B625

G蛋白質活性化ペプチドとG蛋白質との相互作用

森川 友仁^{1,2}、石井 毅¹、新井 有紀子¹、河野 俊之²、佐藤 一紀³、加藤 有介⁴、田之倉 優⁴、○若松 馨¹ (¹群馬大・工、²三菱化学生命研、³福岡女子大・人間環境、⁴東大・院農生科)

【目的】 m4ムスカリン性アセチルコリンレセプター (m4レセプター) 由来のペプチドであるM-IIIとm4I3C(14)、およびマストバランはGi/oファミリーのG蛋白質を活性化することが知られている。これらのペプチドとG蛋白質との相互作用を比較するために、ペプチドとGi1 α との相互作用および膜のG蛋白質の活性化を解析した。

【方法】 Gi1 α へのペプチドの結合は表面プラズモン共鳴で解析した。牛大脳膜画分のG蛋白質の活性化はGTP γ Sの結合で解析した。

【結果】 m4I3C(14)はGi1 α へ約30 μ Mの解離定数(Kd)で結合した。また、このペプチドはGi1 α にダイマーとして結合している可能性が示唆された。マストバランとM-IIIも同様なKdで結合したが、m4I3C(14)に比べて結合速度・解離速度はずっと大きかった。牛大脳膜のG蛋白質はm4I3C(14)で活性化されたが、同じm4レセプター由来のペプチドであるM-IIIでは全く活性化されなかった。低濃度のマストバランは膜のG蛋白質を活性化したが、高濃度では活性化が観測されなかった。

【考察】 G蛋白質とカップルするレセプターにはダイマーとしてG蛋白質に作用すると考えられている物があるので、m4I3C(14)もダイマーとしてG蛋白質に作用している可能性が考えられる。M-IIIやマストバランとm4I3C(14)との結合解離速度の違いはこの会合性の違いを反映している可能性がある。また、膜画分のGi/oの活性化剤としてm4I3C(14)は最良であると考えられる。

T. Morikawa, T. Ishii, A. Arai, T. Kohno, K. Sato, Y. Kato, M. Tanokura, and K. Wakamatsu : Interaction of G protein with G protein activating peptides

B627

コレラ菌誘引物質と忌避物質の同定

○伊東 靖晃、百武 晃宏、西岡 典子、本間 道夫、川岸 郁朗 (名大院・理・生命理学)

コレラ菌は宿主体動物体内外でのさまざまな環境中で生存するために、様々な刺激を認識し、適切な応答をする必要がある。走化性応答もその一つである。また、運動性と病原性は、例えば胆汁などにより、逆向きの調節を受けている。一方、宿主動物内でのコレラ毒素の発現には走化性HisキナーゼCheA2や応答調節因子CheY3が関与している。しかし、走化性そのものについてはほとんど解析がなされていない。そこで、まずアミノ酸、糖などの誘引物質となりうる物質を探索した。野生株を用いてtemporal stimulation assayを行ったが、方向転換頻度の変化が観察しづらかった。そこで方向転換頻度の高いメチル化酵素CheR2過剰発現株を用いたところ、セリンまたはアラニンを与えると方向転換頻度が顕著に低下した。次に、コレラ菌がこれらの化学物質の入ったcapillary内に誘引されるかどうか調べた。その結果、セリン、アラニン、システインが誘引物質と同定された。さらに胆汁についても調べたところ、明らかに誘引作用を示した。現在胆汁の中でどの成分が誘引物質であるかについて検討中である。一方、サルモネラ菌の忌避物質であるフェノールをコレラ菌に添加すると、濃度依存的に方向転換頻度が増加した。これはフェノールが忌避物質であることを示している。では、これらの物質はどのレセプターで認識されるのだろうか。コレラ菌ゲノム配列から、大腸菌の5種のMCPと相同性をもつタンパク質が45種あると推定されている。そこでこれらのMCP遺伝子をクローン化した。現在これらMCP様タンパク質をコレラ菌に発現させて、走化性に対する影響、同定された誘引・忌避物質によるメチル化レベルの変化を調べている。

Y.Ito,A.Hyakutake,N.Nishioka,M.Homma and I.Kawagishi : Identification of attractants and repellents of *Vibrio cholerae*

B626

GPIアンカー型受容体のシグナル伝達を担う短寿命シグナル変換ラフトの生成

○鈴木 健一¹、藤原 敬宏¹、坪井 久恵¹、実松 史幸²、Michael Edidin³、楠見 明弘^{1,2} (¹科技振・ERATO、²名大院・理、³Johns Hopkins University)

GPIアンカー型受容体へのリガンド結合はSrcファミリーキナーゼ(SFK)の活性化や細胞内Ca²⁺信号を誘導するが、細胞膜上での情報変換機構はわかっていない。ラフトの関与も不明である。これらの解明のため、我々は、GPIアンカー型受容体CD59を抗CD59抗体被覆金コロイド(40nm ϕ)を用いて、クロスリンクすることによってシグナルを入力し(リガンドもCD59のクロスリンクによってシグナル入力する)、その後のシグナル分子の挙動を1分子レベルで追跡した。CD59のクラスターはコレステロールをリクルートしてラフト様ドメインを形成し、遅い拡散と一時停留(平均0.7秒、90nm ϕ)とを約3秒毎に繰り返した。一時停留にはコレステロール、アクチン線維、SFK活性及び三量体Gタンパク質G α iの活性が必要で、これらを阻害して一時停留を消失させるとIP₃生成と細胞内Ca²⁺応答は消失した。CD59クラスターラフトと信号分子1分子毎の同時観察では、停留の直前にG α i-YFPの1分子がCD59クラスターに平均130ミリ秒間リクルートされた。一方、G α iのエフェクターであるLyn-GFPの1分子は一時停留のタイミングとは無関係に、しかし頻繁にCD59クラスターに平均230ミリ秒間リクルートされた。さらに、IP₃を産生してERからのCa²⁺放出を誘導するPLC γ のリクルートは、CD59クラスターの一時停留中に限って生じた(平均250ミリ秒間)。これらの結果は、(1)リガンド結合により、CD59クラスターラフトが形成され、(2)ここにLynとG α iが同時にリクルートされると、(3)未知のタンパク質XがLynによってリン酸化され、(4)タンパク質XがCD59クラスターラフトのアクチン結合(＝一時停留)とPLC γ のリクルートを誘起し、(5)PLC γ がラフト上でIP₃を産生し、Ca²⁺シグナルを誘導する、というシナリオを示唆する。

K.Suzuki, T.Fujiwara, H.Tsuboi, F.Sanematsu, M.Edidin, A.Kusumi : Formation of short-lived signalling rafts for GPI anchored proteins

B628

ヒト線維芽細胞の伸張刺激依存的なNF-kappaBの活性化におけるreactive oxygen speciesの関与

○安間 英毅^{1,2}、成瀬 恵治^{2,3}、曾我部 正博^{2,3} (¹名大院・医・整形、²名大院・医・細胞生物物理学、³科技団・国際・細胞力覚)

我々は以前、ヒト線維芽細胞に周期的な伸張刺激を加えると細胞内Ca²⁺濃度の上昇が生じ、cox2遺伝子の転写調節因子であるNuclear Factor κ B(以下NF κ B)が活性化されてcox2が誘導されることを報告した。今回は細胞内Ca²⁺濃度の上昇からNF κ Bの活性化に至る経路におけるreactive oxygen species(ROS)の関与について検討した。フィブロネクチンでコーティングしたシリコンチャンバーを用いてヒト肺線維芽細胞に一軸周期伸張刺激を加えた。細胞質分画内のNF κ Bの核内移行阻害因子であるI κ Bの抗体で免疫沈降した後、I κ Bのリン酸化抗体と、代表的な酸化ストレスマーカーである4-HNE(4-hydroxy-2-(E)-nonenal)に対する抗4-HNEモノクローナル抗体を用いてWesternblottingで解析した。I κ Bのリン酸化と4-HNE化のピークはそれぞれ刺激後10分と2分に認められたので、I κ Bのリン酸化に先立って細胞内の酸化ストレスが増大するものと思われた。NACなどの抗酸化剤存在下では、いずれの反応も抑制され、かつNF κ Bの核内移行とcox2-mRNAの誘導も抑えられたので、＜酸化ストレス→I κ Bの4-HNE化→I κ Bのリン酸化→NF κ Bの核内移行→cox2産生＞というカスケードが示唆された。また、Calcium Ionophore処理によってI κ Bの4-HNE付加が促進され、SAチャネルのブロッカーであるガドリニウム(Gd3+)によって一連の反応が抑制されることから、上記のカスケードの上流には周期的伸張刺激によるSAチャネルの活性化と引き続く細胞内Ca2+の上昇が存在するものと思われる。

H.Amma,K.Naruse,M.Sokabe : Involvement of reactive oxygen species (ROS) in stretch dependent activation of NF-kappa B in human fibroblast cells