

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657038

研究課題名（和文） バクテリア，マルチモーター計測による走化性シグナルとモーター回転との連携の解析

研究課題名（英文） Analysis of the relationship between Chemotaxis system and rotational motion of motors of the bacteria by the multi-motor measurements

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）： バクテリアの非常に高度にシステム化された情報伝達機構，各ユニット間の連携機構を，マルチモーターの計測手法を用いて計測を試みた．その結果，モーター間の回転方向の転換のタイミングには相関があり，さらに，そのタイミングには時間遅れが見られた．この時間遅れはモーター間の距離に依存し，極からの情報の流れが波状に細胞内を伝わって伝搬されたことを示唆する．このことは今までに報告されてはならず，新たな発見となる．また，ケージド化合物を用いた外部刺激により，細胞の回転方向の割合（ $CW/(CW+CCW)$ ）が変化した．このことは，ケージド化合物による刺激により，受容体からの情報が細胞内部に発せられたことを示すものである．

研究成果の概要（英文）： The bacteria flagellar motor is a motor of which diameter is only 40nm, and rotate about 1000 rotations per second using flow of ions. E.Coli has about 5 filaments and changes these directions by the information from chemo-receptors. Although, the bacteria has works with highly sophisticated signal transduction, energy conversion, and cooperation system, we have a few information about them. In this research, by fusing nano-measurements system and imaging system, the relationship between each motors, the response of the motors by the chemo-signals, the response of the motor by the external stimuli, the correlation between the local stimulation by the caged-compounds and the response of the cell and the correlation between the regulation of the gene expression an rotational motion of the motor.

Using these techniques, we found that there were correlations of the switching of each motors, and this timing has some delay. This delay was depended on the position of the each motors, that suggested that the information from the cell pole propagated as wave. Using caged-compounds, the rotational directions of the motors, CW-bias were changed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	480,000	3,480,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1分計測，生物物理，ナノバイオ，ナノマシン，分子モーター

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40 nmと非常に小さく、最大毎秒1000回転という非常に高速で回転するモーターであり、菌体外からのイオンの流れで駆動される。大腸菌は5本程度のべん毛フィラメントを有し、走化性センサーからのシグナルにより、モーターの回転方向を変える。この回転方向の頻度を変えることにより、バクテリアは望みの方向に進む。このようにバクテリアは非常に高度にシステム化された情報伝達機構、エネルギー変換機構、各ユニット間の連携機構により機能しているが、これらのメカニズムについては、我々はほとんど理解していない。

2. 研究の目的

研究代表者がこれまでに構築した、ナノ計測システムとイメージングシステムを融合することにより、

- ・各モーター間の連携の様子
- ・走化性シグナルからの情報伝達による回転の応答
- ・外部刺激の変化による回転の応答
- ・ケージド化合物を用いた局所的環境変化と細胞の応答との相関
- ・遺伝情報の制御、発現の様子と回転との相関

をこのマルチモーターの計測手法を用いて計測を試みる。また、モーター構成タンパク質の固定子にGFPを融合させ、モーターへの組み込みの様子を直接観察し、マルチモーター計測システムとを融合することにより、いかにして誘導剤が目的タンパクを発現し、各モーターユニットに組み込まれていくか、という様子を直接計測することが可能となる。

3. 研究の方法

本研究の研究目的である、複数のモーターの回転を同時に計測し、モーター間、さらには走化性システムとの連携を明らかにするために、

マルチモーターの回転計測システムの構築
バクテリア内イメージングシステムの構築
外部環境変化における細胞の応答
局所的環境の変化における細胞の応答
局所的環境の変化における細胞間コミュニケーションの計測
などの各要素研究を行い、これらの要素研究を統合した同時計測システムを構築する。

(1) マルチモーターの回転計測システムの構築

マルチモーターの回転計測においては、従

来の4分割フォトダイオードではなく、高速度カメラを利用する。モーターの回転は、モーターに微小ビーズを固定し、位相差顕微鏡で観察する。これらのビーズの重心位置を各フレームごとに解析し、その各速度から回転速度、回転方向を求める。同時に解析した複数のモーターの回転速度、回転方向の変換のタイミング、などの相関を解析し、細胞内部の情報伝達の様子を明らかにする。なお、これら画像の取得、解析に必要なプログラムについてはLabViewを用いて、すべて自作する。

(2) バクテリア内イメージングシステムの構築

我々は菌体内の蛍光スポットの局在、拡散運動を計測することに成功したが、まだ蛍光強度などの定量的な解析にまでは及んでいない。そこで、菌体内における蛍光強度の定量的な解析手法の構築する。エバネッセント照明の場合、ガラス表面からの距離が蛍光強度に大きく影響する。従って、俵型をしている菌体内部においては、蛍光色素の位置により蛍光強度が変化してしまう。よって、位置情報を元に補正して、蛍光強度の時間変化を定量的に追跡するシステムの開発する。

また、エバネッセント照明ではなく、斜光照明による励起手法により、背景光を低下させたまま、菌体全体の様子を観察することが可能となる。このように、実験の目的に応じて計測手法を可変させ、計測する。

(3) 外部環境変化における細胞の応答

22年度で得たマルチモーター計測システムを利用して、細胞外部の環境変化(誘因・忌避物質、pH、温度)に対する応答をべん毛モーターの応答を計測する。これら外部からの刺激がいかに細胞が感受し、その情報が細胞内部に伝わるかはその出力系であるモーターの回転速度、回転方向の変化から明らかになる。

(4) 局所的環境の変化における細胞の応答

新たに誘因・忌避物質のケージド化合物を作成し、集光したレーザーによる局所環境変化を引き起こし、細胞がその変化を受容する時間遅れ、モーターの回転速度、回転方向の変化として応答する時間遅れを解析することにより、細胞内部での情報変換、伝達過程を定量的に解析可能となる。

(5) 局所的環境の変化における細胞間コミュニケーションの計測

原核生物のような単細胞生物において、どのように細胞間で情報を共有しているかを明らかにするために、一つの細胞に対して刺

激を与えた際の周囲の細胞の応答をマルチモーター計測システムを用いて計測する。一つの細胞に集光した UV 光, もしくは誘因・忌避物質を与え, その細胞がどう反応し, 外部環境にどう影響を与えるかは複数の細胞の複数のモーターの様子を同時に計測すれば明らかになる。

(6) マルチモーター回転計測と菌体内イメージング手法の同時計測

マルチモーター計測システムとイメージングシステムとを統合して, 回転の様子と菌体内部のタンパク質の流れを同時に計測するシステムの構築を目指す。光学的には回転計測用(近赤外)とイメージング用(可視光)の融合は問題ない。しかし, 2つの異なるイメージをいかにして融合して同期をとって記録するかを検討する必要がある。現時点ではそれぞれのカメラに専用のソフトウェアを用いてデータの取得を行っているが, 2つのカメラからのデータを取得するオリジナルのプログラムの開発を目指す。このシステムを用いて, 走化性シグナルがいかにして, バクテリア内で情報伝達を行い, いつ? どのように? どのくらいの? シグナルが各モーターに伝わり, モーターの回転状態が変化するかを計測する。

4. 研究成果

計測の結果, モーター間の回転方向の転換のタイミングには相関があり, さらに, そのタイミングには時間遅れが見られた。この時間遅れはモーター間の距離に依存し, 極からの情報の流れが波状に細胞内を伝わって伝搬されたことを示唆する。このことは今までに報告されてはならず, 新たな発見となる。また, ケージド化合物を用いた外部刺激により, 細胞の回転方向の割合($CW/(CW+CCW)$)が変化した。このことは, ケージド化合物による刺激により, 受容体からの情報が細胞内部に発せられたことを示すものである。

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 6 件)

1. Shun Terasawa, Hajime Fukuoka, Yuichi Inoue, Takashi Sagawa, Hiroto Takahashi and Akihiko Ishijima, (2011). Coordinated Reversal of Flagellar Motors on a Single Escherichia coli Cell, *Biophysical Journal*, 4, 2193-2200, 査読有

2. Matthew A. B. Baker, Yuichi Inoue, Kuniaki Takeda, Akihiko Ishijima and Richard M. Berry, (2011). Two methods of temperature control for

single-molecule measurements. *European Biophysics Journal*, 5, 651-660, 査読有

[学会発表] (計 15 件)

1. Takashi Sagawa, Yu Kikuchi, Hajime Fukuoka, Yuichi Inoue, Hiroto Takahashi, Akihiko Ishijima, Single cellular response time to chemoattractant photoreleased from caged compound triggered by Real-Time Video Nanometry, Gordon Research Conferences (SENSORY TRANSDUCTION IN MICROORGANISMS), USA, Ventura, (2012.1.15-2012.1.20)

2. Hajime Fukuoka, Yuichi Inoue, Hiroto Takahashi Akihiko Ishijima, Role of the polar localization of CheZ for the propagation of intracellular signal in bacterial chemotaxis system, Gordon Research Conferences (SENSORY TRANSDUCTION IN MICROORGANISMS), USA, Ventura, (2012.1.15-2012.1.20)

3. Yuichi Inoue, Matthew A. B. Baker, Hajime Fukuoka, Richard M. Berry, Akihiko Ishijima, Temperature dependences of torque generation and membrane voltage measured for bacterial flagellar motor, The 2012 Gordon Conference on Sensory Transduction in Microorganism, USA, Ventura, (2012.1.15-2012.1.20)

4. 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 84 回日本生化学会年会, 京都, (2011.9.21-2011.9.24)

5. 福岡 創, 井上 裕一, 高橋 泰人, 石島 秋彦, Consideration of the role of CheZ in the intracellular signaling of Escherichia coli cell, 第 49 回日本生物物理学会年会, 姫路, (2011.9.16-2011.9.18)

6. 佐川 貴志, 菊地 由宇, 福岡 創, 井上 裕一, 高橋 泰人, 村岡 貴博, 金原 数, 石島 秋彦, Real-time video nanometry and controlled laser irradiation reveals a cellular response time of E. coli cell for chemoattractant, 第 49 回日本生物物理学会年会, 姫路, (2011.9.16-2011.9.18)

7. 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, (2010.9.20-2010.9.22)

8. 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)

9. Takahiro Shimizu, Hajime Fukuoka, Yuichi Inoue, Hiroto Takahashi, Akihiko Ishijima, Construction of the optical system detecting the orientation of molecule from the polarization of fluorescence., 第48回日本生物物理学会年会,仙台市, (2010.9.20-2010.9.22)

10. Takashi Sagawa, Hajime Fukuoka, Hiroto Takahashi, Yu Kikuchi, Yuichi Inoue, Akihiko Ishijima, Measurement of rotation of multiple flagellar motors on a single cell with chemotactic substrates, 第48回日本生物物理学会年会,仙台市, (2010.9.20-2010.9.22)

11. 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, (2010.9.20-2010.9.22)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.tagen.tohoku.ac.jp/labo/ishijima/Index-J-tate.html>

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 :