

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 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：2011～2015

課題番号：23115004

研究課題名（和文）細胞内情報伝達の少数性生物学

研究課題名（英文）Spying minority in biological phenomena

研究代表者

石島 秋彦（ISHIJIMA, Akihiko）

大阪大学・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） 144,400,000 円

研究成果の概要（和文）：バクテリア内イメージングシステムの構築として、テザードセル法からビーズアッセイ法にシステムを改変することを試みる。そのためには、細胞上部のアキシコンレンズ系による局所励起を導入する。また、局所環境の変化における細胞の応答を追求するために、新しいケージド化合物の開発（誘因・忌避物質）を行う。また、モーター基体へのシグナル分子の結合・解離の同時計測をさらに進め、回転変換中のモーターの構造変化についての詳細を調べる。さらに、レセプターの動きとモーターの回転変換を同時に計測するために、レセプターに蛍光色素を導入し、FRETなどの蛍光イメージングシステムの構築に取り組んでいる。

研究成果の概要（英文）：To construct the imaging system in bacterial cell, we are trying to improve from tethered cell method to bead assay in which illuminated by axicon lens system. And by using caged compounds we are try to the response of cell by the environmental change. And to understand the conformational change of bacterial motor, we observe the simultaneous measurement of association and dissociation of signal molecules to the motor. And by using fluorescent fusion receptor protein, we try to construct the fluorescent imaging system.

研究分野：生物物理学

キーワード：バクテリア 走化性

1. 研究開始当初の背景

細胞内における生体分子の相互作用・生化学反応は、試験管レベルにおけるモル数レベルの大自由度を有する反応とは違い、少数分子が高密度に存在する反応である。その動作原理を理解するためには、細胞内の少数分子の挙動を直接観察し、これに立脚した理論の構築が必要である。従来にもいくつかの計測手法が計画され、実行されていたが、いずれも単一のパラメータのみの計測であり、細胞内生体分子反応の全体像をつかむまでには至っていない。

2. 研究の目的

本計画では、細胞への外部刺激によるサブミリ秒での制御(caged化合物)、細胞表面受容体の構造変化の直接計測(ダイヤモンドナノ粒子)、細胞内情報伝達機構の直接計測(マルチモーターの同時計測、ラマン分光法)を用いた多角的な同時計測システムを構築し、細胞外部からの誘因・忌避物質刺激に対する受容体応答の高ダイナミックレンジ検出機構及び細胞内情報伝達系を統合的に理解することを目的とする。

3. 研究の方法

高速度ビデオカメラによる複数のべん毛モーター回転計測による細胞内情報伝達機構の解明

べん毛モーターの回転制御に関わる情報伝達因子 Che-Y 分子の細胞内挙動を調べると、従来の“情報伝達分子が単純な拡散によって細胞内を伝わり、各モーターに到達し、回転を制御する”という描像では説明が難しく、極めて精緻な Che-Y のリン酸化状態の制御とべん毛モーターとの超協同的カップリング・脱カップリングが必要である可能性が予想されている。そこで本研究では、誘因・忌避物質の caged 化により局所的に外部摂動を与える技術、細胞内における Che-Y のリン酸化状態の動的分布を可視化する技術を開発し、複数のべん毛モーターの回転や細胞運動と共に高い時空間分解能で同時計測することで、細胞内情報伝達とモータータンパク質のカップリング機構および時空間階層を超えた情報制御機構を解明する。

新規分子観察法の開発とシグナル伝達におけるダイナミックレンジ調節機構解明

細胞内シグナル伝達は、リガンド濃度に対し幅広いダイナミックレンジを有する。その原理として、リガンドへの親和性が異なる複数の受容体の「状態」が存在し、その占有率が調節されることにより幅広い分子数に対処している可能性がある。本テーマでは、無退色、無プリンキング、背景光フリーな蛍光観察が可能なダイヤモンドナノ粒子を蛍光タグとする、新規 1 分子観察法(原田ら特願 2010-021619)やラマン分光を使って、受容体ダイナミックレンジの本質を解明する。朽

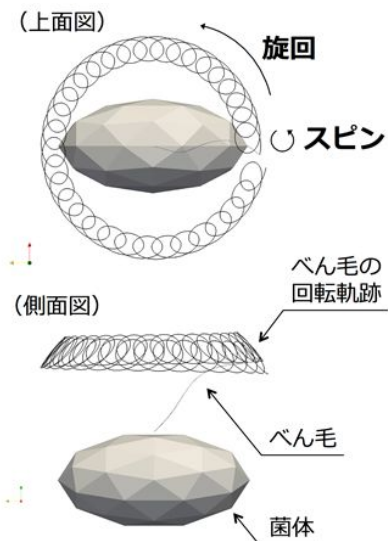
尾の有する Toll-like Receptor シグナル伝達系を用いて、手法の評価をしつつ開発を進める。

4. 研究成果

コマのような新しいべん毛運動の発見、およびその解明

細菌のべん毛(細菌の表面から生えている細長い繊維)が「スピン+旋回運動」というコマのような回転挙動をしていることを実験により見出しました。また独自の理論により、その回転メカニズムは、べん毛が作り出す流れで説明できることを明らかにしました。

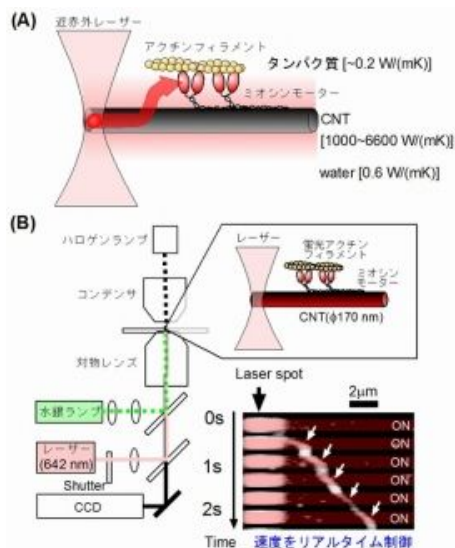
本研究の成果は、細菌のべん毛運動の裏に潜む物理法則をあぶり出すものであり、べん毛モーターの理解と制御に向けた重要な一歩となることが期待されます。(Scientific Reports, 5, 18488 (2015))



カーボンナノチューブで生体分子活性を制御することに成功

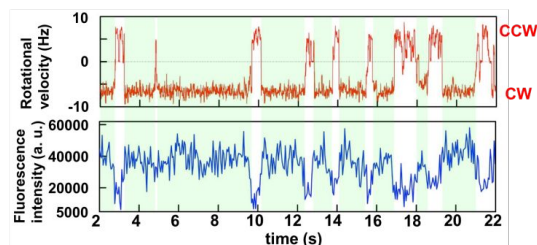
カーボンナノチューブ 1 本上で生体分子モーターの運動活性を観察し、レーザー照射によって運動速度を制御する新技術を開発した。カーボンナノチューブは、炭素原子からなる筒状の物質であり、導電性や弾性など優れた特性を持っている。その中でも熱伝導性は特出しており、金や銅より高い熱伝導率が報告されている。今回の研究では、ウサギ骨格筋から精製したミオシンをカーボンナノチューブ上に失活しないように吸着させ、カーボンナノチューブ自体もガラス上に固定した。そして、ATP と蛍光ラベルしたアクチンフィラメントを与えると、ミオシンラベルしたカーボンナノチューブに沿ってアクチンフィラメントが滑り運動するのが蛍光観察された。さらに、滑り運動中に、カーボンナノチューブの片端だけを、レーザー照射によって加熱した

ところ、アクチンフィラメントがカーボンナノチューブに沿って滑り運動する速度が、レーザー照射時だけ高速化することが分かった。 今後は、より細く微小なカーボンナノチューブなどを用いて、細胞内の狙った分子1個だけの生きた活性を自由自在に操ることができるようになると期待されている。(ACSnano, 9, 3677-3684, 2015)



細菌走化性を制御する細胞内シグナル伝達構成要素の直接的イメージング

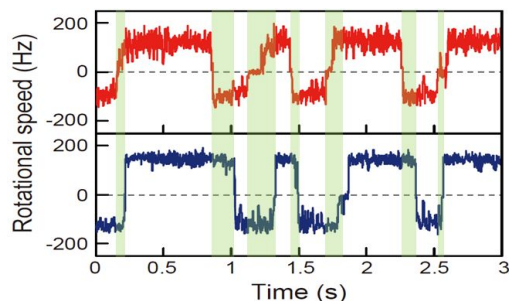
緑色蛍光タンパク質によるCheYの蛍光イメージング(CheY-GFP)と、モーターの回転方向転換(明視野観察)を同時に計測しました。その結果、モーターの回転方向転換がCheY-Pの結合・解離によって直接制御されることを実証することができました。CheY-P分子は必ずしもモーター基部体のすべての結合部位(34箇所)に結合する必要はなく、 13 ± 7 個の結合で時計回りの回転を誘導すること、回転方向転換時にCheY-P分子は ~ 100 ms以内にモーターと結合・解離すること、時計回転型のモーターの方がCheY-Pに対する親和性が高いことなどが分かってきました。(Science Signaling, 319, ra32, 2014)



細胞内情報伝達の新しい計測方法の開発

細胞内情報伝達を明らかにするために我々は、複数のモーターの回転を同時に計測す

ることにより、細胞内の情報伝達を明らかにしようと試みました。その結果、複数のモーター間には回転転換に相関がある、その相関には時間遅れがあり、極に近い方のモーターが早く転換する、その時間遅れは、サブ秒オーダーで、モーター間の距離が長くなると長くなる、ことがわかりました。この結果は、細胞内情報伝達は極から波のように伝わる、極の受容体はあたかも1分子のように非常に強い協同性を有することを意味します。さらに、拡散で情報伝達するためには、脱リン酸化を行うCheZの局在、機能が非常に重要であることを強く示唆することができました。この結果は、原核細胞のみならず、真核細胞にも非常に重要な知見を与えるものです。今後、さらなる計測手法の開発を行い、より詳細を明らかにする予定です。(Biophysical Journal, 100, 2193-2200.2011)



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

Yuichi Inoue, Akihiko Ishijima, Local heating of molecular motors using single carbon nanotubes, *Biophysical Reviews*, 1-8 (2016), 査読有

Yuji Shimogonya, Yoichiro Sawano, Hiromichi Wakebe, Yuichi Inoue, Akihiko Ishijima & Takuji Ishikawa, Torque-induced precession of bacterial flagella, *Scientific Reports*, 5, 18488 (2015), 査読有

Yuichi Inoue, Mitsunori Nagata, Hiroshi Matsutaka, Takeru Okada, Masaaki K. Sato, and Akihiko Ishijima, Single Carbon Nanotube-Based Reversible Regulation of Biological Motor Activity, *ACSnano*, 9, 3677-3684 (2015), 査読有

[学会発表](計 30 件)

Yong-SukChe, Hiroto Takahasi, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka, Importance of receptor cooperativity on the switching coordination of flagellar motors on a single Escherichia coli cell, 日本生物物理学会例会, 2016年11月27日, つくば国際会議場(茨城県つくば市)

Hajime fukuoka, Hiroto Takahasi, Akihiko Ishijima, 走化性タンパク質の細胞動態と細胞応答の同時計測, 日本生物物理学会例会, 2016年11月26日, つくば国際会議場(茨城県つくば市)

〔図書〕(計 4 件)

石島秋彦, 福岡創, 蔡榮淑(永井健治, 富樫祐一), 少数性生物学, 第16章 178(139-152), 2017, 日本評論社

井上裕一, 石島秋彦(原田 慶恵, 石渡信一 編), 1分子生物学, 18章, 292(228-237), 2014, 化学同人

福岡創, 石島秋彦(野地 博行 編), 1分子ナノバイオ計測 -分子から生命システムを探る革新的技術-, 222(41-49), 2014, 化学同人

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石島 秋彦 (ISHIJIMA, Akihiko)
大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
研究者番号: 80301216

(2) 研究分担者

朽尾 豪人 (TOCHIO, Hidehito)
京都大学・理学研究科・准教授
研究者番号: 70336593