2SA04

バクテリアべん毛モーターの1分子計測

○曾和 義幸 (名大院・工)

多くのバクテリアの運動は、細胞表面から長く延びた螺旋状のべん毛繊維の高速回転によって駆動されている。繊維の根元には膜に埋めこまれたべん毛モーターと呼ばれる分子機械があり、細胞膜を介したプロトンまたはナトリウムイオンのイオン駆動力によって回転する。これまで、モーターの回転メカニズムを説明するモデルが多く提唱されてはいるが、これらを検証するためには回転の素過程の詳細を知ることが不可欠であろう。しかし、1974年にモーターの回転が証明され、その2年後の1976年から回転ステップの議論が始まっているにもかかわらず、アクトミオシン系やF1-ATPaseのようなステップを直接観察した報告はされていない。

今回、バクテリアべん毛モーター基本ステップの検出について報告する。我々は、ナトリウム駆動型のモーターを使い入力エネルギーを減少させることや相互作用するモーターユニットを1分子レベルにすることで、ステップ検出に十分な低速回転を作り出すことができた。この条件において、モーターは約14度を基本単位とするステップ状の動きをしていることを見いだした。これは、1回転中に26個のステップが存在していることを意味する。回転に特に重要な役割を担うFliGは回転対称の26量体構造を持つと考えられており、本研究で観察したステップはFliGの周期性を反映しているものと推測される。べん毛モーターにおいても、ATP駆動型分子モーターと同様に1分子レベルでの素過程の議論できる環境が整ってきたと言えるだろう。

Y. Sowa : Single molecule measurement of the bacterial flagellar motor

2SB01

大腸菌由来ヘムPASドメインによるレドックスセンシング機構

○黒河 博文、清水 透 (東北大・多元研)

生物は多様な環境変化に適応するために様々なセンサー蛋白質ファミリーを有している。その多くは、センサードメインと呼ばれる領域で物理化学的環境変化(レドックス、酸素、光)を検出し、それを「分子内シグナル伝達」によりエフェクタードメインへと伝え、ストレスに応答する様々な細胞シグナルを出力している。しかし、その詳細な分子機構は不明のままである。大腸菌由来ヘム制御ホスホジエステラーゼ(*Ec* DOS)はN末端領域にヘムを含んだPASドメイン(*Ec* DOSH)を有しており、ヘムのレドックス状態の変化や、ガス状分子の結合によってC末端領域のホスホジエステラーゼ活性をOn/Offすることが知られる。演者らは*Ec* DOSがヘム鉄のレドックスによって活性制御を行う点に着目した。そこで、*Ec* DOSのレドックスセンシング機構を分子レベルで詳細に解明するために、活性型であるヘム鉄還元型、不活性型であるヘム鉄酸化型の両方についてX線結晶構造解析を行った。*Ec* DOSHは典型的なPASフォールド構造を示した。また、PASフォールドの骨格を形成しているβシート同士が互いに相互作用するダイマーを形成していた。酸化状態ではヘム鉄には77番目のヒスチジンが近位側から、水酸化イオンが遠位側から配位した構造をとっていた。遠位側の配位子である水酸化イオンの近くに位置するFGループと呼ばれる部分は非常にフレキシブルであった。還元状態では、水酸化イオンはヘムから解離し、FGループ中の95番目のメチオニンの側鎖がヘム鉄に配位していた。また、このヘム鉄の配位子交換によって、FGループは柔軟性を失い、しっかりとした立体構造をとることがわかった。本シンポジウムでは、最近の蛋白質-蛋白質相互作用の実験結果から*Ec* DOSHのFGループスイッチによる活性制御機構について議論する。

H.Kurokawa and T.Shimizu : Redox Sensory Mechanism of Heme PAS Domain from *E. coli*

2SA05

ラチェット的な描像とF₁-ATPaseの1分子計測とエネルギー論

○宗行 英朗 (中央大学・理工・物理)

分子モーターなどの説明にしばしば使われるラチェットモデル的なスキームでは、二つのポテンシャルを描いて、その間の非平衡的な遷移が粒子の運動を誘起するとする。ここで描かれる二つのポテンシャルは、もっぱら動く粒子にとってのものであり、エネルギーの入力は二つのポテンシャル間の遷移として表現されている。ところでATPの加水分解などで代表される入力の実自由エネルギーが変化したとき、このポテンシャルは変化しないのであろうか? 単に二つのポテンシャルの上下間隔が変わるだけなのか、ポテンシャルの形自体が変わるのか? ポテンシャルの形が変化すると思えば、それは分子モーターのステップ運動の変化として検知できるはずなので、その点について回転分子モーターであるF₁-ATPaseのステップ回転を解析することによって検討した。その結果、ATP加水分解の実自由エネルギーを変化させても、個々のステップの角速度には実験誤差内で変化がなく、ステップのおこる頻度が変化した。この結果は酵素反応速度論的には当たり前のことのように考えられるが、自由エネルギーの変換という観点から入力の実自由エネルギーの変化が、出力の頻度の変化として現れることの意味を議論したい。またラチェットモデル的な考え方で逆反応を扱う場合のモデル化についても余裕があればふれてみたい。

E. Muneyuki : Ratchet model, single molecule observation of F₁-motor, and energetics

2SB02

PASドメインをもつ一酸化炭素センサー蛋白質

○内田 毅 (岡崎統合バイオ)

NPAS2は哺乳類の前脳で発現し、酸化還元依存する転写調節因子であり、N末端のbasic helix-loop-helix (bHLH)ドメインと2つのPASドメイン(PAS-A, PAS-B)、及びC末端の転写活性化部位からなる。近年、各PASドメインに1つのヘムが結合し、そこに一酸化炭素(CO)が結合することにより、CO依存的にDNAとの結合・解離が制御されることが示されたことから、脳内におけるCOセンサーとしての役割が注目されている。COが存在しない還元状態ではBMAL-1とヘテロダイマーを形成し、E-ボックスと呼ばれる配列に特異的に結合するが、COが結合するとBMAL-1とのヘテロダイマーが解離し、DNAから遊離する。PASドメインへのCOの結合という情報がどのようにBMAL-1との界面に伝達され、蛋白質の構造変化を誘起するか興味を持たれている。

ヘムは酸化型ではCys170/His119を軸配位子としてもつが、還元されるとCys170がHis171に置換され、His171/His119という構造になる。Cys170は水素結合によりHis171を脱プロトン化している。PASドメインを含むO₂センサーヘム蛋白質であるFixL, Dosとの比較から、COが存在するとHis171がCOと交換すると考えられる。一次配列の比較からCys170近くに存在すると考えられる二つの酸性残基を疎水性のアミノ酸残基に置換したところ(K161A, R174V)、Fe-Cys結合が解離した5配位構造のヘムが増え、二つ共に置換するとほぼ完全に5配位構造になった。一方、正電荷を保持した変異体(K161R/R174K)では天然型と同様の6配位構造を保っていた。また、K161A, R174V変異体では還元体におけるヒスチジンの脱プロトン化の程度が減少した。以上のことから、COと交換する軸配位子であるCys170の近傍に存在する酸性アミノ酸残基が水素結合ネットワークを形成し、配位子の結合を調節していることが示された。

T. Uchida : CO Sensory Protein Containing PAS Domains