

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20370056

研究課題名（和文） キメラ菌体によるバクテリアべん毛モーターのエネルギー変換・情報伝達機構の解明

研究課題名（英文） Energy and information transduction of bacteria flagellar motor of chimeric cell

研究代表者

石島 秋彦（ISHIJIMA AKIHIKO）

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：80301216

研究成果の概要（和文）：大腸菌は外部からの受容体への刺激をべん毛モーターの回転を時計・反時計回りの転換を制御する内部の情報伝達に変換する機能を持つ。今回我々は、高速度ビデオカメラを用いてべん毛モーターの回転を取得し、同一セルの異なる二つのモーターの回転変換が、細胞内情報伝達物質、リン酸化 CheY(CheY-P)によって制御されていることを見いだした。転換は非常に高い協同性を持ち、さらにはサブ秒の時間遅れを伴っていた。この時間遅れは、極の受容体からの位置に関連していた。この高い協同性は CheY の突然変異系である *caCheY* の発現により抑制された。さらに、この協同的な変換は脱リン酸化酵素である CheZ を必要とすることも明らかになった。今回の結果は、受容体からの一過的なシグナル濃度の上昇、減少が必要となる。このことはまるで濃度の変化が波のように伝わることを意味する。

研究成果の概要（英文）：An *Escherichia coli* cell transduces extracellular stimuli sensed by chemoreceptors to the state of an intracellular signal molecule, which regulates switching of the rotational direction of the flagellar motors from counterclockwise (CCW) to clockwise (CW). Here, we performed high-speed imaging of flagellar motor rotation and showed that the switching of two different motors on a cell is controlled coordinately by an intracellular signal protein, phosphorylated CheY (CheY-P). The switching is highly coordinated, with a sub-second delay between motors that is correlated with the distance of each motor from the chemoreceptor patch, which is localized at the cell pole. The coordinated switching was disordered by the expression of constitutively active CheY protein, which mimics the CW-rotation stimulating function. Also, the coordinated switching was required the CheZ, which is a phosphatase for CheY-P. Our results suggest that a transient increase and decrease in the concentration of a signal protein from the chemoreceptor patch, which is probably a wave-like change in under a second, triggers and regulates the coordinated switching of flagellar motors. We firstly measured the propagation of intracellular signaling in a single bacterial cell by applying the simultaneous measurement for the rotation of multiple flagellar motors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	16,000,000	4,800,000	20,800,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：バクテリア、回転計測、モータータンパク、温度、トルク

1. 研究開始当初の背景

バクテリアべん毛モーターは、直径が40nmのナノモーターであり、菌体内外のイオン濃度差、膜電位差によるイオン駆動力により回転する。大腸菌においては、5本程度のモーターを有し、この回転方向の頻度を変えることにより、より好ましい方向に進む。走化性シグナルは、細胞極に存在するレセプターに結合し、その情報は細胞内に伝わり、各モーターに伝わった情報により、モーターの回転方向が転換される。このバクテリア走化性応答に関わるタンパク質、その局在などに関しては、様々な研究が進んでいるが、いまだに、各タンパク質はそれぞれ何分子必要なのか?数のゆらぎはどう制御されているのか?必須なのか?時間的制御はどのように行われているのか?などといった具体的な知見は未だ理解できていない。一般的には生体分子が拡散によって細胞内を伝搬される、と記述されるが、これはあまりにも抽象された記述に過ぎない。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きたが、さらにはリン酸化・非リン酸化を区別したイメージング手法はまだ限られており、一般的ではない。さらには、どのようにして、イオンの流れを回転力に変換しているのか?回転方向転換はどのようなメカニズムで起こっているのか?というモーター自体のメカニズムもまだ未知の部分が多い。

2. 研究の目的

本申請においては、

バクテリア細胞内の情報の流れを、複数のべん毛モーターの相関から明らかにする

ケージド化合物を用いた時間・空間的・時間的局所励起による摂動の2つの新しい計測技術を用いることにより、

各モーター間の応答の時間差と相関の様子

走化性シグナルによる各モーターの応答、相関の変化

ケージド化合物を用いた局所的環境変化と細胞の応答の相関をマルチモーター解析、ケージド化合物による摂動を用いて計測し、外部刺激→レセプター→細胞内情報伝達物質→モーター→回転方向の変換、の一連の流れを定量的に評価し、その機構を明らかにする。

(1) 各モーター間の応答の時間差と相関の様子、に関しては、先行研究により、複数のべん毛モーターの回転方向転換に関しては明らかな相関があることが明らかになっている。また、その相関にはサブ秒の時間遅れがあり、このことから、レセプターからの情報が拡散現象などを使って細胞内を伝搬し、各モーターに情報が伝わり、モーターの回転方向が転換される、という現象を強く示唆している。しかし、一般的な拡散ではこれらの現象を説明できず、さらに踏み込んだメカニズムを考えなくてはならない。

(2) 走化性シグナルによる各モーターの応答、相関の変化、に関しても先行研究により、走化性シグナル存在下においてもモーター間の相関は見られ、このモーター間の相関が細胞内情報伝達物質によるものであることが強く示唆されている。また、適応現象(ある濃度の走化性物質にさらされるとその応答がリセットされる)についても、100秒程度の時間遅れで適応現象が起こり、モーター間の相関においても興味深い知見が得られている。

(3) ケージド化合物を用いた局所的環境変化と細胞の応答の相関、に関しては、1980年代の報告があるだけで、その後の追従実験はない。現在、ケージドセリンによる研究を行っているが、水銀ランプ、レーザー照射によるべん毛モーターの応答が見られている。本申請においては、独自にケージド化合物を合成することにより、誘引物質、忌避物質、様々な化合物を作り出すことが可能である。

3. 研究の方法

(1) マルチモーター計測・解析システムの構築

マルチモーターの回転計測においては、従来4分割フォトダイオードではなく、高速度・高感度カメラを用いる。モーターの回転計測にはモーターからのべん毛フィラメントに微小ビーズを固定し、位相差像を高速度で取得する。各ビーズの重心位置をナノメートル、サブミリ秒の分解能で取得し、角速度、回転方向を取得する。複数のべん毛モーターの回転を同時に計測することにより、回転速度、回転方向転換の各モーター間の相関を解析し、細胞内部の情報伝達の様子を明らかにする。また、高速度カメラによる画像情報の、PCへの変換、転送、画像解析はそのデータ量から膨大な時間がかかる。そのため、既存の解析ソフトでは対応出来ないため、LabViewを用いて、すべて自作する。

(2) 新規ケージド化合物の構築

ケージド化合物には、安定性、波長特異性、定量性、細胞・生体分子への安全性などのさまざまな要件が必要となる。すでに我々は

(Nitroveratroyl)oxy 基を有するセリンのケージド化合物を合成し、実際の実験において、ケージドセリンを水銀ランプ、半導体レーザーを用いて安定してバクテリアに適用できることを確認している。しかしながら、励起光量とセリンの生成量との対応、照射による細胞のダメージなど、まだ未確認事項がある。本年度においては、まず、すでに合成したケージドセリンの定量的評価、細胞・生体分子への安全性について検討する。さらに、アスパラギンなどの新規ケージド化合物の合成、アンケージされた分子を不活性化する新手法の検討を始める。

(3) バクテリア内イメージングシステムの構築

べん毛モーターなどの外部出力による細胞内情報伝達のモニターは本申請においての大きな特徴となるが、さらに蛍光イメージングによる細胞内分子の局在、相互作用を同時にモニターすることは細胞内情報伝達を明らかにする上で、非常に重要なテーマとなる。すでに我々は細胞内情報伝達分子の一つである、CheW, の GFP 誘導体の発現による、レセプターの局在の同定に成功している。本年度においては、さらに細胞情報伝達に関与するタンパク質、特に、脱リン酸化酵素である CheZ の局在との関係を明らかにするために、ミュータントの作成、GFP の融合を進める。さらには、CheZ と CheY, CheY とモーター基部位に存在し、CheY と相互作用すると言われている Fli-N との相互作用を確認するために、FRET を用いた観察系を立ち上げる。そのためにも各タンパク質の蛍光 GFP の標識を行う

(4) 局所環境の変化における細胞の応答

バクテリアは局所的な環境変化に対応して応答し、よりよい環境へ向かう。今までは、環境変化への応答を調べるためには、溶液交換、という手法しかなく、時間・空間分解能は限られていた。しかしながら、ケージド化合物を用いることにより、局所的に (0.2 マイクロメートル)、短時間に (ミリ秒以下) で外部環境を操作できるようになった。本年度においては、レーザーによる局所励起システムの構築を目指す。具体的には、紫外、近紫外レーザーの導入、光学系の確立を目指す。また、紫外領域の光は細胞などにダメージを与えてしまう。そこで、細胞へのダメージの影響 (モーターの回転速度を目安に) を距離、強度を変化させ、確認する。また、細胞へのダメージを与えぬよう、照射時のみにマスクを適用するなどの新しい手法も検討する。

4. 研究成果

単一菌体における複数のべん毛モーターの回転を同時に計測し、解析したところ、明らかにモーター間において回転方向のタイミングには相関が見られた。さらにその相関においては、100 ミリ秒オーダーの時間遅れが存在した。この時間遅れとモーターとレセプターとの関係を明らかにするために、レセプター構成タンパクの一つに GFP を融合させ (北大、永井教授との共同研究)、モーターの回転と蛍光を同時に観察したところ、モーター間の距離が長くなるほど、相関の遅れは大きくなり、さらに、レセプターに近いモーターが先に方向転換することを見いだした。このことは、レセプターからの情報が各モーターに拡散などの何らかの情報伝達機構により、各モーターに伝達されていることを意味する。また、それぞれの回転方向転換 (CW→CCW, CCW→CW) において、レセプターに近いモーターの回転方向転換が早いことから、細胞内においては、単純な拡散現象ではなく、波のような状態で情報伝達物質が伝搬することを明らかにした。

さらに、外界からの刺激に対する応答を明らかにするために、時間、空間的に局所的に刺激を与える目的で、caged 化合物 (東北大、金原教授との共同研究) を用いた走化性応答を検討した。菌体にとっての誘引物質であるセリンの caged 化合物を、レーザーにより短時間で照射、励起したところ、細胞におけるモーターの回転は方向転換を停止し、20 秒ほど後に、復帰することを見いだした。

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 9 件)

1. Shun Terasawa, Hajime Fukuoka, Yuichi Inoue, Takashi Sagawa, Hiroto Takahashi and Akihiko Ishijima, Coordinated Reversal of Flagellar Motors on a Single Escherichia coli Cell, Biophysical Journal, 4, 2193-2200.(2011) 査読有
2. Matthew A. B. Baker, Yuichi Inoue, Kuniaki Takeda, Akihiko Ishijima and Richard M. Berry, Two methods of temperature control for single-molecule measurements. European Biophysics Journal, 5, 651-660. (2011) 査読有
3. Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka, and Yuichi Inoue. Verification of Single-Molecule Imaging and

Single-Molecule Measurements.
Journal of Robotics and
Mechatronics, 5, 568-578.(2010)査
読無

4. Kou Okuro, Kazushi Kinbara,
Kuniaki Takeda, Yuichi Inoue,
Akihiko Ishijima, Takuzo Aida.
Adhesion Effects of a Guanidinium
Ion Appended Dendritic “Molecular
Glue” on the ATP-Driven Sliding
Motion of Actomyosin.
Angewandte Chemie, International
Edition,49(17),3030-3033.(2010.4)
査読有
5. Hajime Fukuoka, Yuichi Inoue,
Shun Terasawa, Hiroto Takahashi,
Akihiko Ishijima.
Exchange of rotor components in
functioning bacterial flagellar
motor.
Biochemical and Biophysical
Research
Communications,394(1),130-135.(2
010.3) 査読有
6. So-ichiro Nishiyama, Shinji Ohno,
Noriko Ohta, Yuichi Inoue, Hajime
Fukuoka, Akihiko Ishijima, Ikuro
Kawagishi.
Thermosensing Function of the
Escherichia coli Redox Sensor Aer.
Journal of
Bacteriology,192(6),1740-1743.(201
0.3) 査読有
7. Fukuoka H, Wada T, Kojima S,
Ishijima A, Homma,
Sodium-dependent dynamic
assembly of membrane complexes in
sodium-driven flagellar motors. M.
Mol Microbiol. 71, 825-35. (2009) 査
読有
8. Inoue, Y., Lo, C. J., Fukuoka, H.,
Takahashi, H., Sowa, Y., Pilizota, T.,
Wadhams, G. H., Homma, M., Berry,
R. M. & Ishijima, A. 1 0 . 1 0
Torque-speed relationships of
Na⁺-driven chimeric flagellar motors
in Escherichia coli. J Mol Biol 376,
1251-9. (2008)査読有

[学会発表] (計 5 1 件)

1. Yuichi Inoue, Hajime Fukuoka, Akihiko
Ishijima.
Torque steps of the bacterial flagellar
motor induced by heating.
BLAST XI meeting (Bacterial
Locomotion and Signal
Transduction),USA,New
Orleans.2011.1.16-2011.1.21
2. 井上裕一, 福岡 創, 石島秋彦
生体分子モーター活性の局所的熱変調
第 36 回日本生体エネルギー研究会・特定
領域研究「革新的ナノバイオ」合同シンポ
ジウム,吹田市,2010.11.18-2010.11.20
3. 福岡 創, 清水孝浩, 井上裕一,高橋泰人,
石島秋彦
偏光による蛍光分子の配向検出のための
顕微鏡構築
第 36 回日本生体エネルギー研究会・特定
領域研究「革新的ナノバイオ」合同シンポ
ジウム,吹田市,2010.11.18
4. Hajime Fukuoka, Shun Terasawa,
Yuichi Inoue, Hiroto Takahashi,
Akihiko Ishijima
Synchronous regulation of multiple
flagellar motors on a single Escherichia
coli cell
第 48 回日本生物物理学会年会,仙台
市.2010.9.20
5. Yuichi Inoue, Hajime Fukuoka, Akihiko
Ishijima.
Analysis of torque steps of the bacterial
flagellar motor induced by heating.
第 48 回日本生物物理学会年会,仙台
市,2010.9.20-2010.9.22
6. Hiroshi Matsutaka, Takeru Okada,
Yuichi Inoue, Hajime Fukuoka,
Shahbaz Khan, Shige H. Yoshimura,
Akihiko Ishijima.
Direct observation of carbon nanotube
in solution by surfactant-terminated
fluorescent labeling.
第 48 回日本生物物理学会年会,仙台
市,2010.9.20
7. Yu Kikushi, Hajime Fukuoka, Yuichi
Inoue, Hiroto Takahashi, Takahiro
Muraoka, Kazushi Kimbara, Akihiko
Ishijima
Measurement of rotational behavior of
flagellar motors in E. coli induced by

- caged serine.
第 48 回日本生物物理学会年会,仙台市,2010.9.20
8. 井上裕一, 福岡創, 石島秋彦
バクテリアべん毛モーターの温度応答解析と局所的熱変調
特定領域研究「膜超分子モーターの革新的ナノサイエンス」第 5 回班会議, 東京都,2010.6.24-2010.6.25
9. T. Okada, Y. Inoue, H. Orikasa, T. Kyotani, A. Ishijima
Diffusional motion analysis of water-dispersible and uniform carbon nanotubes in solution for drug delivery application.
3rd Carbon Nanotube Biology, Medicine and Toxicology Satellite Symposium 11th International Conference on the Science and Application of Nanotubes (NT10),Canada,Montreal,2010.6.27
10. T. Okada, Y. Inoue, H. Orikasa, T. Kyotani, A. Ishijima
Diffusional motion analysis of water-dispersible and uniform carbon nanotubes in solution for drug delivery application.
11th International Conference on the Science and Application of Nanotubes,Canada,Montreal,2010.6.27
11. Masaaki Sato, Masaya Toda, Takahito Ono, Akihiko Ishijima
Measurement of heat produced by a single brown adipocyte using bimetal cantilever
第 62 回日本細胞生物学会大会, 大阪市, 2010.5.19
12. 石島秋彦
単一バクテリアにおける複数のべん毛モーターの走化性応答と相関
第 83 回日本細菌学会総会, 横浜市. 2010.3.27.
13. Shun Terasawa, Hajime Fukuoka, Hiroto Takahashi, Yuichi Inoue, Akihiko Ishijima
Simultaneous measurement of rotational movement of multiple flagella motor in a single cell
第 47 回日本生物物理学会年会,日本,徳島,2009.10.30-2009.11.1
14. Yuichi Inoue, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima
Torque response of bacterial flagellar motor induced by transient heating
生物物理学会 第 47 回年会,徳島市,2009.10.30-2009.11.1
15. Hajime Fukuoka, Yuichi Inoue, Akihiko Ishijima
The chemotactic response and correlation of the multiple flagellar motors in a single bacterial cell
International Symposium "Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins",日本, 京都,2009.9.8-2009.9.10
16. Yuichi Inoue, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima
Torque response of bacterial flagellar motor induced by reversible temperature change
Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins Working in Biomembranes,Kyoto,2009.9.8-2009.9.10
17. Yuichi Inoue, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima
Torque response of bacterial flagellar motor induced by reversible temperature change
International Symposium of post-silicon materials and devices research alliance project,Osaka,2009.9.5-2009.9.6
18. 福岡 創, 石島 秋彦
光学顕微鏡を用いた細菌べん毛モーター1分子の観察および計測
第 82 回日本細菌学会総会, 日本, 名古屋, 2009.3.12-2009.3.14
19. Akihiko Ishijima, Yuichi Inoue, Hajime Fukuoka
Temperature-dependence Of Torque Generation Of The Na⁺-driven Chimeric Flagellar Motor And Visualization Of The Stator Proteins In E.coli (Temperature-dependence Of Torque Generation Of The Na⁺-driven Chimeric Flagellar Motor And

Visualization Of The Stator Proteins In E.coli)
Biophysical Society 53rd Annual Meeting (Biophysical Society 53rd Annual Meeting), U.S.A., Boston, 2009.2.28-2009.3.4

2 0. Akihiko Ishijima

Direct observation of steps in rotation of the bacterial flagellar motor (Direct observation of steps in rotation of the bacterial flagellar motor)

Japan-Mexico Workshop on "Pharmacobiology" and "Nanobiology" (Japan-Mexico Workshop on "Pharmacobiology" and "Nanobiology"), Mexico, Mexico City, 2009.2.25-2009.2.26

2 1. Yuichi Inoue, Kuniaki Takeda, Hajime Fukuoka, Hiroto Takahashi, Akihiko Ishijima

TORQUE RESPONSE OF THE SODIUM-DRIVEN CHIMERIC FLAGELLAR MOTOR IN E.COLI INDUCED BY REVERSIBLE TEMPERATURE CHANGE. BLAST X (Bacterial Locomotion and Signal Transduction X), メキシコ, 2009.1.18-2009.1.23

2 2. Hajime Fukuoka, Shun Terasawa, Yuichi Inoue, Akihiko Ishijima

Visualization of exchange of rotor component in functioning bacterial flagellar motor
BLAST X, Mexico, Cuernavaca, 2009.1.18-2009.1.23

2 3. Akihiko Ishijima

Direct observation of steps in rotation of the bacterial flagellar motor
JSPS-DST Asian Academic Seminar
2008, India, Bangalore, 2008.12.26-2008.12.30

2 4. 石島秋彦

ナノ計測、イメージング技術による、回転モーターの1分子計測 (Single molecule measurement using nano-measurements and imaging technique)

第46回日本生物物理学会年会, 日本, 博多市, 2008.12.3-2008.12.5

2 5. Yuichi Inoue, Hajime Fukuoka,

Akihiko Ishijima

Torque response of the Na⁺-driven chimeric motor induced by reversible temperature change

The Fourth Workshop of the UK-Japan Bionanotechnology Collaboration, 日本, 神戸, 2008.9.17-2008.9.18

[図書] (計1件)

1. 石島秋彦・井上裕一・福岡創、丸善出版、「現代界面コロイド科学の事典」、2010、120-122

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石島 秋彦 (ISHIJIMA AKIHIKO)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：80301216

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：