



Title	Multiscale and quantitative analysis of intact Escherichia coli cells by solid-state NMR combined with optical and electron microscopy
Author(s)	山田, 和哉
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72663
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (山 田 和 哉)

論文題名

Multiscale and quantitative analysis of intact *Escherichia coli* cells by solid-state NMR combined with optical and electron microscopy
(固体NMRと光学・電子顕微鏡を組み合わせた大腸菌生細胞の多階層定量解析法に関する研究)

論文内容の要旨

背景

生物や細胞内でいつ、どのくらい、どの分子が合成され、その結果細胞の環境や大きさはどうなるのか、それらを定量的に解析することは、生命現象を理解するうえで必須であると考えられる。しかしながら、これまで生命システムを定量的に測定し、解析できる手法はほとんど存在しなかったため、これらの情報は全く得られていないのが現状である。そこで、本研究ではIPTGを用いた大腸菌過剰発現系を生命現象のモデルとし、固体NMRを用いて細胞内で合成される分子や細胞環境を定量的に解析することを目指した。一方、生命現象の理解には、細胞骨格など分子より高次の構造情報を多階層的に把握することも必須である。本研究では固体NMRにより得られる分子の構造情報、光学顕微鏡と電子顕微鏡により得られる細胞レベルの情報を組み合わせることで、大腸菌細胞を多階層的かつ定量的に理解する方法論の確立と応用を目指した。大腸菌過剰発現系の標的タンパク質として、立体構造が既知であること、固体NMRで化学シフトが帰属されていること、発現量が多いことから、ユビキチンを選択した。

実験結果

一細胞当たりの組み換えタンパク質発現量を見積もるためには、固体NMRサンプル内の分子種の同定及び分子数と細胞数の定量が必要である。サンプル調製では、ユビキチン発現誘導直前に大腸菌を非標識培地から ^{13}C 、 ^{15}N 標識培地に移すことにより、ユビキチン過剰発現中に合成された分子のみ ^{13}C 、 ^{15}N 標識される培養を行った。一方、サンプル内の細胞数は、NMR測定後に細胞計数盤を用いて計数した。

まず、ユビキチンを過剰発現させた大腸菌(Ubq cell)が合成する分子種について考察した。上記培養法で培養した大腸菌細胞のNMRスペクトルを、精製したユビキチンのNMRスペクトルと比較すると、大腸菌細胞のNMRスペクトルにはユビキチン以外に脂質と糖鎖由来のシグナルが見られた。また、Ubq cellと空ベクターを誘導した大腸菌(Mock cell)の差スペクトルは、凍結乾燥したユビキチンのNMRスペクトルとよく一致した。これらの結果より、ユビキチン過剰発現でユビキチン以外に糖と脂質も合成されていることが強く示唆された。また、糖鎖のヘミアセタール炭素信号の積分値より、五炭糖と六炭糖の比を求めた。

次に、定量的なNMR測定法により、一細胞あたりに合成された分子数の計数を行った。Mock cellの1D ^{13}C NMRスペクトルを、タンパク質、脂質及び糖のNMRスペクトルの線形和に、Ubq-cellの1D ^{13}C NMRスペクトルを、Mock cellと精製ユビキチンのNMRスペクトルの線形和に分解した。次に各NMRスペクトルの積分値と検量線、およびサンプル内の大腸菌数を用いて、大腸菌1細胞当たりの分子数に換算した。結果、一細胞あたりユビキチンは $(5.8 \pm 0.5) \times 10^6$ 分子、ユビキチン以外のタンパク質は $(2.6 \pm 0.3) \times 10^6$ 分子、脂質は $(9.9 \pm 1.1) \times 10^6$ 分子、五炭糖は $(1.2 \pm 0.5) \times 10^8$ 分子、六炭糖は $(3.0 \pm 0.8) \times 10^7$ 分子合成されたことが分かった。

ユビキチン過剰発現時にユビキチン以外の分子が合成されていることは、細胞体積や培養液中の細胞濃度の変化を示唆している。また、外膜内膜間距離が変化し、細胞質体積が変化している可能性がある。それを確かめるため、光学顕微鏡で細胞の大きさと培養液中の細胞濃度を、電子顕微鏡で外膜内膜間距離を測定した。その結果、4時間のユビキチン発現誘導中に、細胞数は2.1倍に、細胞体積は0.83倍になっていた。細胞数の増加により、一細胞当たりの非標識の分子数が減少し、 ^{13}C 標識分子が合成されたと考えられる。一方、外膜内膜間距離はユビキチン過剰発現の前後で10 nm短くなり、外膜内膜間体積が小さくなっていた。

発現誘導時間を変えて集菌した菌体を用いて、発現誘導中に合成される分子数の時系列解析を行った。結果、一細胞当たりの ^{13}C 原子数は発現誘導後1時間でほぼ一定数になったのに対し、 ^{15}N 原子数は増加し続けた。これは、培地内の炭素源からアミノ酸前駆体の合成に時間がかかるために炭素源が細胞に早く取り込まれるのに対し、窒素源のタンパク質への取り込みは早いいため、必要に応じてゆっくりと取り込まれていることが示唆された。

Ubq-cellとMock-cellの2D ^{13}C - ^{13}C DARR NMRスペクトルをサンプル内の大腸菌数で標準化して差スペクトルを

作成し、凍結乾燥ユビキチンのスペクトル、および全アミノ酸残基がヘリックスまたはストランド構造を持つユビキチン、及び結晶構造と同じ構造を持つユビキチンのシミュレーションスペクトルと比較した。タンパク質の二次構造に鋭敏な α 炭素とカルボニル炭素の交差ピーク領域において、スペクトルの差分とその射影を比較した結果、細胞内のユビキチンと凍結乾燥ユビキチンのスペクトルとの差分は、他のシミュレーションスペクトルとの差分の半分以下であった。以上より、ユビキチンは大腸菌細胞内においても正しい二次構造を保ち、結晶構造よりも主鎖に揺らぎのある凍結乾燥構造に近いことが考えられた。

本研究で定量的に得られた分子数は、大腸菌細胞の培地からの炭素の取り込み率、ユビキチンの細胞体積に占める割合、ユビキチン合成に関与するリボソームの個数などに関する情報を与える。ユビキチンの細胞内濃度は通常の細胞内タンパク質濃度とほぼ一致した。また、培地1 Lあたりのユビキチンの収量は55 mgであった。また、報告されているリボソームの数とタンパク質合成速度から、リボソームの18%がユビキチン合成に関与していることが分かった。さらに、求めた量のユビキチンを4時間で合成するために必要なグルコース分子を、炭素源およびエネルギー源から計算すると、1秒当たり 4.2×10^5 分子が必要である。大腸菌は 5×10^5 分子のグルコースの取り込み能力があるので、84%の取り込み能力を用いていた。そのグルコースを取り込むために必要なグルコーストランスポーターは一細胞あたり9300分子であり、膜表面の2%を占めていることが示唆された。培地1 L中に存在する 1.9×10^{22} 分子のグルコースのうち、大腸菌が利用したのはその22%である 4.2×10^{21} 分子であった。

以上より、本研究ではタンパク質過剰発現時に大腸菌一細胞が合成する分子種とその分子数を、定量分析可能な固体NMRを用いて見積もった。その結果は、光学顕微鏡と電子顕微鏡から得られた細胞数や大きさの変化、および過去の報告と矛盾せず、本測定法によって得られたデータが正しいことが示された。これらの結果は大腸菌の分子の取り込みや合成能力を評価し、大腸菌を理解する上で重要である。また、大腸菌のシステム生物学を議論するのに必要不可欠なデータとなる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (山田 和哉)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	藤原 敏道
	副 査	教授	上田 貴洋
	副 査	教授	塚原 聡

論文審査の結果の要旨

生物や細胞内で分子が合成される分子種や分子数、その時間を解析し、それに伴い細胞の環境や大きさはどうなるのか、それらを解析することは、生命現象を理解するうえで必須である。一方、生命現象の理解には、細胞骨格など分子より高次の構造情報を多階層的に把握することも必須である。本研究では、固体 NMR を用いて細胞内で合成される分子や細胞環境を定量的に解析するとともに、固体 NMR により得られる分子の構造情報、光学顕微鏡と電子顕微鏡により得られる細胞レベルの情報を組み合わせることで、大腸菌細胞を多階層的かつ定量的に理解する方法論の確立を目指した。さらに、IPTG を用いた大腸菌過剰発現系を生命現象のモデルとし、確立した方法論を応用した。

申請者は、ユビキチン発現誘導直前に大腸菌を非標識培地から ^{13}C , ^{15}N 標識培地に移すことにより、ユビキチン過剰発現中に合成された分子のみ ^{13}C , ^{15}N 標識されたサンプルを調製した。一方サンプル内の細胞数は、NMR 測定後に細胞計数盤を用いて計数した。1D ^{13}C NMR スペクトルより、ユビキチン過剰発現でユビキチン以外に糖と脂質も合成されていることが分かった。続いて、定量的な NMR 測定法により、1細胞あたりに合成された分子数の計数を行った。光学顕微鏡測定により、4時間のユビキチン発現誘導での細胞数と細胞体積の変化を明らかにした。さらに、電子顕微鏡により外膜内膜間距離の減少を見出した。また、発現誘導時間を変えて集菌した菌体を用いて発現誘導中に合成される分子数の時系列解析を行い、炭素源と窒素源の取り込み速度の違いを明らかにした。最後に、細胞内、凍結乾燥と結晶構造のユビキチンスペクトルと全アミノ酸残基がヘリックスまたはストランド構造を持つユビキチンのシミュレーションスペクトルと比較した。タンパク質の二次構造に鋭敏な α 炭素とカルボニル炭素の交差ピーク領域において、細胞内と凍結乾燥ユビキチンのスペクトルとの差分は、他スペクトルとの差分の半分以下であり、ユビキチンは大腸菌細胞内においても正しい二次構造を保っていると考えられた。本研究で定量的に得られた分子数から、大腸菌細胞の培地からの炭素の取り込み率、ユビキチンの細胞体積に占める割合、ユビキチン合成に関与するリボソームの個数に関する情報を明らかにした。

申請者は本研究を通じて、初めて定量的な固体 NMR 測定法を確立し、細胞内の複数分子の定量に成功した。その結果、NMR を用いて初めて細胞内のユビキチンを観測し、細胞内の構造を明らかにした。また、細胞が合成した分子数と細胞の大きさの相関を初めて明確にした。炭素源と窒素源の取り込み速度の違いと、取り込まれた炭素源の行き先を初めて実験的に明らかにした。本研究で培われた方法論は、より複雑な細胞系の定量解析や、細胞内でのタンパク質構造解析に利用可能である。また、本研究で見いだされた生物学的情報は、システム生物学を議論し細胞を制御するための基本的な情報であり、学術的な波及効果は高いと考えられる。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。