2P237

互いに相同な大腸菌走化性レセプター Tsr と Tar によるアミノ酸リガンド認識機構の解析

○田島 寛隆¹、佐久間 麻由子¹、服部 文幸¹、角井 碧²、奈良 敏文²、加茂 直樹²、本間 道夫¹、川岸 郁朗¹ (¹ 名大・院理・生命理学、² 北大・院薬)

大腸菌アスパラギン酸レセプター Tar とセリンレセプター Tsr は高い相同性を持つ。しかし、両者はこれらのよく似たアミノ酸を厳密に識別する。Tar ペリプラズム (リガンド結合) ドメインの結晶構造が解析されており、アスパラギン酸結合残基も特定されている。これらの残基は Tsr にもよく保存されており、セリン結合残基と推定されている。しかし、我々が両者間で保存されていない残基を入れ替えたキメラレセプターを用いた実験を行ったところ、この推定とは矛盾する結果が得られた。すなわち、65-90 番残基を Tar と入れ替えた Tsr、Tsar ではアスパラギン酸に応答したが、逆の Tasar ではセリンに反応しなかった。そこで、保存されたリガンド結合残基の空間的配置の違いが重要と考えた。この仮説を検証するため、Tsr ペリプラズムドメインの構造解析とキメラレセプターを用いた機能解析を行っている。まず、Tsr のペリプラズムドメインを GST と融合させたタンパク質をプラスミドから発現させ、精製・結晶化を行った。Tsr はホモダイマーを形成するため、36 番アスパラギン酸残基をシステインで置換し、S-S 架橋により人為的にダイマー化させた変異体を実験に用いた。このタンパク質の精製標品から柱状もしくは針状の結晶が得られた。現在、この結晶を用いて X 線解析を進めている。これと並行して、新たなキメラレセプターを作製し、機能を調べた。Tar の 41-88 番残基または 31-88 番残基を Tsr の対応残基と入れ替えたキメラレセプターは、セリン、アスパラギン酸どちらにも応答しなかった。そこで、これらの切り替え領域中で保存されていない残基をランダムに入れ替えた変異レセプターを作製し、リガンド識別に重要な残基の決定を試みている。

H.Tajima, M.Sakuma, F.Hattori, M.Sumii, T.Nara, N.Kamo, M.Homma, and I.Kawagishi : Mechanisms underlying discrimination of amino acid ligands by two closely related chemoreceptors, Tsr and Tar of *Escherichia coli*

2P239

大腸菌走化性シグナル伝達における受容体のメチル化とダイマー間相互作用の関係

○入枝 泰樹、本間 幹啓、本間 道夫、川岸 郁朗 (名大院・理・生命理学)

大腸菌は環境中の化学物質の濃度勾配を感知し、より良い方向へ移動する走化性を示す。刺激を受容するのは二回膜貫通型受容体 (MCP) である。受容体はリガンドの有無に関わらず常にホモダイマーで存在し、ヒスチジンキナーゼ CheA、アダプター CheW と安定した複合体を形成している。また受容体は細胞質側でメチル化を受け、刺激に対する適応を引き起こす。これまでに、受容体が CheA、CheW 依存的に菌体の極に局在し、クラスターを形成することがわかっている。このクラスター内での受容体ダイマー間の相互作用が走化性におけるシグナル増幅に重要と考えられている。当研究室では、アスパラギン酸受容体 Tar を用いて、リガンド結合によるダイマー間相互作用の変化を *in vivo* での S-S 架橋形成により解析する系を確立した。しかし、シグナル増幅との関係は明らかではない。そこで、メチル化によるシグナル入出力の制御 (ゲインコントロール) に対する受容体ダイマー間相互作用の関与について検討した。まず、適応に際して受容体がメチル化されたとき、ダイマー間相互作用がどう影響されるかについて調べた。メチル化はダイマー内架橋形成にはほとんど影響しなかったが、ダイマー間架橋形成を有意に促進した。すなわち、メチル化がクラスター内のダイマー間のパッキングを変化させたと考えられた。またこのことは、メチル化が受容体の極でのクラスター形成をわずかながら促進するという、当研究室で最近示された結果とも整合的である。さらに、メチル化によりゲインが低下することを示唆する予備的な結果を得ている。したがって、メチル化がダイマー間相互作用に影響することはほぼ確実であり、おそらくゲインコントロールに関与すると考えている。この点について別の角度から検討するため、セリン受容体 Tsr との共発現による異種受容体間相互作用についても調べている。

H.Irieda, M.Homma, M.Homma and I.Kawagishi : Relationship between receptor methylation and dimer-to-dimer interaction in chemotactic signal transduction of *Escherichia coli*

2P238

分子動力学シミュレーションを利用した走化性レセプター Tar のリガンド認識機構の解析

○堀田 韻虹、田島 寛隆、服部 文幸、本間 道夫、川岸 郁朗 (名大院理・生命理学)

大腸菌の二つ走化性レセプター Tar と Tsr は互いに相同であり、それぞれアスパラギン酸 (Asp) とセリン (Ser) を誘引物質として認識する。Asp と Ser の形がよく似ているにもかかわらず、Tar は Asp、Tsr は Ser を正確に識別する。当研究室はそのリガンド特異性メカニズムを解明するために、様々な変異体、キメラを構築してきた。Tar ペリプラズムドメインの立体構造はすでに解かれている。Asp リガンドと直接相互作用をしているのは 3 つの Arg 残基と、ループ 3 (Y149-Q152) である。これらの残基のなかで、I65、S68 と Y149 だけが Tsr に保存されていない。Tsr ではそれぞれ、N65、N68 と F151 が対応している。このうち特に Y149 が Asp-Ser 識別に重要と考えられてきた。我々はこの 3 つの部位について、Tar の残基を Tsr のものと入れ替えた変異体を構築した。Y149F 変異体は野生型とほぼ同じ Asp 認識能を示し、Ser は認識しなかった。I65N、S68N 変異体も、これらを組み合わせた二重、三重変異体も Asp 認識能は低下したが、Ser は認識しなかった。以上の結果は Koshland らの予測に反し、Y149 は Asp を特異的に認識するのに必須な残基ではないことを示唆している。そこでサルモネラ菌由来の Tar-Asp 複合体 X 線構造 (PDB-ID:2lig) をテンプレートにし、大腸菌 Tar-Asp 複合体をホモロジーモデリング法で構築した。コンピュータ上で変異させ、分子動力学シミュレーションプログラム CHARMM のもとで、それぞれのレセプター・リガンド相互作用について詳しく解析した。その結果、I65N と S68N 変異が Asp リガンドと R69 や R73 との結合を阻害してしまうことが分かった。また、Y149F の変異は結合様式にほとんど影響がなかった上に、シミュレーションの間ではリガンドエネルギーがもっとも安定だった。

Y.Hotta, H.Tajima, F.Hattori, M.Homma and I.Kawagishi : MD simulation of the ligand recognition by the aspartate chemoreceptor Tar

2P240

固体 ¹³C NMR による脂質膜表面における PLC- δ 1 PH ドメインの立体構造の解析: 負電荷脂質の影響

○辻 暁、杉田 多喜男、上釜 奈緒子、岡田 雅司、八木澤 仁 (兵庫県立大院・生命理)

Pleckstrin Homology (PH) ドメインは細胞内情報伝達系などの重要な細胞機能を担う蛋白質に広く分布する残基数 120 残基程度の蛋白質ドメインであり、PLC- δ 1 の PH ドメインでは脂質膜中の PI(4,5)P₂ およびその極性頭部に対応する水溶性分子 IP₃ を特異的に認識、結合することで PLC- δ 1 の膜結合を制御することが知られている。我々はこれまでに PLC- δ 1 PH ドメインを対象として、固体高分解能 ¹³C NMR を用いて脂質二重膜ベシクル表面における立体構造を解析し、中性脂質膜表面における疎水性相互作用に由来する PH ドメインの立体構造変化を報告してきた。本研究では、酸性脂質 (PS) を 20 % 含む脂質膜ベシクルを用い、生体膜に 10-40 % 程度含まれる負電荷脂質が PH ドメインの脂質膜上における構造と挙動に与える影響を解析した。CP-MAS および DD-MAS 法による固体 ¹³C NMR 測定から、負電荷脂質を含む膜に PI(4,5)P₂ を介して結合した PLC- δ 1 PH ドメインは、電気的に中性の膜に結合した場合に比べて高い運動性を示し、また β 5/ β 6 ループおよび α 2-ヘリックスの構造変化を生じることが見出された。これらの変化は、負電荷脂質膜表面において、水溶液中で IP₃ と結合した PH ドメインに見られる構造に近い立体構造を生じ、この構造と中性脂質膜結合時に見られる立体構造との間に動的な交換が観測された。また、負電荷脂質膜上に特徴的な構造および運動状態は、溶媒中のカチオンによる負電荷の遮蔽状態に依存し、カチオン濃度の低い条件下で支配的であることから、負電荷脂質の影響は脂質膜表面の負電荷と PH ドメインの荷電性側鎖間の静電相互作用に由来すると同定された。これらの結果は、生体膜上における膜結合性蛋白質の構造が膜の組成、近傍の溶液のイオン組成などに依存して変化しうること示唆している。

S. Tuzi, T. Sugita, N. Uekama, M. Okada and H. Yagisawa : A solid state ¹³C NMR study of the structure of the PLC-delta1 PH domain at the membrane surface: the effect of a negatively-charged lipid