

令和元年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04777

研究課題名(和文)細胞内情報伝達機構の包括的研究

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

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本申請は、統合的に細胞内情報伝達機構を明らかにすることを目的として、さまざまな計測手法により、明らかにすることである。その結果、1. 脱リン酸化機能を有するCheZの局在できないミュータントを用いた結果、CW、CCWにおいてモーターと局との距離依存による同期の時間遅れが消失した。このことは、極からの情報伝達が行われていることを示唆している(論文準備中)。2. S/Nの向上を目指しているが、まだ機能を有する融合タンパク質の作成までは至っていない。3. 大腸菌にとって生理的な角速度の強制回転を与えたところ、数個の分子の結合の上昇がみられた。今後は理論的な裏付けを行うことが必要となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の考えでは非常に小さな空間であるバクテリアは空間的な分布を考えずに一様として、化学反応、拡散現象で説明してきた。しかし、我々の研究により空間的な不均一性が発生していることを明らかにした。このことは細胞内の情報伝達を考える上で非常に重要な知見である。我々は国内・国際学会において発表、説明を行い、他の研究者らと議論を進めてきた。今後この空間の不均一性がどのように生理的に有利に働くかを明らかにしたい。

研究成果の概要(英文)：To clarify the understanding of signal transduction of cell, we tried to measure multiple measuring systems. 1. using the mutant of CheZ that could not localize at cell pole, the delay time of switching depending the distance between the motor and cell pole was disappeared. 2. However, we tried to construct the fusion proteins that is function, it was still working state. 3. When the compulsive force was applied to the motor, a few molecules were more attached to the motor. Next stage is needed to consider theoretical proof.

研究分野：生物物理学

キーワード：走化性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

バクテリアは生物学上最下層に位置する生物と考えられ、単なる遺伝子工学上のツールとして扱われている。しかし、そこには、高度なセンシング機能、情報処理能力、情報伝達機能、モーター機能などを有しており、高等生物とほとんど同等の機能を有していると考えられている。従って、バクテリアの機能を理解することは生命現象を理解することと同等である。大腸菌走化性システムは、誘因・忌避物質が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、複数のタンパク質が関与するこの情報伝達システムについての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ているが、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。我々は、この細胞内情報伝達機構を明らかにするために、複数のモーターの回転の同時計測を行うことにより、従来の静的な情報伝達分子の濃度の増減による確率的な結合・解離ではなく、情報が受容体から伝搬して細胞内を伝わる、という従来の考えとは全く異なることを提言した (BJ, 2011)。さらには、モーターへの情報伝達物質、リン酸化 CheY の (CheY-P) の結合・解離とモーター回転方向転換を同時に計測することにより、回転方向と CheY-P の結合数、などを 1 細胞レベルで明らかにすることに成功した (Science Signaling, 2014)。このように、当研究室では走化性システムに関して、従来とは異なる概念を打ち出すことに成功した。これら知見を基盤として、さらなる生命システムの理解に取りかかる準備が整ってきていた。

2. 研究の目的

本申請においては、今まで得られた知見、手法を元に、様々な計測手法、手段

- ・高速度カメラを用いた複数のモーターの回転の同時計測
- ・新規開発ケージド化合物による外部環境の高時間、空間分解能での制御
- ・蛍光タンパクを融合した情報伝達分子の作成、モーターの回転と蛍光観察の同時計測
- ・新しい斜光照明系による局所励起システム
- ・回転電場を用いたモーターへの力学的制御
- ・FRET を用いた受容体システムと細胞質内の情報の流れ、モーターの機能の同時計測

に取り組むことにより、細胞内情報伝達の全容を多角的に解析することを目的とする。

3. 研究の方法

- ・情報はどのように伝搬していくのか

先行研究から一過的にリン酸化活性が急激に上昇し極で短時間の間に CheY のリン酸化が起こることが明らかになった。さらに、CheY-P の脱リン酸化は、極に局在している CheZ の局在、機能が重要であることも示唆された。これら、リン酸化、脱リン酸化酵素の局在、活性化のタイミング、伝搬の様子を明らかにするために、複数のモーターの回転の同時計測システムと各酵素の局在、活性を同時計測することにより明らかにする。また、分担者であるユタ大学の Sandy Parkinson 教授の保有する多数の走化性タンパク質のミュータントを用いた相関解析を行う。

- ・外界からの化学刺激に対する応答は？

ケージドセリンを用いることにより、高時間・空間分解能での外部刺激を制御することに成功した (BJ, 2014)。今後、外部刺激の種類、濃度、暴露時間を制御することにより、細胞に様々な条件での刺激を与え、刺激の時間、履歴などの効果を探る。さらには新規ケージド物質の開発により、様々な小分子への応答を理解することが可能となる。

- ・モーターはどのようにしてシグナル分子を認識し反応するのか？

我々は、13 個の CheY-P の結合・解離がモーターの回転方向転換に必要な数であることを示した (S S, 2014)。このことは、モーター基部体すべての結合部位への結合が必要ではないこと、つまり、高い協同性を有することを直接証明した。CheY の発現量の違いによる回転の転換頻度の違い、上記の Parkinson 教授の所有するさまざまなミュータントを用いた情報の流れを明らかにする。さらに、現在の計測システムでは蛍光観察のために、テザードセル法による回転計測を行っている。さらなる高時間・空間分解能の計測のためにはビーズアッセイによる計測が必要となる。そこで、新しい照明システム、かすり照明を用いてビーズアッセイ法による回転と蛍光観察の同時計測手法の開発を行う。

・受容体構造変化と細胞内情報の流れ、モーター回転転換との相関の理解

先行研究により、細胞質内の情報の流れとモーターの回転転換、外部刺激によるモーターの応答について研究を行ってきた。残された領域は受容体である。共同研究者である Parkinson 教授らの助言により、受容体 Tsr タンパク質の細胞質側の先端部分の構造変化がその下流である CheA などのタンパク質に情報を伝えると考えられている。そこで、Tsr と CheA との相互作用を直接観察するために、FRET 手法を導入し、さらには FRET とモーター回転の同時計測システムを構築し、細胞内情報伝達の統合的理解を勧める。さらには、CheA はダイマー形成しているが、ホモ FRET 計測により CheA 同士の相互作用についても計測を試みる。

・モーター回転は単なるアウトプットか？

今までの理解では、情報の流れは一方通行であり、モーター回転は単なるアウトプットであった。しかし、近年、モーター回転に対して負荷を掛けることによりステータータンパク質の離合集散が報告された。従って、モーターへの負荷そのものがフィードバック機構として情報伝達に関与している可能性が高い。我々は回転電場システムを導入することにより、モーターを強制回転させたときの CheY-P の結合の変化を回転と同時に計測することを試みる。

4. 研究成果

本申請は、統合的に細胞内情報伝達機構を明らかにすることを目的として、

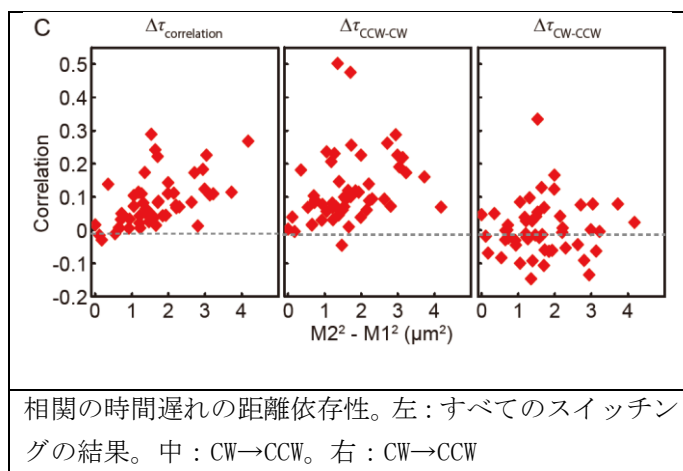
- (1) 複数のモーターの回転の同時計測による情報伝達分子の変化の計測、
- (2) 新規開発ケージド化合物による高時間分解能外部環境変化による細胞の応答、
- (3) モーターへの情報伝達分子の結合・解離と回転との同時計測、
- (4) 外部からの力学応答による情報伝達機構のフィードバック回路の解明、
- (5) 受容体の構造変化とモーター回転との相関計測、などといったさまざまな計測手法により、明らかにすることである。

(1)に関しては、脱リン酸化機能を有する CheZ の局在できないミュータントを用いた結果、CW→CCW においてモーターと局との距離依存による同期の時間遅れが消失した。このことは、極からの情報伝達が行われていることを示唆している (論文準備中)。

(2)に関してはケージド化合物投入の前段階として青色忌避応答の負荷依存性について明らかにすることができた。

(3)に関してはさらなる S/N の向上を目指しているが、まだ機能を有する融合タンパク質の作成までは至っていない。

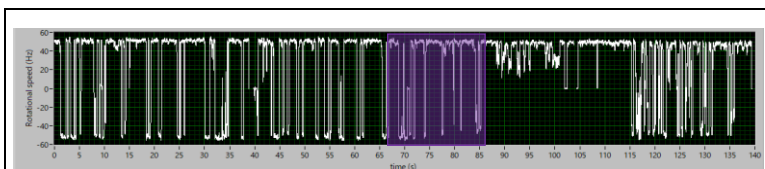
(4)に関しては大腸菌にとって生理的な角速度の強制回転を与えたところ、数個の分子の結合の



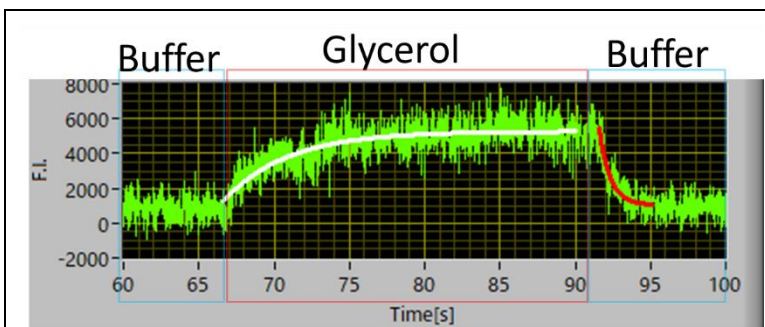
上昇がみられた。

(5)に関しては、適応にかかわる CheB の蛍光融合タンパク質が外部環境の変化により局への局在の様子が変化することを1細胞レベルで明らかにした(論文準備中)。これらの結果のように、1細胞レベルで機能を保ったまま

走化性関連タンパク質の細胞内動態を明らかにすることが可能となってきた。また、蛍光イメージングとモーターの回転速度、回転方向転換も同時に計測できるようになってきた。今後はさらなるS/Nの向上に加えて、理論的な裏付けを行うことが必要となる。



大腸菌の回転速度波形 (1. 0 μm ビーズ、laser output=0. 27 $\mu\text{W}/\mu\text{m}^2$)。横軸は時間、縦軸は回転速度 (CCW を+、CW を-としている)。紫のハッチ部分が紫レーザーを照射したところ。



CheB-GFP の極局在の様子、バッファーから忌避物質であるグリセロールに変えることにより、極の蛍光強度が上昇している。このことは CheB が忌避応答により極局在していることを示している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 福岡創、蔡榮淑、石島秋彦、「細胞内タンパク質動態と細胞応答の1細胞同時計測が明らかにする -大腸菌の情報伝達-」、生産と技術 春号、2018、査読なし
- ② 福岡創、蔡榮淑、石島秋彦、「生命科学と光学顕微鏡一どのようにして照明してきたか」、光アライアンス 11月号、2017、査読なし
- ③ 福岡創、蔡榮淑、石島秋彦、「たかがバクテリア、されどバクテリア」、実験医学 12月号、少数性生物学ってなんだ?、2017、査読なし

[学会発表] (計 14 件)

- ① Single cell measurement for chemotaxis signaling system of E.coli
Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima, Yong-Suk Che (Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.),
2018年度べん毛研究交流会、愛知、2019
- ② Simultaneous measurement of chemoreceptor array's activity and the flagellar motor rotation utilizing single cell FRET
Hajime Fukuoka, Tatsuya Yamakoshi, Sarina Nishimura, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima (Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.)
第56回日本生物物理学会年会、岡山、2018
- ③ Simultaneous measurement of flagellar motor rotation and dynamics of CheY in a single E.coli cell
Tatsuya Yamakoshi, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka (Grad. Sch. Frontier. Osaka Univ.)
第56回日本生物物理学会年会、岡山、2018
- ④ Role of polar localization of chemotaxis protein CheY for the intracellular signaling under non-stimulated conditions in *Escherichia coli*
Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka (Dept. Frontier Biosci., Osaka Univ.)

- 第 5 6 回日本生物物理学会年会、岡山、2018
- ⑤ The role of CheR and CheB in coordinated switching of flagellar motor in *Escherichia coli*
Tatsuki Hamamoto, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka (Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.)
第 5 6 回日本生物物理学会年会、岡山、2018
- ⑥ Quantitative analysis for the ratio of WT and mutant receptors that collapses receptor cooperativity in chemotaxis in *Escherichia coli*
Shin Koguchi, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima, Yong-Suk Che (Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.)
第 5 6 回日本生物物理学会年会、岡山、2018
- ⑦ Difference on chemotaxis response of *E. coli* derived from the dependency of flagellar motor
Akinori Nagataki, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka (Grad. Sch. Front Biosciences, Osaka Univ.)
第 5 6 回日本生物物理学会年会、岡山、2018
- ⑧ Quantitative observation of CheY-GFP binding to a flagellar motor in the presence of external load by electrorotation
Kenta Morishima, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka (Grad. Sch. Front Biosciences, Osaka Univ.)
第 5 6 回日本生物物理学会年会、岡山、2018
- ⑨ Single cell measurement for the chemotaxis proteins and cellular behavior
Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima, Yong-Suk Che (Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.)
2017 年度べん毛研究交流会、滋賀、2018
- ⑩ Novel imaging method for chemotaxis protein using a super-duper chemiluminescent protein, Nano-lantern
Shintaro Aso, Masahiro Nakano, Hajime Fukuoka, Takeharu Nagai, Akihiko Ishijima (Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ., ISIR, Osaka Univ.)
第 5 5 回日本生物物理学会年会、熊本、2017
- ⑪ Minicell tethered assay that enables simultaneous observation of a flagellar motor rotation and the incorporation of stators to the motor
Takao Nakajima, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka (Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.)
第 5 5 回日本生物物理学会年会、熊本、2017
- ⑫ Functional signaling-fluorescent fusion protein for the dynamics of signaling pathway in *E. coli*
Ryota Shiono, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka (Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.)
第 5 5 回日本生物物理学会年会、熊本、2017
- ⑬ Computational simulation of spontaneous transition between active and inactive in whole chemoreceptor array in *E. coli*
Tatsuki Hamamoto, Takashi Sagawa, Shin Koguchi, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima (Sch. Eng. Sci., Osaka Univ, NICT, Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.)
第 5 5 回日本生物物理学会年会、熊本、2017
- ⑭ Development of simultaneous observation system for flagellar components and motor rotation with external load by electrorotation
Kenta Morishima, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka (Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.)
第 5 5 回日本生物物理学会年会、熊本、2017

〔図書〕 (計 1 件)

少数性生物学、日本評論社、2017、永井 健治、富樫 祐一 編 総ページ数 178

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/ishijima/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：福岡 創

ローマ字氏名：FUKUOKA Hajime

研究協力者氏名：蔡 栄淑

ローマ字氏名：CHE Yong-Suk

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。