

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06097

研究課題名(和文)細胞内タンパク質動態と細胞応答の1細胞同時計測で解き明かす情報伝達機構の基本原則

研究課題名(英文) Clarifying the fundamental principles of signal transduction mechanisms by simultaneous measurement of intracellular protein behavior and cellular responses in a single cell

研究代表者

福岡 創 (Fukuoka, Hajime)

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：50447190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、1細胞計測技術を基盤として『シグナル入力、細胞内タンパク質の動態、細胞応答』までの一連の計測パラメーターを関連つけて大腸菌の走化性情報伝達を定量的な理解を目的とした。本研究では、1)受容体アレイの自発的な活性化がCheRおよびCheBによる受容体のメチル化数の変動で生じることを明らかにした。2)忌避応答時におけるCheBの細胞内動態と細胞行動の1細胞計測により、受容体活性を反映したCheB局在の動的変動を明らかにした。3)CheZとCheY間のFRET変化とべん毛モーター回転方向の1細胞計測によって、誘引刺激に対する細胞内CheYp濃度変化と細胞行動の相関関係を定量化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

『外環境情報を感知・処理し応答する』ことは最も重要な生命現象の一つである。従来は、生物種を問わず情報処理を担う生体分子の機能やそれらの相関図の解明に焦点が当てられてきた一方で、生きた細胞内での情報処理を担うタンパク質の動態(活性、相互作用、数など)を細胞の応答に直接的に結びつけて理解するには至っていない。本研究は、シンプルな情報伝達系である大腸菌の走化性システムを対象に、独自の1細胞計測技術により『シグナル入力、細胞内タンパク質の動態、細胞応答』を同時に計測し、それら計測パラメーターの関連付けによって情報伝達の定量的な理解に繋げた。本研究の成果は生物に共通の情報伝達系の定量的理解に貢献する。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to quantitatively understand chemotaxis signaling in a single E. coli cell by correlating with parameters among signal input, behavior of intracellular protein, and cellular response based on single-cell measurement technique. This study clarified that 1) spontaneous activation of the receptor array is caused by changes in the methylation level of the chemoreceptor by the activity of CheR and CheB. This study also found that 2) by simultaneous measurements of dynamics in CheB and cellular behavior during the repellent response, dynamic changes in CheB localization reflects chemoreceptor's activity. This study also quantified 3) the correlation between the intracellular CheYp concentration change and cellular behavior in response to an attractant stimulus by measuring the FRET change between CheZ and CheY and the rotational direction of flagellar motor.

研究分野：生物学

キーワード：走化性 感覚受容 情報伝達

1. 研究開始当初の背景

『外環境情報を感知・処理し応答する』ことは最も重要な生命現象の一つである。この生命現象は様々なタンパク質が情報処理システムを構成することで達成され、生命の根幹として機能する。従来は、生物種を問わず情報処理を担う生体分子の機能やそれらの相関図の解明に焦点が当てられてきた一方で、生きた細胞内での情報処理を担うタンパク質の動態（活性，相互作用，数など）を細胞の応答に直接的に結びつけて理解するには至っていない。

大腸菌は小さな細胞の中に、高等生物と同じような環境センシング能、情報処理能、情報伝達能、運動能、情報処理システムのリセット能を有しており、これらを駆動し生存している(図1)。従来の研究は、外部シグナル入力に対する応答として、細胞応答（細胞遊泳やべん毛モーターの回転方向）のみ、或いは細胞内のタンパク質動態計測のみなどの単一パラメーターで計測されており、かつ両実験の殆どが細胞集団を対象とした解析がベースとなっていた。しかし真に情報伝達システムを理解するためには、同じ細胞で計測された細胞内のタンパク質動態（活性，局在，相互作用，濃度）と細胞応答の相関関係を理解する必要があった。

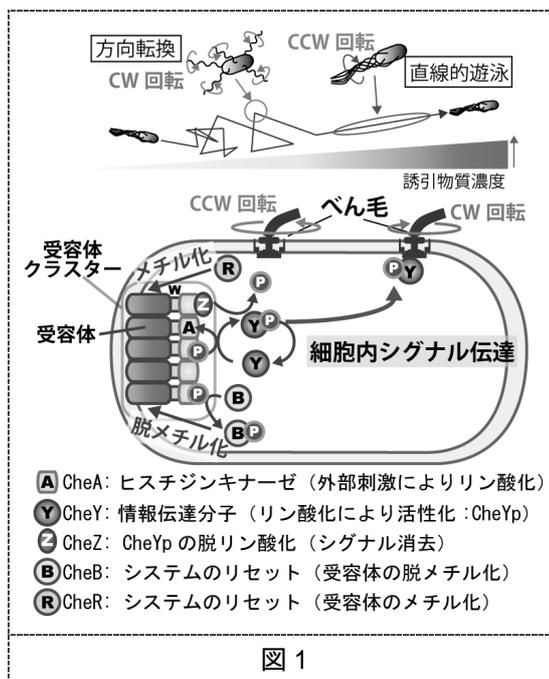


図 1

2. 研究の目的

大腸菌の走化性システムでは、外部シグナルは細胞極にクラスター化した受容体により認識される(図1)。受容体により認識された細胞外シグナルは、受容体の細胞質ドメインに結合したヒスチジンキナーゼ-CheA のリン酸化状態に変換される(細胞内情報に変換)。CheA のリン酸基は情報伝達タンパク質 CheY に転移され(CheYp), CheYp はべん毛モーターに結合し、モーターの回転方向を反時計(CCW)回転から時計(CW)回転に変換する(細胞遊泳の制御)。走化性システムの活性化状態は適応システムによって常にフィードバック制御をうけている。受容体脱メチル化酵素 CheB は CheA よりリン酸基を受け取り(CheBp), CheBp が受容体を脱メチル化することで走化性システムを OFF 状態へ移行させる。一方受容体メチル化酵素 CheR は受容体をメチル化することで走化性システムを ON 状態へ移行させるようとする。この CheB / CheR による受容体メチル化レベルのフィードバック機構によって、走化性システムを外部シグナル受容前にリセットしている。本研究は、よりシンプルな情報伝達系である大腸菌の走化性システムを定量的に理解するために、独自の1細胞計測技術を基盤として、1)入力シグナルの制御、2)細胞内タンパク質動態の直接計測、3)細胞応答の計測を、『同時かつ1細胞で』行い、得られた複数のパラメーターを統合的に解析し、『シグナル入力 細胞内タンパク質の動態 細胞応答』までの一連の計測パラメーターを全て関連づけて解釈することを目的とした。

3. 研究の方法

無刺激環境下における走化性受容体クラスターの自発的活性化

大腸菌は、受容体やヒスチジンキナーゼなど数万分子から成る受容体クラスター化し規則的なアレイ(受容体アレイ)を細胞極に形成する(図1)。これまでの研究で、無刺激環境下において受容体アレイの自発的な活性化/不活性化(Array blinking)が CheYp 濃度の揺らぎを生じさせ、その揺らぎが同一細胞上のべん毛モーターの回転方向転換を同調させることを示してきた(Terasawa et al. 2011, Che et al. 2020)。無刺激環境下における Array blinking のメカニズムを解明するために、さまざまなメチル化レベルの受容体変異体、ならびに CheR, CheB の変異体の発現細胞において、同一細胞上の二つのべん毛モーターの回転方向転換の同調性を高速カメラで計測した(図2)。

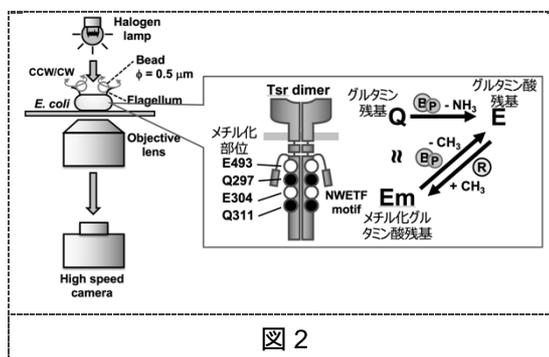


図 2

走化性タンパク質 CheB の細胞内動態とのべん毛モーターの同時計測

忌避刺激に対する CheB の細胞内動態(細胞極への局在の時間変化)ならびに実際の細胞行動(べん毛モーターの回転方向変化)を定量解析した。セリン受容体 Tsr, CheB-GFP の発現細胞に対し忌避刺激としてイソロイシンを添加し, CheB-GFP の細胞内局在とべん毛モーターの回転方向を『同一細胞』で『同時』に計測した。観察には GFP の緑色蛍光とべん毛繊維に付着させた微小ビーズ(赤色光による明視野像)を2台のカメラで同時に観察可能な顕微鏡システムを開発し用いた(図3)。

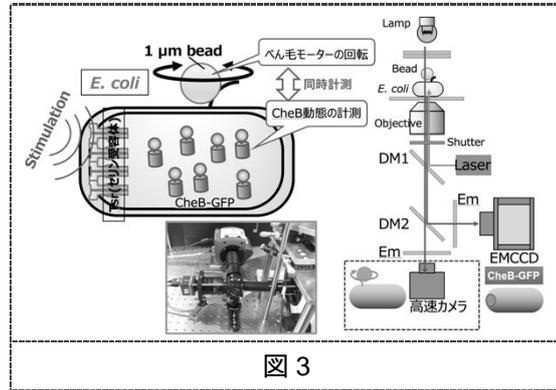


図3

FRET による細胞内情報伝達タンパク質 (CheYp)濃度とべん毛モーターの同時計測

誘引刺激に対する CheY-YFP と CheY-CFP 間の FRET 変化 (FRET ratio) ならびに実際の細胞行動(べん毛モーターの回転方向変化)を定量解析した。CheY-YFP と CheY-CFP の発現細胞に対し誘引刺激としてセリンを添加し, FRET ratio とべん毛モーターの回転方向を『同一細胞』で『同時』に計測した。観察には YFP および CFP の蛍光を1台のカメラで検出可能な Double View 光学系とべん毛繊維に付着させた微小ビーズ(赤色光による明視野像)を同時に観察可能な顕微鏡システムを開発し用いた(図4)。

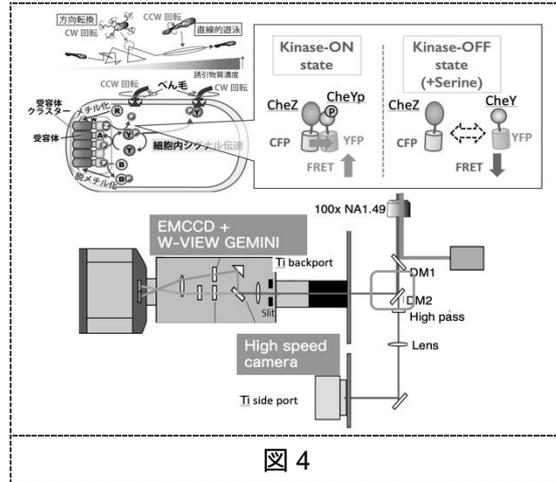


図4

4. 研究成果

無刺激環境下における走化性受容体クラスターの自発的活性化

大腸菌は、受容体やヒスチジンキナーゼなど数万分子から成る受容体クラスター化し規則的なアレイ(受容体アレイ)を細胞極に形成する(図1)。これまでの研究で、無刺激環境下において受容体アレイの自発的な活性化/不活性化(Array blinking)が CheYp 濃度の揺らぎを生じさせていることを示してきた(Terasawa et al. 2011, Che et al. 2020)。本研究において、この Array blinking が、走化性システムの適応反応を担う CheR ならびに CheB を介した受容体のメチル化レベルの変動が、この受容体クラスターの自発的な活性化/不活性化を生じさせていることを明らかにし(図5)、この成果を論文としてに発表した(Uchida et al. 2022 J. Bacteriol.)。

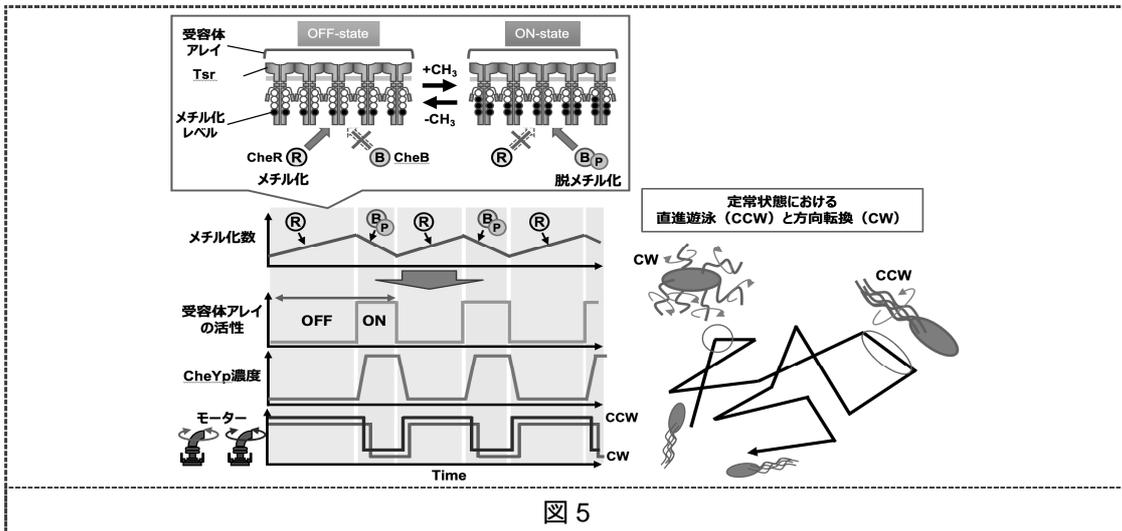


図5

走化性タンパク質 CheB の細胞内動態とのべん毛モーターの同時計測

上述のように CheB は走化性シグナル伝達システムにおいてシステム活性のリセット(適応)を担っている。我々はシグナル入力に対して適応酵素 CheB の受容体への結合がダイナミックに変動することを見出し、本研究において忌避刺激(イソロイシン)に対する CheB の細胞内動態(細胞極への局在の時間変化)ならびに実際の細胞行動(べん毛モーターの回転方向変化)を定量解析した。その結果、(1) CheB の受容体への結合(局在)の持続時間が忌避刺激の強度に依存する

こと、(2) 局在の持続時間と細胞応答 (CW 回転の持続時間) が一致すること、を明らかにした (図 6 左). CW 回転の持続時間は細胞内情報伝達タンパク質の CheYp 量を反映する指標であり、CheB の局在持続時間と CW 回転の持続時間が一致したことは、CheB の局在は受容体アレイの活性化状態を反映することがわかった. この結果は CheB の局在変化を通じて受容体活性をイメージングできることを意味しており、本研究での重要な研究成果の一つである. また (3) CheB の局在から受容体活性化時 (忌避刺激時) における CheB の局在数の定量化に初めて成功した (4) 様々な受容体アレイ変異体を用いて忌避刺激時の CheB 局在とべん毛モーター回転を同時計測することによって、忌避刺激への応答時 (システムの活性化) ならびに適応時 (システムの不活化) と CheB の結合ターゲット、反応プロセスの詳細を定量解析することができた (図 6 右). この研究成果は論文として国際学術雑誌へ投稿し、現在査読中である.

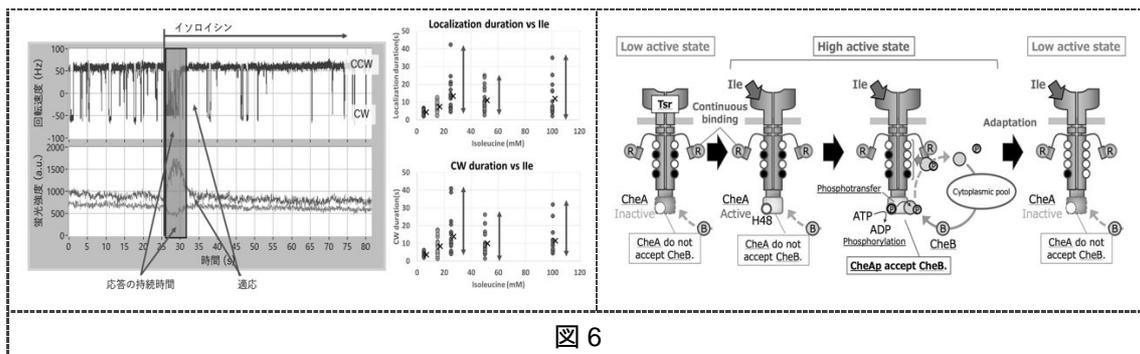


図 6

FRET による細胞内情報伝達タンパク質 (CheYp) 濃度とべん毛モーターの同時計測

上述のように CheY は走化性シグナル伝達システムにおいて情報伝達タンパク質として、受容体アレイで感知したシグナルをべん毛モーターへ伝達し、モーターの回転方向を CW 方向へ変換させる. 細胞内の情報伝達タンパク質はリン酸化状態の CheY (CheYp) により行われるため、生細胞における情報伝達の定量解析では CheY と CheYp を区別する必要がある. 既往の研究によって CheYp と CheZ (CheYp の立つリン酸化酵素) の結合を FRET により可視化することで、CheYp の濃度変化をモニターできることが知られている (Soujik & Berg 2022 PNAS). 本研究では、走化性刺激に対する CheZ-CFP と CheY-YFP 間の FRET 変化とべん毛モーターの回転方向を、『1 細胞』かつ『同時に』計測することで、生理的条件下における細胞内 CheYp 濃度変化と細胞行動の相関関係を定量化した. その結果、(1) 生理的条件下における誘因刺激 (セリン) に対する応答反応と適応反応を、CheYp 濃度変化と細胞行動の両面からの計測に成功した. (2) 誘因刺激後の CheYp 濃度の回復時間と細胞行動の適応時間がほぼ同一であることを明らかとした. 以上成果についても、国際学術雑誌へ論文として発表するために準備を行っている. また、今後の発展として、野生型大腸菌が 5 種類の受容体をクラスター化した異種混合受容体アレイを形成する生理学的意義を検証するために、単一種受容体による受容体アレイとの比較検証を継続的に進めている.

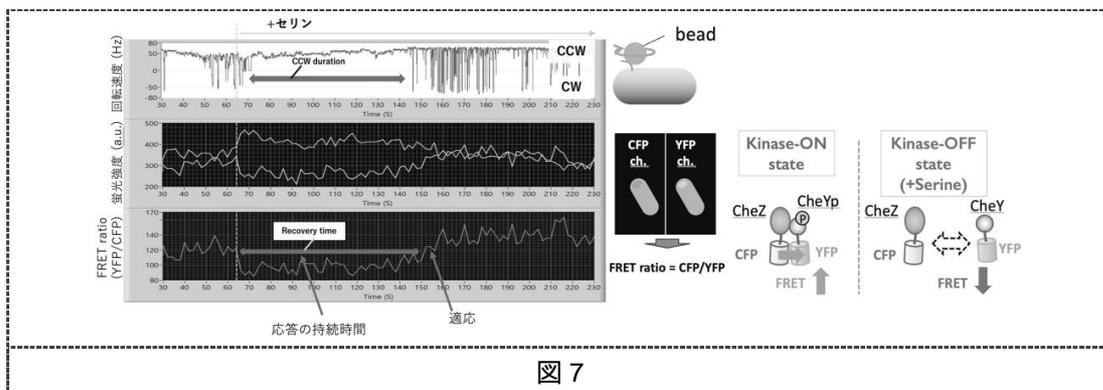


図 7

外部シグナル入力、FRET 検出、および細胞応答計測を可能とする顕微鏡システムの開発

本研究では外部シグナルを入力するための方法として、(1) 電気浸透流を利用したマイクロピペット法、(2) ペリスタポンプを使った溶液交換チャンパー、を検討した. マイクロピペット法では、セリン放出に依存して野生型大腸菌がマイクロピペット先端に集まる様子、ならびにセリン放出の停止に依存してマイクロピペットから離散する様子が観察され、両反応の時定数を見積った (集合: 約 30s. 離散: 約 20s). 外部刺激の入力系として有用性が確かめられたため、今後、様々な顕微鏡システムへの導入を検討している. 溶液交換チャンパーでは、ピペットからチャンパー入口に滴下した誘因物質あるいは忌避物質を含むバッファーをペリスタポンプでチャンパー出口から吸い出すことにより、数秒 - 数十秒でチャンパー内の溶液が可能となった. このチャンパーは、本研究 (忌避刺激の強度に対する CheB 局在持続時間および CW 回転の持続時間の計測) に用いられた.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yumiko Uchida, Tatsuki Hamamoto, Yong-Suk Che, Hiroto Takahashi, John S. Parkinson, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka	4. 巻 204
2. 論文標題 The Chemoreceptor Sensory Adaptation System Produces Coordinated Reversals of the Flagellar Motors on an Escherichia coli Cell	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e0027822
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jb.00278-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計25件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hajime Fukuoka, Yumiko Uchida, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima
2. 発表標題 大腸菌単一細胞における走化性応答時の走化性タンパク質の細胞内動態の観察
3. 学会等名 第61会日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yumiko Uchida, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 デコンボリューション法を用いた大腸菌走化性受容体の三次元観察
3. 学会等名 第61会日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Saki Ueda, Yumiko Uchida, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 同種の受容体からなる受容体アレイがもたらす短い適応時間
3. 学会等名 第61会日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taketo Oshima, Yumiko Uchida, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 適応を担う2種類の酵素であるCheRとCheBの細胞内動態の比較
3. 学会等名 第61会日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinnosuke Kawahara, Yumiko Uchida, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 Exploration of isoleucine recognition sites in chemoreceptor using chimeric receptors
3. 学会等名 第61会日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taisei Miyamoto, Yumiko Uchida, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 回転方向に依存した大腸菌べん毛モーターの回転ゆらぎ
3. 学会等名 第61会日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福岡 創
2. 発表標題 CheB-GFPの1細胞動態計測による大腸菌セリン受容体 Tsr の忌避刺激認識および情報伝達の解析
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議 2024
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内田裕美子, 石島秋彦, 福岡創
2. 発表標題 大腸菌べん毛モーターの回転ゆらぎ
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議 2024
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 福岡 創
2. 発表標題 大腸菌べん毛の回転方向に依存した揺らぎとフックの関係
3. 学会等名 2023 年度べん毛研究交流会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kazumi Akahoshi, Yumiko Uchida, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 Investigation for the cause of rotational fluctuations depending on the rotational direction of flagellar motor
3. 学会等名 第60回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taiga Deguchi, Yumiko Uchida, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Tatsuki Hamamoto, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 Repellent response and adaptation through the CheB-localization in single E. coli cell
3. 学会等名 第60回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sawako Matsuda, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Masaru Kojima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 Analysis for the effect of CheZ localization on chemotaxis of Escherichia coli by capillary assay
3. 学会等名 第60回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinnosuke Kawahara, Yumiko Uchida, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 Comparison of responses to repellent stimulus at heterogeneous MCPs through polar localization of CheB
3. 学会等名 第60回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yumiko Uchida, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima, Yong-Suk Che
2. 発表標題 Estimation of mutant/WT receptors ratios in receptor array that disrupts the switching coordination between flagellar motors of E. coli
3. 学会等名 第60回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Takada, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka, Yong-Suk Che
2. 発表標題 Two behaviors of adaptation by cooperative action of a single E. coli receptor to low concentrations of serine using FRET measurement
3. 学会等名 第60回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福岡 創
2. 発表標題 走化性受容体脱メチル化酵素 CheB の局在変化を通じた忌避応答反応過程の考察
3. 学会等名 2023年 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima
2. 発表標題 QUANTIFICATION OF REPELLENT RESPONSE THROUGH THE CHEB- LOCALIZATION AND REVERSALS OF FLAGELLAR MOTOR IN SINGLE E. COLI CELL
3. 学会等名 BLAST XVII
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tatsuya Nakaue, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 Observation of behavior of flagella in Escherichia coli by using fluorescence staining
3. 学会等名 第59回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirotto Kozono, Yong-Suk Che, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima
2. 発表標題 Search for domain in chemoreceptor to cause coordination of rotational switching between flagellar motors
3. 学会等名 第59回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yumiko Uchida, Tatsuki Hamamoto, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 Change in methylation level in receptor array causes coordinated reversal of flagellar motors on a single Escherichia coli cell
3. 学会等名 第59回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shiori Awa, Yumiko Uchida, Hajime Fukuoka, Akihiko Ishijima, Yong-Suk Che
2. 発表標題 Quantification for mutant/WT receptors ratio that collapses receptor cooperativity and switching coordination between flagellar motors
3. 学会等名 第59回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taro Yuri, Yumiko Uchida, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 High temporal observation of CheY-binding and dissociation during rotational switching of a single flagellar motor
3. 学会等名 第59回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohiro Teshima, Yumiko Uchida, Yong-Suk Che, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka
2. 発表標題 Simultaneous measurement for the stator-incorporation and the flagellar motor rotation
3. 学会等名 第59回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福岡 創
2. 発表標題 大腸菌べん毛の回転方向に依存した揺らぎ
3. 学会等名 2022年 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福岡 創
2. 発表標題 忌避シグナル導入におけるCheBの細胞内動態とべん毛モーター回転の同時計測
3. 学会等名 2021 年度べん毛研究交流会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関