

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14710

研究課題名(和文)細胞内情報伝達は単なる一方通行？

研究課題名(英文)Signal transduction in cell is only one way?

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌は外環境シグナルを走化性受容体によって認識し受容体に結合したCheAの自己リン酸化活性が調整される。CheAのリン酸基は速やかにCheYに転移されべん毛モーターに結合してモーターの回転方向をCCW回転CW回転へと転換する。本研究では情報伝達フィードバック機構の有無を検証した。同一菌体中での2個のべん毛モーターの片方のモーターの強制回転停止実験を行なった。その結果、回転停止直後に、片方のモーターのCW biasが徐々に上昇する傾向が見られた。これは、片方のべん毛モーターを強制的に回転停止することにより受容体が活性化し、もう片方のモーターのCW回転の割合を上昇させた可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：E.coli recognize the environmental stimuli by receptor patch at cell pole and phosphorylate CheA, CheA-P transfer to CheY, CheY-P bind to flagellar motor and rotational direction changed from CCW to CW. In this study, we validate a feedback system of signal transduction system in cell. When the rotation of one motor on the cell was stopped, CW bias of another motor on the same cell was gradually increased. This result suggested that the stopped motor activated the CheA and increased the CW bias of other motor on the same cell.

研究分野：生物物理学

キーワード：バクテリア

## 1. 研究開始当初の背景

一般的に、細胞内情報伝達は一方通行であると考えられている。もちろん、過程においてはさまざまなフィードバック機構が介在しているが、最終ゴールはあくまでシグナル伝達の結果に過ぎない。しかし、大腸菌走化性において、最終アウトプットであるべん毛モーターが外界の環境を感知し、細胞内情報伝達に参与することを我々は見いだした。モーターの回転方向に応じて、モーターへのシグナルタンパク質である CheY-P (リン酸化 CheY) の親和性が変化したり、負荷に応じてスイッチング頻度、CW bias (全回転中の時計回りの割合) が変化している。さらに、我々以外にも H.C.Berg らは外界の負荷に応じてモーター固定子の数が変わることを報告しているし、海洋性ビブリオ菌は外界の粘度に応じて側毛、極毛の出現状態を変化させている。つまり、細胞の流れは一方通行ではなく、さまざまなフィードバック機構が介在しており、バクテリア細胞内情報伝達はそれを明らかにする上で非常に重要な試料となる。また、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)。

## 2. 研究の目的

本申請においては、回転電場による力学制御によるシグナル伝達の変化を回転電場、蛍光イメージング手法を用いて明らかにし、情報伝達機構の方向性、フィードバック機構について明らかにする。前述したように、一般的には情報伝達はいくつかのフィードバックを経由しているものの基本的には一方通行である。今回、我々が見いだした大腸菌におけるモーターのフィードバック機構は全く新しい概念であり、これらを明らかにすることにより、原核生物のみならず、真核生物にも適用可能である。さらに、従来の矢印で結んだだけの情報伝達マップをエネルギーランドスケープとしてとらえ直すことにより、より定量的な生命科学の理解につながるものと期待できる。

## 3. 研究の方法

(1) 回転電場を用いたモーターへの力学的制御  
大腸菌における情報伝達におけるアウトプットはモーターの回転方向の転換である。そこで、回転自体を回転電場を与えることにより制御させることで、細胞内の情報伝達におけるフィードバック機構を明らかにする。今

までの考えでは、情報の流れは上流から下流へ一方通行で流れていたが、アウトプットであるべん毛モーターの回転もまた外部環境のセンサーとして考えることができる。このモーターの外部環境センサーを利用したフィードバック機構が生命現象の情報伝達機構に重要な働きをしていることが十分に考えられる。そこで、回転電場により積極的に外部からの力学刺激を加えることにより、モーター基部体へのシグナル分子の結合数の変化などを捉える。テザードセル法、回転計測、蛍光イメージング、回転電場などの要素技術は現在までの研究である程度進展している。これら要素技術を統合するために、モーターの CW, CCW 回転の持続時間の負荷依存性、強制回転中のモーター基部体へのシグナル分子の結合・解離の変化、モーター基部体へのシグナル分子の結合・解離の変化と負荷との関連性、を探る。システム開発としては、4 極の電極のリソグラフィによるパターン形成を主として行う。細胞の位置決めシステムの開発も合わせて行う (電極の中心部に細胞を設置する必要がある、現状のパターンではその調整が難しい)。また、細胞と電極とを独立に制御できる、タングステン電極を用いた電場発生システムの構築も行う。

(2) 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

我々は GFP を融合させた CheY のイメージングと、テザードセル法による回転の同時計測により、CW 回転中に有意な蛍光強度の上昇を見出すことに成功した。この結果は、モーターがいかんにしてシグナルの結合により回転変化を行うか、と言う重要な生物学的課題に対して非常に大きな結果となった (Science Signaling, 2014)。この計測手法をさらに推し進めることにより、回転転換、および情報伝達の詳細に迫る。

先行実験の結果から、モーター基部体へのシグナル分子の結合・解離は強い協同性を示すことが示唆された。そこで、ケージド化合物を導入することにより、モーター基部体へのシグナル分子の結合・解離が外部環境変化によりどのように影響を受けるかを検討する。また CheY と融合する蛍光タンパク質を超高速超解像イメージング (超解像画像を 1 秒以内で取得) が可能な新規光スイッチング蛍光タンパク質に置換することで、CheY-P のモーター基部への結合数を定量解析可能にする。誘因・忌避物質の投与により、細胞内の CheY-P 濃度が減少・上昇する。それに伴うモーター基部体への CheY-P の解離・結合が引き起こされ、モーターの回転が反時計・時計回りとなる。この誘因・忌避物質の暴露量、暴露時間、暴露変化量などを変えることにより、細胞の応答を、モーターの回転と基部体への CheY-P の結合数の変化を同時計測することにより、細胞内情報伝達機構を明らかに

する．さらには，発現量を調節して，モーターの回転換の最低数を明らかにすることにより，モーター自体の回転方向転換に必要な協同的機構についても明らかにする．これらの同時計測システムに前述した外部負荷を与える系を融合して，情報伝達の最終地点であるモーターと情報伝達物質との相互作用が外部負荷に対してどのように影響するかを確認する．

### (3) 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

当研究室で開発した高速度カメラによる同時計測システムを用いて共同研究者である Sandy Parkinson 教授（ユタ大，アメリカ）の保有する遺伝子改変走化性関連タンパク質を組み込んだ菌体を用いて，複数モーターの回転の同時計測を行う．Parkinson 教授の保有するミュータントはそれぞれ性質が異なり，走化性能力が異なる．そこで，これら変異株を用いて計測を行えば，どの部位の変異が協同的な性質に重要であるかを判別できる．このようなミュータントを用いた実験は莫大な実験量と人手を要するが共同研究を行うことによって，それぞれの特長をうまく活用できる．Parkinson 教授は走化性研究の大家であり，この分野の牽引役でもある．長年の研究により多数の走化性タンパク質のミュータントを有しており，共同研究により，情報伝達，特に受容体，及びその下流システムの理解につながるものである．さらにこのミュータントを用いた系で前述の外部負荷実験を行い，CheA 領域での外部負荷の様子を探る．

## 4. 研究成果

### (1) べん毛モーター強制停止

大腸菌は外環境刺激に応じてべん毛モーターの回転方向を制御し，自身にとってより好ましい環境へと移動する走化性を有している．外環境シグナル（誘引物質や忌避物質）は細胞極に局在する走化性受容体によって認識され，受容体に結合した CheA の自己リン酸化活性が調整される．CheA のリン酸基は速やかに CheY に転移され，リン酸化 CheY はシグナル伝達分子として細胞質を伝わり，べん毛モーターに結合してモーターの回転方向を CCW 回転 CW 回転へと転換する．従来の研究では，入力センサーである受容体から走化性システムの出力器官であるべん毛モーターへの一連のシグナル伝達のメカニズムについて詳しく研究されてきた．しかし，先行研究でべん毛モーターへの負荷が走化性応答に影響することがわかってきている．これは外界からの刺激を受けたべん毛モーターが受容体の活性を制御するようなフィードバック機構の存在の可能性を示唆している．そこで，本研究ではべん毛モーターからの情報伝達フィードバック機構の有無を，ガラスニードルを用いた方法で検証した．

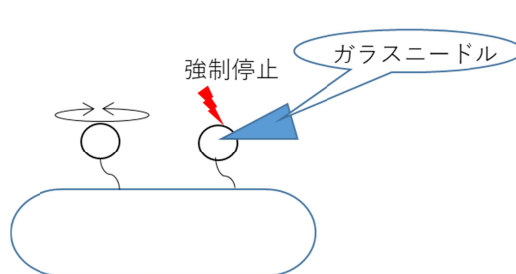


図 1．単一菌体上の二つのモーターの一つを強制停止させる

べん毛モーターの強制回転停止実験を行なったところ，回転停止直後に，回転停止させなかったもう片方のモーターで回転方向変換が起きている菌体も観察された．そこで，両方のモーターについて回転停止前・停止中・停止後について時間変化を解析した．

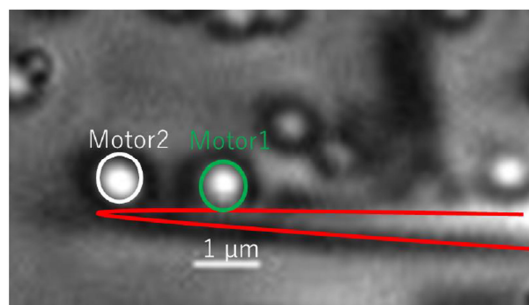


図 2．回転停止中の 2 個のモーターとガラスニードル

その結果，回転停止中に停止していない方のモーターの CW bias が徐々に上昇する傾向が見られた．これは，片方のべん毛モーターを強制的に回転停止することにより受容体が活性化し，もう片方のモーターの CW 回転の割合を上昇させた可能性が考えられる．また，どちらのモーターにおいても回転停止を解除すると CW bias が下降するような傾向が見られた．これは，モーターへの負荷が受容体の活性に影響を与えたことにより CW bias の数値変化に影響を及ぼしたのかもしれない．

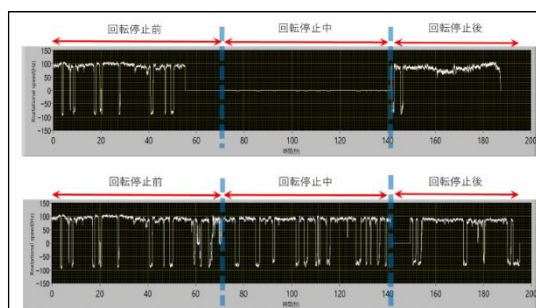


図 3．上：強制停止させたモーターの回転の様子．下：自由に回転しているモーターの回

転の様子。縦軸：回転速度(+がCCW,-がCW)。回転停止後に強制停止させたモーターの回転が復活しているがCCWのみになっていること、自由に回転しているモーターのCWbiasが変化していることがわかる。

## (2) 回転電場による外部付加実験

大腸菌を一本のべん毛によってスライドガラスによって固定し、べん毛モーターが菌体を回転させる状態をテザードセルと呼ぶ。本研究はテザードセルの周囲に4本のタングステンニードルを配置し、これらに回転電場を与えることで大腸菌を強制回転させた。観察領域を囲む4つの電極に90度ずつ位相をずらした交流電圧を四方向から与えることで電極の正極と負極が遷移し、電場が回転する。これを回転電場と呼ぶ。大腸菌に外部電場を与えると、正極と負極に誘電分極する。その後電場を回転させると、大腸菌が回転する電場の方向に引っ張られるように回転する。これにより、大腸菌のべん毛モーターに負荷を与えることができる。

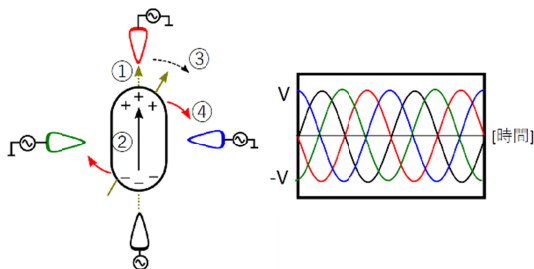


図. 3 回転電場の様子

大腸菌を強制回転させることができる回転電場の周波数、電圧のデータを収集した。まず、大腸菌に与える回転電場の周波数は100 kHz から10 MHz まで試みた。その結果、1 MHz から5 MHz の周波数で大腸菌を回転させることができた。さらに回転電場の周波数を一定にした状態で印可電圧を変化させると、大腸菌の回転速度は印可電圧の二乗に比例していることが計測された。過去の研究から、回転電場によるバクテリアの強制回転において、バクテリアにかかるトルクは印可電圧の二乗に比例することが分かっており、本研究で回転電場の実験系は構築することができたと考える。

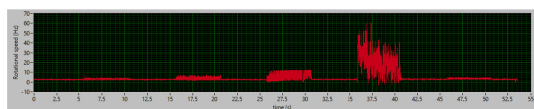


図. 4 回転電場によるモーターの回転速度変化。電場を増やしていくと回転速度が上昇することがわかる。

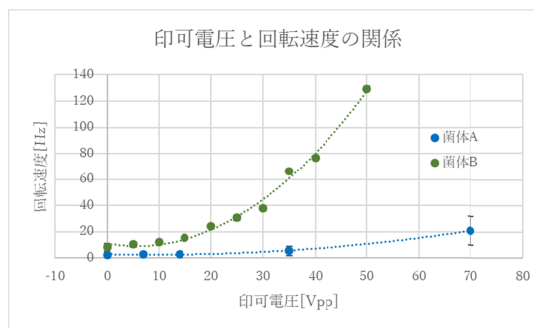


図 5. 異なる菌体での印可電圧と回転速度の関係。理論通り、回転速度は印加電圧の二乗に比例することがわかる。菌体により回転速度が異なるのは菌体のサイズが異なるため

今後、全反射顕微鏡を用いてエバネッセント光をテザードセルに照射することで、べん毛モーターに結合した CheY-GFP のみの蛍光を観察することができる。回転電場によって強制的に回転させた大腸菌の回転速度と、エバネッセント光によって励起された CheY-GFP の蛍光を同時に計測することで、大腸菌の情報伝達フィードバック機構の有無を検証しようと考えている。本研究では大腸菌の回転速度を制御することはできなかった。今後、回転電場による強制回転によって大腸菌の回転速度を制御するためには、回転電場の電圧や周波数の変化に対して、菌体の回転速度ではなく菌体にかかるトルクがどのように変化するかを調べる必要があると考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

Kenta Morishima, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka, Development of simultaneous observation system for flagellar components and motor rotation with external load by electrorotation, 日本生物物理学会熊本年会, 2017 年

〔図書〕(計 3 件)

福岡創, 蔡栄淑, 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, 90-93

福岡創, 蔡栄淑, 石島秋彦, 「生命科学と光学顕微鏡—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, 22-27

福岡創, 蔡栄淑, 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, 3224-3228

〔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

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
なし