2P145

コレラ菌における 45 種の走化性受容体様タンパク質と 3 種の CheA 様キナーゼの共役関係の解析

○百武 晃宏¹、伊東 靖見¹、西岡 典子¹、塩見 大輔²、本間 道夫¹、川岸 郁朗¹ (¹ 名大院・理・生命、² テキサス大・医)

コレラ菌 *Vibrio cholerae* は、走化性の細胞質内シグナル伝達を担う Che システムに相関したシステムを 3 組もつ。そのうち CheA2 と CheY3 を含むシステム II だけが走化性に関与する。一方、CheA 活性を制御する走化性受容体様タンパク質 (MLP) は 45 種ある。今回、MLP と Che システムのネットワークを推測するため、MLP の一次構造を解析した。MLP は膜トポロジーより (A) 二回膜貫通型でペリプラズム領域を持つ、(B) 二回膜貫通型でペリプラズム領域を持たない、(C) 膜貫通領域を持たないものに分類された。うち 4 種および 2 種の MLP はそれぞれ *che* 遺伝子クラスター I および III にコードされるので、それぞれ CheA1 および CheA3 と共役すると推定された。また別の 19 種の MLP は、*V. parahaemolyticus* (Che システムは一つ) の MLP と全長または細胞質領域 (CheA との相互作用部位である高度保存領域 HCD を含む) の相関性が高いことから、CheA2 共役型と推定された。また、HCD 前後のコイルドコイル領域の長さにも特徴が見られたので、これを指標として共役する CheA を推定した。以上の推測について実験的に検討した。まず、メチル基転移酵素 CheR と MLP の相互作用の特異性を調べた。走化性に関与し、CheA2 共役型と推定される Mlp24(タイプ A) は、CheR2 特異的にメチル化された。また Mlp1 は、推定 CheA3 共役型の Mlp45(タイプ C) と同様に、CheR3 に優先的にメチル化されたことから、CheA3 共役型と示唆された。つづいて GFP 融合タンパク質を用いて細胞内局在を調べた。システム II を構成する CheA2、CheY3、推定 CheA2 共役型の Mlp11 は、べん毛側の極に局在した。一方、システム I を構成する CheA1、CheY2 は細胞の極のほか、細胞質中にも点状に局在した。システム III を構成する CheA3 と Mlp45 も同様に細胞の極と細胞質に局在した。以上の結果より、MLP と Che システムの共役関係は細胞内局在に反映されることが考えられた。

A. Hyakutake, Y. Itoh, N. Nishioka, D. Shiomi, M. Homma and I. Kawagishi : Analyses of coupling between 45 chemoreceptor-like proteins and 3 CheA-like kinases of *Vibrio cholerae*.

2P147

大腸菌 1 細胞でのエネルギー代謝の定量的解析の試み

○梅原 千慶^{1,2}、安田 賢二¹ (¹ 東大院・総合文化、²Stanford Univ., Genome Technology Center)

【背景・目的】細胞の生命活動を規定する情報には、先天の情報と後天的情報がある。先天の情報は、ゲノムに配列として書き込まれている。一方、後天的情報は、環境に応じて動的に変化する細胞内代謝ネットワークなどに担われていると考えられる。この後天的情報は、先天の情報のみでは予測しきれない環境変化への細胞の応答 (順応) に深く関わっている。しかし、この後天的情報に基づく細胞の応答については、集団ベースでの培養系では計測が難しかった。例えば、環境に応じて細胞がとりうる状態は離散的なのか連続的なのか、あるいは、細胞内でエネルギーはどのようにして各機能に分配されているのか、これらについて十分な知見は得られていなかった。我々はこれまでに、環境からの供給エネルギー量変化への順応を、大腸菌で 1 細胞計測してきた。そして、細胞が無栄養下で成長を完全に停止した後、エネルギー再供給により再び成長できることを見出した。そこで今回は、細胞成長とともに細胞運動も同時に計測することで、エネルギーが 1 細胞内でどのようにして各機能に分配されるのかを定量的に明らかにすることを目的として研究を行った。

【方法・結果】「オンチップ 1 細胞培養システム」を改良した成長・運動デュアル実時間計測系を用いて、栄養条件変化への大腸菌 1 細胞の応答ダイナミクスを計測した^[1]。その結果、(1) 無栄養条件下で細胞の成長と分裂が停止した後、4 時間以上も細胞が運動を続けること、そして (2) 運動を停止した後に再度栄養を供給された細胞は、細胞成長とともに運動も再開すること、を確認した。この実験結果から、エネルギー供給停止後の運動持続時間は、1 細胞内に蓄えられるエネルギーから計算される値 (1 時間程度) よりも長いことが示唆された。詳細については本会にて報告する。

[1] 梅原千慶, 安田賢二. 伝熱 43(180):28-32 (2004).

S. Umehara and K. Yasuda : Quantitative approach to the dynamics of energy metabolism within single *E. coli* cells

2P146

Vibrio alginolyticus のもつ二種類のべん毛モーターは単一の CheY により制御される

○小嶋 勝、薬師 寿治、本間 道夫、川岸 郁朗 (名大院・理・生命理学)

海洋細菌 *Vibrio alginolyticus* は、極べん毛と側べん毛の二種類のべん毛をもつ。一方のべん毛しかもたない変異株を用いた解析から、極べん毛による運動も側べん毛による運動も走化性制御をうけ、セリンに対して誘引応答を、フェノールに対して忌避応答をすることがわかっている。走化性情報伝達についてよくわかっている大腸菌においては、ヒスチジンキナーゼ CheA、応答調節因子 CheY が中心的な役割をはたしていて、リン酸化型 CheY がべん毛のスイッチ複合体に結合することで回転方向を変化させる。*V. alginolyticus* も同様のシグナル伝達系を用いていると考えられるが、興味深いことにべん毛が二種類あるのに対し CheY は一つしかない。我々は、この制御がどのように行われているのかを調べている。これまでに、PCR 法を用いて *V. alginolyticus* の *cheY* 遺伝子のクローニングを行った。この *cheY* 遺伝子は、大腸菌の *cheY* 欠損株を相補した。CheY タンパク質を *V. alginolyticus* 野生株中で大量発現して、顕微鏡下で遊泳を調べたところ、極べん毛による遊泳はタンブル頻度が増加し、側べん毛においては遊泳がみられなくなった。今回、*V. alginolyticus* の *cheY* 欠損株を構築したところ、極べん毛、側べん毛共に走化性応答を示さなかった。これらのことから 2 つのべん毛は共通の CheY の制御を受けていると考えられる。また、忌避応答の違いや、テザートセルの観察結果から、極べん毛は大腸菌と同じ回転方向制御型だが、側べん毛は Stop snd go 型である可能性が考えられる。近縁種のゲノム配列から、極べん毛、側べん毛それぞれに対応したスイッチ複合体が存在していると推定され、現在、CheY が直接結合する FliM に注目して解析を進めている。

M.Kojima, T.Yakushi, M.Homma and I.Kawagishi : Single CheY regulates two different flagellar motors in *Vibrio alginolyticus*.

2P148

酵母プリオンタンパク質の 1 細胞内ダイナミクスの解析

○綾野 賢¹、野間 繁子^{2,3}、吉田 賢右²、田口 英樹^{3,4}、安田 賢二¹ (¹ 東大院・総合文化、² 東工大・資源研、³ 東大・新領域、⁴ JST・さきがけ 21)

【背景と目的】異常型タンパク質が正常型タンパク質の構造転換を自己永続的に促すというプリオンの性質は、タンパク質の高次構造自体が生体内で情報を保持・伝達し得ることを示唆する。そのよいモデルとして出芽酵母の細胞質遺伝因子 [*PSI*⁺] が知られており、これはタンパク質 Sup35 のプリオンの挙動によって説明される。[*PSI*⁺] の表現型を示す細胞では Sup35 は難溶性の状態で存在し、しばしば凝集体を形成する。この凝集状態がプリオンのメカニズムによって親細胞から娘細胞に伝播する事が [*PSI*⁺] という表現型が細胞質遺伝する原因と考えられている。本研究は Sup35 と GFP の融合タンパク質を発現する酵母をサンプルとし、特定の細胞とその細胞内の凝集体に着目することで、凝集体の細胞内ダイナミクスを明らかにし細胞質遺伝の本質を知ることとする。

【方法】新たに開発されたオンチップ 1 細胞培養システムを酵母プリオンタンパク質の経時的観察に利用した。これによって特定の 1 細胞を観察しながら培養条件を変化させることができる。具体的には、培地交換によって観察中に Sup35-GFP の発現誘導を行い、1 細胞内のタンパク質濃度の変化と凝集形成を蛍光観察によって経時的に観察した。また凝集形成後に発現誘導を止め、その後の細胞内のタンパク質濃度と凝集体サイズの経時変化を世代に渡って連続観察した。

【結果と考察】Sup35-GFP の発現誘導を開始すると、初め細胞質全体で GFP 蛍光強度の増加、すなわち Sup35-GFP の濃度増加が観察されるが、ある時点で細胞内に Sup35 の凝集体が形成される (臨界濃度の存在)。また誘導を停止すると細胞の成長とともに凝集体は解消されていった。このような細胞内での凝集体の振る舞いと細胞の成長との関連など、結果の詳細・考察については本会にて発表する。

S.Ayano, S.Noma, M.Yoshida, H.Taguchi and K.Yasuda : Analysis of yeast prion dynamics in a single cell