

令和元年5月31日現在

機関番号：32606

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06230

研究課題名(和文) IV型線毛のライブイメージングによる機械的刺激応答機構の解明

研究課題名(英文) T4P dynamics in response to mechanosensing system

研究代表者

中根 大介 (Nakane, Daisuke)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：40708997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：バクテリアはもっとも単純な生命体の1つであり、大きさは1ミリの1000分の1程しかありません。ところが、動く仕組みに注目すると、実に多様で複雑な様式を発達させていることが知られています。申請者らは光合成微生物のラン藻が細い糸のような繊維状構造物を持ち、その伸長収縮を繰り返す様子を撮影することに成功しました。さらに、独自の光学顕微鏡を駆使することで、この生命体は指向性のある光という外部シグナルによって、その運動を制御する能力を持つことを明らかにすることができました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これは「視覚を備えたバクテリア」という点でも画期的です。光を感知するだけでなく、光の向きを認識するという事実は、単純な生命体が、高度な情報処理を達成していることをあらわしています。スパイダーマンのようなバクテリアは、非常に単純ではあるが初歩的な視覚を備えることで、自身の持つ「糸」を伸縮させる方向を自由自在に制御していると考えられます。この成果は、同様の「糸」を持つ病原菌の制御にも応用できる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：Type IV pili (T4P) are cell-surface appendages observed in prokaryotes that perform critical functions in cell motility, surface adhesion, virulence, and biofilm formation. Although the architecture of T4P has already been determined, the dynamics resulting from the response to various environmental signals remain unclear. Here we demonstrated the sequential process of T4P dynamics from stimulus to taxis at the single-cell level in a model cyanobacterium, which can recognize light direction. We directly visualized that T4P filaments dominantly appeared from the side of the cell opposite the illumination. This asymmetric activation is regulated on a timescale of minutes, and the process was transitioned between three sequential phases. These findings provide clues toward a general regulation mechanism of the T4P system.

研究分野：細菌学・生物物理学

キーワード：シアノバクテリア 動態計測 走光性 表面運動

1. 研究開始当初の背景

機械的な刺激への応答は、真核生物の細胞生物学を理解する上で重要であり、液体の流れや表面での機械的刺激に関する研究は、1細胞から個体といった多様なスケールで研究が展開している [Vogel and Sheetz. (2006) Nat Rev Mol Cell Biol]。対照的に、微生物学は伝統的に化学応答に関する研究が盛んであり、豊富な栄養培地や寒天プレートという限られた培養手法が主流であったため、『メカニクス』が個体や集団に重要な影響を及ぼすことは、最近になってようやく注目されはじめた [Rusconi, Garren and Stocker. (2014) Annu Rev Biophys, Persat, et al. (2015) Cell]。自然環境下ではバクテリアは浮遊状態と付着状態とを高頻度に遷移している [Costerton and Lewandowski. (1995) Annu Rev Microbiol]。海洋で生息するバクテリアを除くと、かなりのものが表面の近くで生活しており、液体と固体の境界での生存戦略を発達させている。その1つに、IV型線毛と呼ばれる接着に有利にはたらく繊維状構造がある [Korotkov, Sandkvist and Hol. (2012) Nat Rev Microbiol.]。IV型線毛は幅広いバクテリアで見つかっており、緑膿菌や淋菌では病原性発揮に重要であることが示されている [Zhao, et al. (2013) Nature]。IV型線毛の機能は多岐に及ぶが、近年新しい展開を見せており、固形物表面での機械的刺激を知覚するメカノセンサーとして注目が集まっている。これまでは、接着と運動を担う構造物であると見なされており、1-5 μm の長さの繊維構造が伸長・接着・収縮という一連のサイクルを繰り返すことで、バクテリアは表面特異的に動くことができる (Fig. 1) [Skerker and Berg. (2001) PNAS]。このとき、線毛繊維はピンッと引っ張られる。この張力をバクテリアが感知していればメカノセンサーとしても機能するだろう、というアイデアが提案されている [Persat, et al. (2015) PNAS]。しかし、どのようにしてバクテリア1匹が周辺の力学変化をアクティブに感知しているのか、その詳細は全く分かっていない。

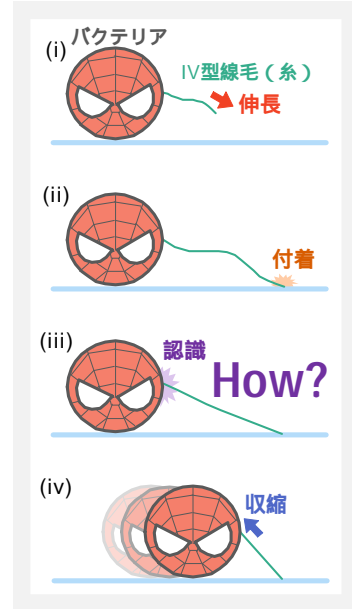


Fig. 1. IV型線毛による機械的刺激応答の模式図

2. 研究の目的

バクテリアに『皮膚感覚(触覚)』はあるのだろうか。化学物質を介さずに外界を認識する仕組みは、微小な生物にも存在するのだろうか。近年、機械的刺激を認識する“センサー”としてIV型線毛と呼ばれる繊維状構造が注目されているが、その詳細なメカニズムは不明である。IV型線毛は光学顕微鏡下で見えないことが当たり前であったが、申請者らはこれをライブイメージングする方法を見つけ出した。本研究では、IV型線毛のありのままの姿を高時空間分解能で画像化・定量化することで、メカニカルなシグナル認知機構が本当に存在するのかを検証する。

3. 研究の方法

申請者が注目しているIV型線毛は、これまで光学顕微鏡下で見えないことが当たり前であった [Merz, So and Sheetz. (2000) Nature]。線毛繊維の細さが5 nmしかないこと、その動きは毎秒1 μm に達する素早い動きであることから、このアプローチが容易ではないことは想像がつく。最も難しい問題は、IV型線毛を直接蛍光標識する手法が確立していない点である。IV型線毛を可視化した論文は、申請時にはたった1報しかなく、これだけで複雑な機能を考えるには情報として不十分であった。代替案として、細胞の微小な動きを解析することで多数の線毛の振る舞いを逆算的に見積もるといった研究はいくつか報告がなされていた [Marathe, et al. (2013) Nat Comm]。そこで、申請者はIV型線毛からなる繊維構造をダイレクトに可視化することでこの研究を大きく進展させることに挑戦する。これまで不明瞭であったIV型線毛の動態を高時空間分解能で、ダイレクトに画像化・定量化できる。線毛が表面に接着する様子、機械的刺激で線毛繊維の形状が変化する様子、このような変化を感知して線毛を収縮させる様子、これら一連の過程すべてをイメージングする。

IV型線毛がどのように動くのか、それを光学顕微鏡下で初めて測定をした研究は2000年頃にまで遡る。1つ目は線毛繊維の色素標識によるもの [Skerker and Berg. (2001) PNAS]、2つ目は光ピンセットを介した収縮の検出によるものである [Merz, So and Sheetz. (2000) Nature]。ただし、これらの方法は緑膿菌や淋菌などいくつかの種に限られたものであった。そ

ここで、申請者は、材料としてシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 を用いた。これまでの研究から、この種は IV 型線毛依存的な運動を示すことが変異株を用いた解析で明らかになっていたが [Bhaya. (2004) Mol Microbiol], 線毛繊維やその動きを光学顕微鏡下で観察するという研究アプローチはほとんど行われていなかった。

4. 研究成果

申請者らは、光合成微生物のラン藻が細い糸のような繊維状構造物を持ち、その伸長収縮を繰り返す様子を撮影することに成功した。さらに、独自の光学顕微鏡を駆使することで、この生命体は指向性のある光という外部シグナルによって、その運動を制御する能力を持つことを明らかにした [Nakane and Nishizaka. PNAS (2017)]。これは「視覚を備えたバクテリア」という点でも画期的である。光を感知するだけでなく光の向きを認識するという事実は、単純な生命体が高度な情報処理を達成していることをあらわしている。スパイダーマンのようなバクテリアは非常に単純ではあるが初歩的な視覚を備えることで自身の持つ「糸」を伸縮させる方向を自由自在に制御していると考えられる。この成果は、同様の「糸」を持つ病原菌の制御にも応用できる可能性を秘めている。

「糸」の動きを見る IV 型線毛の機能を調べる最も単純な方法は、その動きを直接映像として捉えることである。しかし、線毛は細く、通常の観察では見ることができない。そこで、申請者らはこの問題点を克服し、IV 型線毛の光学顕微鏡下での可視化、および、動態計測に成功した。その方法はシンプルで、微小なビーズを目印として線毛に付着させることで、その動きを検出するというものである。ビーズは線毛よりも厚みがあり明るく光るため、その動きを検出することが可能となる。これにより細胞が自身の線毛繊維の伸長・収縮を繰り返す様子を撮影することに成功した (Fig. 2 上図)。これは、ちょうど「スパイダーマン」が「糸」を伸ばしたり、手繰り寄せたりする様子とよく似ている。自身の体長の数倍程度のテリトリーの中で、1 分間に 10 本程度の糸を毎秒 0.3-0.8 ミクロンの速さで伸縮していた。

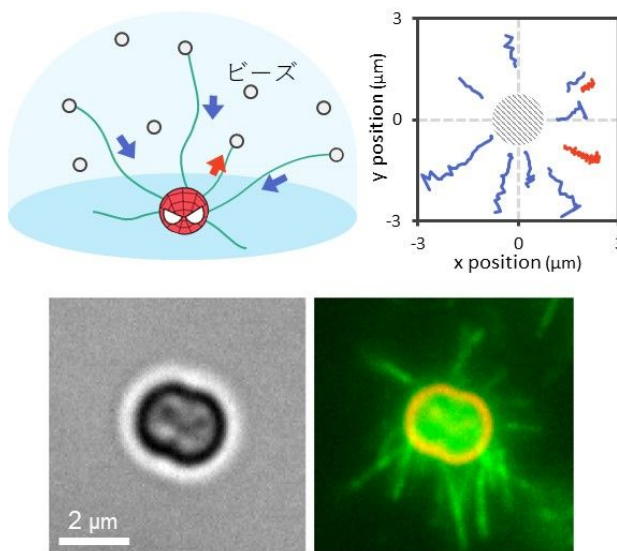


Fig.2. 上図: ビーズを介した IV 型線毛の動態計測。下図: IV 型線毛繊維の蛍光標識。左が細胞の明視野像, 右が蛍光像。

線毛の可視化 申請者らは、線毛を光学顕微鏡下で直接観察する方法も構築した。偶然にも、アビジンという生物工学用途で汎用されるタンパク質が IV 型線毛に特異的に結合することを発見した。そこで、蛍光色素で標識したアビジンを用いることで、線毛 1 本 1 本を画像化することができた (Fig. 2 下図)。化学固定した細胞において、線毛繊維を光学顕微鏡下で観察することが可能となり、線毛の長さや本数は、電子顕微鏡観察の結果や動態計測の結果とも一致していた。

これら 2 つの方法を確立する過程で、申請者らは偶然にも IV 型線毛とその光制御について新しい知見を得ることに成功した。光は生物にとって、自身の生存にかかわる重要な外界情報であり、多様な光認識機構を発達させている。もっとも単純な生命体の場合、細胞の大きさは可視光の波長程度しかない。ところが、申請者らは、バクテリアという小さな生命体であっても、指向性のある光という外部シグナルによって、その運動を制御する能力を持つことを実証した [Nakane and Nishizaka. PNAS (2017)]。

「糸」を光で制御する 以前から、細胞は光に対して応答することが知られていた。しかし、これまで、IV 型線毛の動態が環境要因に応答してどのように制御されているのかについては、ほとんど研究されていなかった。本研究で用いた *Synechocystis* sp. PCC6803 は、IV 型線毛依存的な走光性を示し、特に光の向きを認識して、光源に向かって動く「正の走光性」、または光源から離れるように動く「負の走光性」を示すことが知られていた。そこで我々は、光学顕微鏡下で細胞に光刺激を与える実験系を構築し、光刺激により IV 型線毛がどのように動的に制御されるのかを観察した (Fig. 3A)。まず、顕微鏡ステージ上で横から強青色光をレーザーで照射し、負の走光性を示す条件下で IV 型線毛の動態計測と線毛繊維可視化の実験を行った。すると予想した通り、光刺激により IV 型線毛は非対称に活性化した。つまり、光軸の進行方向

側に位置する IV 型線毛のみ、伸長・収縮が活性化していた (Fig. 3B)。これは、細胞が光の向きを認識し、方向性のある動きを生み出すために、IV 型線毛装置を制御した結果であると考えられる。では、一体どのように細胞は光の向き認識という複雑な情報処理を行うのだろうか。

光の向きを認識する仕組み

バクテリアには一般的に「目」のような細胞内小器官はない。しかし、光を遮蔽する構造体がなくとも、細胞内の光の強度差を検出する機構さえあれば、光の向きを認識することが可能であることが最近示された [Schuergers, N., et al. eLife (2016)]。指向性のある光が照射されたとき、細胞の屈折率は周りの水よりも高いため、細胞周辺において光軸の進行方向の光の強度は光源側に比べて少しだけ高くなる。

Synechocystis sp. PCC6803 はこのような細胞内の光強度差を光の向き情報として捉えているのだと考えられる。詳細については原著論文の実験を参照されたいが、人為的に光の強度差を与えると、光の向き認識と同様の IV 型線毛の制御応答を示すことから、筆者らはこの強度差が向き認識の本質であると考えている。このような光の強度差が走光性に影響しているという例はクラミドモナスでも報告されており、微生物の視覚という観点でも重要な研究課題である [Ueki, et al. PNAS (2016)]。ただし、*Synechocystis* sp. PCC6803 においては、どのようにして細胞内の光強度差を情報として統合させているかについての詳細はまだよくわかっていない。また、筆者らが調べた負の走光性については、青色光受容タンパク質 PixD (BLUF) が関与することがすでに明らかになっている。しかし、光刺激の開始から細胞の応答現象までには、およそ 1 min もの時間差があり (Fig. 3C)、試験管内で見られる PixD-PixE 複合体の離合集散の時間スケールと比べて、随分と遅い光応答のように見える [Tanaka, et al. JACS (2012)]。この遅い応答時間を決定する仕組みにこそ、光応答機構の本質が隠されているのかもしれない。

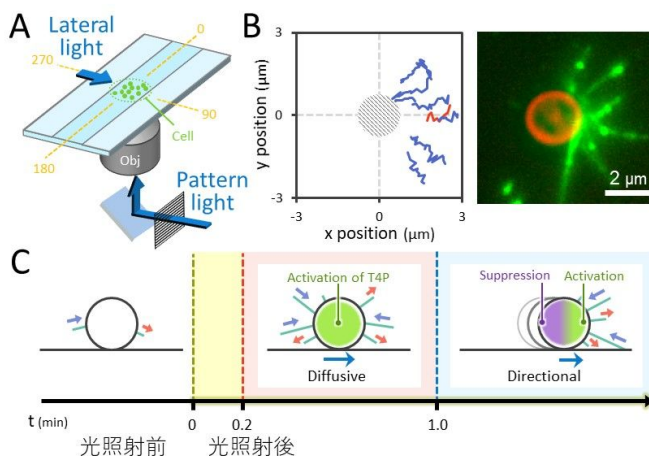


Fig. 3. (A) 顕微鏡ステージ上で光刺激を与える実験系。横からの光刺激や対物レンズを介して縦方向の光刺激を与えることができる。(B) 横から光を照射したときの IV 型線毛の動態計測と線毛繊維の可視化。(C) 強青色光照射による細胞の負の走光性応答と、IV 型線毛繊維の動態制御のモデル図。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Kimura T, Tezuka T*, **Nakane D**, Nishizaka T, Aizawa SI, and Ohnishi Y*. Characterization of zoospore type IV pili in *Actinoplanes missouriensis*. Journal of Bacteriology 査読有 in press (2019)
DOI: 10.1128/JB.00746-18
2. Iwata S, Kinoshita Y, Uchida N, **Nakane D***, Nishizaka T*. Motor torque measurement of *Halobacterium salinarum* archaeellar suggests a general model for ATP-driven rotary motors. Communications Biology 査読有 2, 199 (2019)
DOI: 10.1038/s42003-019-0422-6
3. Naito T, Masaike T*, **Nakane D**, Sugawa M, Okada K, Nishizaka T*. Single-molecule pull-out manipulation of the shaft of the rotary motor F1-ATPase. Scientific Reports 査読有 9, 7451. (2019)
DOI: 10.1038/s41598-019-43903-2
4. **中根大介***, 西坂崇之. シアノバクテリアの運動. 生物工学会誌 査読有 96, 244-247. (2018)
https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9605/9605_tokushu_2.pdf
5. **中根大介***, 西坂崇之. 光に応答したバクテリア IV 型線毛の動的制御. 生物物理 査読有 58, 207-208. (2018)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophys/58/4/58_207/_pdf/-char/ja
6. Katoh TA, Ikegami K, Uchida N, Iwase T, **Nakane D**, Masaike T, Setou M, Nishizaka T*. Three-dimensional tracking of microbeads attached to the tip of single isolated tracheal cilia beating under external load. Scientific Reports 査読有 8, 15562. (2018)
DOI: 10.1038/s41598-018-33846-5
7. Sato K*, Kakuda S, Yukitake H, Kondo Y, Shoji M, Takebe K, Narita Y, Naito M, **Nakane**

- D**, Abiko Y, Hiratsuka K, Suzuki M, Nakayama K. Immunoglobulin-like domains of the cargo proteins are essential for protein stability during secretion by the type IX secretion system. *Molecular Microbiology* 査読有 110, 64-81. (2018)
DOI: 10.1111/mmi.14083
8. Imamura K, Sato K, Narita Y, Kondo Y, **Nakane D**, Naito M, Fujiwara T, Nakayama K. Identification of a major glucose transporter in *Flavobacterium johnsoniae*: Inhibition of *F. johnsoniae* colony spreading by glucose uptake. *Microbiol Immunol* 査読有 62, 507-516. (2018)
DOI: 10.1111/1348-0421.12633
 9. Kinoshita Y*, Kikuchi Y*, Mikami N, **Nakane D**, and Nishizaka T. Unforeseen swimming and gliding mode of an insect gut symbiont, *Burkholderia* sp. RPE64, with wrapping of the flagella around its cell body. *ISME J.* 査読有 12, 838-848. (2018)
DOI: 10.1038/s41396-017-0010-z
 10. **Nakane D**, and Nishizaka T*. Asymmetric distribution of type IV pili triggered by directional light in unicellular cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 査読有 114, 6593-98. (2017).
DOI: 10.1073/pnas.1702395114
 11. Liu P, Zheng H, Meng Q, Terahara N, Gu W, Wang S, Zhao G, **Nakane D**, Wang W, Miyata M*. Chemotaxis without conventional two-component system, based on cell polarity and aerobic conditions in helicity-switching swimming of *Spiroplasma eriocheiris*. *Frontiers in Microbiology* 査読有 8, 58. (2017)
DOI: 10.3389/fmicb.2017.00058
 12. Kinoshita Y, Uchida N*, **Nakane D** and Nishizaka T*. Direct observation of rotation and steps of the archaellum of swimming halophilic archaea. *Nature Microbiology* 査読有 1, 16148. (2016)
DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.148
 13. Tanaka A, **Nakane D**, Mizutani M, Nishizaka T and Miyata M. Directed binding of gliding bacterium, *Mycoplasma mobile*, shown by detachment force and bond lifetime. *MBio* 査読有 7, e00455-16. (2016)
DOI: 10.1128/mBio.00455-16.

[学会発表](計27件)

1. **中根大介**, 村田幸樹, 見理剛, 柴山恵吾, 西坂崇之. 小さなバクテリアがもつ分子速度計. 2018年度べん毛交流会 愛知 2019年3月
2. **Nakane D**, Nishizaka T. (招待講演) Asymmetric distribution of type IV pili triggered by directional light in unicellular cyanobacteria. 43rd Indian Biophysical Society Meeting Kolkata, India 2019年3月
3. **Nakane D**, Murata K, Kenri T, Nishizaka T. Molecular speedometer for gliding motility of *Mycoplasma pneumoniae*. Bacterial Locomotion and Signal Transduction XV. New Orleans, LA 2019年01月
4. **中根大介**, 村田幸樹, 見理剛, 柴山恵吾, 西坂崇之. 小さなバクテリアがもつ分子速度計. 生体エネルギー研究会 第44回討論会 愛知 2018年12月
5. **中根大介**, 小高祥子, 西坂崇之. Collective motion of gliding *Flavobacteria* exhibits unforeseen vortex lattice and dynamic plate with rotation. 第56回生物物理学会年会 岡山 2018年9月
6. **中根大介**, 西坂崇之. (招待講演) Tiny Spider-Man: Bacteria pulling fibers. 第56回生物物理学会年会 岡山 2018年9月
7. **Nakane D**, Murata K, Kenri T, Nishizaka T. Molecular speedometer for gliding motility of *Mycoplasma pneumoniae*. 22th Congress of International Organization for Mycoplasmaology Portsmouth, NH 2018年07月
8. **Nakane D**, Ito T, Nishizaka T. Co-existence of two chiral helices produces kink translation in *Spiroplasma* swimming. 22th Congress of International Organization for Mycoplasmaology Portsmouth, NH 2018年07月
9. **中根大介**. (招待講演) ラン藻はスパイダーマン? 糸の伸縮で動く仕組み. ラン藻ゲノム交流会 2018 東京 2018年6月
10. **Nakane D**. (招待講演) Molecular speedometer for gliding motility of *Mycoplasma pneumoniae*. The 8th Meeting of Asian Organization for Mycoplasmaology. Tokyo, Japan 2018年5月
11. **Nakane D**. (招待講演) Bacterial motility on surfaces. 第91回細菌学会総会 福岡 2018年3月
12. **Nakane D** and Nishizaka T. (招待講演) Bacterial motility on surfaces. 第91回細菌学会総会 福岡 2018年3月
13. **Nakane D**, Nishizaka T. Type IV pilus dynamics in response to directional light. Gordon

- Research Conferences (Photosensory Receptors and Signal Transduction) Lucca, Italy
2018年03月
14. **Nakane D**, Tamakoshi M, Nishizaka T. Direct visualization of T4P dynamics at 70 degree. Gordon Research Conferences (Sensory Transduction in Microorganisms) Ventura, CA
2018年01月
 15. **中根大介**. (招待講演) 最小の戦車. 第7回 日本微生物学連盟フォーラム 東京 2017年
12月
 16. **中根大介**, 西坂崇之. 膜デバイス解剖の技術開発とバクテリア運動可視化への応用 日
本生体エネルギー研究会 第43回討論会 京都 2017年12月
 17. **中根大介**. (招待講演) こいつ...動くぞ! ねじる・ひっぱる・はうバクテリア. 生命科学
系学会合同年次大会 ComBio2017 神戸 2017年12月
 18. **中根大介**, 玉腰雅忠, 西坂崇之. *Thermus thermophilus* の表面運動と IV 型線毛のダイナ
ミクス. 第18回 極限環境生物学会 つくば 2017年11月
 19. **Nakane D** and Nishizaka T. (招待講演) Asymmetric distribution of Type IV pili triggered
by directional light in unicellular cyanobacteria. 第55回 生物物理学会年会 熊本
2017年9月
 20. **Nakane D**, Ito T, Nishizaka T. Co-existence of two chiral helices produces kink
translation in *Spiroplasma* swimming. International Symposium on "Harmonized
supramolecular motility machinery and its diversity" 名古屋 2017年9月
 21. **Nakane D**. (招待講演) How bacteria move without flagella. International Symposium
on "Harmonized supramolecular motility machinery and its diversity" 名古屋 2017
年9月
 22. **中根大介**, 西坂崇之. Asymmetric distribution of type IV pili triggered by directional
light in unicellular cyanobacteria. 新学術領域 ゆらぎと構造の協奏 班会議 東京
2017年6月
 23. **中根大介**. (招待講演) 這うバクテリア Move?. 第90回 細菌学会総会. 仙台 2017年3月
 24. **中根大介**, 西坂崇之. シアノバクテリア IV 型線毛は局所的な刺激により非対称に伸長す
る. 日本生体エネルギー研究会 第43回討論会 京都 2016年12月
 25. **中根大介**, 西坂崇之. Dynamics of Type IV pili controlled by light direction in
unicellular cyanobacteria. 第54回 生物物理学会年会 つくば 2016年11月
 26. **中根大介**, 葛生祥平, 田岡東, 西坂崇之. バクテリアがもつナノサイズのコンパスの極性
を逆転させる. 第10回 細菌学若手コロッセウム. 草津 2016年8月
 27. **中根大介**. べん毛を持たずに高速遊泳運動をするバクテリア. 新学術領域 運動マシナリ
ー班会議 長崎 2016年6月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.gakushuin.ac.jp/univ/sci/phys/nishizaka/lab/lp/>

<https://www.univ.gakushuin.ac.jp/news/2017/0606.html>

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 西坂 崇之

ローマ字氏名: Takayuki Nishizaka

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。