Osaka University Knowledge Archive

Title	プロトン駆動型細菌べん毛モーターの出力特性の解析
Author(s)	中村, 修一
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49319
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【105】

氏　　名	中　村　修　一（なかむらしゅういち）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学 位 記 番 号	第　２３１００　号
学位授与年月日	平成21年３月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学 位 論 文 名	**プロトン駆動型細菌べん毛モーターの出力特性の解析**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授　難波　啓一 （副査） 教 授　平岡　　泰　　教 授　野地　博行

論 文 内 容 の 要 旨

細菌の運動器官であるべん毛モーターは、細胞膜内外に形成される陽イオンの電気化学的ポテンシャル差を回転力（トルク）に変換する生体超分子ナノマシンである。べん毛モーターは、陽イオンの透過経路でもある固定子と、固定子に対して回転する回転子から成る。これまでの遺伝学的および生化学的機能解析から、陽イオンが固定子の中を通ることによって固定子内の構造変化が起こり、その結果固定子と回転子が相互作用し、トルクが発生すると考えられている。しかしながら、べん毛モーターがどのようにして陽イオンの電気化学エネルギーを回転という力学的仕事に変換するのかは未だ明らかではない。本研究は、べん毛モーターのエネルギー変換機構の仕組みを解明することを目的とし、遺伝学的機能解析が進んでいるサルモネラ菌のプロトン駆動型べん毛モーターの出力特性を解析した。

サルモネラ菌のべん毛は、水素イオンの電気化学ポテンシャル差をエネルギー源に、1秒間に最高約300回転する分子モーターである。そのべん毛モーターの出力特性を正確に計測するためには、その回転をサブミリ秒の時間分解能で解析できるナノ光学計測システムを構築する必要がある。そのために、微小ビーズの位相差像を４分割センサー上に投影することで、ビーズの時々刻々の位置を正確に計測できるナノ光学計測システムを構築した。本システムの空間分解能は約5 nm、時間分解能は約0.08 msecであった。これを用いて、様々な条件下で野生型や変異型のモーターの回転計測を行った。

酢酸塩や安息香酸塩のような膜透過性の弱酸は、プロトンの電気化学的ポテンシャル差をほとんど変化させることなく、細胞内外のpH差を部分的に消失させることができる。このような弱酸の効果を用いてサルモネラ菌の細胞内pHを低下させると、べん毛モーターの回転速度が顕著に低下することが報告されている。本研究では、べん毛モーターの出力特性における細胞内pHの効果を詳細に解析した。ナノ光学計測システムを用い、様々な大きさのビーズで標識したべん毛モーターの回転速度を様々な細胞内pH条件下で計測した。その結果、細胞内pHの低下に伴い、特に低負荷・高速回転条件下においてべん毛モーターの回転速度が顕著に低下することが判明した。一方、細胞外pHのみを変化させた場合では、べん毛モーターの回転速度に変化が見られなかった。低負荷・高速回転条件下ではプロトンの結合解離速度がトルク発生サイクルの律速となるが、高負荷・低速回転条件下では回転速度はプロトンの結合解離速度に依存しないことから、細胞内pHの低下によってプロトンがモーターから解離する反応が阻害され、その結果、低負荷・高速回転条件下ではモーターの回転速度が顕著に低下するものと結論した。

固定子構成タンパク質であるMotAのPro-173は、プロトン結合部位と考えられているMotBのAsp-32に隣接するアミノ酸残基で、種間で非常に高く保存されており、プロトンがAsp-32へ結合するのに伴ってPro-173がMotAの構造変化を引き起こすものと推察されている。本研究では、トルク発生サイクルにおけるPro-173の役割を明らかにするため、このプロリンがアラニンに変異したMotA(P173A)変異株のべん毛モーターの出力特性およびプロトン透過活性を調べた。高負荷条件下では、MotA(P173A)変異型モーターが発生するトルクは野生型のモーターと同程度であった。しかしながら、負荷を減少させると、変異型モーターが発生するトルクは野生型モーターに比べて急激に低下した。さらに、P173A 変異によって固定子複合体のプロトン透過活性が著しく減少することが判明した。以上の結果から、Pro-173はべん毛モーターのプロトン結合解離サイクルを効率よく行うために重要であることが示唆された。

ナトリウム駆動型べん毛モーターでは1回転中に26回のステップ動作の存在が明らかにされ、回転子側モーター蛋白質FliGが作るリングの対称性が26であることと一致していた。そこで、プロトン駆動型べん毛モーターの回転ステップを検出するために、サルモネラ菌べん毛モーターの固定子数を遺伝学的手法により1個程度に減らし、さらに細胞内pHを低下させることによりプロトンの流入量を制限した。その結果、プロトン駆動型べん毛モーターでも約14度の回転ステップが検出された。べん毛モーターがどのように14度のステップ動作をするのかは未だ明らかではないが、少なくとも隣接するFliGの1分子ごとに固定子との相互作用によるトルク発生過程が存在することが、べん毛モーターの基本的なメカニズムであることを示す結果である。

論文審査の結果の要旨

細菌の運動器官であるべん毛は、その根元で細胞膜を貫通するべん毛モーターで駆動される。申請者は、膜を横切る水素イオン流をエネルギー源として回転するこの分子モーターの作動機構の解明を目的として、細胞内プロトン濃度計測系を確立するとともに、光学ナノ計測システムを工夫し、サルモネラ菌のプロトン駆動型べん毛モーターの入出力特性解析を行った。細胞内プロトン濃度の上昇に伴ってモーターの低負荷時の高速回転速度が低下することや、トルク発生反応サイクルの律速段階が細胞内でのプロトン解離過程にあることを明らかにし、また、突然変異型モーターの出力特性を解析することにより、プロトンが効率的に透過するには固定子タンパク質の構造変化が必要であることを示した。さらに、ナトリウム駆動型モーターで報告された１周あたり26ステップの回転動作がプロトン駆動型モーターでも同様に存在することを示した。本研究で得られた結果は、べん毛モーターのエネルギー変換機構を理解する上で重要な情報である。この研究成果の学術的価値を高く評価し、学位の授与に値するものと認める。