色素であり，脂溶性構造により浸透速度は遅いものの，容易に脂質二重膜に浸透することができる．膜電位に応じて拡散した TMRM の濃度を,細胞内と細胞外の蛍光強度から求める．ネルンストの式を用いて膜電位を算出することができる．

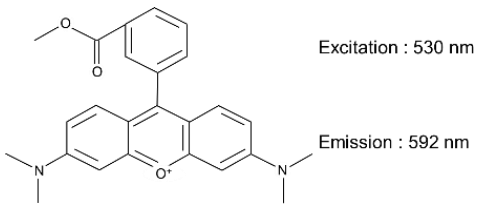

図２　蛍光色素 TMRM

（３）細胞内 Na^+濃度計測

細胞内 Na^+濃度の計測には，Na^+蛍光指示薬 Sodium Green を使用した(図３). 膜透過性のある Sodium Green は細胞膜を横切って自由に拡散することが可能である．菌体内に入るとエステラーゼによってアセテート部位が切断され，Na^+と 1:1 で反応する酸性型に変化する．酸性型になり負に帯電することで，菌体からの漏出速度が大幅に低下し，細胞内の Na^+のみと反応が可能である．蛍光強度から細胞内の Na^+の濃度を算出することが出来る．

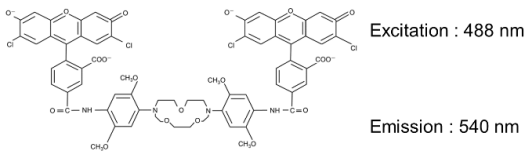

図３　蛍光色素 Sodium Green

３．結果と考察

（１）膜電位計測上昇

KR2 発現時の膜電位の上昇を TMRM の蛍光強度から計測した．まず菌体の蛍光強度を計測した後，緑色ハロゲン光でロドプシンを 30 分間励起し，再び蛍光強度を計測した．その結果，菌体が発現する固定子にかかわらず，緑色光を照射したときのみ約 15 mV の膜電位の変化が検出された（図４）

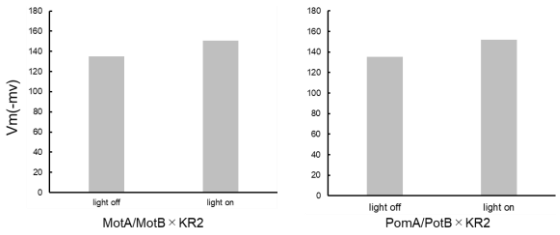

図４　KR2 機能時の膜電位上昇

（２）細胞内 Na^+濃度の低下

KR2 を発現させた菌体を用いて，菌体の蛍光強度を計測した後，ロドプシンを励起して再び蛍光強度を測定した．このとき蛍光の褪色を補正し，蛍光強度から細胞内 Na^+を計測した．その結果，ロドプシン機能時に Na^+が排出されたことによる細胞内 Na^+濃度の低下が検出された(図５).

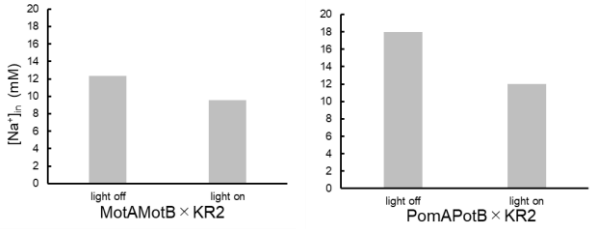

図５　KR2 機能時の細胞内 Na^+の低下

（３）IMF とモーター回転速度

KR2 の機能による SMF の上昇は 15%程であった．同じ条件下で計測した PomAPotB で駆動されるべん毛モーターの回転速度の上昇幅とほぼ一致した．光駆動型ロドプシンで強制的に操作した SMF に対しても，べん毛モーターの回転速度は直線的な関係になることが示唆された.

４．結言

TMRM と Sodium Green を用いて，SMF の計測をおこなった．ロドプシン KR2 による駆動力制御を定量したところ 15%程度の上昇が観察された. Na^+駆動型モーターの特徴である外液の Na^+濃度変化や阻害剤と光操作による制御を組み合わせた，様々な SMF 条件下におけるべん毛モーターの特性評価は，エネルギー変換機構の解明につながると期待される.

参考文献

1）Gabel *et al*.,(2003), *PNAS*. **100**, 8748-8751.

2）Tipping, *et al*.,(2006), *Mol Microbiol*. **87**, 338-347.