

電圧印加によるバクテリアモーターの応答の観察

03-110208 関護和 指導教員 小穴英廣准教授

1. 研究背景と目的

バクテリアの多くは細胞表面に持つらせん状のべん毛を回転させて流体中を移動する。このバクテリアを回転させているのが図1のバクテリアモーターである。

このバクテリアモーター

については、詳しい駆動原理や運動特性がいまだに明らかにされていない。しかし、その回転は細胞膜内外のプロトンポテンシャル差に従って流入するプロトンが駆動力となって起きることがわかっているため、本研究では細胞膜内外のプロトンポテンシャルを電圧印加により変え、それに対するべん毛運動の応答を観察することを目的とする。

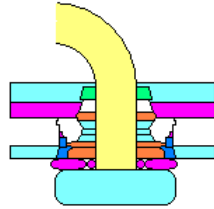


図1 バクテリアモーター

2. 実験方法

2.1 オリフィスシート

これまでの研究として、べん毛を基板に付着させ回転する菌体を観察するテザードセル法がある。しかし、この方法では回転するべん毛そのものの様子を観察したり、細胞膜内のプロトン環境を制御することができなかった。

そこで、オリフィスシート(図2)と呼ばれる、微細な穴の複数空いた薄膜に菌体を固定し、シートに対して片側の細胞膜のみを破壊するという観察方法を用いる。この方法ではべん毛の運動が阻害されない上、オリフィスを挟んだ両側に細胞膜内外それぞれの環境を再現し、個別に電圧をかけることができる(図3)。

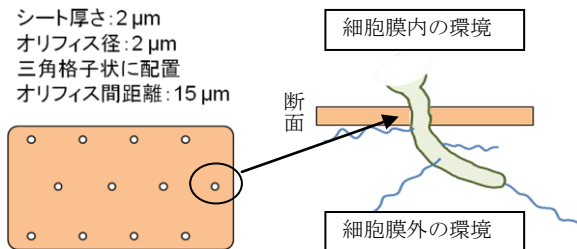


図2(左) オリフィスシートの模式図

図3(右) 固定・細胞膜破壊した菌体

2.2 菌体の伸長化

前項のオリフィスシートの穴は直径2 μm と菌体の直径よりわずかに大きいため、そのままでは菌体がすり抜けてしまう。そこで、cephalexineという菌体の分裂を阻害する抗生物質を投与することで菌体を伸長化させ、図3のように菌体が孔に引っかかりやすくする。

2.3 細胞壁の破壊

サルモネラ菌の細胞壁は、外膜、ペプチドグリカン層、内膜の3層からなり、強靱なペプチドグリカン層によって細胞壁内外の圧力差によって菌体の形が変わらないよう保っている。このペプチドグリカンを酵素リゾチムによって選択的に加水分解したのち、低張液にさらすことで残った外膜と内膜を内側から破裂させ、細胞壁破壊を行う。

2.4 マイクロ流路デバイス

菌体の吸引、電圧印加、観察を行うデバイスとして図4のマイクロ流路デバイスを用いる。

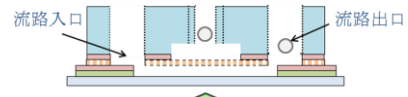


図4 マイクロ流路デバイス

このデバイスでは、オリフィスシート(図の破線部)の上下で別々に溶液を置換できるため、流路に導入した菌体をオリフィスシートに固定した上で細胞膜内外の環境を個別に操作できる。

2.5 べん毛の染色

菌体のべん毛可視化のため、抗体染色法を用いる。べん毛を構成するたんぱく質フラジリンに特異的に結合する抗体を1次抗体とし、それを蛍光で標識した2次抗体(抗原を1次抗体とする抗体)で検出する。しかし抗体は抗原への結合基を2つずつ持つためそのままでは菌体やべん毛同士が抗体を介し凝集してしまう。先行研究ではそれにより回転するべん毛の観察ができなかったため、本研究では抗体のヒンジ部のS-S結合を還元することにより切断し、結合基を一つのみ持つ抗体を作って使用した。

3. 結果

抗体の還元をしたのは1次抗体のみだったが自然状態で回転するべん毛の観察をすることができた(図5)。

また、DNAと結合して蛍光する膜非透過性色素YO-PRO1によって細胞壁破壊が完了したことも確認した(図6)。

膜破壊とべん毛染色完了両方を確認した菌体に対し1~10V程度の電圧印加を、数秒ごとに向きを逆転しながら行ったが、電圧印加に合わせて溶液に流れが生じそれによってべん毛がなびく様子が観察されたものの、べん毛が回転し出したりする様子はみられなかった。

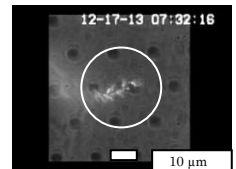


図5 自然状態で回転するべん毛

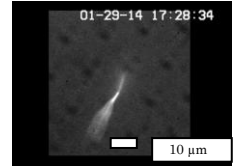


図6 細胞壁破壊した菌体の蛍光

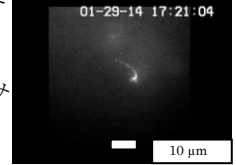


図7 電圧印加によってなびくべん毛

4. 結論

1次抗体の還元によって自然状態で回転するべん毛を観察できた。電圧印加によるべん毛の回転応答は観察が出来なかった。原因としては、2次抗体によるべん毛凝集を除ききれていないことその他、電圧印加時に起きる流れは電気浸透流と思われるため、それに関わるEHD的要素の考慮も今後必要である。

5. 参考文献

- [1] 相沢慎一、転機にきたべん毛研究(2010), Mol Sci (Web), 4:1: A0034
- [2] 長谷川彰洋、マイクロ流路内でのその場蛍光染色法によるバクテリアモーターの運動解析(2012), 東京大学工学系研究科修士論文
- [3] 伊藤 政博, 寺原 直矢, “環境に応じて2種類のエネルギーを使い分ける: ハイブリッド型生物モーターべん毛モーターの固定子から考える細菌の環境適応と進化”, 化学と生物 47(7), 473-479 (2009)
- [4] Fung, D. C., Berg, H. C., “Powering the flagellar motor of Escherichia coli with an external voltage source”, Nature, Vol.375, No.6534, pp.809-812 (1995)