

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440073

研究課題名(和文) 環境刺激に対する大腸菌細胞内情報伝達の定量的解析

研究課題名(英文) Quantitative analysis of intracellular signaling for environmental stimuli in a single *E. coli* cell

研究代表者

福岡 創 (FUKUOKA, Hajime)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：50447190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、誘引物質のケージド化合物を用いた局所的シグナル導入系、入力刺激に対する細胞応答の高時間分解能計測系を通じて、細胞極に局在したCheZによる情報伝達分子CheY-Pの脱リン酸化および拡散に依存したCheY-P濃度減少が細胞内のシグナル伝達の本質であること、また刺激の無い定常状態において、CheY-P濃度のダイナミックな増減がべん毛モーターの回転方向を直接的に制御することを明らかにした。またシグナル伝達分子として機能的なCheY-GFPの開発に成功したが、GFPの励起光照射によって細胞が忌避応答してしまうなどの課題も明らかとなった。今後の研究遂行にはこれらの課題の克服が必要である。

研究成果の概要(英文)：This study measured the cellular response for the extracellular stimulus utilizing the controlled photo-cleavage of caged-serine under high speed imaging. By this measurement, it was revealed the intracellular signal would be performed by the propagation of the decrease in the concentration of CheY-P (signal molecule) and this propagation was performed due to the dephosphorylation of CheY-P by polar localized CheZ and diffusion of CheY-P molecules. By the simultaneous measurement of the time difference between two motors on the same cell and comparison it between wild-type and mutant cells, the dynamic change in CheY-P concentration directly regulates the rotational direction of motor in the absence of extracellular stimuli. The functional CheY-GFP fusion as the intracellular signal molecule could be constructed, however, the cell expressing this fusion unexpectedly exhibited repellent response to the excitation light for GFP. This problem should be untied to progress this study.

研究分野：生物学

キーワード：走化性 感覚受容 情報伝達

### 1. 研究開始当初の背景

生物はシグナル伝達系によって「環境変化」を感知し、それに応答する。大腸菌は走化性システムにより、化学物質、温度等の「環境の変化」を感知・判断し、べん毛モーターの回転方向を変え、自身にとって好ましい環境へ遊泳する。走化性システムは大腸菌が自然界で生存するために必須であり、システムに関わるタンパク質の殆どが明らかであるため、「環境の変化に応じて自ら考え動く」という現象を分子レベルで理解できる研究材料である。

しかし従来の走化性シグナル伝達系の研究は、多くの場合、系を構成するタンパク質の同定や、それらの相関図を明らかにすることに重点が置かれてきた(図1)。しかし細胞のシグナル伝達機構を真に理解するためには、シグナル伝達系を構成するタンパク質間の反応、それによって引き起こされる細胞の表現型を、“生きた細胞で”かつ“定量的に”計測する必要があった。

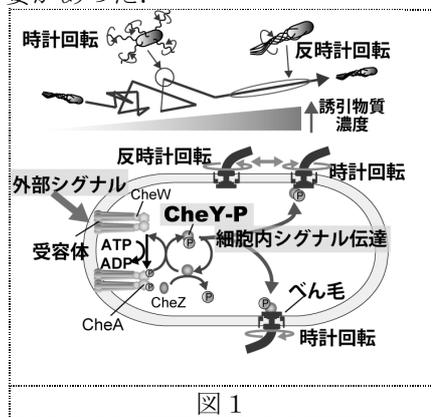


図 1

### 2. 研究の目的

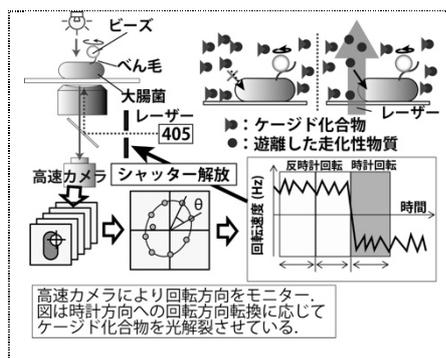
シグナル伝達系の研究は、多くの場合、系を構成するタンパク質の同定や、それらの相関図を明らかにすることに重点が置かれてきた一方で、我々は走化性システムについて、系を構成するタンパク質の細胞内動態を“生きた細胞で”かつ“定量的に”計測することを研究方法として取り入れてきた。

本研究では光学顕微鏡をベースとし、誘引/忌避物質のケージド化合物を用いた局所的シグナル導入系、入力シグナルに対する細胞応答の高時間分解能計測系、細胞内シグナル伝達分子 CheY の蛍光イメージング、を手法として用い、入力刺激に対する細胞応答の時間 (Response Time)、受容体-モーター間距離に対する Response Time の依存性、CheY-GFP の結合・解離とモーター回転方向転換の時間差測、などの定量的計測結果から、入力刺激に対する細胞内情報伝達を、細胞内のタンパク質動態レベルで明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 走化性物質のケージド化合物を用いた局所的シグナル導入系、ケージド化合物を用いた細胞応答の高時間分解能計測法

外部シグナル入力を時間・空間的に制御するため、ケージド化合物の光解裂反応を利用した(図2)。本研究では誘引物質のセリンのケージド化合物を利用した。紫レーザーを局所的に照射し、標的大腸菌の周辺にのみセリンを発生させた。プローブとしてべん毛に付着させた微小ビーズ(直径 0.5 μm)の回転を高速カメラで常時モニターし、モーターの反時計方向(CCW)から時計方向(CW)への回転方向転換に応じて紫レーザー光軸上のシャッターを解放(60 ms 間)し、セリンを発生させた。セリンの入力時間とモーターの回転方向転換の時間差から、セリン応答に要する時間 (Response time) を計測した(図3)。



高速カメラにより回転方向をモニター。図は時計方向への回転方向転換に応じてケージド化合物を光解裂させている。

図 2

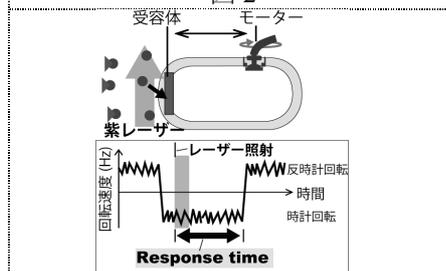


図 3

(2) ケージド化合物を用いた外部シグナル導入と蛍光イメージングのための顕微鏡構築

ケージド化合物を用いた外部シグナル導入と同時に起こる細胞内情報伝達タンパク質 CheY の細胞内動態の変化を同時に捉えるため、図4に示す顕微鏡の開発を試みた。ケージド化合物の光開裂反応のための 405 nm レーザーと、CheY-GFP のイメージングに用いる 488 nm レーザーが同一試料面上に照射されるようにダイクロイックミラーを選定した。また、入力刺激に対する細胞応答をべん毛モーターの回転方向として同時に計測するため、赤色光を用いた明視野像を、微小ビーズ(直径 0.5 μm)を用いたべん毛モーターの回転計測に用いた。また、GFP の緑色蛍光を EMCCD カメラに、明視野像の赤色光を高速カメラにそれぞれ投影させるため、各カメラの前や、ハロゲンランプの前に設置する適切な各種フィルタを選定した。

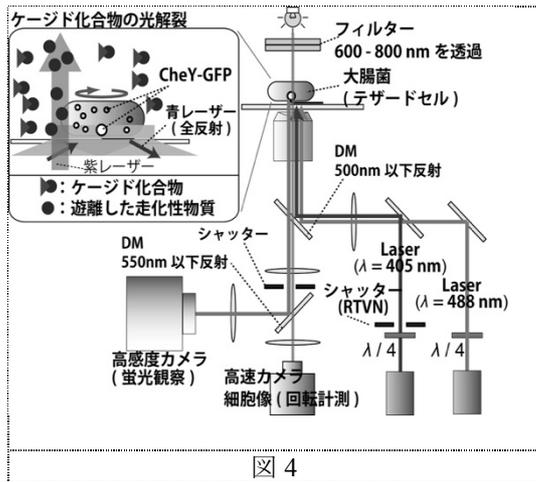


図 4

(3) CheY の蛍光イメージングのための機能的 CheY-GFP の開発.

研究の開始当初は、先行研究によって開発された CheY と GFP の融合タンパク質を用いる計画であったが、本研究での予備実験の結果、機能が不十分であることがわかった。そのため、CheY と GFP をつなぐアミノ酸リンカーの検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ケージドセリンを用いた細胞応答時間 (Response Time) の計測.

構築した計測システム (図 2) を用いて、光開裂させたケージドセリンに対する Response Time 計測を行った。また、細胞内のシグナル伝達タンパク質であるリン酸化 CheY (CheY-P) は細胞極の受容体に局在する CheZ により脱リン酸化される (シグナル消去)。本研究では、CheY-P の細胞内動態を明らかにするため、野生型の大腸菌と、シグナル消去を担う CheZ が極局在しない変異株について (図 1) Response Time を計測し、両者を比較した。

まずレーザー照射によりセリンを放出させた場合と、レーザー照射をしなかった (セリン放出なし) 場合で Response Time を計測したところ、野生株と変異株のどちらにおいても、セリンを放出させた際の Response Time が有意に短かった。この結果から、野生株、変異株のどちらも放出されたセリンに反応しており、かつ Response Time は細胞の反応に要する時間の解析に有用であることがわかった。

次に、野生株と変異株において、受容体-モーター間の距離に対する Response Time の相関関係を調べた。野生株では、Response Time が受容体-モーター間の距離に依存して長くなる傾向が見られた (図 5, 四角)。一方、CheY-P を脱リン酸化する CheZ が極局在しない変異株では、Response Time は受容体-モーター間の距離に依存せずほぼ一定であった (~350 ms) (図 5, 黒丸)。セリンは受容体クラスター内の CheA 活性 (CheY のリン酸化) を抑制するため、結果として CheZ の働きにより細胞内の CheY-P 濃度が減少する。以上の研究結果から、CW から CCW への回転方向転換は細胞

内の CheY-P 濃度の減少により起こり、また CheZ の極局在が CheY-P 濃度減少の伝搬に方向性を生んでいることが分かった。

さらに、野生株での CheY-P 濃度減少の距離依存性、および CheZ 極局在の欠損による CheY-P 濃度減少の距離依存性の消失から、CheY-P 濃度減少の伝播は、細胞極での CheY-P の脱リン酸化と、細胞内における CheY および CheY-P 分子の拡散を基本としていることが分かった。

また野生株では、セリンに対する応答が (受容体に近いべん毛モーターについて)、変異株より 100 ms 程度早かった。大腸菌は CheZ を極に局在させることで、誘引物質に対する感度を高めている可能性が示唆された。

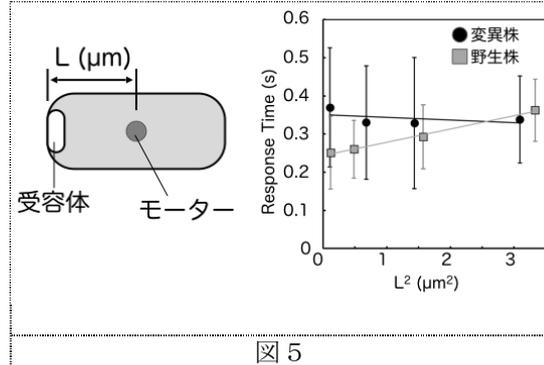


図 5

(2) 同一細胞上の 2 つのべん毛モーター回転方向転換の同時計測.

我々は先行研究にて、刺激のない環境下において、野生株大腸菌について、同一細胞上の 2 つのべん毛モーターの回転を同時計測し、2 つのべん毛モーターの回転方向転換が同調すること、またその回転方向転換のタイミングに時間差 ( $\Delta\tau$ ) があること、さらに、回転方向転換の時間差が、受容体からの距離に依存することを報告した (Terasawa *et al.* 2011 *Biophys. J.*).

本研究では、同様の計測を CheZ が極局在しない変異株で行った。さらに回転方向転換の時間差 ( $\Delta\tau$ ) と受容体-モーター間の距離の関係を、CCW から CW、および CW から CCW のそれぞれの回転方向転換に分けて解析した (図 6)。

解析の結果、野生株では、CCW から CW、および CW から CCW のどちらの回転方向転換についても、2 つのモーターの回転方向転換の時間差が  $M_2^2 - M_1^2$  (受容体と各モーター間の距離の 2 乗の差分) に対して長くなることが分かった (図 7)。これは先行研究 (Terasawa *et al.* 2011 *Biophys. J.*) の結果と一貫している。

次に、CheZ が極局在しない変異株で同様の解析を行った。解析の結果、CCW から CW の回転方向転換については、2 つのモーターの回転方向転換の時間差が  $M_2^2 - M_1^2$  に対して長くなることが分かった (図 8)。一方、CW から CCW の回転方向転換については、2 つのモーターの回転方向転換の時間差が  $M_2^2 - M_1^2$  に依存しないことが分かった。

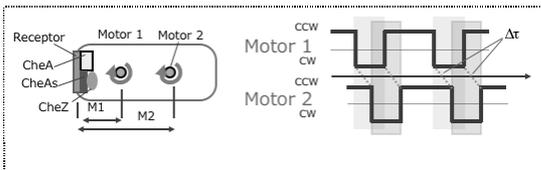


図 6

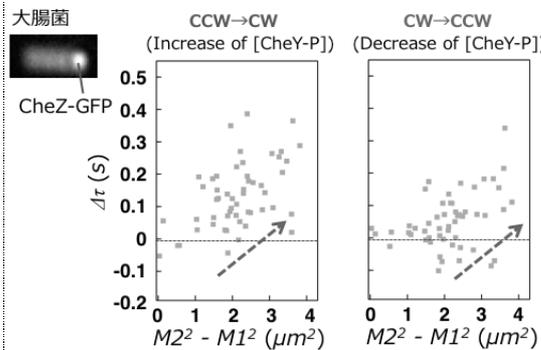


図 7

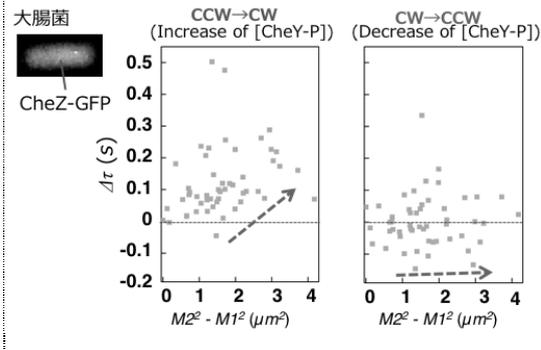


図 8

以上の結果から、CW から CCW の回転方向転換について、野生株で見られた 2 モーター間の回転方向転換時間差の距離依存性が、CheZ 極局在の欠損によって消失したことを意味する。この結果はケージドセリンに対する Response Time の距離依存性と一致している。つまり、刺激のない環境下においても、CW から CCW の回転方向転換は、細胞内の CheY-P 濃度の減少によって起こることが示唆された (図 9)。一方 CCW から CW の回転方向転換については、野生株および変異株のどちらにおいても、2 モーター間の回転方向転換時間差の距離依存性がみられた。この結果は細胞極の受容体 (CheA) によって産生される CheY-P の濃度増加が拡散によって細胞内を伝播することを示唆する。

つまり大腸菌は、刺激のない環境下においても、自発的に細胞内の CheY-P 濃度をダイナミックに増減させており、この CheY-P 濃度の増減が複数のべん毛モーターの回転方向を同調的にかつ直接的に転換させることで、細胞の遊泳方向を制御していると考えられる (図 9)。つまり大腸菌は刺激がない状況でもエネルギーを費やして、常により良い環境を探索することで、生存競争に打ち勝ってきたのかもしれない。以上の内容は学術雑誌に投稿するため準備している。

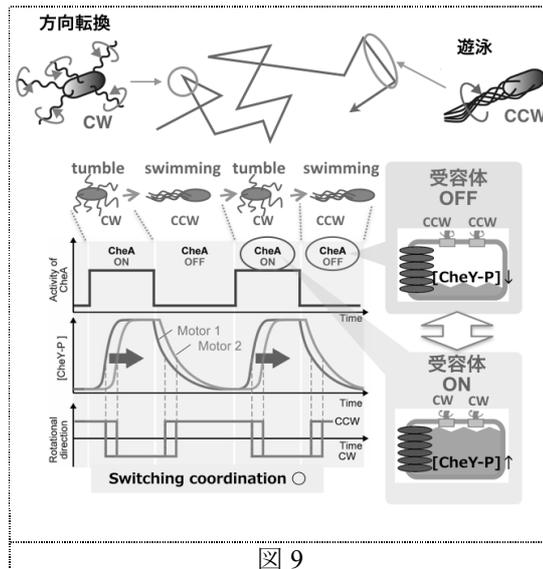


図 9

(3) 細胞内情報伝達の可視化のための機能的 CheY-GFP の開発。

我々は先行研究にて、CheY と GFP の融合タンパク質 (CheY-GFP) の細胞内動態を全反射蛍光顕微鏡で観察することで、CheY-GFP のモーターへの結合・解離がべん毛モーターの回転方向を直接制御することを証明した (Fukuoka *et al.* *Sci. Signal.*2014)。本研究では、先行研究で開発した CheY-GFP を使う予定であったが、この CheY-GFP はべん毛モーターへの結合能、モーターの回転方向を制御する能力は保持していたものの、シグナル伝達分子としての機能が低下していることが、本研究の予備実験で明らかになった。そこで本研究では、CheY と GFP を繋ぐアミノ酸リンカーについて (長さ、アミノ酸の種類) を探索した。数種類のリンカーを検討した結果、シグナル伝達分子としての機能を有した CheY-GFP を開発することができた。

(4) 機能的 CheY-GFP の蛍光イメージングとべん毛モーター回転の同時計測。

本研究は、ケージドセリンの光開裂によるセリン刺激に対する細胞応答を、細胞内情報伝達分子 (CheY-GFP) の細胞内動態変化とモーターの回転方向 (シグナル入力に対する最終出力) を同時に計測することで、細胞外刺激に対する細胞応答を、細胞内のタンパク質動態レベル、かつ 1 細胞で定量的に解析することを目的とした。そこで予備的な実験として、3-(2) で構築した顕微鏡システム、および 4-(3) で開発した機能的 CheY-GFP を用いて、CheY-GFP の極局在とべん毛モーター回転の同時計測を行った。

まず、CheY-GFP を発現させた細胞について、CheY-GFP を励起するためのレーザーを照射しない条件で、同一細胞上の 2 モーターを同時計測したところ、モーター同士の回転方向転換の同調が見られた (図 10)。この結果は新規構築した CheY-GFP が細胞内シグナル伝達分子として機能していることを示している。

そこで、励起光を照射し、CheY-GFP の局在観察と2つのモーター回転の同時計測を行った。その結果、CheY-GFP の局在を細胞の極に観察することができた(図10)(CheYは受容体クラスターの構成要素であるCheA(CheYのリン酸化)およびCheZ(CheYの脱リン酸化)への結合によって細胞極へ局在する)。しかしながら、べん毛モーターの回転は、両方のモーターで、レーザーの照射直後から安定したCW方向の回転が見られた(図10)。この安定したCW回転は、GFPの励起光である青色レーザーの照射が刺激となり大腸菌が忌避応答を起ってしまったと推測される。

本研究では、細胞外刺激の入力の前後で、シグナル伝達タンパク質であるCheY-GFPの動態変化を計測したいと考えていた。しかしながら、CheY-GFPの蛍光観察のためのレーザーそのものが忌避シグナルとして認識されてしまうと、細胞外刺激の入力の前後でのCheY-GFPの動態変化を正確に評価できなくなってしまう。そのため、今後の研究の継続のためには、蛍光観察のためのレーザーが忌避シグナルとして認識されない計測条件の探索が必須である。対策としては、レーザー光の強度を抑制する条件(より高輝度の蛍光タンパク質など)の探索や、レーザー光の波長を変更する(GFPよりも高波長の蛍光タンパク質など)などが考えられる。

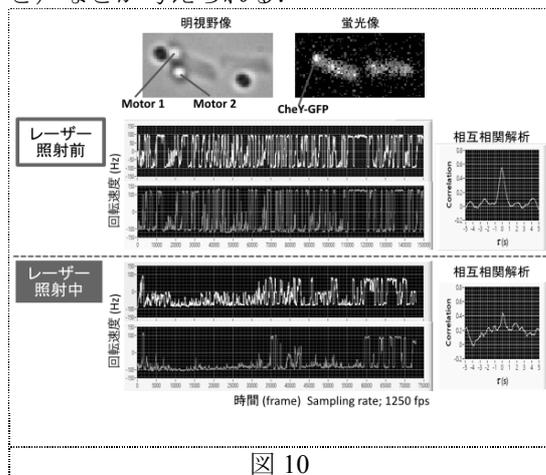


図10

#### (5) 三波長同時計測顕微鏡の開発

本研究の今後の発展を想定し、波長の異なる二種類の蛍光タンパク質と、べん毛モーターの回転を同時に計測する顕微鏡システムの開発を行った。これにより、二種類の走化性関連タンパク質の細胞内動態と、それにより引き起こされる走化性応答(モーターの回転方向転換)を同時に計測できることになる。その結果、二種類のタンパク質の相互作用および動態がどのように走化性応答を引き起こすかを明らかにすることが可能となる。

本研究では、CFP系とYFP系の蛍光タンパク質を同一のEMCCDカメラ上に投影し、赤色光を用いたビーズの明視野像を高速カメラ上に投影するシステムを開発した。その結果、CFPおよびYFPで蛍光標識された二種類の走

化性タンパク質の局在と、モーターの回転を同時に計測することが可能となった(図11)。今後、この顕微鏡システムにケージド化合物の光開裂システムを組み合わせることで、入力刺激に対する細胞応答(モーターの回転方向転換)を二種類の走化性タンパク質の細胞内動態・相互作用として理解することができると期待される。

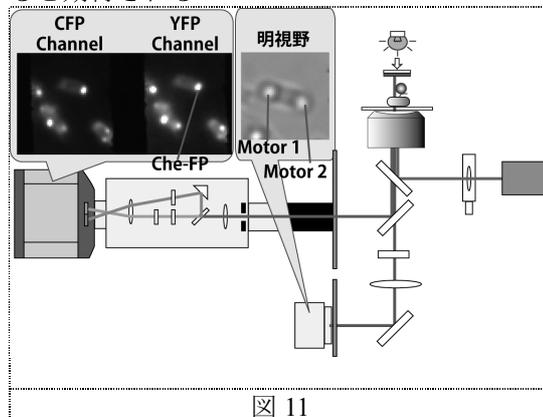


図11

#### 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2件)

- ① Fukuoka, H. (2017) Direct imaging of intracellular signaling molecule responsible for the bacterial chemotaxis. *Methods Mol Biol.* 1593:215-226. doi: 10.1007/978-1-4939-6927-2\_17. 査読あり.
- ② Sagawa, T., Kikuchi, Y., Inoue, Y., Takahashi, H., Muraoka, T., Kinbara, K., Ishijima, A., \*Fukuoka, H., (2014) Single-cell *E. coli* response to an instantaneously applied chemotactic signal". *Biophys. J.*;107, 730-739. doi: 10.1016/j.bpj.2014.06.017. 査読あり.

[学会発表](計15件)

- ① Y.S. Che, A. Ishijima, H. Fukuoka, Relation of Cooperativity in Receptor Cluster and Switching Coordination Between Multiple Flagellar Motors of *E. coli* under Steady-State, Bacterial Flagella, Injectisomes and Type III Secretion Systems, OIST(沖縄県・恩納村), 2017年3月1~4日.
- ② 福岡 創, 蔡 榮淑, 石島 秋彦, 細胞内情報伝達分子による定常状態大腸菌のべん毛モーターの回転方向制御, 生体運動研究合同班会議, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市), 2017年1月6~8日.
- ③ H. Fukuoka, H. Takahashi, A. Ishijima, Simultaneous observation of the intracellular chemotactic proteins and the cellular behavior, 第54回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場(茨城県・つくば市), 2016年11月25~27日.
- ④ Y.S. Che, H. Takahashi, A. Ishijima, H.

- Fukuoka, Importance of receptor cooperativity on the switching coordination of flagellar motors on a single *Escherichia coli* cell, 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場 (茨城県・つくば市), 2016 年 11 月 25 ~ 27 日.
- ⑤ 福岡 創, 石島秋彦, 走化性受容体クラスターの協同性と複数べん毛モーターの回転同調性の関係, 第 12 回 21 世紀大腸菌研究会, 琵琶湖グランドホテル・京近江 (滋賀県・大津市), 2015 年 6 月 5 ~ 6 日.
- ⑥ 蔡 榮淑, 福岡 創, 石島秋彦, 大腸菌走化性シグナル伝達における CheZ 極局在の役割, 琵琶湖グランドホテル・京近江 (滋賀県・大津市), 2015 年 6 月 5 ~ 6 日.
- ⑦ H. Fukuoka, Y.S. Che, T. Horigome, Y. Inoue, H. Takahashi, A. Ishijima, Relationship between cooperativity in receptor array and intracellular signaling under steady-state of *Escherichia coli*, 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢大学角間キャンパス (石川県・金沢市), 2015 年 9 月 13 ~ 15 日.
- ⑧ Y.S. Che, H. Fukuoka, Y. Inoue, H. Takahashi, A. Ishijima, Relationship between polar localization of chemotactic proteins and intracellular signaling under steady-state of *Escherichia coli*, 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢大学角間キャンパス (石川県・金沢市), 2015 年 9 月 13 ~ 15 日.
- ⑨ T. Horigome, H. Fukuoka, H. Takahashi, Y. Inoue, A. Ishijima, The detection of chemoreceptor cluster's activity in a single *E. coli* cell by the functional FRET probe, 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢大学角間キャンパス (石川県・金沢市), 2015 年 9 月 13 ~ 15 日.
- ⑩ 福岡 創, 走化性受容体クラスターの協同性と複数べん毛モーターの回転同調性の関係, 第 20 回べん毛研究交流会, 合歓の郷 (三重県・志摩市), 2015 年 3 月 1 ~ 3 日.
- ⑪ H. Fukuoka, T. Sagawa, Y. Inoue, H. Takahashi, A. Ishijima, Regulation of the rotational switching of bacterial flagellar motor by binding of an intracellular signaling protein CheY, 第 52 回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市), 2014 年 9 月 25 ~ 27 日.
- ⑫ Y.S. Che, H. Fukuoka, Y. Inoue, H. Takahashi, A. Ishijima, Role of the polar localization of CheZ in chemotactic signal transduction of *Escherichia coli*, 第 52 回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市), 2014 年 9 月 25 ~ 27 日.
- ⑬ M.Sato, H. Fukuoka, A. Ishijima, Effect of forced-rotation of *E. coli*'s flagella motor on

the behavior of intracellular CheY, 第 52 回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市), 2014 年 9 月 25 ~ 27 日.

- ⑭ H. Fukuoka, T. Horigome, Y. Inoue, H. Takahashi, A. Ishijima, Trial for detecting the activation and inactivation of chemoreceptor array in a single *E. coli* cell, 第 52 回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市), 2014 年 9 月 25 ~ 27 日.
- ⑮ 福岡 創, 走化性タンパク質 CheZ の細胞極局在と細胞内シグナル伝達の関係, 日本生物物理学会東北支部会 2014, 岩手県公会堂 (岩手県・盛岡市), 2014 年 9 月 5 日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福岡 創 (FUKUOKA, Hajime)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号 : 50447190