

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



研究ノート

福岡 創*, 蔡 栄淑**, 石島 秋彦***

Mechanism of Signal Transduction Clarified by Simultaneous Measurement for Behavior of Chemotaxis Proteins and the Cellular Response under Single *E. coli* cell.

Key Words : Chemotaxis Signal Transduction *E. coli*

はじめに

大腸菌は小さな単細胞生物にも関わらず、個々の細胞が走化性システムという情報伝達システムを用いて環境中を探索する。つまり大腸菌は高等生物と同様に、高度な環境センシング能、情報処理能力、情報伝達機能、運動能（べん毛モーター）を有しており、これらを巧みに駆動して目的地へ到達する（図1A）。従来の研究の多くは、細胞の行動（遊泳）の解析、走化性を担う細胞内の生体分子の同定、それ



* Hajime FUKUOKA

1977年9月生まれ
名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻博士後期課程（2005年）
現在、大阪大学大学院 生命機能研究科 准教授 博士（理学） 生物物理
TEL : 06-6879-4429
FAX : 06-6879-4429
E-mail : fhajime@fbs.osaka-u.ac.jp



** Yong-Suk CHE

1979年2月生まれ
大阪大学 大学院生命機能研究科 博士後期課程 卒業（2008年）
現在、大阪大学 大学院生命機能研究科 助教 博士（理学） 生物物理
TEL : 06-6879-4429
FAX : 06-6879-4429
E-mail : cheyong@fbs.osaka-u.ac.jp



*** Akihiko ISHIJIMA

1961年9月生まれ
早稲田大学 大学院理工学研究科 物理学及び応用物理学専攻 修士課程 卒業（1986年）
現在、大阪大学 大学院生命機能研究科 教授 博士（工学） 生物物理
TEL : 06-6879-4650
FAX : 06-6879-4429
E-mail : ishijima@fbs.osaka-u.ac.jp

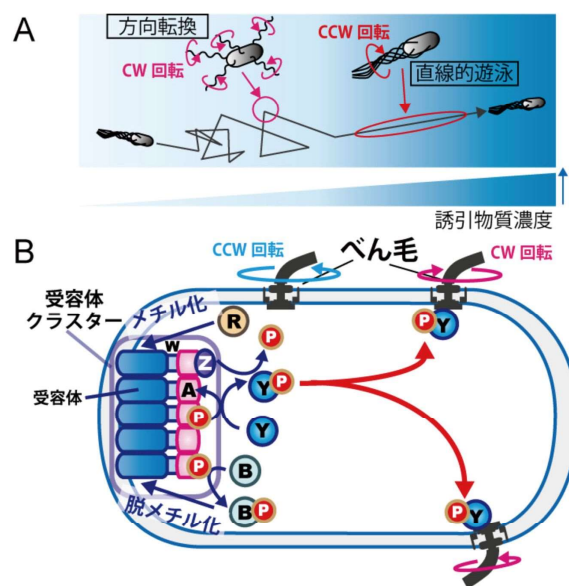


図1 大腸菌走化性システム. A, CheA. B, CheB, R, CheR, W, CheW, Y, CheY, Z, CheZ, P, リン酸基.

らの機能解析や相互作用解析に焦点が当てられ、それぞれ個別の実験で調べられたり、試験管のような均一かつ安定した条件で実験されてきた。しかし細胞内は試験管内のような均一な環境ではなく、また同一環境で育った細胞でも、それぞれの細胞ではタンパク質の発現量などが異なるため、試験管内で得られた実験結果をそのまま生きた細胞に当てはめることは難しい。我々は大腸菌の走化性システムを、システムを担うタンパク質の生細胞内での動態と細胞の応答を、1細胞レベルで、かつ同時に計測し、それらの定量的情報に基づきシステムを理解することを目指してきた。ここでは、我々の最近の研究結果を基に、刺激のない安定した環境下における大腸菌の情報伝達の原理について考察したい。

大腸菌の走化性

大腸菌は好ましい環境へ移動し、好ましくない環

境からは逃避する。この行動は走化性とよばれ、運動器官のべん毛モーターの回転方向を走化性システムで制御することで達成される (図1B) (1, 2)。外環境シグナルは細胞極に局在する走化性受容体によって認識され、受容体は入力シグナルに応じて受容体に結合したヒスチジンキナーゼ CheA の自己リン酸化活性を調節する。走化性受容体, CheA, CheW は、それぞれ数千~数万分子が細胞極で重合し、高度に規則的なアレキ構造を形成する (受容体クラスター)。CheA のリン酸基は速やかに応答制御因子 CheY へ転移され、リン酸化 CheY (CheY-P) 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時計方向 (CW) 回転を引き起こす (3)。一方、受容体の活性が誘引物質などによって抑制されると、CheA の自己リン酸化が停止し、CheY-P 産生も停止する。CheY-P は受容体クラスターに結合した CheZ により脱リン酸化され、細胞内の CheY-P 濃度が減少する。そして CheY-P の解離によってべん毛モーターの回転方向が反時計回転に戻る。

また、受容体は $1\mu\text{M}$ – 100mM もの広いレンジの濃度差を感知できる (一般的な結合・解離現象では化学物質の濃度差は一桁程度しか感知できない) (4, 5)。これには「協同性」および「適応」が大きく関わっている。大腸菌の受容体クラスターは、その構成タンパク質が協同的に働くことにより、ごく微量の化学分子の結合を増幅して伝える。また、一度外界の分子に反応すると、その分子に反応しなくなる「適応」とよばれる機能を有しており、走化性システムをリセットしている (2, 6)。適応には受容体のメチル化が関わっており、受容体のメチル化レベルと受容体の活性の相関が示されている。受容体のメチル化レベルは、脱メチル化酵素 CheB, メチル化酵素 CheR によって調節されており、受容体の活性化状態に応じて、受容体のメチル化レベルを制御するフィードバック機構となっている。

細胞内シグナル伝達分子 CheY の細胞内動態とべん毛モーター回転方向の同時計測

上述のように CheY-P はべん毛モーターに結合してモーターの CW 回転を引き起こすと記述したが、我々が研究を開始した時点では、様々の間接的な実験結果からの推測に過ぎず、CheY-P の結合・解離

によるべん毛モーターの回転方向転換が機能的なモーターで本当に起こっているかは分かっていなかった。そこで我々は、緑色蛍光タンパク質による CheY の蛍光イメージング (CheY-GFP) と、モーターの回転方向転換を同時に計測するための顕微鏡システムの開発を行った (図2) (3)。CheY-GFP の細胞内局在とテザードセルの回転を同時に計測した結果、モーターの回転方向転換が CheY の結合・解離によって直接制御されることを、生きた1細胞内の機能的な単一べん毛モーターで実証することができた。また CheY 分子は必ずしもモーター基部体のすべての結合部位 (34 箇所) に結合する必要はなく、 13 ± 7 個の結合で CW 回転が起こることや、回転方向転換時に CheY 分子は 100 ms 以内にモーターと結合・解離するなどの定量値を求めることができた。

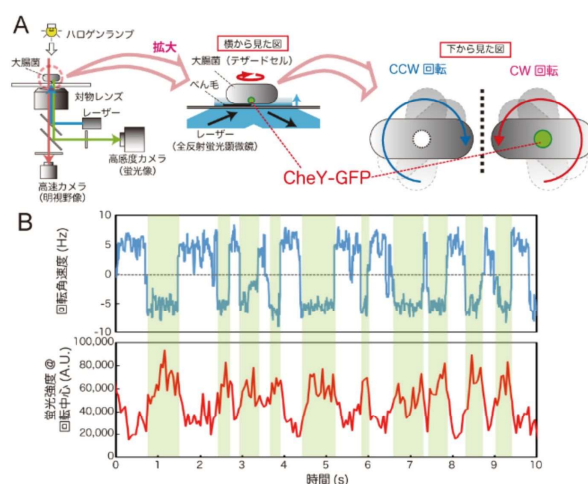


図2 CheY-GFP の結合解離とべん毛モーター回転方向の同時計測

単一細胞上の複数べん毛モーター回転の同時計測

我々の研究室では、大腸菌1細胞の走化性応答を高時間・空間分解能での計測によって、ミリ秒で起こる細胞応答や細胞内のタンパク質の結合・解離や酵素活性の定量的な解析から、細胞内の情報伝達のメカニズムを理解しようとしている。走化性システムの最終的な出力はべん毛モーターの回転方向であり、短くしたべん毛繊維に付着させた微小ビーズの回転をフォトダイオードや高速度カメラで捉えることで、細胞応答の高時間・空間分解能計測が可能となる (7-11)。我々は、外部刺激の無い環境下の定常状態にある大腸菌において、走化性システムによる情報伝達がどのように制御されているかを明らかに

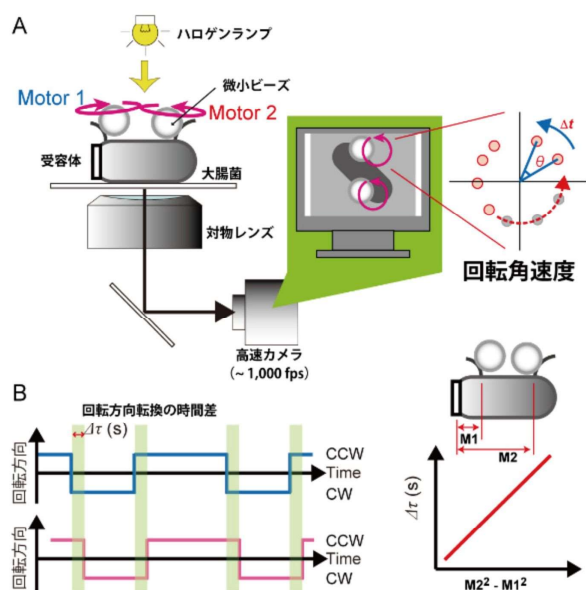


図3 同一細胞複数べん毛モーターの同時計測

するため、同一細胞上の複数のべん毛モーターの回転方向転換を同時に計測した (図3A) (12)。その結果、1) 同一細胞上のべん毛モーター同士の回転方向転換が高度に同調すること、2) べん毛モーター同士の回転方向転換には時間差があり、その差は受容体からの距離に依存すること (受容体から遠いモーターほど回転方向転換のタイミングが遅くなる)、を明らかにした (図3B)。これはモーターの回転方向転換が受容体からのシグナルに依存し、かつそのシグナルの伝達に受容体からの距離に依存した時間遅れが存在することを示している。

細胞内におけるシグナル伝達の実態

上述のように、1) べん毛モーターの回転方向転換はCheYの結合・解離によって引き起こされることが、2) 同一細胞上のべん毛モーター同士の回転方向転換が同調すること、3) 2つのモーターの回転方向転換にレセプターの位置を基準とした時間差があることを明らかにした (3, 12)。これらの事実から、我々は、刺激のない定常状態における情報伝達が、受容体から発せられたCheY-P濃度のダイナミックな増減により駆動され、CheY-P濃度の増減が直接的にべん毛モーターを制御するというモデルを提言した (図4) (従来のモデルでは、安定なCheY-P濃度下で (揺らぎによる局所濃度変化は存在するが)、個々のモーターが確率的に回転方向転換すると考えられている)。すなわち、大腸菌は外部刺激が無く

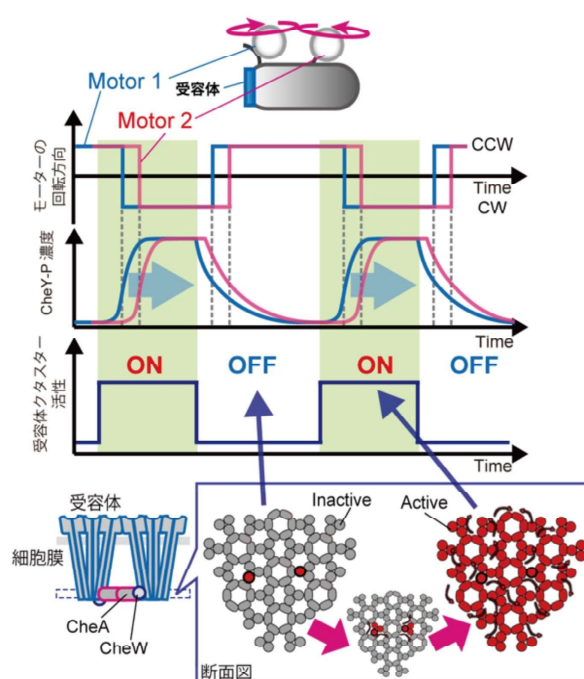


図4 定常状態の大腸菌の情報伝達モデル

とも、自発的にCheY-P濃度の増減を産み出し、べん毛モーターの回転方向を制御していることになる。

おわりに

ところでCheY-Pを産生するのは細胞極に形成された受容体クラスターである。受容体クラスターは、10,000分子以上の受容体分子、CheWおよびCheAで形成される巨大分子複合体である。しかしながら、これらのタンパク質 (受容体に連結されたCheA) が確率的に活性化した場合、細胞内のCheY-P濃度はある値に平均化されるはずである。上述のようなCheY-P濃度のダイナミックな増減を生み出すためには、巨大な受容体クラスターが、協同性によってあたかも巨大な1分子のように振る舞うことが想像される (図4)。すなわち、大腸菌は、刺激のない環境下においてシステムを休ませているわけではなく、逆にエネルギーを費やして、自発的に受容体クラスターを活性化・不活性化させていることになる。それによってCheY-P濃度のダイナミックな増減を産み出し、べん毛モーターの回転方向を変えて細胞遊泳を制御し、環境を探索しているのかもしれない。以上のように、一見すると下等な生物と思われがちな大腸菌でさえ、ほんの数マイクロメートルという小さな空間の中に、まだ我々が理解できていない世界があるということにワクワクさせられる。細胞内

のタンパク質の動態とそれによる細胞応答を同時に測り、両者の相関関係を明らかにすることで、情報伝達の根源に迫っていきたい。

参考文献

- 1) Wadhams, G. H., & J. P. Armitage. 2004. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:1024-1037.
- 2) 坂野聡美, 田島寛隆. 2007. *細胞工学*. 26:903-908.
- 3) Fukuoka, H., Sagawa, T., Inoue, Y., Takahashi, H., Ishijima, A. 2014. *Sci. Signal.* 7:ra32.
- 4) Berg, H. C. 2004. *E. coli*. Motion.
- 5) Sourjik, V., & Berg, H. C. 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:123-127.
- 6) Bray, D., Levin, M. D., Morton-Firth, C. J. 1998. *Nature* 393:85-88.
- 7) Ryu, W. S., Berry, R. M., Berg, H. C. 2000. *Nature* 403:444-447.
- 8) Sowa, Y., Hotta, H., Homma, M., Ishijima, A. 2003. *J. Mol. Biol.* 327:1043-1051.
- 9) Sowa, Y., Rowe, A. D., Leake, M. C., Yakushi, T., Homma, M., Ishijima, A., Berry, R. M., 2005. *Nature* 437:916-919.
- 10) Inoue, Y., Lo, C. J., Fukuoka, H., Takahashi, H., Sowa, Y., Pilizota, T., Wadhams, G. H., Homma, M., Berry, R. M., Ishijima, A. 2008 *J. Mol. Biol.* 376:1251-1259.
- 11) Sagawa, T., Kikuchi, Y., Inoue, Y., Takahashi, H., Muraoka, T., Kinbara, K., Ishijima, A., Fukuoka, H. 2014 *Biophys. J.* 107:730-739.
- 12) Terasawa, S., Fukuoka, H., Inoue, Y., Sagawa, T., Takahashi, H., Ishijima, A. 2011 *Biophys. J.* 100:2193-2200.

