

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05797

研究課題名（和文）細菌個体レベルの情報処理の情報熱力学的な理解

研究課題名（英文）Comprehensive research of signal transduction of cell

研究代表者

石島 秋彦（test, test）

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：80301216

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 83,700,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、バクテリア忌避応答に着目し、適応現象に必要なCheBの細胞極への局在状況を計測した。忌避物質投与後の極の蛍光強度変化とともに、モーターの回転の同時計測を行い、忌避物質濃度依存性、回転と局在との相関、さらには、局在する分子数の推定などを行った。さらに、受容体のCheB結合部位を削除した変異体による応答なども計測を行った。さらに実験ごとのばらつきを排除するために、複数の菌の応答を同時に計測・解析するシステムの開発を行った。その結果、個々の計測に比べて明らかにばらつきが減少した。現在、まだ残っているこのばらつきが大腸菌固有のものなのか、実験条件なのかを検討しているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

忌避応答に対する応答は、誘因応答と呼ばれ、よりよい環境を目指す応答であり、今までの走化性応答のほとんどの研究は誘因応答であった。しかしながら、忌避応答は、単に誘因応答の逆反応ととらえられてきた。しかしながら、生体の生存に必須なのはむしろ忌避応答であり、忌避応答の欠如は、死、に直結する。本研究においては、忌避応答のメカニズムを回転と局在の同時計測による定量的な研究の第一歩となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the bacterial repellent response and measured the localization of CheB to the cell poles, which is necessary for the adaptive phenomenon. We simultaneously measured the change in fluorescence intensity at the poles and the motor rotation after the administration of repellent substances, and estimated the dependence on the concentration of repellent substances, the correlation between the rotation and the localization, and the number of localized molecules. Furthermore, the response of mutants in which the CheB binding site of the receptor was deleted was also measured. In addition, we developed a system to simultaneously measure and analyze the responses of multiple bacteria to eliminate the variation among experiments. As a result, the variability was clearly reduced compared to individual measurements. We are currently investigating whether this remaining variability is unique to *E. coli* or to the experimental conditions.

研究分野：生物物理学

キーワード：走化性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸菌走化性システムは、外界の誘因・忌避物質が細胞極に存在する受容体に結合し、その情報は細胞内を通して各モーターに伝わり、モーターの回転方向が転換される。蛍光イメージングが盛んになり、細胞内の生体分子の局在や運動などが直接観察できるようにはなっているが、単に個々の分子の動態、相互作用を明らかにするだけでは生命現象を理解したことになる。このような考えから、申請者はこれまで科研費等による支援の下、バクテリア 1 細胞上の運動装置である複数のモーターの回転およびモーターに情報を伝達する細胞内の情報伝達分子を同時計測するなどの独自のアプローチにより、情報が受容体から伝搬して細胞内を伝わる様子を計測してきた(Biophys J, 2011, 2014; Sci Signal, 2014)。その結果、走化性刺激受容において、協同性、適応性、自発性の 3 つの特徴が、それぞれ別の分子反応経路ではなく、受容体のメチル化レベルの変動という共通の分子機構で実現されている、という従来説とは全く異なる新しいモデルを提唱している。これは、バクテリアに限らず生物の外界刺激受容に共通する主要な特徴であり、生物の情報処理機構の設計原理の根本に直結する問題である。

2. 研究の目的

本申請はこれを発展させ、統合的にバクテリア細胞内情報伝達機構を明らかにすることを目的とする。特に、1細胞レベルでの走化性動態を、走化性システム活性を保ったまま明らかにする点に重点を置く。バクテリア走化性は、レセプター(Tsr, Tar など) CheA CheY (モーター) CheZ への情報の伝搬と CheR, CheB などによる適応反応が関与している。それぞれのタンパク質の役割はほぼ同定されている。しかしながら、いつ? どこで? 何分子が? どの分子と? どのように? といった定量的な評価は未だ行われていない。申請者は、走化性に関わるすべてのタンパク質の挙動をそれぞれ、1細胞レベルでイメージングすることを試みる。このとき、情報伝達系のアウトプットである 1細胞上の複数のべん毛モーターの回転方向と同時計測を行うことにより情報伝達の入出力関係を解析する。さらに、直接計測することが出来ない細胞内の情報伝達物質の動態、受容体アレイの高い協同性とメチル化などについては、シミュレーションを積極的に活用し、実験結果との比較検討を行う。

3. 研究の方法

バクテリア走化性に関わるすべてのタンパク質を 1細胞レベルでイメージングすることにある。これは、すべての走化性関連タンパク質に単に蛍光色素を融合させることだけではなく、“本来の機能を有した状態での蛍光タンパク質との融合タンパク質の作成”であり、そのために、“可能性のある結合部位、リンカーの種類・長さ、蛍光タンパク質”などを網羅的に調べてきた。受容体の構成タンパク質である、CheA, CheW, CheZ、レセプター本体、情報伝達タンパク質である CheY、適応関連タンパク質である、CheB, CheR、モーター構成タンパク質である、MotAB, FlIMなどをターゲットしている。申請時には CheW, CheZ にほぼ目処が立っていた。現在、CheY, CheB に関しては、GFP との融合タンパク質の作成に成功し、さらなる安定性、蛍光強度の改善などを試みている。さらに、CheZ の局在の違いによる情報伝達の様子を明らかにすることができた (Biomolecules, 2020)

4. 研究成果

1) 誘因応答における CheY, CheZ の相互作用を FRET により計測を行った。セリンなどの誘因刺激により、受容体の活性は低下し、受容体下流の CheA の林間か活性が低下する。その結果 CheZ によるリン酸化された CheY の脱リン酸化活性が低下し、CheY と CheZ の相互作用が低下する。CheY, CheZ にそれぞれ FRET 用の蛍光プローブを付加しているので、FRET 効率は低下する。図 1 にあるように、セリン転嫁後に、FRET 効率は低下する(緑)、その後適応現象により元の状態に戻る。この適応までの時間を回転方

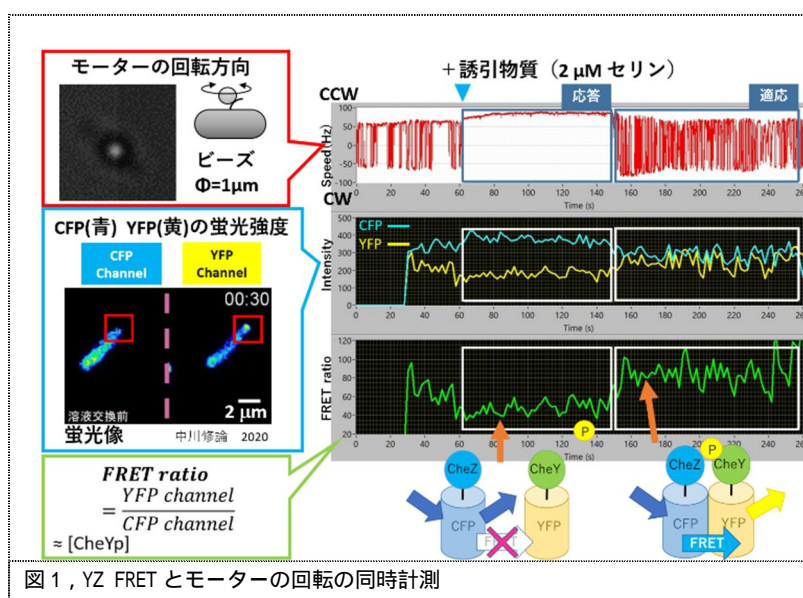


図 1, YZ FRET とモーターの回転の同時計測

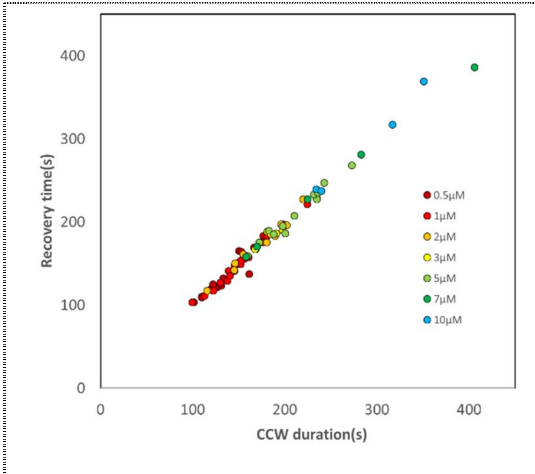


図2 各セリン濃度における CCW duration と Recovery time の関係性．非常に高い精度で 1 対 1 に対応していることがわかる．

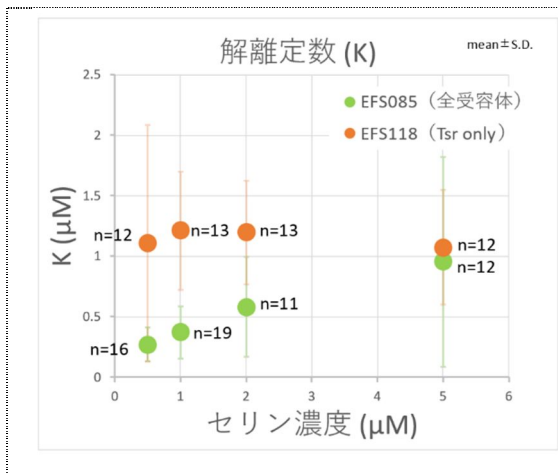


図3 全受容体と Tsr only 株による解離定数の違い．全受容体の方が解離定数が小さい(感度が高い)ことがわかる．

向転換, FRET の変化双方から解析した結果, 回転方向転換, FRET 効率の回復はセリン濃度とともに長くなった. これらの相関をとると図 2 にあるように非常に高い一致を見出した. この結果は, 適応現象が YZ 活性の上昇とともに起き, その結果回転方向が変化することをこの実験系の時間分解能内ではほぼ一致していることを示している. さらに, 受容体を Wild 状態 (数種類の受容体が混在している状態), Tsr のみを発現している状態の変異体で計測を行ったところ, 予想に反して, セリンへの応答は, Tsr のみの発現系に比べて, Wild の条件の方が親和性が上がっていることがわかった (図 3). これは受容体の混在が単に応答物質の多様性を確保しているのではなく, それぞれの応答物質の感度を上げることに寄与していることがわかった. 現在, その詳細について検討中である.

また, CheB-GFP を用いた忌避物質投与時の細胞極への極在変化の様子の計測に成功しており, またこの変化がモーターの回転方向 (走化性システムの適応) と高度にリンクしていることがわかった (図 4). これは当該分野における新たな発見である. さらに, 極に局在する CheB の分子数の定量化を行った. その結果, 約 230 分子の CheB が忌避応答に局在していることがわかった. 極には 1000 単位の受容体が存在し, 細胞内すべての CheB が局在してもおかしくない. 現在その原因を単なる解離定数の問題なのか, 極の協同性によるものなのかを検討中である. また, CheB が極のどの部位と主に結合しているかを確認するために, 受容体の結合部位である, NWETF モチーフを欠落した変異体を作成し, 実験を行った. その結果, 忌避刺激において局在はほぼ同等にみられたがその後の適応現象による蛍光強度の減少は見られず, 極への蛍光を維持していた (図 5). このことは, CheB は受容体ではなく, 主に受容体の下流に位置する CheA と相互作用していることが明らかになった. このことは従来の主張とは異なり, 現在検討中である.

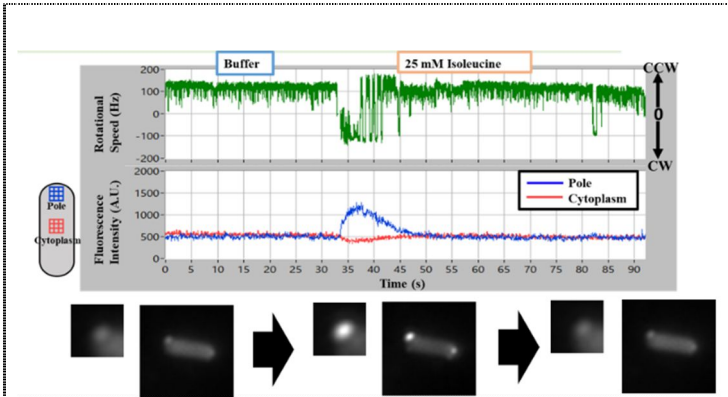


図 4, 忌避応答における CheB-GFP の極局在 (青), 細胞質強度 (赤), さらに, モーターの回転の様子 (緑). 刺激後, 一過的に極の蛍光強度が上がりその後減少することがわかる. 同時に, モーターの回転が CCW から一過的に CW に変化していることもわかる

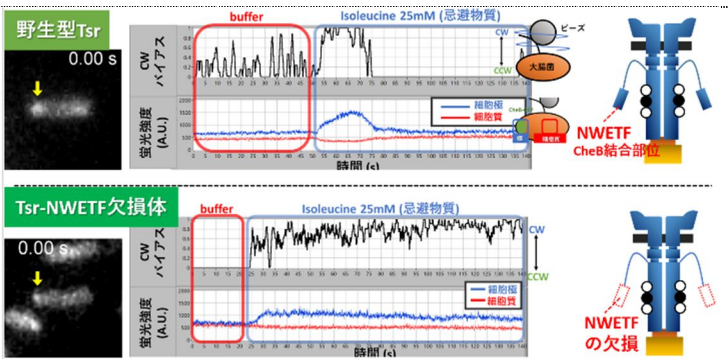


図 5, 全 NWETF モチーフの欠損した変異体の忌避応答. 刺激直後の一過的な蛍光強度の上昇は二つの菌体とも同じだが, その後の適応による局の蛍光強度の減少には差が出る.

このことは従来の主張とは異なり, 現在検討中である.

さらに、忌避物質が受容体のどの部位に結合するのか、受容体の種類と忌避応答との関係を調べるために、受容体 Tsr, Trg のキメラを作成し様々な融合部位による応答の変化を測定した。今回は忌避物質イソロイシンと相互作用を行う Tsr, とイソロイシンと相互作用しない Trg とのキメラを作成した。そもそも Trg は CheB との結合モチーフである NWETF モチーフを持っていないため、Trg に NWETF モチーフを付加したものを用いた。その結果、ペリプラズム領域と細胞質領域との間に存在する、コントロールケーブル周辺を境に応答が変化することがわかった。イソロイシン自身はペリプラズムの部位と相互作用することがわかっているため、このコントロールケーブル領域が 2 種類の受容体で混在している場合には応答がなくなることが明らかになった (図 6)。

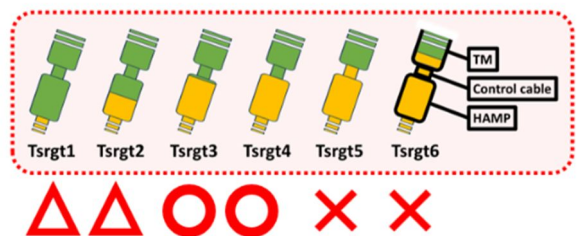


図 6, 全受容体と Tsr only 株による解離定数の違い。全受容体の方が解離定数が小さい (感度が高い) ことがわかる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yumiko Uchida, Tatsuki Hamamoto, Yong-Suk Che, Hiroto Takahashi, John S. Parkinson, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka	4. 巻 204
2. 論文標題 The Chemoreceptor Sensory Adaptation System Produces Coordinated Reversals of the Flagellar Motors on an Escherichia coli Cell	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00278-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jb.00278-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Lin Tsai-Shun, Kojima Seiji, Fukuoka Hajime, Ishijima Akihiko, Homma Michio, Lo Chien-Jung	4. 巻 12
2. 論文標題 Stator Dynamics Depending on Sodium Concentration in Sodium-Driven Bacterial Flagellar Motors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 765739
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.765739	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Che Yong-Suk, Sagawa Takashi, Inoue Yuichi, Takahashi Hiroto, Hamamoto Tatsuki, Ishijima Akihiko, Fukuoka Hajime	4. 巻 10
2. 論文標題 Fluctuations in Intracellular CheY-P Concentration Coordinate Reversals of Flagellar Motors in E. coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1544 ~ 1544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom10111544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計25件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazumi Akahoshi, Yumiko Uchida, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 回転方向に依存した大腸菌べん毛モーターの回転揺らぎの原因
3. 学会等名 日本生物物理学会 第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taiga Deguchi, Yumiko Uchida, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Tatsuki Hamamoto, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 1 細胞内でのCheB 局在変化による忌避応答および適応
3. 学会等名 日本生物物理学会 第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sawako Matsuda, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Masaru Kojima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 CheZ 局在の大腸菌走化性に及ぼす影響のキャピラリーアッセイによる解析
3. 学会等名 日本生物物理学会 第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinnosuke Kawahara, Yumiko Uchida, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 CheB の極性局在を利用した異種走化性受容体の忌避刺激に対する応答性の比較
3. 学会等名 日本生物物理学会 第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yumiko Uchida, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima, Yong-Suk Che
2. 発表標題 大腸菌べん毛モーター間の回転方向転換同調を阻害する走化性受容体クラスター内における野生型/変異体比率の見積もり
3. 学会等名 日本生物物理学会 第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miyuto Miyazaki, Yumiko Uchida, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima, Yong-Suk Che
2. 発表標題 回転する大腸菌べん毛モーター中のGFP-FliL 局在の定量解析
3. 学会等名 日本生物物理学会 第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Takada, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka, Yong-Suk Che
2. 発表標題 FRET 計測系を用いた低濃度セリンに対する単一大腸菌受容体の協同作用による2 種類の適応
3. 学会等名 日本生物物理学会 第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tatsuya Nakaue, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 Observation of behavior of flagella in Escherichia coli by using fluorescence staining
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Biophysics Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yumiko Uchida, Tatsuki Hamamoto, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 Change in methylation level in receptor array causes coordinated reversal of flagellar motors on a single Escherichia coli cell
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Biophysics Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shiori Awa, Yumiko Uchida, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima, Yong-Suk Che
2. 発表標題 Quantification for mutant/WT receptors ratio that collapses receptor cooperativity and switching coordination between flagellar motors
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Biophysics Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taro Yuri, Yumiko Uchida, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 High temporal observation of CheY-binding and dissociation during rotational switching of a single flagellar motor
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Biophysics Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohiro Teshima, Yumiko Uchida, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Hukuoka
2. 発表標題 Simultaneous measurement for the stator-incorporation and the flagellar motor rotation
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Biophysics Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taro Yuri, Takuma Nakagawa, Keisuke Nishitani, Yong-Suk Che, Yumiko Uchida, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 Simultaneous observation of chemotactic response and intracellular behavior of chemotaxis proteins at single E. coli cell.
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the Biophysics Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keisuke Nishitani, Tatsuki Hamamoto, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 Simultaneous measurement of flagellar motor rotation and Dynamics of CheB localization during chemotactic response
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the Biophysics Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takuma Nakagawa, Tatsuya Yamakoshi, Che Yong-Suk, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima
2. 発表標題 Elucidation of mechanism for adaptation system through the simultaneous observation CheYp by single cell FRET and flagellar motor rotation
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the Biophysics Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koki Murai, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 High temporal resolution measurement of rotational fluctuation of flagellar motor depending on rotational direction.
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the Biophysics Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuki Hamamoto, Yumiko Uchida, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 Requirement for Chemotaxis Protein CheR and CheB for the switching coordination between two flagellar motors on E. coli cell.
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the Biophysics Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuya Yamakoshi, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 Simultaneous measurement of flagellar motor rotation and CheYp concentration via single cell FRET
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuma Nakagawa 1, Tatsuya Yamakoshi, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 Developing the detection system of the conformational change in rotating flagellar motor by single motor FRET
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福岡 創
2. 発表標題 1 細胞FRETによるべん毛モーター回転と情報伝達分子濃度の同時計測
3. 学会等名 「情報物理学でひもとく生命の秩序と設計原理」第1回領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川拓真
2. 発表標題 FRETによる回転する単一べん毛モーター構造変化の検出系の開発
3. 学会等名 「情報物理学でひもとく生命の秩序と設計原理」第1回領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西谷 恵輔
2. 発表標題 走化性の適応現象を担うCheBの細胞内動態と適応現象の1細胞同時計測
3. 学会等名 「情報物理学でひもとく生命の秩序と設計原理」第1回領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村井航希
2. 発表標題 高速カメラを用いたべん毛モーター回転の高時間分解能計測
3. 学会等名 「情報物理学でひもとく生命の秩序と設計原理」第1回領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石島秋彦
2. 発表標題 The Chemotactic Response and Motor Function of a Bacterial Flagellar Motor in a Single Cell
3. 学会等名 Sensory Transduction in Microorganisms, Gordon Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福岡 創, 山越 達矢, 西谷 恵輔, 蔡 栄淑, 石島 秋彦
2. 発表標題 大腸菌走化性応答と情報伝達の蛍光イメージング
3. 学会等名 2020年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	福岡 創 (Fukuoka Hajime) (50447190)	大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授 (14401)	
研究 分担者	蔡 栄淑 (Che Yong-Suk) (40378716)	大阪大学・大学院生命機能研究科・助教 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------