

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770144

研究課題名(和文) 1分子蛍光偏光イメージング法による生体回転モーターの回転力発生部位の特定

研究課題名(英文) Identification of torque generation part in flagellar motor by using fluorescence polarization

研究代表者

福岡 創 (Hajime, Fukuoka)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：50447190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、GFPで蛍光標識されたべん毛モーターを材料に、GFPの蛍光偏光からモーター回転子の回転を証明することを目指した。蛍光分子の蛍光偏光を捉える顕微鏡システムを開発し、ガラス上に付着したGFP 1分子の向きを検出可能なことを確認した。またGFPの蛍光と細胞の位相差像を同時に捉えることのできる顕微鏡システムを構築し、細胞内のGFP融合タンパク質の細胞内局在と細胞の回転を同時に計測した。その結果、細胞内シグナル伝達タンパク質CheY-GFPがモーターに結合することで、べん毛モーターの回転方向が転換されることを証明した。本成果はSci. Signal. 2014. 7: ra32に掲載された。

研究成果の概要(英文)：The microscopic system to detect the polarization of fluorescent molecules was developed. By using this microscopic system, the polarization of fluorescence from a single GFP molecule was detected, and the direction of a GFP molecule on the surface of coverslip was estimated from the fluorescence intensities of GFP in P-polarization and S-polarization. The microscopic system to simultaneously observe the fluorescence from GFP-fusion proteins and the rotation of flagellar motor was also constructed. By using this microscopic system, it was demonstrated that the rotational switch of a motor was directly regulated by the binding and dissociation of phosphorylated CheY by simultaneously visualizing CheY tagged with GFP and the rotational switching of a motor in live cells. The results of this study was published from Sci. Signal. 2014. 7: ra32.

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：バイオイメージング 分子モーター べん毛モーター

### 1. 研究開始当初の背景

細菌のべん毛モーターは直径 50 nm の微小な回転モーターで、数百分子のタンパク質が重合することで形成される。モーターの駆動力は細胞膜内外に形成されるイオンの濃度勾配で、1,000Hz もの高速で回転することから、生物学的興味のみでなく工学的応用にも魅力的な研究対象である。モーター本体と信じられている構造体(図1)は、複数のリング構造とロッドで構成される回転子とされる構造体と、その周囲に配置された 10 個程のイオンチャネル複合体(MotAB)から成る。モーターはイオン流入のエネルギーを回転運動に変換すると、教科書にも記述されている。しかし現実には、モーターの回転機構が明らかにされていないだけでなく、回転子とされる構造体の回転も未だに証明されていない。

### 2. 研究の目的

これまでの多くの研究から、べん毛モーターを構成するタンパク質、それらの機能、べん毛モーターの回転特性、そして、モーター構成タンパク質の細胞内での動態などは明らかにされてきたが、べん毛モーター回転機構を明らかにするには至っていない。モーターの回転機構が明らかにされない主な原因は、モーター内での真の回転力発生部位が特定されていないことが挙げられる。多くの回転機械では、力を発生する(回転しない)部位と、発生した力を受取る(回転する)部位の間で回転力が発生する。すなわち、べん毛モーターでも両者の間で回転力が発生すると考えられる。しかし、モーター回転子とされている構造体の回転すら直接的に検出されておらず、従って回転する部位と回転しない部位は全く特定されていないことが問題点であった。

本研究ではべん毛モーター構造体の回転を直接的に捉えることのできる計測系を開発し、べん毛モーターの回転機構を理解するための第一歩として、モーターの回転力発生部位の特定を目的として研究を遂行した。そのために、リング構造を構成するモーターの一部を GFP で蛍光標識し、その蛍光を偏光子を通して観察することを採用した。一般的に蛍光分子は双極子モーメントに従って偏光する。モーターのリング構造の一部を蛍光標識できれば、モーターの回転に伴い双極子モーメントの向きが変わることで、GFP 蛍光の偏光方向も変化する。つまり、モーターから発せられた蛍光を偏光子を通して観察することで、モーターの回転を蛍光強度の周期変化として捉えることが可能であると期待された。申請者は新規に構築した計測系を通じて、モーターの回転する部位と回転しない部位を特定し、モーターの回転力発生部位を明らかにすることを研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 一分子蛍光偏光イメージングシステム

#### の開発

蛍光分子の向きを蛍光強度の差として捉えることのできる顕微鏡システムを図のように開発した(図1)。べん毛モーターのリング構造の一部が GFP 標識されたモーターでは、モーターの回転に伴い双極子モーメントの向きが変わることで、GFP 蛍光の偏光方向も変化する。つまり、回転するモーターから発せられた蛍光を偏光子を通して観察することで、モーターの回転を蛍光強度の周期変化として捉えることが期待された。

研究ではモーターの回転に伴うモーターの蛍光強度の周期変化を捉えることを目的としたが、その周期変化がモーターの回転によるかを検証する必要がある。そのため、対物レンズを通して捉えた GFP 蛍光を偏光ビームスプリッターで P 偏光と S 偏光に分離し、それらを高感度カメラ(EM-CCD カメラ)上に並べて投影した(図1)。モーターの回転に伴い、偏光ビームスプリッターに対する GFP 蛍光の偏光方向が変化するので、P, S 偏光像での蛍光強度の周期変化は、図5に示すように互いに排他的となると期待された。

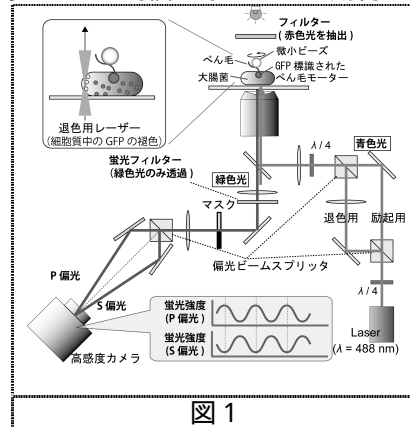


図 1

#### (2) べん毛モーター回転子の蛍光偏光観察

(1)で構築した顕微鏡システムを用いて、GFP で蛍光標識されたべん毛モーターを生きた細胞内で観察した。べん毛モーターの蛍光標識は、モーター構成タンパク質の1つである FliM の GFP 融合タンパク質(FliM-GFP)を用いて行った。

#### (3) モーターの蛍光観察とモーター回転の同時計測

上述のように、捉えられた蛍光強度の周期変化がモーターの回転によるかを検証する必要があるため、モーターの蛍光観察とべん毛繊維に付着させたビーズの回転像を同時に計測可能な顕微鏡システムを構築した(図2)。ビーズ像の取得は高速カメラを用い、観察には GFP の蛍光波長と(500 nm ~ 550 nm)一致しない 600nm 以上の光を用いた。

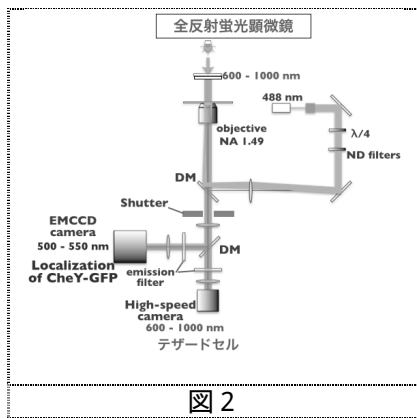


図 2

#### 4. 研究成果

##### (1) 蛍光偏光イメージングシステムを用いた蛍光観察.

構築した蛍光偏光イメージングシステムを用いて蛍光偏光を捉えられるかどうかを評価するため、ローダミンで蛍光標識されたアクチン繊維を観察した(図3). その結果、P 偏光像では画面上で横方向のアクチン繊維の蛍光強度が高かったのに対し、縦方向のアクチン繊維の蛍光強度は低く観察された. 一方 S 偏光像では、P 偏光像と比較して、アクチン繊維の向きと蛍光強度の関係が逆転していた. 以上のことから構築された顕微鏡システムで、蛍光偏光の検出が可能であることが確認された.

次に、本顕微鏡システムで GFP 1 分子の蛍光偏光を捉えられるかどうかを検証した. 大腸菌より精製した GFP をカバーガラス上に付着させ、GFP 1 分子の顕微鏡観察を行った. その結果、GFP に由来する輝点の蛍光強度が P 偏光像と S 偏光像で異なっていた. また顕微鏡上で試料をのせたステージを回転させることで、蛍光観察中に GFP 分子の向きを変え、ステージ回転前後での蛍光強度を計測した. その結果、ステージの回転の前後で、P 偏光像と S 偏光像間の蛍光強度比が反転した(図4). 以上の結果から、構築した顕微鏡システムで、GFP 1 分子の向きを蛍光偏光から推定することが可能であることが分かった.

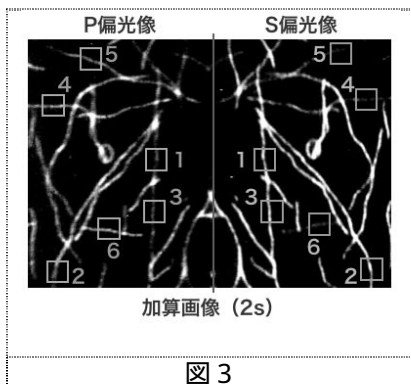


図 3

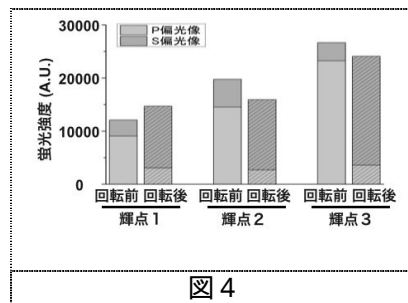


図 4

##### (2) GFP 標識したべん毛モーターの蛍光偏光観察.

上述した蛍光偏光イメージングシステムを用いて、GFP 標識したべん毛モーターの蛍光偏光観察を行った. 本計測ではべん毛モーターの構成タンパク質の1つである FliM を GFP で標識した(図5, 上段). べん毛繊維に付着させたポリスチレンビーズを指標として、その根元に存在するモーター蛍光観察を行った. ビーズの回転中心に FliM-GFP に由来する蛍光スポットが観察された(図5, 中段). FliM-GFP に由来する蛍光スポットの蛍光強度の時間変化を、P 偏光像、S 偏光像のそれぞれについて解析したところ、図5に示すように、P 偏光像と S 偏光像の間で、排他的に蛍光強度が変化する時間帯が見られた. P 偏光像-S 偏光像の間で見られた排他的な蛍光強度がモーターの回転に由来することが期待されたが、本実験では、べん毛モーターの回転を同時に捉えていなかったため、計測された蛍光強度変化がべん毛モーター回転子の回転に由来するかどうかを明らかにするためには、更なる検証が必要である.

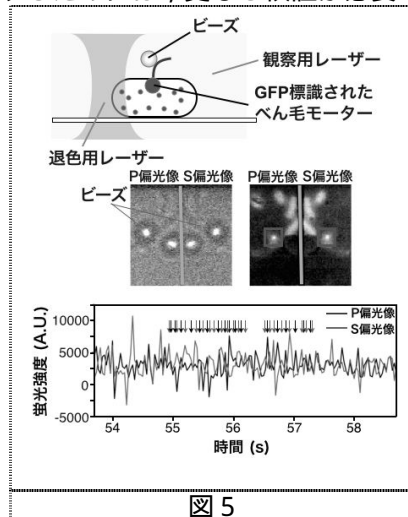


図 5

##### (3) GFP 蛍光とべん毛モーター回転の同時計測系を用いた、走化性シグナル伝達タンパク質 CheY 結合によるべん毛モーター回転方向転換の証明.

大腸菌のべん毛モーターの回転方向は、走化性シグナル伝達タンパク質である CheY によって制御されている. 一般的に、リン酸化 CheY (CheY-P) がモーターに結合すると、べん毛モーターの回転方向が反時計方向から時計方向へ変換されると考えられてきた. し

かし、CheY 結合によるべん毛モーターのか移転方向制御は、生きた細胞内の機能的なモーターで直接的に証明されていた訳ではなかった。そこで本研究で構築した、GFP 蛍光と明視野像によるモーター回転の同時計測系を検証するために、CheY-GFP の蛍光観察とテザードセル法によるモーターの回転計測を同時に行った(図6)。その結果、べん毛モーターが時計回転している時のみ、細胞の回転中心に CheY-GFP の局在が観察された(図6)。細胞の回転中心にはべん毛モーターが存在することから、CheY-GFP の局在は、CheY のモーターへの結合を反映していると考えられた。また CheY-GFP の局在は、大腸菌の誘引物質存在下では観察されなかったことから、モーターへ結合するのはリン酸化された CheY であることも証明された。以上の結果から、細胞内シグナル伝達分子 CheY-P の結合により、時計方向へのモーター回転が引き起こされることを捉えることに成功した。この

結果は、長らくモデルとして想像されてきた事象が、大腸菌 1 細胞で直接可視化することが可能にな

ったことを意味する。また、本計測系を用いることで、1) 時計回転を引き起こすには約 13 分子の CheY-P 結合が必要なこと(全ての CheY 結合部位への結合は必要ない)、2) モーターの回転方向転換時に CheY-P は 100 ミリ秒程度で結合・解離すること、3) 時計回転するモーターの方が CheY-P に対する結合能が高いこと、等が明らかになった。本成果は、*Sci. Signal.* 2014, 7 (319), ra32. に掲載された。

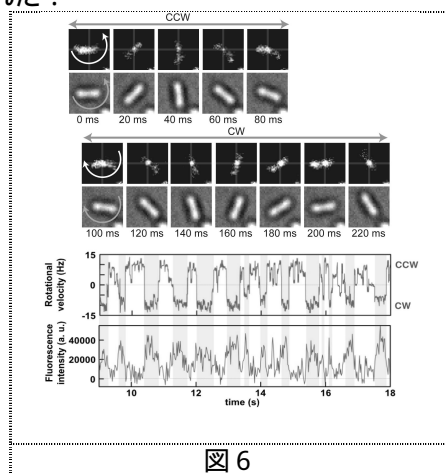


図6

## 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1件)

H. Fukuoka, T. Sagawa, Y. Inoue, H. Takahashi, A. Ishijima. (2014) Direct imaging of intracellular signaling components that regulate bacterial chemotaxis. *Sci Signal.*;7(319):ra32.

[学会発表](計11件)

H. Fukuoka, T. Sagawa, Y. Inoue, H. Takahashi, A. Ishijima. Direct imaging of intracellular signaling protein CheY regulating bacterial flagellar rotation. GRC2014 Sensory Transduction in Microorganisms. Vantura, CA, USA. 2014/1/12 - 2014/1/17.

福岡 創. 蛍光イメージングによる大腸菌細胞内情報伝達の直接的観察. 生物物理東北支部会. 仙台市. 2013/12/13.

福岡 創, 佐川貴志, 井上裕一, 高橋泰人, 石島秋彦. 蛍光イメージングによる大腸菌細胞内情報伝達の直接的観察. 多元研究発表会. 仙台市. 2013/12/6.

H. Fukuoka, T. Sagawa, Y. Inoue, H. Takahashi, A. Ishijima. Direct imaging of the rotational switching of a functioning flagellar motor by binding of an intracellular signaling protein CheY. 第51回生物物理学会年会 京都市 2013/10/28 - 2013/10/30.

福岡 創. イメージングによる大腸菌シグナルトランスダクションの定量的解析. イメージング若手の会(招待講演). 野田市. 2013/9/7 - 2013/9/8.

福岡 創, 佐川貴志, 井上裕一, 高橋泰人, 石島秋彦. 細菌べん毛モーターとシグナル伝達分子 CheY の結合を細胞内でイメージングする. 第10回21世紀大腸菌研究会. 修善寺. 2013/6/20 - 2013/6/21.

H. Fukuoka, T. Sagawa, Y. Inoue, H. Takahashi, A. Ishijima. Direct imaging of CheY-binding to a functioning bacterial flagellar motor. BLAST XII, Tucson, USA. 2013/1/20 - 2013/1/25.

福岡 創. 大腸菌シグナル伝達分子 CheY の細胞内イメージングとべん毛モーターの回転計測. 生物物理東北支部会. 仙台市. 2012/12/21.

M. Nakajima, H. Fukuoka, Y. Inoue, H. Takahashi, A. Ishijima. Simultaneous observation of the rotation of flagellar motor and GFP-labeled stator unit in a functioning flagellar motor. 日本生物物理学会年会, 名古屋. 2012/9/22 - 2012/9/24.

H. Fukuoka, T. Sagawa, Y. Inoue, H. Takahashi, A. Ishijima. Propagation of intracellular signaling molecule in the presence and absence of polar localization of CheZ in a single E. coli cell. 日本生物物理学会年会, 名古屋. 2012/9/22 - 2012/9/24.

福岡 創, 佐川貴志, 高橋泰人, 井上裕一, 石島秋彦. 複数べん毛モーターの同時計測による、大腸菌細胞内シグナル伝達の計測. 第9回21世紀大腸菌研究会. 長浜. 2012/6/21 - 2012/6/22.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福岡 創 (Fukuoka Hajime)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：50447190