

高圧力顕微鏡法による細菌運動観察

西山雅祥*

京都大学 白眉センター / 物質-細胞統合システム拠点, 京都市左京区吉田本町

*E-mail: mnishiyama@icems.kyoto-u.ac.jp

要旨

大腸菌は、細胞外に伸張させたべん毛繊維を束ねて回転させることで、水溶液中を自由に泳ぎ、より生育条件のよい場所へと移動することができる。従来から、細菌の運動機能は圧力の影響を受けやすいことが知られていたが、その詳細なメカニズムは判明していなかった。我々は、高圧力環境下にある物体を高解像度で実時間観察できる高圧力顕微鏡を開発し、大腸菌の遊泳運動が高圧力によりどのように阻害するのか精査した。圧力の増加と共に、大腸菌の遊泳速度は低下していき、80 MPa で全ての菌体の並進運動は停止した。しかしながら、テザードセルの実験系を利用してモーターの回転計測を行ったところ、モーターは回転運動を持続していることが明らかになった。従って、高圧力下で大腸菌の遊泳運動が阻害されるのは、個々のモーターの回転停止ではなく、べん毛繊維の束化阻害が直接的な原因と考えられる。

キーワード：細菌運動、べん毛モーター、高圧力顕微鏡

1. はじめに

大腸菌は、生命科学分野で幅広く利用されている代表的なモデル生物である。高圧力研究においても、常圧力環境で生育する生命体が高圧力環境下でどのような影響を受けるのかを調べる際、大腸菌はモデル生物としてよく利用されてきた。大腸菌に細胞外から負荷した圧力は細胞内に伝わるため、様々な生命活動が影響を受ける。例えば、細胞増殖や分裂反応に関する圧力研究などは好例として挙げられよう[1, 2]。最近では、蛍光タンパク質 YFP の変異株を作成することで、細胞内の圧力を計測できる手法も開発されてきている[3]。これまでから、大腸菌をはじめとする微生物に圧力をかけると運動機能がどのように変化するのか調べられており（1880 年代後半には、高圧下にある海洋小生物の挙動の報告がある[4]）、運動機能は圧力の影響を受けやすい現象の一つとして知られている[5, 6]。筆者らは、高圧力下で大腸菌の遊泳運動がどのように変化するのか精査した[7-9]。

大腸菌の表面には、べん毛と呼ばれるらせん状の繊維がおおよそ 5 本程度生えている[10, 11]。それぞれの繊維の根元にはべん毛モーターと呼ばれる回転器官があり、細胞外から流入するイオン流を利用してべん毛全体を数百ヘルツもの速度で回転させている[12-15]。べん毛繊維が寄り集まり、あたかも 1 本の繊維のように回転すると、推進力のベクトルがそろうため、大腸菌は水のなかを自由に泳げるようになる。自然界では、大腸菌は周囲の環境を感知しながら、よりよい環境へと移動する。そのため、大腸菌は好ましくない環境を感知すると、モーターを反転させて遊泳運動を停止させてしまう。筆者らは、大腸菌の運動特性の圧力依存性を調べるため、モーターの回転方向を切り替える応答制御因子をもたない菌体を用いて実験を行った。

2. 材料と方法

2.1. 大腸菌培養条件と運動観察

正常な運動能があるものの、走化性応答を行わない大腸菌 RP4979 株を用いた[7]。寒天培地上に RP4979 株のシングルコロニーを作成した後、LB 培地 (0.5% Bacto Yeast Extract, 1.0% Bacto tryptone, 0.5% NaCl) を用いて、30°C で振とう培養を行った。分注した培地を液体窒素で急速凍結し、-80°C で保存した。運動アッセイ時には、フローゼンストックを解凍し、TB 培地 (1.0% Bacto tryptone, 0.5% NaCl) を用いて、濁度が OD₆₀₀ ~0.7 程度になるまで 30°C で振とう培養を行った。その後、菌体の溶液をアッセイバッファ (10 mM Tris (pH=7), 0.1 mM EDTA) に置換して、高圧力チャンバーに封入し遊泳運動を観察した。

2.2. べん毛モーターの回転観察

大腸菌 YS1326 株は、べん毛繊維を構成するフラジェリンの遺伝子をゲノムから欠損させた変異株である[7]。この YS1326 株を形質転換させ、疎水性のアミノ酸が外側に露出したべん毛繊維 (*fliC-sticky*) を発現させた。培養後、細い管の中を往復させることで、培養した大腸菌から伸張したべん毛繊維を短くした。次に、菌体をチャンバー内に封入し、観察窓に非特異的に吸着させた[5]。なお、べん毛繊維の抗体を利用すれば、野生型のべん毛繊維を観察窓などに固定することも可能となる[16]。

2.3. 高圧力顕微鏡

筆者らが開発した高圧力顕微鏡は、倒立型顕微鏡に搭載する高圧力チャンバーとセパレーター (図 1A)、および、圧力を加えるハンドポンプから構成されている[7, 8, 17] (図 1B)。

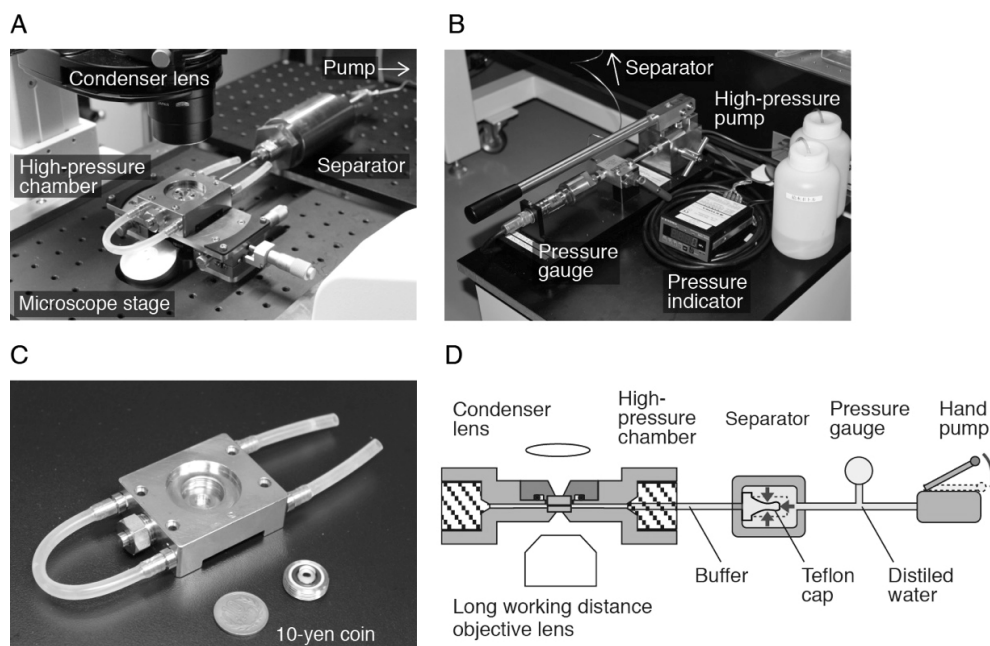


Fig.1. High-pressure microscope. (A) High-pressure chamber and separator. (B) High-pressure pump. (C) Dismounted parts of the high-pressure chamber. (D) Schematic drawing of the experimental setup (not to scale).

実験サンプルを封入する高圧力チャンバーは、加圧時に生じる歪みに対して可塑的に変形できるようにニッケル合金（ハステロイ C276）を用いて製作した（図 1 C）。チャンバーには 2 つの開口部を設け、ガラス製（BK7）の光学基板をエポキシ樹脂で固定した。開口数は、対物レンズ側が NA=0.60、コンデンサー側は NA=0.55 である。この装置を用いれば、高圧力下であっても、細胞観察に適した位相差像の観察を実施できる。

図 1D に装置の概念図を示す。ハンドポンプにより、圧力媒体である蒸留水がポンプから押しだされ、セパレーター内へと流入する。水圧により厚さ 0.2 mm のテフロン製の膜を変形させることで、高圧力チャンバー内を満たす緩衝溶液の圧力へと適切に変換される仕様となっている。ハンドポンプを文字どおり「手動」で 10 秒ほど動かせば、チャンバー内の圧力は、地球上で最も深い場所である太平洋のマリアナ海溝チャレンジャー海淵最深部（10,924 m, 海上保安庁観測船による測定値）の静水压～110 MPa まで到達できる（最大 150 MPa まで加圧可能）。また、高圧力をかけても結像能や倍率にほとんど影響はなく、常圧力とは変わらぬ解像度で多様な顕微観察像（明視野、暗視野、位相差、蛍光像）を取得できた[7]。

2.4. 精製したタンパク質を用いた予備実験

この装置を用いて、高圧力下で生じるタンパク質の構造変化や機能変化を測定できるのか予備実験を行った。微小管は、チューブリン分子が数珠つながりに結合してできている代表的な細胞骨格である。Paclitaxel 存在下では、チューブリンの脱重合反応が抑制され、フィラ

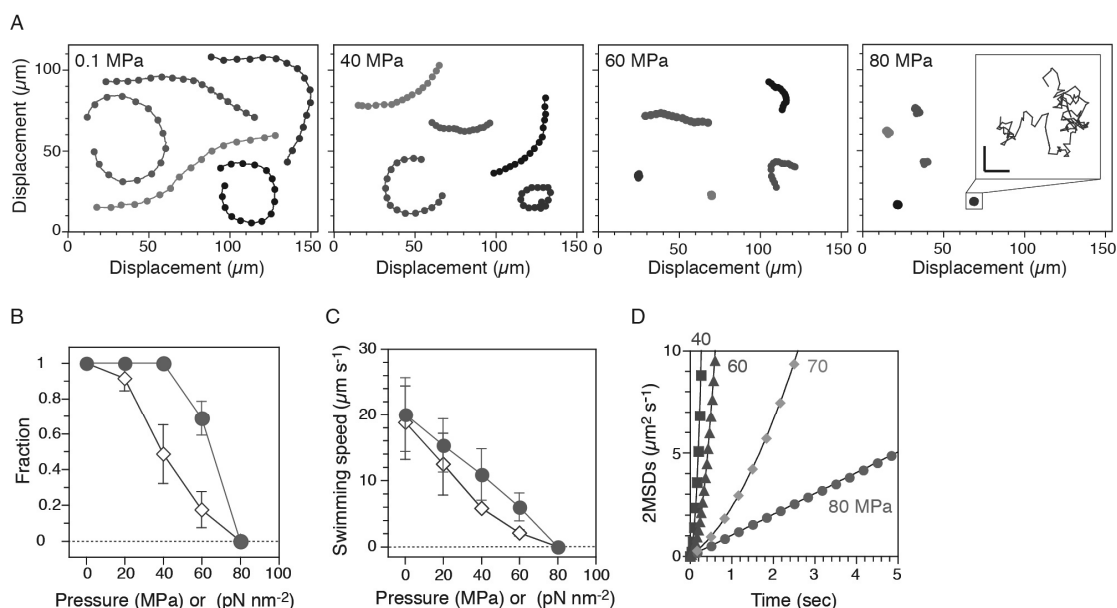


Fig.2. Motility of smooth-swimming cells. (A) Trajectories of RP4979 cells. The positions of the cell were plotted every 10th frame for 5 s. (Inset) Trajectory of a cell at 80 MPa for 5 s on an expanded scale. Scale bar, 2 μm . (B and C) Swimming fraction and speed during the pressurization (solid circles) and depressurization processes (open diamonds). Swimming fractions were based on the number of cells that swam with a speed of $>2 \mu\text{m s}^{-1}$ at each pressure. The speed was the average value of the swimming cells in C. Error bars represent the SD. (D) 2MSDs plotted at every frame for 5 s (40 and 60 MPa) or every 10 frames (70 and 80 MPa) ($n = 46\text{--}59$, total = 202). Data were fitted by $(vt)^2$ and/or $4D_{x-y}t$, where v is the translational speed, D_{x-y} is the diffusion constant, and t is time (40 MPa, $v = 11 \mu\text{m s}^{-1}$; 60 MPa, $v = 5.2 \mu\text{m s}^{-1}$; 70 MPa, $v = 1.0 \mu\text{m s}^{-1}$ and $D_{x-y} = 0.35 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$; 80 MPa, $D_{x-y} = 0.25 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$).

メント構造が長期間にわたって維持される。Paclitaxel で安定化させた微小管を高圧力顕微鏡で観察したところ、微小管の両端からチューブリンが脱重合を行う様子が観察できた[18, 19]。おそらく、高圧力下では、チューブリン分子間の結合部分に水分子が侵入しやすくなり、解離反応が進行すると考えられる。

次に、代表的な生物分子モーターである ATP 合成酵素 F_1 -ATPase を利用して、高圧力下でその回転運動がどのように変化するのか調べた。実験結果から圧力増加と共に回転速度の低下が示され、ATP 結合反応と、それに続く一部の反応過程が圧力の影響により阻害されることが明らかになった[20, 21]。

3. 結果

3.1. 大腸菌遊泳運動の圧力依存性

大腸菌を高圧力チャンバーに封入し、菌体の位相差像を観察した [7, 8]。図 2A に大腸菌の遊泳運動の軌跡を示す。常圧条件 (0.1 MPa) では、菌体は約 $20 \mu\text{m s}^{-1}$ の速度で滑らかに泳いでいたが、圧力の増加とともに、泳ぐ菌体の割合や、その速度がだんだん低下していった (図 2B, C)。圧力が 80 MPa に到達するとすべての菌体は遊泳運動を停止し、ブラウン運動により水溶液中を不規則に動きはじめた。一方向性の運動能が失われたことを確認するため、菌体重心位置の二次元平均二乗変位 (2MSDs) の時間変化を調べたところ、時間の二乗に比例する成分は 70 MPa まで含まれていたものの、80 MPa で完全になくなった (図 2D)。この結果から、80 MPa で全ての菌体は遊泳運動を停止したと判断した。その後、圧力値を下げていくと、菌体は運動能を回復していった。加圧過程と減圧過程では、実験結果にヒステリシスが見られたものの、概して、運動能は可逆的に変化したと言えそうである。

4.4. べん毛モーターの回転運動観察

大腸菌べん毛モーターの回転運動を測定するために、テザードセルの実験を行った [7, 8]。この実験系では、べん毛繊維をカバーガラスなどの光学基板 (今回の実験では高圧力チャンバーの観測窓) に吸着させることで、細胞内にあるモーターが発生する回転運動を細胞本体の回転として手軽に観察できる (図 3A)。このテザードセルの実験系では、菌体がガラス基板上に固定されており移動しないため、実験条件を変えながら、同一のモーターの回転運動を追跡できるメリットがある。我々は、圧力を変えながらテザードセルの回転運動がどのように変化するのかを調べた。常温常圧 (20°C, 0.1 MPa) 下では、菌体は反時計方向に滑らかに回転した (図 3B)。圧力値の増加とともに、回転速度が低下していった。80 MPa では大腸菌が遊泳運動を完全に停止したものの、細胞は依然として反時計方向に回りつづけており、その速度は、加圧前の約 60%であった[7, 16]。

ここで、さらに高い圧力をかけた際の結果について付記しておく[22, 23]。120 MPa まで圧力を上げると、一部の細胞は、これまでとは逆方向、つまり、時計方向に回りはじめた (図 3B, C)。それ以外にも、回転方向を頻繁に変更しながら回転運動を持続する細胞や、回転運動を停止した細胞なども見られた。回転方向の圧力依存性を解析した所、逆向きに回る確率は、圧力の増加と共に増加することが明らかになった。

4. 考察

本研究では、高圧力顕微鏡を用いて、大腸菌の遊泳運動能の圧力依存性について調べた。大腸菌は、圧力の増加と共に運動能は低下し、80 MPa に達すると完全に遊泳運動を停止させた。この遊泳運動停止が見られた圧力は、これまでの報告例よりも高い値であった[5, 6]。

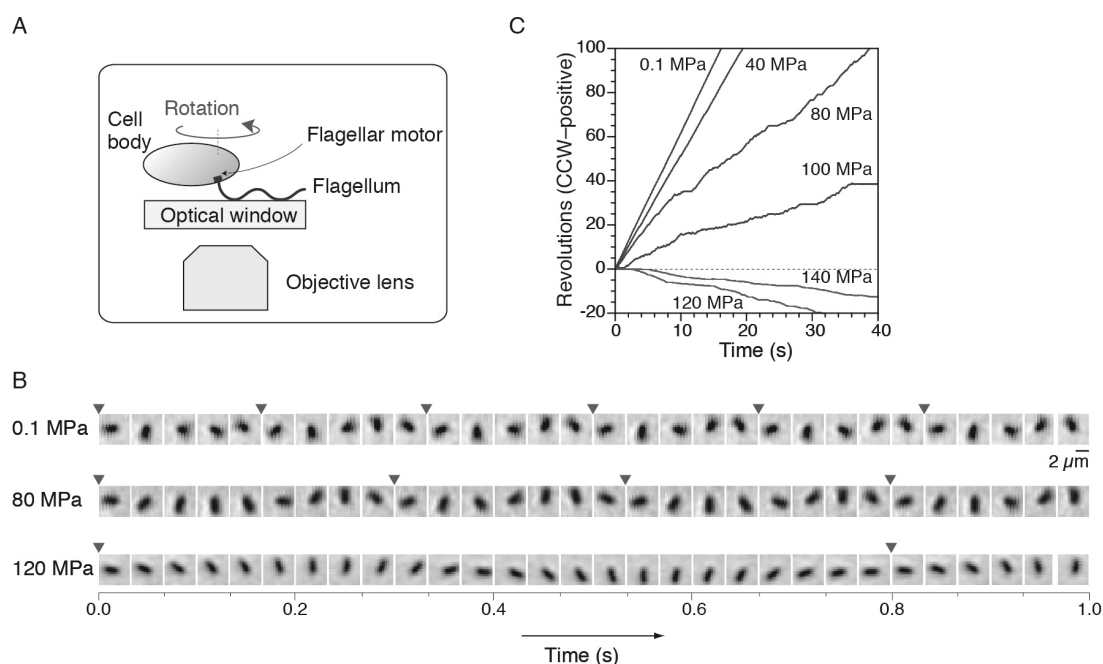


Fig.3. Torque generation of single flagellar motors. (A) Experimental system (not to scale). (B) Sequential phase-contrast images of the same rotating tethered cell were taken at every frame. Arrowheads indicate completion of a turn. (C) Time courses of rotations of the same cell at each pressure condition (CCW positive).

今回の実験では、大腸菌の運動能をよりよくするための培養条件を採用し、かつ、粘性の低い希薄溶液中での運動観察を行ったことから、従来よりも高い圧力環境であっても運動機能を示したと考えられる。

図 2 に示したような遊泳速度の圧力依存性と比べて、モーターが発生するトルクには顕著な圧力依存性は見られず、モーターは 80 MPa であっても常圧時の約 60% の速度で回転していた。また、それ以外の実験からもモーターは遊泳運動能を持続するのに十分なトルクを発生させていたことが明らかになった[7]。つまり、大腸菌が遊泳運動を停止したのは、モーターの停止が原因ではないことになる。それでは一体何がおきているのだろうか？

大腸菌は遊泳運動を行う際に、体外に伸張させたべん毛繊維を束としてまとめ、回転させることで、一方向性の運動を生み出している。おそらく、高圧力下では、この束化の過程が阻害されてしまうため、個々のべん毛繊維が発生する力のベクトルがうまく揃わなくなり、一方向性の推進力が生まれなくなるのだと考えられる。今後、遊泳運動中の大腸菌のべん毛繊維を可視化することで[24, 25]、詳細な阻害機構を解明できるだろう。

謝辞

本稿を執筆するにあたり、常日頃からご支援を頂いている京都大学の原田慶恵教授に深く謝意を表します。ここで紹介させていただいた研究は、法政大学の曾和義幸准教授、同志社大学の木村佳文教授、理化学研究所の奥野大地博士研究員、東京大学の野地博行教授、名古屋大学の本間道夫教授、小嶋誠司准教授、東北大学の石島秋彦教授、京都大学の寺嶋正秀教授との共同研究であり、皆様にお礼申し上げます。また、本研究は、科学技術振興機構さきがけ「生命現象と計測分析」および、科学研究費補助金、島津科学技術振興財団の支援により達成されたものです。

参考文献

- [1] Zobell, C. E. and Cobet, A. B. (1962) Growth, reproduction, and death rates of *Escherichia coli* at increased hydrostatic pressures. J Bacteriol. 84: 1228-1236.
- [2] 加藤千明 (2013) 深海微生物の圧力耐性機構, 進化する食品高圧加工技術, NTS 出版.
- [3] Watanabe, T. M., Imada, K., Yoshizawa, K., Nishiyama, M., Kato, C., Abe, F., Morikawa, T., Kinoshita, M., Fujita, H. and Yanagida T. (2013) Glycine insertion makes yellow fluorescent protein sensitive to hydrostatic pressure. PLOS ONE 8: e73212.
- [4] 谷口・弘 (2003) 6.1 タンパク質と高圧力, 新しい高圧力の科学, 講談社.
- [5] Meganathan, R. and Marquis, R. E. (1973) Loss of bacterial motility under pressure. Nature. 246: 525-527.
- [6] Elo, E. A., Lauro, F. M. and Bartlett, D. H. (2008) The deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 utilizes separate flagellar systems for swimming and swarming under high-pressure conditions. Appl. Environ. Microbiol. 74: 6298-6305.
- [7] Nishiyama, M. and Sowa, Y. (2012) Microscopic analysis of bacterial motility at high pressure. Biophys. J. 102: 1872-1880.
- [8] 西山雅祥, 曾和義幸 (2013) 細胞内の水で生命活動を操る！ -高圧力下で観るタンパク質水と変調イメージング, 化学 68: 31-36.
- [9] Nishiyama, M. High-pressure microscopy for studying molecular motors. In: High Pressure Bioscience - Basic Concept, Applications and Frontiers, Akasaka, K. and Matsuki, H. (eds.), Springer, New York, *in press*.
- [10] 相沢慎一 (1998) バクテリアのべん毛モーター, 共立出版.
- [11] Berg, H. C. (2003) *E. coli* in Motion, Springer.
- [12] 寺内堯史, 小嶋誠司, 本間道夫 (2011) 細菌べん毛モーターエネルギー変換タンパク質の構造と機能, 生化学 83: 822-833.
- [13] 今田勝巳, 南野徹 (2012) べん毛モーターの逆回転のしくみに挑む -熱い論争と 3つのモデル, 化学 67: 37-41.
- [14] 小嶋誠司, 今田勝巳 (2012) ペリプラズム側構造から見たべん毛モーター構築とモーターの活性化機構, 生物物理 52: 18-21.
- [15] 曾和義幸 (2014) バクテリアべん毛モーター, 1 分子生物学, 化学同人
- [16] Nishiyama, M. and Kojima, S. (2012) Bacterial Motility Measured by a Miniature Chamber for High-Pressure Microscopy. Int. J. Mol. Sci. 13: 9225-9239.
- [17] 西山雅祥, 木村佳文 (2013) 高圧力顕微鏡, LTM センター誌 22: 18-27.
- [18] Nishiyama, M., Kimura, Y., Nishiyama, Y. and Terazima M. (2009) Pressure-induced changes in the structure and function of the kinesin-microtubule complex. Biophys. J. 96: 1142-1150.
- [19] 西山雅祥 (2014) 力学刺激でタンパク質間相互作用を操作する, 化学と生物 52: 782-784.
- [20] Okuno, D., Nishiyama, M. and Noji, H. (2013) Single molecule analysis of the rotation of F₁-ATPase under high hydrostatic pressure. Biophys. J. 105: 1635-1642.
- [21] 西山雅祥 (2015) 高圧力顕微鏡の開発と生物ナノマシンの運動観察, 高圧力の科学と技術, 25: 127-136.
- [22] Nishiyama, M., Sowa, Y., Kimura, Y., Homma, M., Ishijima, A. and Terazima, M. (2013) High hydrostatic pressure induces CCW to CW reversals of the *Escherichia coli* flagellar motor. J. Bacteriol. 195: 1809-1814.
- [23] 西山雅祥 (2013) バクテリア・べん毛モーターが高圧力下で逆向きに回り出す！？, 生物物理 53: 264-265.
- [24] Turner, L, Ryu, WS, Berg, HC (2000) Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments. J. Bacteriol. 182: 2793-2801.
- [25] 難波啓一 (2003) 細菌べん毛繊維の超らせん構造スイッチ機構, 生物物理 43: 118-123.

Bacterial Motility Measured by High–Pressure Microscopy.

Masayoshi Nishiyama^{*}

*The HAKUBI Center for Advanced Research / WPI-iCeMS,, Kyoto University,
Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan*

**E-mail: mnishiyama@icems.kyoto-u.ac.jp*

Abstract

Hydrostatic pressure is one of the physical stimuli that characterize the environment of living matter. Many microorganisms thrive under high pressure and may even physically or geochemically require this extreme environmental condition. In contrast, application of pressure is detrimental to most life on Earth; especially to living organisms under ambient pressure conditions. To study the mechanism of how living things adapt to high-pressure conditions, it is necessary to monitor directly the organism of interest under various pressure conditions. Recently, we constructed a high–pressure microscope that enables us to acquire high–resolution microscopic images, regardless of applied pressures. The developed system allowed us to monitor the motility of swimming *Escherichia coli* cells. The fraction and speed of swimming cells decreased with increased pressure. At 80 MPa, all cells stopped swimming and simply diffused in solution. Direct observation of the motility of single flagellar motors revealed that the motors function even at 80 MPa. The discrepancy in the behavior of free swimming cells and individual motors could be due to the applied pressure inhibiting the formation of rotating filament bundles that can propel the cell body in an aqueous environment.

Keywords : Bacterial motility, Flagellar motor, High-Pressure Microscope