

光架橋法と蛍光観察による大腸菌べん毛モーター固定子ユニットのダイナミクスの解明

TATSUNO, Marie / 竜野, 真理衣

(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/10.15002/00025418>

光架橋法と蛍光観察による大腸菌べん毛モーター 固定子ユニットのダイナミクスの解明

DYNAMICS OF THE STATOR UNITS IN *Escherichia coli* FLAGELLAR MOTOR REVEALED
BY PHOTO-CROSSLINKING AND FLUORESCENCE OBSERVATION

竜野真理衣

Marie TATSUNO

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

The bacterial flagellar motor consists of a rotor and ~10 stator complexes, MotA/MotB. Its rotational torque is generated by interactions between the cytoplasmic region of stator protein MotA and the C-terminal region of rotor protein FliG. By changing the conformation of periplasmic domains of MotB to anchor to the peptidoglycan layer, each stator complex opens its proton channels and works as a stator. In this study, we observed the dynamics of eGFP-fused MotB by TIRF microscopy, after jamming the stator-rotor interactions by *in vivo* photo-crosslinking. The UV intensity was adjusted to form one or a few cross-links between a rotor and stator units. From the results of fluorescence observation, it was found that the stator units dissociated from the motor within 30 s to 1 min after jamming the motor rotation. Interestingly, a short time after the rotation was jammed, some motors re-started to rotate. These results suggest that the stator unit, which was cross-linked to the rotor, was inactivated and no longer bound to the peptidoglycan layer, allowing it to rotate with the rotor.

Key Words: *bacteria flagellar motor, in vivo photo-crosslinking, stator units*

1. 緒言

大腸菌などの細菌は菌体から伸びる数本のべん毛を回転させることで水中を遊泳する。べん毛の回転は、その根元にある両方向に回転可能なべん毛モーターによって駆動される。べん毛モーターは、回転方向を制御する回転子と、エネルギー変換をおこなう複数の固定子ユニットから構成される。固定子を構成する MotA の細胞質領域と、回転子を構成する FliG の C 末端領域が相互作用することにより回転トルクは発生する。さらに固定子 MotB の C 末端ペリプラズムドメインにはペプチドグリカン結合モチーフをもち、この領域がペプチドグリカン層に結合することで固定子は活性化状態となり、プロトンチャンネルとして機能する。また、モーターに組み込まれる固定子ユニットは、環境に応じてその数を動的に変化させる。固定子ユニットのモーターへの組み込みは、モーター回転が促進する可能性が示唆されたが[1]、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。

本研究では、モーターの回転と固定子ユニットのダイナミクスとの関係を明らかにすることを目的とした。そこで、

FliG-MotA 間の光架橋によるモーター回転の強制停止と、固定子ユニットの結合解離の全反射顕微鏡を用いた観察を組み合わせた実験をおこなった。

2. 実験方法

(1) *in vivo* 光架橋法とテザードセルアッセイ

本研究では、FliG の R281 をコードするコドンに TAG に置換した変異型 *fliG* 遺伝子と、TAG を pBPA のコドンとして利用できる変異型 tRNA をプラスミドから発現させる大腸菌 *fliG* 欠失株を用いた。モーターの回転は、1本のべん毛を顕微鏡カバーガラスに固定して菌体の回転を観察するテザードセルアッセイを用いた。

(2) モーター停止後の固定子ユニットの振る舞い

(1) の菌体のゲノム上の MotB に eGFP を融合することで、モーターに組み込まれる固定子を全反射顕微鏡によって観察した。まずテザードセルによってモーターが機能する菌体の回転を確認した。同一の菌体に UV を照射することで FliG-MotA 間で光架橋を形成させ、回転を停止させた(図 1)。回転停止後、0 秒~60 秒の任意の時間が経過した後に、全反射顕微鏡を用いて回転中心の基点の強度

を計測した。蛍光の褪色過程を指数関数でフィッティングすることでモーターの初期蛍光強度を算出し、モーターに組み込まれていた固定子数を強度によって比較した。

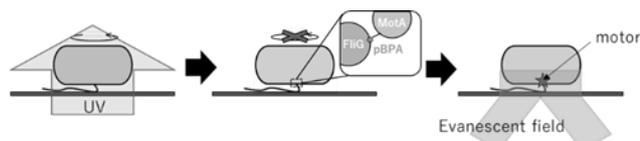


図1 回転停止と蛍光観察

3. 結果と考察

(1) 回転停止後の経過時間と初期蛍光強度の関係

FliG の R281 を pBPA に置換した変異 FliG をもつ菌体の回転をテザードセルアッセイによって観察した。この変異 FliG と MotA が架橋を形成することは過去の研究より明らかとなっているが、本研究では UV 照射により 1~少数個の架橋が形成するように UV 強度を調節した。FliG-MotA 間で架橋を形成させてモーターの回転を停止させた直後に UV 照射を停止して、0 秒、30 秒、45 秒、60 秒の時間が経過した後、蛍光観察をおこなった。eGFP の褪色過程から初期蛍光強度を算出したところ、回転停止 0 秒、30 秒後の蛍光強度の減少は見られなかったが、45 秒、60 秒後の蛍光強度が減少していた(図 2)。各固定子ユニットがトルクを生成できる状態にもかかわらず、回転を阻害されているために固定子ユニットがモーターから離散したと予想される。また、この時間スケールは固定子ユニットの平均的な滞留時間は約 30 秒であるという過去の報告にも一致する[2]。一方、興味深いことに、回転停止後 1 分以上の時間を空けると、再回転する菌体が多く見られた(図 3)。

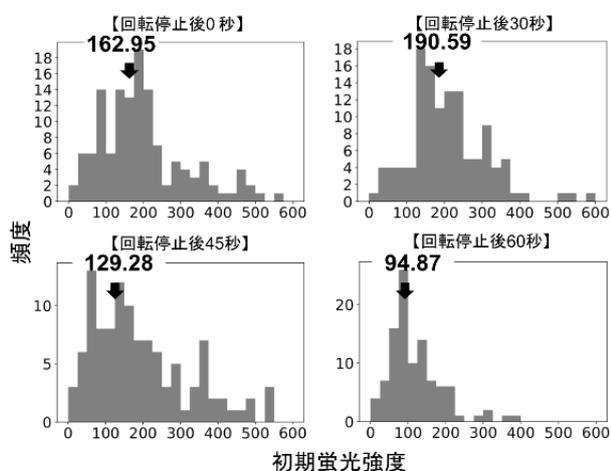


図2 回転停止後の初期蛍光強度

(2) FliG-MotA 間の架橋形成後の再回転メカニズム

再回転したモーターに組み込まれる固定子ユニット数との関係を調べた。UV を照射して回転停止を確認した直後に UV 照射を停止して、再回転するまでの時間を記録し

たところ、再回転率は時間とともに上昇し、初期蛍光強度の減少の時間スケールとほぼ一致した(図 3)。また、UV 照射回数が多くなるにつれて、再回転後の回転速度は減少して、停止頻度が上昇した(図 4)。

以上の結果から、本研究で観察した現象は次のように説明できる。まず、架橋形成によりトルク発生ができなくなった固定子は、ペプチドグリカン層との結合が解離して回転子と共に回転できるようになる。つぎに、架橋形成をしていない固定子は、自発的に解離して、回転子の周りに架橋された固定子が移動できる十分な空間ができる。少数の固定子ユニットが回転力を生み出して回転子を回転させる。ただし、架橋された固定子が接触すると固定子ユニットは解離する必要があるため、頻繁に交換が起きていると予想される。

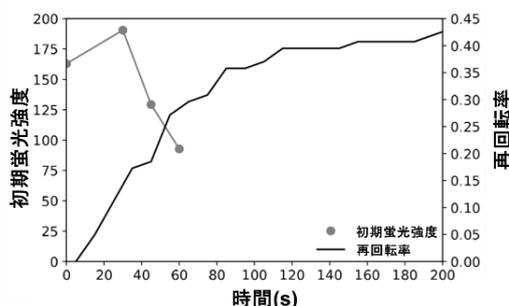


図3 初期蛍光強度の変化と再回転率

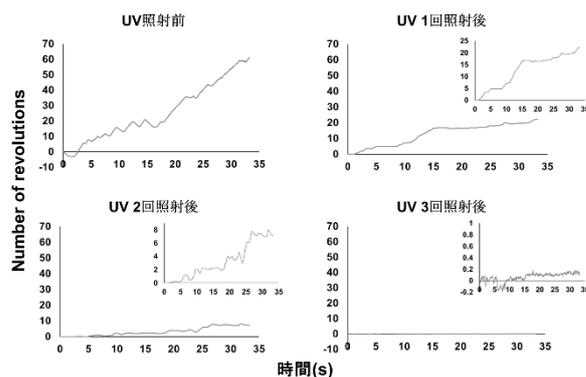


図4 UV 照射回数ごとの回転角度

4. 結言

以上の結果より、モーター回転を停止させることによる固定子ユニットの不活性化および離散が誘導されることが明らかとなった。また、再回転後の連続的に起こる回転角度変化から、架橋を形成していない固定子ユニットの頻繁な結合解離が予想される。

参考文献

- 1) Ito *et al.*,(2021), *Nature Communications* **12**
- 2) Leake *et al.*, (2006), *Nature*. **443**, 355-358