

バクテリアべん毛モーターの自律的なフィードバック制御機構



研究ノート

南野 徹*

Autonomous feedback control mechanism of the bacterial flagellar motor

Key Words : Bacterial flagellar motor, Motility,
Transmembrane proton channel complex.

はじめに

Salmonella enterica (通称、サルモネラと呼ぶ) は細菌性食中毒を引き起こす病原細菌で、全世界のサルモネラ感染者数は毎年 7,500 万人にのぼり、死者数は 27,000 人にも達する。サルモネラは人の腸管上皮細胞内に感染して細胞内に侵入し、急性胃腸炎を引き起こす。したがって、サルモネラには、口から腸管上皮細胞まで効率よく移動できる運動マシナリー、最適な環境や危険な環境を感知できる感覚センサー、その情報を運動マシナリーに伝える情報処理システムが装備されている。サルモネラは短軸が 1 μm 、長軸が 2 μm の俵のような形をしており、その周囲には十数 μm の長さのべん毛と呼ばれる繊維状のタンパク質複合体が 5~10 本程度存在する。このべん毛こそがサルモネラの運動マシナリーである。サルモネラはべん毛を高速に回転させることで、水中を約 30 $\mu\text{m}/\text{秒}$ の速さで泳ぐことができる。この速度を 170 cm の人に例えると、時速 90 km の速度で走ることに相当する。

サルモネラのべん毛は約 30 種類のタンパク質からなる超分子複合体で、回転モーターとして働く基部分、らせん型スクリューとして機能するフィラメント、そして両者を繋ぎ自在継手としての役割を果たすフックの 3 つの部分構造で構成される [1]。べん毛モーターは固定子、回転子、回転軸および軸受

けから構成される (図 1)。べん毛モーターの動力源は細胞膜内外に形成される水素イオンの電気化学勾配 (プロトン駆動力) である。水素イオン (以降、プロトンと呼ぶ) がプロトン駆動力に沿って固定子内部を細胞の外から内に向かって流れると、固定子は回転子と相互作用し回転力 (トルク) が発生する。サルモネラのべん毛モーターの最高回転速度は毎分 21,000 回転にも達し、F1 レーシングカーに搭載されているエンジンの最高回転速度を遥かに凌駕している。べん毛モーターはプロトンの流れの向きを変えずに反時計方向にも時計方向にも回転方向の切替えができる。しかも、べん毛モーターのエネルギー変換効率率は 100% に近い [2]。

筆者らの研究室では、べん毛モーターのエネルギー変換メカニズムを解明するため、べん毛モーターの出力特性やプロトンチャネル活性が著しく変化した変異型べん毛モーターの生物物理学的解析に取り組んでいる。本稿では、これまでに筆者らが見出したべん毛モーターのエネルギー変換に関わる自律的なフィードバック制御機構に関する研究成果について紹介する。

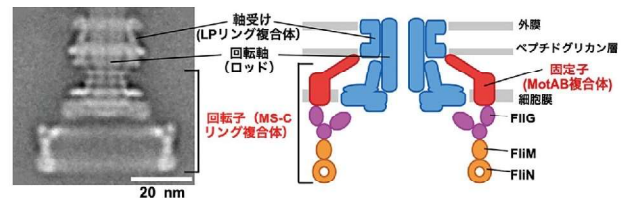


図 1. サルモネラのべん毛モーターとして働く基部分の電子顕微鏡像 (左) とその模式図 (右)

べん毛モーターに配置される固定子の数は環境中の粘度変化に応じて自律的に変化する

MotA および MotB と呼ばれる 2 種類の膜タンパク質から構成される固定子はプロトンチャネルとして働き、細胞の外側から内側に向かって流れるプロ



* Tohru MINAMINO

1969年12月生まれ

広島大学 大学院生物圏科学研究科 生物機能科学専攻博士後期課程 (1997年)
現在、大阪大学 大学院生命機能研究科 准教授 博士(学術)

専門/分子微生物学・生物物理学

TEL : 06-6879-4625

FAX : 06-6879-4652

E-mail : tohru@fbs.osaka-u.ac.jp

トン流を回転力に変換するエネルギー変換装置である。MotAB 複合体は大まかに分けて、回転子と相互作用する細胞質ドメイン、プロトン透過に関わるプロトンチャネルドメイン、細菌の細胞壁に相当するペプチドグリカン層に結合するペプチドグリカン結合ドメイン (以降、PGB ドメインと呼ぶ) から構成される (図 2) [3]。MotAB 複合体は、PGB ドメインを介してペプチドグリカン層に結合することで回転子の周りに固定され、初めて活性型の固定子として働くことができる。

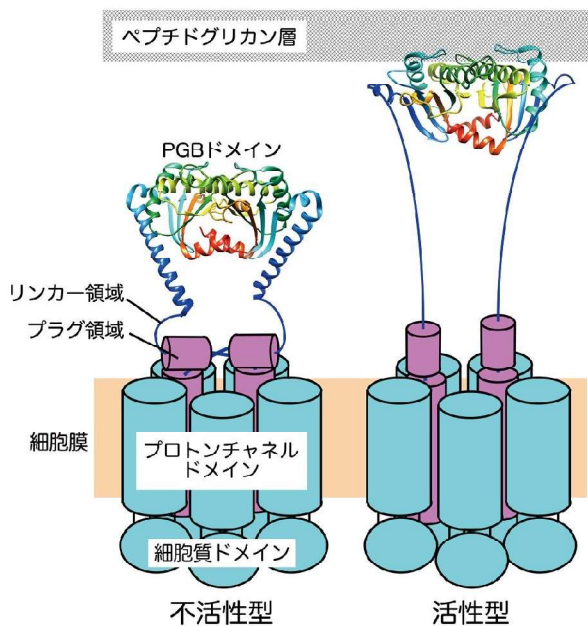


図 2. MotAB 複合体のドメイン構造。MotAB 複合体は細胞質ドメイン、プロトンチャネルドメイン、ペプチドグリカン結合 (PGB) ドメインからなる。MotAB 複合体が回転子の周りに組み込まれると、プラグ領域がプロトンチャネルドメインから解離して PGB ドメインがペプチドグリカン層に結合する。その結果、MotAB 複合体は活性型の固定子として働く。

べん毛モーターの回転子の周りには約 10 個程度の MotAB 複合体が存在する。緑色蛍光タンパク質を融合した MotB の 1 分子蛍光イメージング法により、MotAB 複合体は、常にペプチドグリカン層に結合しているのではなく、モーターの回転中にもダイナミックに入れ替わることが示された [4]。

広範囲の負荷条件下において回転速度と回転力の相関関係をプロットしたものをトルク・スピードカーブと呼び (図 3)、べん毛モーターの出力特性を表す重要なパラメーターである。べん毛モーターのトルク・スピードカーブはトルクの減少率が低い高負荷・低速回転領域とトルクの減少率が大きい低負荷・高速回転領域に分けられる。

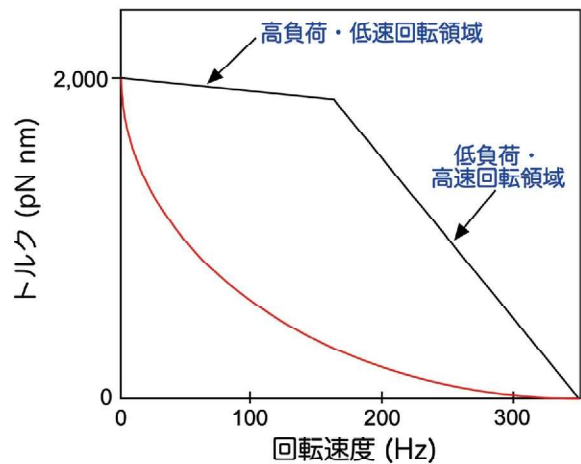


図 3. 野生型 (黒線) とリンカー領域の一部が欠失した変異型 (赤線) べん毛モーターのトルク・スピードカーブ。

べん毛モーターが高負荷・低速回転領域で回転する際には、回転子の周りには 10 個程度の MotAB 複合体が固定子として存在する。一方、外部負荷の減少に伴ってべん毛モーターが低負荷・高速回転領域で回転すると、固定子の数が 2~3 個程度まで減少する (図 4) [5]。このように、べん毛モーターは環境中の粘度変化を感知し回転子の周りに配置される MotAB 複合体の数を制御している。それでは、一体どのようにべん毛モーターは環境中の粘度変化を感知するのだろうか？

MotAB 複合体の細胞質ドメインが回転子構成タンパク質である FliG と相互作用すると、回転力が発生する。我々は、この細胞質ドメインに変異をもつ変異型べん毛モーターの出力特性を広範囲の負荷条件下で計測し、野生型べん毛モーターは高負荷・低速回転領域ではトルクの減少率が低いのに対し、変異型べん毛モーターは外部負荷の低下に伴ってト

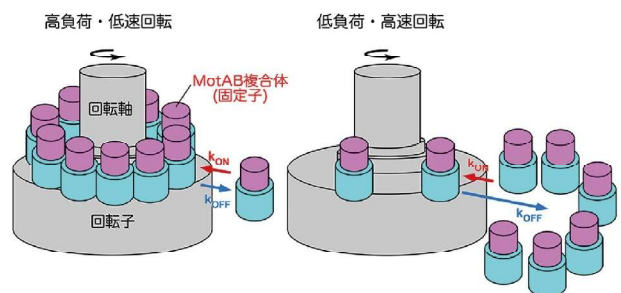


図 4. 外部負荷に依存した固定子の数の変化。外部負荷が小さくなると、MotAB 複合体の解離速度 (k_{OFF}) が速くなる。しかしながら、その会合速度 (k_{ON}) は変化しない。

ルクが急激に減少することを明らかにした。以上の結果から、べん毛モーターは MotAB 複合体の細胞質ドメインと FliG との相互作用を介して外環境の粘度変化を感知する分子センサーとして働くことが示唆された [6]。

環境の粘度低下に伴って固定子の数が減少するには、回転子の周りに配置されている MotAB 複合体をペプチドグリカン層から解離させる必要がある。その分子機構を解明するため、我々は、プロトンチャンネルドメインと PGB ドメインをつなぐリンカー領域の一部を欠失させた変異型べん毛モーターを作成し、その出力特性を解析した。リンカー領域の一部を欠失させても、べん毛モーターの最大トルクは変化しなかった。しかしながら、この欠失によって、野生型 MotAB 複合体がべん毛モーターから解離し始めるよりもはるかに高い負荷で、多くの欠失型 MotAB 複合体がべん毛モーターから解離した (図 3)。以上の結果から、プロトンチャンネルドメインと PGB ドメインをつなぐリンカー領域が PGB ドメインのペプチドグリカン層への結合親和性を負荷依存的に制御することが示唆された [7]。さらに、無負荷で回転しているべん毛モーターの回転計測を行った結果、高負荷条件下で回転しているべん毛モーターに比べ、MotAB 複合体の解離速度がはるかに速くなることを突き止めた [8]。以上の結果から、PGB ドメインには負荷依存的な構造スイッチが存在し、そのスイッチが負荷依存的に PGB ドメインの構造変化を引き起こすことが推察される。

べん毛モーターは環境中の粘度変化を感知し固定子のプロトンチャンネル活性を自律的に制御する

MotAB 複合体はべん毛モーターに組み込まれない限りプロトンチャンネル活性を示さない。そのため、MotAB 複合体をサルモネラで大量発現させても、細胞増殖にはほとんど影響がない。一方、プロトンチャンネルドメインと PGB ドメインをつなぐリンカー領域の一部にあるプラグと呼ばれる領域を欠失させると、細胞内部に大量のプロトンが流れ込み、その結果細胞増殖が停止する [9]。つまり、プラグ領域がべん毛モーターの回転と共役しないプロトンの流れを完全に抑制していると推察される。

MotAB 複合体がべん毛モーターに組み込まれると、プラグ領域は MotAB 複合体から外れ、その結

果 MotAB 複合体はプロトンチャンネルとして働くことができる (図 2)。プロトンチャンネルドメインに存在する MotB の 33 番目のアスパラギン酸 (Asp-33) がプロトンの結合と解離に直接関与する。このアスパラギン酸のプロトン化と脱プロトン化が繰り返し起こることで、プロトンは細胞の外から内へ向かって流れる。べん毛モーターの回転はプロトンの流れと共役していることから、べん毛モーターの回転速度はプロトンの流入速度に比例する。

我々はべん毛モーターのエネルギー変換機構を解明するため、この 33 番目のアスパラギン酸をグルタミン酸に置換した *motB(D33E)* 変異株を作製し、変異型べん毛モーターの出力特性を解析した。外部負荷が十分に高い条件下では、この変異型べん毛モーターはほぼ一定の速度で回転した。しかしながら、外部負荷が低下すると、この変異型モーターの回転速度は大幅に揺らぐとともに、一時停止も繰り返し起こった [10, 11]。このことから、D33E 変異により、べん毛モーターは低負荷を適切に感知できなくなり、その結果、変異型 MotAB 複合体のプロトンチャンネル活性が低負荷条件下で大きく揺らぐことが示唆された。最近、MotAB 複合体の細胞質ドメインと FliG の相互作用を介し、MotB の N 末近傍領域が MotAB 複合体のプロトンチャンネル活性を自律的にフィードバック制御している可能性を強く示唆する実験データを得た [12]。

おわりに

熱揺らぎが大きく影響する微視的空間において高効率かつ高出力という 2 つの優れた性能を持つべん毛モーターの構造とその作動原理は、ナノテクノロジー産業の発展において大いに役立つことが期待されてきたが、べん毛モーターを手本とした人工機械は未だ作り出されていない。ごく最近になって、MotAB 複合体のプロトンチャンネルドメインや細胞質ドメインの立体構造が明らかにされたが [13]、どのように MotAB 固定子複合体が FliG との相互作用を介して自律的に自身のプロトンチャンネル活性や回転子の周りに配置される固定子の数を制御するのかが不明である。今後は、べん毛モーターの自律的なフィードバック制御回路の設計原理を原子レベルで理解することで、ナノバイオテクノロジー産業の礎を作りたい。

参考文献

- [1] Nakamura S, Minamino T. Flagella-driven motility of bacteria. *Biomolecules* 9: 279 (2019).
- [2] Minamino T, Imada K, Namba K. Molecular motors of the bacterial flagella. *Curr Opin Struct Biol* 18: 693–701 (2008).
- [3] Minamino T, Terahara N, Kojima S, Namba K. Autonomous control mechanism of stator assembly in the bacterial flagellar motor in response to changes in the environment. *Mol Microbiol* 109: 723–734 (2018).
- [4] Leake MC, Chandler JH, Wadhams GH, Bai F, Berry RM, Armitage JP. Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. *Nature* 443: 355–358 (2006).
- [5] Lele PP, Hosu BG, Berg HC. (2013) Dynamics of mechanosensing in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 11839–11844.
- [6] Pourjaberi SNS, Terahara N, Namba K, Minamino T. The role of a cytoplasmic loop of MotA in load-dependent assembly and disassembly dynamics of the MotA/B stator complex in the bacterial flagellar motor. *Mol Microbiol* 106: 646–658 (2017).
- [7] Castillo DJ, Nakamura S, Morimoto YV, Che YS, Kami-ike N, Kudo S, Minamino T, Namba K. The C-terminal periplasmic domain of MotB is responsible for load-dependent control of the number of stators of the bacterial flagellar motor. *Biophysics* 9: 173–181 (2013).
- [8] Nakamura S, Hanaizumi Y, Morimoto YV, Inoue Y, Erhardt M, Minamino T, Namba K. Direct observation of speed fluctuations of flagellar motor rotation at extremely low load close to zero. *Mol Microbiol* 113: 755–765 (2020).
- [9] Morimoto YV, Che YS, Minamino T, Namba K. Proton-conductivity assay of plugged and unplugged MotA/B proton channel by cytoplasmic pHluorin expressed in *Salmonella*. *FEBS lett* 584: 1268–1272 (2010).
- [10] Che YS, Nakamura S, Kojima S, Kami-ike N, Namba K, Minamino T. Suppressor analysis of the MotB(D33E) mutation to probe the bacterial flagellar motor dynamics coupled with proton translocation. *J Bacteriol* 190: 6660–6667 (2008).
- [11] Che YS, Nakamura S, Morimoto YV, Kami-ike N, Namba K, Minamino T. Load-sensitive coupling of proton translocation and torque generation in bacterial flagellar motor rotation. *Mol Microbiol* 91: 175–184 (2014).
- [12] Morimoto YV, Namba K, Minamino T. GFP fusion to the N-terminus of MotB affects the proton channel activity of the bacterial flagellar motor in *Salmonella*. *Biomolecules* 10: 1225 (2020).
- [13] Santiveri M, Roa-Eguiara A, Kühne C, Wadhwa N, Berg HC, Erhardt M, Taylor NMI. Structure and function of stator units of the bacterial flagellar motor. *Cell* 183: 244–257 (2020).

