

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770157

研究課題名（和文）

超分子複合体の生体膜上における動態を探る：細菌べん毛モーターの構築・機能維持機構

研究課題名（英文）

Investigation about the behavior of supramolecular complex in cell membrane: mechanism for the construction and maintenance of bacterial flagellar motor

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

研究成果の概要（和文）：べん毛モーター構成素子の GFP 融合タンパク質の構築，およびそれらの全反射照明を用いた退色後蛍光回復（Eva-FRAP）を単一モーターで観察することで，細菌べん毛モーターの回転子構成素子が，機能的に回転しているモーターにおいて交換されていることが明らかにされた．またべん毛繊維に付着させた微小ビーズの回転を高速カメラで同時に計測することで，単一細胞上の複数べん毛モーターの回転方向転換が，受容体を基準とした時間差を伴って同調することが分かった．このことから細胞内シグナル伝達分子の濃度上昇および減少が細胞内を波状に伝播することが示唆された．

研究成果の概要（英文）：Expression systems for GFP-FliN, FliM-GFP, and GFP-FliG were constructed, and the functional incorporation was confirmed. In a fluorescently labeled motor by GFP, the recovery of fluorescence after photobleaching by the evanescent light was observed. This is the first evidence for the exchange of rotor components in a functioning bacterial flagellar motor. The rotation of motors of individual *E. coli* cells by combining a high-speed camera and the bead assay method. From this experiment, it was showed that the switching of two different motors on a cell is controlled coordinately by an intracellular signal protein, phosphorylated CheY. From these results, wave-like propagation model of intracellular signal was proposed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理

キーワード：分子モーター，イメージング，バクテリア，一分子計測，イオン

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 ほどの

巨大なタンパク質複合体である．運動器官としてのべん毛は，べん毛繊維，膜に埋め込ま

れたモーター，両者をつなぐフックの3つの部分から構成されており，数十種類のタンパク質が，それぞれ数十分子ずつ重合することで構成される．モーターは複数のリングとロッドで構成される回転子と，その周囲に配置された10個程の固定子から成る．

研究代表者は，これまでに回転子構成因子と緑色蛍光タンパク質（GFP）の融合タンパク質を大腸菌に発現させることで，回転するモーター内で構成素子を可視化すること，また，構築途中のモーターが細胞質膜上で拡散することを明らかにした．これは，べん毛はあらかじめ決まった場所に構築されるのではなく，拡散する構築途中のべん毛構造体が，何らかの要因によって膜内に固定されることを示唆した．また，ビブリオ菌のNa⁺駆動型モーターにおいて，駆動力のNa⁺が，モーター回転だけでなく，固定子のモーターへの組み込みを制御することを明らかにした．これらの先行研究の知見から，モーターを構成する素子が，機能的なモーターに置いても積極的に交換されていること，またその交換が外的要因によって制御されることが示唆されていた．

2. 研究の目的

(1) 流動性に富む細胞膜上において，べん毛の構築部位を決める機構を明らかにする．べん毛モーターがモーターとして機能するために，構築途中のモーターは膜上で拡散している．いつ，どのように固定され，べん毛の構築が続けられるのかを明らかにする．

(2) 超分子複合体であるべん毛モーターの機能維持機構を明らかにする．

従来の解釈では，機能的なべん毛モーター回転子の構成素子は交換されないとされていたが，モーターが細胞内で適切に機能し続けるためには，それらの機能を維持する機構が存在すると考えられた．本研究では機能的回転子構成素子の可視化系を利用し，素子交換反応を可視化する．

3. 研究の方法

(1) べん毛モーター回転子構成素子を緑色蛍光タンパク質（GFP）で蛍光標識し

(GFP-FliN, GFP-FliM, あるいはGFP-FliG), 単一モーターを可視化する系を開発する．

(2) 方法(1)で可視化されたべん毛モーター構造体（構築途中のもの）の細胞膜上で拡散を計測する．

(3) 方法(1)で可視化された単一のべん毛モーターをテザードセル法（べん毛繊維をカバーガラス表面に付着させることで，べん

毛繊維の代わりに細胞が回転する）で観察する．全反射蛍光顕微鏡での観察を組み合わせることで，細胞の回転中心に機能的なモーターがGFPの輝点として観察される．また全反射蛍光顕微鏡下において，全反射照明を用いてモーターに融合させたGFPを退色させ，その後の蛍光回復の過程を観察する（Eva-FRAP法）．

(4) 大腸菌のべん毛繊維に微小ビーズを付着させ，微小ビーズの回転を高速カメラで撮影することで，複数のモーターの回転を同時に計測する．

4. 研究成果

(1) Eva-FRAP法による機能的べん毛モーター構成素子の交換

① 研究方法(1)～(3)で記載した方法を用いて，細胞中のモーターを蛍光観察した結果，1細胞あたり6個程度の固定されたモーターが存在し，また20個程度の構築途中のモーターが細胞膜中で拡散していることが分かった．

② モーター構成素子 FliM-GFP, GFP-FliN の蛍光強度を単一モーターで計測したところ，両者の蛍光強度比が1:4でありこれまでの知見と矛盾しない結果を得た．

③ Eva-FRAP法にてGFP-FliN, FliM-GFP, あるいはGFP-FliGの組み込まれた単一モーターについて退色後の蛍光回復を観察したところ，GFP-FliNあるいはFliM-GFPが組み込まれた機能的なモーターにおいて，退色後の蛍光回復が観察された．以上の結果から生体膜上の生物機械である細菌べん毛モーターの回転子構成素子が，機能的に回転しているモーターにおいて交換されていることが明らかにされた（図1）．

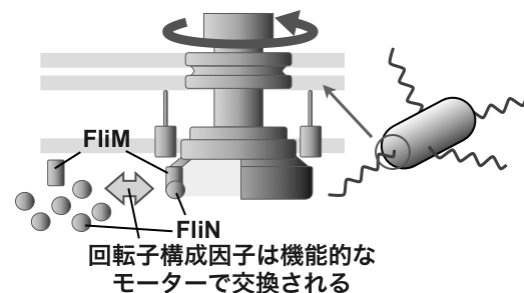


図1

(1)に関する成果はBiochem. Biophys. Res. Commun. (2010) 394:130-135.に掲載された．また Proc. Natl Acad. Sci. (2010) 107:

11151-11152. の Commentary に紹介記事が掲載されたり、Yuan et al. Nature (2012) に引用され彼らの研究の着想に深く関与するなど、海外を含めた研究に広くインパクトを与えた。

(2) 高速カメラを用いた大腸菌複数べん毛モーターの同時回転計測

① 研究方法(4)で記載した方法を用いて、大腸菌の複数べん毛モーターの回転を同時に計測することで、単一細胞上の複数べん毛モーターの回転方向転換が同調することが分かった(図2)。

② 同調したモーター同士の回転方向転換では、受容体からの距離に依存した時間差があることが分かった(図2)。

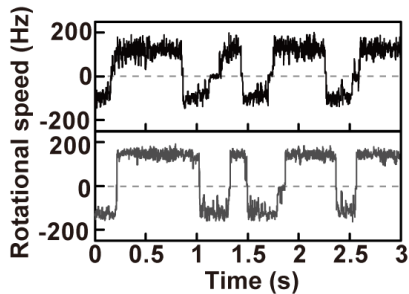


図2

③ ①および②の結果から、大腸菌では、受容体を基準とした細胞内シグナル伝達分子(リン酸化CheY)の濃度増加/減少の方向性を伴った伝播(波状伝播)によって複数のモーターの回転方向転換を制御することを提唱した(図3)。

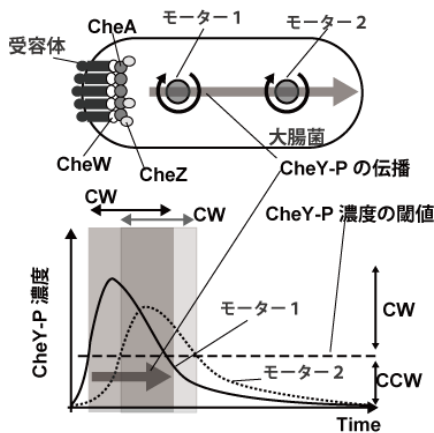


図3

(2)に関する成果は本研究実施の過程で明らかになり、これまでの知見を覆す全く新しい発見であり、当該分野の研究発展において非常にインパクトを与えた。成果はTerasawa and Fukuoka et al. Biophys. J. (2011) 100:2193-2200に掲載された。

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4件)

1. Fukuoka, H., Inoue, Y., Ishijima, A. (2012) Coordinated regulation of multiple flagellar motors by the Escherichia coli chemotaxis system. Biophysics, 8, 59-66. 査読あり。

2. 福岡創 大腸菌複数べん毛モーターの回転方向転換における同期性. (2011) 生物物理, 51, 234-235. 査読あり。

3. Terasawa, S., Fukuoka, H., Inoue, Y., Sagawa, T., Takahashi, H., and Ishijima, A. (2011) Coordinated Reversal of Flagellar Motors on a Single Escherichia coli Cell. Biophys. J., 100, 2193-2200. 査読あり。

4. Fukuoka, H., Inoue, Y., Terasawa, S., Takahashi, H., and Ishijima, A. (2010) Exchange of rotor components in functioning bacterial flagellar motor. Biochem. Biophys. Res. Commun., 394, 130-135. 査読あり。

[学会発表] (計10件)

1. Fukuoka, H., Sagawa, T., Inoue, Y., Takahashi, T., Ishijima, A. Coordinated Regulation of Multiple Locomotive apparatus in a Single Bacterial Cell. International Symposium on Innovative Nanobiodevices ISIN2012, 2012. 3. 21, 名古屋。

2. Fukuoka, H. Role of the polar localization of CheZ for the propagation of intracellular signal in bacterial chemotaxis system. Gordon Research Conferences, Sensory Transduction in Microorganisms, 2012. 1. 17, USA, Ventura.

3. Fukuoka, H., Inoue, Y., Takahashi, H., Ishijima, A. Consideration of the role of CheZ in the intracellular signaling of

Escherichia coli cell. 第49回日本生物物理学会年会, 2011.9.18, 姫路.

4. Fukuoka, H., Terasawa, S., Inoue, Y., Sagawa, T., Takahashi, H., Ishijima, A. Coordinated regulation of flagellar motors on a single Escherichia coli cell. BLAST XI meeting, 2011.1.18, USA, New Orleans.

5. 福岡 創, 清水孝浩, 井上裕一, 高橋泰人, 石島秋彦. 偏光による蛍光分子の配向検出のための顕微鏡構築. 第36回日本生体エネルギー研究会. 2010.11.18, 吹田市.

6. Fukuoka, H., Terasawa, S., Inoue, Y., Takahashi, H., Ishijima, A. Synchronous regulation of multiple flagellar motors on a single Escherichia coli cell. 第48回日本生物物理学会年会, 2010.9.20, 仙台.

7. Fukuoka, H. The monitoring of intracellular signaling in one bacterial cell by the measurement of multiple flagellar rotations. International Symposium of Joint Research Network on Advanced Materials and Devices, 2010.3.25, Hokkaido, Japan

8. 福岡 創. 機能的細菌べん毛モーターにおけるモーター構成素子の交換割合の見積り. 第47回生物物理学会年, 2009.10.31, 徳島.

9. Fukuoka, H. The chemotactic response and correlation of the multiple flagellar motors in a single bacterial cell. International Symposium "Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins Working in Biomembranes". 2009.9.8, Kyoto, Japan.

10. 福岡創. 機能的な生体回転モーターにおけるモーター構成素子交換の可視化. 東北大学バイオサイエンスシンポジウム, 2009.6.16, 仙台

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :

出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

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