1B1100

水溶液中の (Pro-Pro-Gly)₁₀ の熱転移に及ぼす種々のアルコールの効果

○富山 徹夫¹、甲斐 力¹、内山 進²、西 義則³、小林 裕次³
(¹ 名大院・理、² 阪大院・工、³ 阪大院・薬)

コラーゲンのモデルペプチドとして、よく研究されている (Pro-Pro-Gly)₁₀ は、水溶液中において、温度の上昇に伴い、三本鎖のトリプルヘリックス状態から一本鎖の統計鎖状態へと転移する。溶液に、重水素化アルコールを添加すると、アルコールの種類、アルコールの添加量によって、溶液内では、多様な変化が起こる。本会では、重水素化アルコールのトリプルヘリックス状態と一本鎖の統計鎖状態の (Pro-Pro-Gly)₁₀ の存在比が、アルコールの添加によって、如何に変化するか、また、そのような多様な変化が観測される理由について考察する。

実験は、(Pro-Pro-Gly)₁₀ について、一次元の核磁気共鳴吸収を用い C₂D₅OD、CD₃CD(OD)CD₃、CD₃CD₂CD₂OD の 4 種のアルコールの D₂O 溶液で行った。種々のアルコール添加量の (Pro-Pro-Gly)₁₀ 溶液について、種々の温度で、三本鎖と一本鎖が、平衡状態において、如何なる比率で存在するかを、ProC_αH の吸収ピークの求積から求めた。主な結果は、CD₃OD、C₂D₅OD の系では、アルコールの添加に伴って、温度の上昇とともに、転移温度が直線的に上昇したのに対して、CD₃CD(OD)CD₃、CD₃CD₂CD₂OD の系では、いったん、転移温度が重水中より、低下し、それから上昇した。これまで、この系の溶液への添加物の添加は、いずれも転移温度の上昇をもたらしたので、これは初めての例であり、添加物が導入された際の溶質溶媒相互作用が (Pro-Pro-Gly)₁₀ の入った溶液系の熱力学的もしくは統計力学的状態に如何なる影響を与えるかを考える格好の系となった。1998 年以来、特に、最近、水溶液、アルコール溶液、疎水相互作用についての理解が急激に進んでいるが、これを踏まえて、三本鎖のトリプルヘリックス状態から一本鎖への転移温度が溶媒添加によって、どのように変化かするかについて報告する。

T.Tomiyama, T.Kai, S. Uchiyama, Y. Nishi and K. Kobayashi : Effect of alcohols on the thermal transition of (Pro-Pro-Gly)₁₀

1C0900

大腸菌細胞極における走化性レセプター・キナーゼ複合体形成の制御機構

○塩見 大輔、本間 道夫、川岸 郁朗 (名大院・理・生命理学)

全ての生物において、タンパク質の正確な時間的・空間的配置がシグナル伝達に重要である。大腸菌走化性において、刺激を受容する 2 回膜貫通型レセプターがヒスチジinkinアーゼ CheA、カップリングタンパク質 CheW と複合体を形成し、極に局在しており、これがシグナル増幅や適応に重要であると提唱されている。レセプターは適応過程において CheR、CheB によるメチル化・脱メチル化修飾を受ける。我々は、GFP-CheR、GFP-CheB を用いた観察を行い、いずれもレセプターがメチル化されているほど、より極局在するという結果を得ている (昨年度年会)。In vitro では、レセプター細胞質フラグメントのメチル化レベルが高いほど、CheA、CheW と安定な複合体を形成することが示されている。以上のことから、複合体の極局在がレセプターのメチル化によって制御されている可能性が考えられた。そこでアスパラギン酸レセプター Tar あるいは CheA と GFP の融合タンパク質を作製し、それらの極局在を直接観察した。その結果、Tar-GFP も GFP-CheA もレセプターのメチル化により極局在が促進された。また、in vitro の Tsr を用いた実験では、リガンドのセリンが複合体形成を促進することが示されている。そこで、リガンドの影響も調べたところ、Tar-GFP の極局在がアスパラギン酸で促進された。一方、セリンによっても Tar-GFP の極局在が促進された。これは複合体の中で Tar と Tsr が相互作用している可能性を示唆している。確かに、Tsr の発現量を上げていくに従って Tar-GFP の極局在が促進された。以上の結果は、複合体の極局在が、様々な要因によって制御されることを示しており、メチル化による適応のメカニズムについても、極複合体のダイナミックな制御が影響する可能性を考察する必要が出てきた。

D.Shioimi, M.Homma, and I. Kawagishi : Regulation of the bacterial chemoreceptor-kinase complex at cell poles.

1B1115

グルコシルトランスフェラーゼにおけるドメイン間相互作用の水和量測定による解析

亀井 敬¹、○児玉 孝雄²、稲積 広平²、鈴木 誠¹ (¹ 東北大院・工・金属工学、² 九工大・情報工・生化システム)

う蝕 (虫歯) 誘発性口腔連鎖球菌の菌体外酵素であるグルコシルトランスフェラーゼ GTF は N 端の触媒ドメインと C 端のデキストラン結合ドメインからなる大きな分子 (約 180 k Da) である。Streptococcus sobrinus 由来の不溶性グルカン合成を行う GTF の N、C 両端を部分欠損した GTF' (Δ 1-85/Δ 1330-1592: デキストラン依存性の不溶性グルカン合成活性を示す) とその N 端ドメイン (GS, Δ 1-85/Δ 1086-1592: GTF' と同じショ糖分解活性を示す) および C 端ドメイン (3.5R, Δ 1-1085/Δ 1330-1592: GTF' と同じデキストラン親和性を示す) はいずれも大量発現系と精製法が確立されていることに着眼して、ドメイン間相互作用の誘電スペクトル測定による水和解析を行った。測定は Kamei ら (Biophys.J. 82: 418-425, 2002) の方法に準じて、マイクロ波ネットワークアナライザ HP8720C を用い、周波数領域を 0.2GHz~20GHz として、タンパク質濃度 10-20 mg/ml で行った。その結果、タンパク 1 分子あたりの水和数として次の値がえられた: GTF', 4710 ± 110; GS, 3000 ± 233; 3.5R, 661 ± 39。一方、GTF' 分子内の GS および 3.5R の CD スペクトルは単独発現した場合と大きな差異はないことが示された。これらの結果は、ドメインの融合によってドメイン自体のコンフォメーションは大きく変化しないが、溶媒接触面積の質的な変化が誘発されることを示唆している。

T.Kamei, T.Kodama, K.Inazumi and M.Suzuki : Hydration analysis of domain-domain interaction in glucosyltransferase.

1C0915

大腸菌走化性に関与する脱メチル化酵素 CheB の細胞内局在の解析

○坂野 聡美、塩見 大輔、本間 道夫、川岸 郁朗 (名大院・理・生命理学)

走化性は、刺激に対する応答能力と、持続する刺激への適応能力の両方が必須である。適応は、走化性レセプターのメチル化によって起こり、それに関わる因子の秩序ある空間配置によって制御されている。実際、走化性レセプターはヒスチジinkinアーゼ CheA と複合体を形成し、またメチル化酵素 CheR はレセプター C 末端 NWETF に結合して、菌体の極にそれぞれ局在している。脱メチル化酵素 CheB は適応の中心的役割を果たし、シグナル増幅にも関与する可能性が提唱されている。しかしその細胞内局在についてはよく知られていない。そこで本研究では、GFP-CheB 融合タンパク質を作製して解析した。はじめに、GFP-CheB はレセプター依存的に極局在した。次に、CheB の各領域 (N 末端調節ドメイン (N)、C 末端触媒ドメイン (C)、および両者を繋ぐリンカー (L)) に GFP を融合させて観察した。GFP-N-L 発現株のみ極局在が見られ、この局在もレセプター依存的であった。以上から、CheB の極局在には N および L 領域が必須であると結論された。次に、CheB 極局在における標的因子を同定するため、NWETF 欠失レセプター (Tar) と共発現させたところ、GFP-CheB は極局在した。一方、P2 ドメイン欠失 CheA を発現する株内では、Tar-GFP は局在したが、GFP-CheB の局在は見られなかった。また、in vitro において、GFP-N-L は CheA の P2 ドメインと結合した。以上の結果から、CheB の極局在には CheA の P2 ドメインとの結合が必須であると示唆された。さらに、共発現させる Tar のメチル化レベルが高いとき CheB はより多く極局在した。当研究室の塩見らにより、メチル化は Tar-CheA 複合体の局在に影響することが示されているが、CheB の局在変化はより顕著であり、何らかの積極的な制御が働いている可能性も考えられる。

S.Banno, D.Shioimi, M.Homma and I.Kawagishi : Polar localization of the chemotactic methyltransferase CheB of Escherichia coli