

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32675

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657108

研究課題名(和文)細菌膜蛋白質複合体の分子配列メカニズムに関する光学・電子顕微鏡複合解析

研究課題名(英文)Optical and electron microscopic analyses on arrangements of bacterial membrane protein complexes

研究代表者

川岸 郁朗 (KAWAGISHI, Ikuro)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：80234037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光学顕微鏡と電子顕微鏡を相関的に用いるアプローチにより膜内粒子を同定し、その局在、分子配置、および環境変化に応じたそれらの制御を明らかにすることを目指した。主要な対象として、内膜の極で巨大クラスターを形成する走化性受容体、内膜と外膜を貫く異物排出トランスポーター複合体を選定した。その結果、走化性受容体の局在・膜内動態、走化性受容体クラスターの構造とその制御について、解析系を開発し、重要な知見を得た。また、走化性受容体発現による細胞膜構造の変化、異物排出トランスポーター複合体由来の細胞表層構造に関して電子顕微鏡解析を行い、手法の改良を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed at identifying intra-membrane particles of *Escherichia coli* and characterizing their localization, arrangement and their regulation in response to environmental changes. We focused on chemoreceptors, which form a huge cluster at a pole of the inner membrane, and xenobiotic efflux complexes, which bridge the inner and the outer membranes. We obtained valuable findings concerning localization, membrane dynamics and cluster structure of chemoreceptors using improved protocols of fluorescence microscopic observations. Quick-freezing replica and ultra-thin section electron microscopic analyses were also carried out to characterize chemoreceptors and xenobiotic efflux complexes.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞膜 膜蛋白質 大腸菌 蛍光顕微鏡 電子顕微鏡 凍結切断レプリカ法

## 1. 研究開始当初の背景

大腸菌は、生命システム全体の働きを分子レベルで理解するのに適したモデル生物である。しかしその細胞は小さく、細胞生物学的解析は困難であり、とくに細胞表層系の構造-機能相関の理解は立ち遅れている。大腸菌の細胞表層は内膜・細胞壁(ペプチドグリカン)を含むペリプラズム空間・外膜の三層からなる。このいずれも決して均一ではない。少なくとも内膜蛋白質のいくつかは、さまざまな場所に局在したり、クラスターを形成したりする。例えば、走化性受容体は極に局在する。また、例えば、ある種の異物排出ポンプは三層全てを貫く蛋白質複合体である。細胞壁という強固な構造を貫通しているため、構築後は膜中でほぼ固定され、内膜と外膜をつなぎ止めると推定される。これらの膜蛋白質複合体が、正確には膜内のどこにあり、どのように振る舞うのか、どのタイミングで形成・分解されるのか、クラスター内での蛋白質の配置はどのように制御されているのかなどについては、ほとんどわかっておらず、手法の開発を含めて、この点を明らかにすることが望まれた。

また、光学顕微鏡と電子顕微鏡を相関的に用いるアプローチ(Correlative Light Electron Microscopy, CLEM)には、多くの関心が集まっていた。Tetra-cysteine (TC) タグ(+ ReAsH 標識)や GFP タグによって対象蛋白質の細胞内動態を蛍光顕微鏡で把握し、一方、超薄切片試料上でこれら蛍光標識による DAB の光酸化反応で形成させた微小沈着から、対象蛋白質の細胞内局在を電子顕微鏡像として捉え、両顕微鏡からの情報を統合して扱えることが示されている[Gaietta et al. (2002); Grabenbauer et al. (2005)]。しかし、実際に電子顕微鏡観察の方も行っている応用例はまだ数少ない。その試料作製法としては超薄切片に限られている。CLEM の電子顕微鏡側試料として超薄切片ではなく凍結切断レプリカを用いて新たな展開を図ることは原理的には可能であり、レプリカの方が高コントラストかつ高倍率の(見やすい)細胞像の上で対象蛋白質の存在を明確化できるはずと予測された。凍結切断レプリカによる CLEM への挑戦例が未だ実証されていない理由は、凍結切断レプリカを実施できる実験室が世界的にも希少であることと、この方法に適した GFP タグや TC タグの発現系がうまく作れていないためと考えられた。そこで、本研究課題では、大腸菌を対象として、蛍光顕微鏡観察と凍結切断レプリカ法を実践してきた研究者どうしが共同研究を行うことで、難題に挑戦した。

## 2. 研究の目的

われわれは、緑色蛍光蛋白質(GFP) で標識した走化性受容体が、合成後菌体側面に出現し、やがて極へ移動することを見出していた。また、この解析の過程で蛋白質膜挿入装置

(Sec 複合体)がらせん状に配列していることを発見した。一方、凍結切断レプリカ法を用いた電子顕微鏡観察により、内膜に格子状配列構造やクレバス状の切れ込み(らせん形)、内膜と外膜を橋渡しするロッド状の構造体を見出していた。

以上の予備的結果を踏まえ、本研究では、光学顕微鏡と電子顕微鏡を相関的に用いるアプローチにより膜内粒子を同定し、その局在、分子配置、および環境変化に応じたそれらの制御を明らかにすることを目指した。主要な対象として、内膜の極で巨大クラスターを形成する走化性受容体、内膜と外膜を貫く異物排出ポンプを選定した。これらは、研究代表者が解析してきた実績もあり、周辺情報も豊富なためである。

## 3. 研究の方法

大腸菌の膜蛋白質のうち、内膜の極で巨大クラスターを形成する走化性受容体、内膜と外膜を貫く異物排出ポンプに焦点を当てる。それぞれの蛋白質に tetra-cysteine (TC) タグを付加し、TC 配列に共有結合すると赤色蛍光を発する ReAsH により標識する。これを落射型および全反射蛍光顕微鏡により観察し、局在・動態を解析する。これと並行して、凍結切断レプリカ法を用いてさまざまな変異株の膜内粒子の電子顕微鏡観察を行う。蛍光顕微鏡観察のできた ReAsH 標識蛋白質については、DAB 光酸化反応により微小沈着を形成させて電子顕微鏡観察を行い、膜内粒子の同定、その分子配置の解析を行う。

(1) 走化性受容体の ReAsH による標識法の確立: まず、TC 配列導入走化性受容体を構築し、FlAsH, ReAsH (TC 配列に結合すると赤色蛍光を発する)を反応させ、落射型蛍光顕微鏡により GFP 融合体と比較しながら局在を観察した。標識効率等を最適化するための条件検討も行った。さらに、TC 配列導入受容体を厳密に発現誘導できる系も構築した。

(2) GFP 融合および ReAsH 標識走化性受容体の TIRFM による観察: GFP 融合受容体を発現させ、1細胞を連続的に観察することにより、誘導後の蛍光の挙動を追った。また、極への移動および滞在の過程を高時間分解能・高空間分解能でリアルタイム解析するため、全反射蛍光顕微鏡を用いたイメージングも行った。また、TC 配列導入受容体を発現させ FlAsH, ReAsH で標識後連続に連続観察することも試みた。

(3) 内膜-ペリプラズム空間-外膜を貫く異物排出ポンプの ReAsH による標識: 外膜チャネル TorC および内膜トランスポーター AcrB に TC 配列導入し、ReAsH で標識した。標識できれば、落射型および全反射蛍光顕微鏡による観察を行った。

(4) 凍結割断レプリカ法による観察：走化性受容体欠失株と高発現株、外膜チャンネル TorC 欠失株と高発現株を用いて、凍結割断レプリカ法による試料を調製し、電子顕微鏡観察を行った。比較のために、超薄切片試料も調製し、電子顕微鏡観察を行った。

#### 4. 研究成果

大腸菌内膜で巨大クラスターを形成する走化性受容体、内膜と外膜を貫く異物排出トランスポーター複合体に焦点を当てた解析を行い、以下の結果を得た。

(1) 走化性受容体の局在・膜内動態：まず、走化性受容体 Tar と GFP の融合蛋白質を染色体上から発現する菌株を構築し、落射型蛍光顕微鏡観察を行った。同じ融合蛋白質をプラスミドから発現させた場合に比べ、免疫電子顕微鏡・間接蛍光抗体法などの結果とよく一致する局在を示した。これを、全反射型蛍光顕微鏡で観察し、受容体膜内動態を解析できる系を構築した。この株に変異を導入することにより、Che 蛋白質の影響を解析した。その結果、受容体が内膜の細胞側面領域に挿入された後、徐々に大きなクラスターを形成し、極へと移行することが示唆された。

また、TC 配列導入受容体 Tar に FlAsH (TC 配列に結合すると緑色蛍光を発する) および ReAsH (TC 配列に結合すると赤色蛍光を発する) を反応させ、落射型蛍光顕微鏡により局在を観察した。GFP 融合体よりコンパクトなクラスターが観察できるようになった。電子顕微鏡観察のために DAB 標識を行ったが、成功しなかった。

(2) 走化性受容体クラスターの構造とその制御：全走化性受容体遺伝子欠失株に Cys 置換変異受容体 Tar と Tsr を発現させ、Tar-Tsr 間架橋形成を検出する系を確立した。この結果、異種受容体が混合クラスターを形成すること、リガンド存在下で異種受容体どうしの配置が変化することが示唆された。

(3) 走化性受容体発現による細胞膜構造の変化：Tar, Tar-GFP, Tar-TC を全受容体遺伝子欠失大腸菌株に発現させ、凍結割断レプリカ法により内膜の微細形態を観察した。より詳細な解析の結果、Tar の局在場所と無粒子領域には直接の相関が見られなかった。

(4) 異物排出トランスポーター複合体由来の細胞表面構造：内膜と外膜を貫く構造体として異物排出トランスポーターと外膜チャンネル TolC の複合体の検出を試みた。具体的には、tolC 欠失株と相補株から、凍結割断レプリカおよび超薄切片試料を調製し、電子顕微鏡で観察した。しかし、両株間ではっきりとした構造の違いはみられず、TolC 由来構造を見出すには至らなかった。

#### 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 1 件)

Hiremath, G., Hyakutake, A., Yamamoto, K., Ebisawa, T., Nakamura, T., Nishiyama, S., Homma, M., and Kawagishi, I.: Hypoxia-induced localization of chemotaxis-related signaling proteins in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **95**: 780-790 (2015). 【査読有】

[学会発表](計 8 件)

Kawasaki, K., Inaba, T., Kobayashi, E., Nishiyama, S., and Kawagishi, I.: A quick-freezing replica electron microscopic analysis for the localization of chemoreceptors on bacterial inner membranes. 日本生物物理学会第 52 回年会, 2014 年 09 月 25 日~27 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市).

川崎一則, 稲葉岳彦, 小林恵美子, 西山宗一郎, 川岸郁朗: 大腸菌内膜における走化性レセプター Tar の局在性に関する急速凍結レプリカ電子顕微鏡法による検討. 第 11 回 21 世紀大腸菌研究会, 2014 年 06 月 05 日~06 日, ホテル大観(岩手県盛岡市).

小池 志津香, 稲葉 岳彦, 川岸 郁朗: 大腸菌走化性受容体 Tar とヒスチジンキナーゼ CheA の複合体形成の可視化. 第 96 回日本細菌学会関東支部総会, 2013 年 10 月 31 日~11 月 01 日, 東京ドームホテル(東京都文京区).

Kawasaki, K., Inaba, T., Kobayashi, E., Nishiyama, S., and Kawagishi, I.: A quick-freezing replica study on morphological changes in the bacterial inner membrane induced by chemoreceptor expression. 日本生物物理学会第 51 回年会, 2013 年 10 月 28 日~30 日, 京都国際会館(京都府京都市).

川崎一則, 稲葉岳彦, 小林恵美子, 西山宗一郎, 川岸郁朗: 走化性レセプター Tar の発現による大腸菌内膜の構造変化—急速凍結レプリカ電子顕微鏡法による検討. 第 10 回 21 世紀大腸菌研究会, 2013 年 06 月 20 日~21 日, ラフォーレ修善寺(静岡県伊豆市).

Yamamoto, K., Inaba, T., Sowa, Y., and Kawagishi, I.: Intracellular dynamics of the xenobiotic efflux proteins in

*Escherichia coli*. 日本生物物理学会第50回年会, 2012年09月22日~24日, 名古屋大学(愛知県名古屋市).

Watanabe, T., Jintori, K., Irieda, H., and Kawagishi, I.: Characterization of receptor clustering by cross-linking a series of cysteine-substituted mutants of the aspartate chemoreceptor Tar. 日本生物物理学会第50回年会, 2012年09月22日~24日, 名古屋大学(愛知県名古屋市).

玉井 怜, 山本健太郎, 稲葉岳彦, 曾和義幸, 川岸郁朗: 大腸菌 RND 型多剤排出トランスポーターAcrD の蛍光分子イメージング. 第9回21世紀大腸菌研究会, 2012年06月21日~22日, 長浜ロイヤルホテル(滋賀県長浜市).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川岸 郁朗 (KAWAGISHI, Ikuro)  
法政大学・生命科学部・教授  
研究者番号: 8 0 2 3 4 0 3 7

### (2) 研究分担者

川崎 一則 (KAWASAKI, Kazunori)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・バイオメディカル研究部門・主任研究員  
研究者番号: 4 0 3 5 6 8 3 7