B621

固体高分解能 NMR および QCM 法による膜結合時における PLC- δ 1 PH domain の立体構造の解析○上釜 奈緒子¹、吉良 敦史²、岡田 雅司¹、八木澤 仁¹、辻 暁¹ (¹ 姫工大院・理、² ULVAC)

PLC- δ 1 は生体膜成分である PtdIns(4,5)P₂ を加水分解し、セカンドメッセンジャーとして機能する Ins(1,4,5)P₃ および diacylglycerol を産生する酵素である。この分子の N 末端に存在する PH domain は PtdIns(4,5)P₂ の脂質頭部および Ins(1,4,5)P₃ を選択的に認識、結合することで PLC- δ 1 の生体膜への局在を調節していることが明らかになっている。我々は [¹³C]Ala 標識 PLC- δ 1 PH domain の固体高分解能 ¹³C NMR スペクトルの信号を Ala 残基を Leu または Gly に置換した変異体を用いて全て帰属し、Ala88 および Ala112 が膜結合に伴い構造変化することを確認した。このことから β 5/ β 6 ループ部位が膜表面において構造化する事を見出し、ループ中に位置する両親媒性 α helix と脂質膜の疎水の内部の相互作用が膜上におけるドメインの安定性に寄与するというモデルを提案した。この構造モデルの検証のために K86P、L84C 変異体を作成し、それによる膜結合能および立体構造の変化を水晶発振子天秤 (QCM) 法および固体高分解能 NMR 法を用いて解析した。QCM 法による PtdIns(4,5)P₂ 含有脂質膜への結合状態の解析から、野生型の結合定数が 9.45×10^6 M⁻¹ であったのに対し、 β 5/ β 6 ループ中の α helix 内に Pro を導入した K86P では 1.95×10^7 M⁻¹ となり、膜への結合力が強くなったことが示された。一方、酸化による-S-S-結合形成で β 5/ β 6 ループの固定化が期待される L84C においても、結合定数は還元型では野生型と同等であったのに対し酸化型では 1.80×10^7 M⁻¹ となり、 β 5/ β 6 ループが脂質膜結合に関与していることが見出された。

N.Uekama, A.Kira, M.Okada, H.Yagisawa, S.Tuzi : Structural analysis of the PLC-delta1 PH domain at the lipid bilayer surface by solid-state NMR and quartz crystal microbalance techniques

B623

大腸菌アスパラギン酸レセプター Tar の極クラスターにおけるダイマー間相互作用とシグナル増幅

○本間 幹啓、塩見 大輔、本間 道夫、川岸 郁朗 (名大院・理・生命理学)

大腸菌の走化性レセプター (MCP) は 2 回膜貫通型サブユニットのホモダイマーで、ヒスチジンキナーゼ CheA およびアダプター CheW と結合し、菌体の極に局在してクラスターを形成する。クラスター内でのダイマー間相互作用がシグナル増幅に重要といわれている。我々は、部位特異的 S-S 架橋を用いた解析によって Tar のダイマー間相互作用を in vivo で検出し、アスパラギン酸がクラスター内のダイマー間相互作用を変化させることを示唆する結果を得た (昨年度年会で報告)。そこで、ダイマー間相互作用がシグナル増幅に関与しているかどうか調べた。そのため、アスパラギン酸の親和性にはほとんど影響しない Tar のメチル化がアスパラギン酸によるキナーゼ不活性可能を大きく低下させることに着目した。すなわち、様々なアスパラギン酸濃度における架橋形成の変化を脱メチル化状態とメチル化状態の Tar について調べ、比較した。その結果、脱メチル化状態のほうがメチル化状態よりも (1) より低濃度で、(2) より大きく、架橋形成の変化が検出された。これはダイマー間相互作用の変化によってシグナルの入出力の調節が起きていることを示唆する初めての結果である。しかし、S-S 架橋形成効率の変化は小さく、検出には困難が伴った。そこで、SH 基特異的蛍光試薬 IAF による Cys 残基の標識を試みた。Tar ペリプラズム領域の loop2-3 領域を系統的に Cys 置換した変異体の修飾効率はリガンド結合部位の変異体の修飾効率よりも一様に低かった。これは、loop2-3 領域がダイマー間相互作用によって溶液から隔離されていることを示唆している。また、多数の変異体でアスパラギン酸の影響が検出されなかったため、アスパラギン酸がダイマーの集合状態にはほとんど影響しないことが改めて示唆された。一方、明らかに修飾効率が変化する変異体もあった。現在これらを用いて改めてメチル化の影響を検討中である。

M.Homma, D.Shioni, M.Homma and I.Kawagishi : Does the aspartate chemoreceptor Tar amplify signals through its interdimer interaction?

B622

細菌温度レセプター Tar 膜貫通領域の構造変化

○Swain KaLin、本間 幹啓、本間 道夫、川岸 郁朗 (名大・院理・生命)

The Escherichia.coli chemoreceptor Tar mediates responses to both chemical and thermal stimuli. When the attractant aspartate binds to the periplasmic domain of the Tar receptor, it induces a piston-type movement of one of the helices in the transmembrane (TM) region. However, the mechanism for thermosensing is largely unknown. Studies with chimeric receptors led to a hypothesis that temperature is sensed through the TM region of the receptor. In order to test this hypothesis, we have scanned the TM region for pairs of cysteine residues that may potentially form disulphide bonds between the TM1 and TM2 α -helices. In in vivo oxidative crosslinking assays, cysteines placed closer toward the inner surface of the membrane were not crosslinked well but the ones that were placed toward the outer surface were crosslinked to various degrees. Some of the latter pairs of cysteines responded to aspartate. In particular, a specific pair of cysteines in the TM region (L28C-Q193C) was crosslinked extensively in the presence of 10 μ M Cu-phenanthroline. Moreover, at this particular position, crosslinking was inhibited in the presence of the attractant aspartate. Currently we are investigating whether or not receptor methylation affects the temperature dependency of crosslinking because when Tar is methylated, its thermosensing property is inverted.

K.Swain, M.Homma, M.Homma and I.Kawagishi : Structural changes in the transmembrane region of the bacterial thermoreceptor protein Tar

B624

サルモネラ菌クエン酸レセプター Tcp のリガンド認識における Asn-67 残基の役割

○岩間 智徳¹、伊東 靖晃²、山縣 修造¹、川岸 郁朗² (¹ 岐阜大・農・生物資源利用、² 名古屋大・院理・生命理学)

サルモネラ菌クエン酸レセプター Tcp は、クエン酸と金属-クエン酸複合体を別々の誘引物質として識別する。すなわち、Tcp 発現菌はマグネシウムなどの金属イオン単独には応答を示さないが、クエン酸適応後に金属イオンを与えるとさらに誘引応答を示す。我々はこれまでに、Tcp のこれら二つのリガンドの識別に関与する部位を同定する目的で、細胞外の α 1- α 2 間と α 3- α 4 間に位置する塩基性や極性アミノ酸残基を Cys 置換し、N67C 変異がクエン酸応答には影響しないがマグネシウム-クエン酸複合体応答を著しく低下させることを示した。このことは、Asn-67 がマグネシウム-クエン酸複合体の特異的認識、ひいてはリガンド識別において何らかの関与をすることを示唆している。そこで、この残基の役割をさらに詳しく調べるため、様々なアミノ酸に置換してその影響を解析した。まず、各置換体を全レセプター欠損大腸菌株に発現させ、トリプトン軟寒天培地に接種したところ、どの置換体も野生型とほぼ同じスウォーム能を示した。次に、クエン酸応答やマグネシウム-クエン酸複合体応答を測定した。その結果、Asn と構造の似た Gln 置換体以外に Thr、Val、Ile の各置換体も両リガンドに対して野生型とほぼ同様の応答を示した。一方、Ala や Ser 置換体はマグネシウム-クエン酸複合体応答での著しい低下が見られた。また、Asp 置換体や Glu 置換体では、クエン酸応答が著しく低下したが、マグネシウム-クエン酸複合体応答は正常に示した。しかし、マグネシウム単独では応答を示さなかった。以上の結果から、Asn-67 残基においてその側鎖の極性基はマグネシウム-クエン酸複合体との結合には直接関与せず、むしろ側鎖の空間配置がマグネシウム-クエン酸複合体の結合に最適な結合ポケットの構造の維持に寄与すると考えられた。

T. Iwama, Y. Itou, S. Yamagata and I. Kawagishi : Role of Asn-67 in ligand recognition of the bacterial citrate chemoreceptor Tcp