

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370051

研究課題名(和文)細菌膜貫通センサーを介した情報伝達の構造基盤

研究課題名(英文)Structural basis of the trans-membrane chemo-receptors involved in bacterial signal transduction

研究代表者

今田 勝巳 (Imada, Katsumi)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40346143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円、(間接経費) 3,810,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌由来セリン受容体Tsr、クエン酸受容体TcpのX線結晶構造解析を行い、構造に基づく変異体解析とITC測定を行い、それぞれのリガンド認識機構を明らかにした。また、Pas-likeドメインを持つタイプの走化性受容体Mlp24とMlp37のリガンド認識機構とリガンド結合による構造変化を、リガンドが結合状態と非結合状態の結晶構造、および変異体解析から明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed the ligand recognition mechanism of Tsr, a bacterial chemo-receptor for serine, and Tcp, that for citrate, by X-ray crystallography, mutational analysis and the ITC measurements. We also elucidated the ligand binding mechanisms of Mlp24 and Mlp37, bacterial chemo-receptors with PAS-like domains, from the crystal structures of Mlp24 and Mlp37 with or without ligands and following mutational analyses.

研究分野：生物科学・構造生物化学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：分子機械 走化性センサー 膜タンパク質 生体分子

1. 研究開始当初の背景

外部情報の取得は、細胞が生きていく上で欠かせない。細菌の走化性センサーは広いダイナミックレンジを持ち、刺激物質濃度の時間変化、信号を記憶する仕組みを有するインテリジェントセンサーであり、温度・pH等も感知する多機能センサーである。ペリプラズム側のリガンド結合ドメインに刺激物質が結合すると、その信号は細胞質側のドメインに伝達され、His-Asp リン酸リレー系を介して運動器官であるべん毛に届く。センサーは分子量約6万の2回膜貫通型蛋白質2分子で構成される。このセンサー3個が細胞質側で1ユニットを形成し、そのユニットどうしが網目構造を形成する。これまでに、アスパラギン酸受容体(Tar)のリガンド結合ドメインとセリン受容体(Tsr)の細胞質ドメインの構造から、センサー分子の刺激物質感知機構が議論されている。また、センサー集合体の研究も盛んに行われている。しかし、センサーの膜貫通領域構造が不明のため、細胞内へ信号伝達機構は不明である。変異体実験からは、センシングの分子機構が論じられてきたが、菌体の応答で機能評価しており、結合能と信号伝達能が区別されずに議論されていた。また、リガンド認識機構もTarリガンド結合ドメインの各種構造から議論されてきたが、リガンド認識に関わる残基に変異や入替を行っても特異性変化が起きず、他のセンサーの構造が待ち望まれていた。我々はTsrのリガンド結合ドメインの構造解析をすすめ、変異TsrやTar-Tsrキメラ受容体と刺激物質の結合を等温滴定熱測定(ITC)で測定することで、Tsrが従来考えられていた機構と全く異なるリガンド認識を行うことを示すデータを得た。また、クエン酸受容体(Tcp)がクエン酸以外に2価イオンに応答すること、さらに新たにPas-likeドメインを持つタイプの走化性受容体の発見があり、走化性受容体のリガンド認識は、従来考えられていたよりも複雑であることが見出されつつあった。

2. 研究の目的

本研究では、走化性受容体が刺激物質を識別する機構、膜外の情報を膜内に伝える分子機構を原子レベルで明らかにすることを目指した。そのために、(1)膜貫通領域を含む細菌走化性受容体の結晶構造解析、(2)リガンド結合ドメインのリガンド結合状態・非結合状態の結晶構造解析、(3)構造に基づいた変異型受容体と刺激物質の結合解離の直接測定を行い、刺激物質の結合信号が細胞質側のドメインに伝えられる仕組み、走化性受容体の刺激物質に対する特異性が非常に厳密であると同時に、異なるタイプの刺激をも感知する仕組みを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 膜貫通領域を含む細菌走化性受容体の

結晶構造解析

全長蛋白質の大量発現に成功していた大腸菌由来Tarの精製・結晶化から開始し、リガンド結合部と膜貫通領域を含むHampドメインまでのフラグメントの発現・精製、さらにPas-likeドメインを持つタイプの走化性受容体であるMlp24、Mlp37の発現・精製と順次取り組んだ。結晶化スクリーニングは、スクリーニングロボット(Phoenix)を使用し、detergentの交換を含む広範なスクリーニングを行った。また、発現条件と精製条件の見直しは随時進めた。

(2) リガンド結合ドメインのリガンド結合状態・非結合状態の結晶構造解析

結晶化に成功しているTcpリガンド結合ドメイン-クエン酸複合体のX線結晶構造解析を行った。また、Pas-likeドメインタイプの走化性受容体Mlp24とMlp37のリガンド結合ドメインについても精製・結晶化・構造解析を行った。これらについては、リガンド非結合状態と結合状態の両方の解析を進めた。データ収集はSpring-8ビームラインBL41XUで行った。

(3) 構造に基づいた変異型受容体と刺激物質の結合解離の直接測定

Tsr、Tcp、Mlp24、Mlp37について、構造解析結果に基づいて変異体精製試料を作製し、等温滴定熱測定を行い、各変異がリガンドの結合定数に及ぼす影響を調べた。また、変異体の走化性応答を調べた。

4. 研究成果

(1) 膜貫通領域を含む細菌走化性受容体の結晶構造解析

全長Tarおよび膜領域を含む種々のフラグメントの大量発現・精製・結晶化を行った。その結果、N末からHAMPドメインまでを含むフラグメントからの結晶作製に成功した。しかし、分解能がまだ15Åと低いため、結晶が条件を検討して分解能を上げていく必要がある。

(3) Tsrのリガンド認識機構の解明

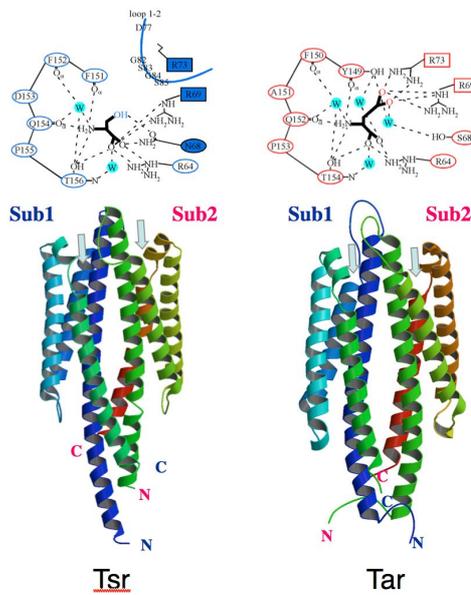
Tsrリガンド結合ドメインの構造と変異体のITC測定から、リガンド結合ポケットに隣接するループ構造がTarではリガンド認識に関わるArg側鎖をトラップすることにより、リガンド結合ポケットの構造を変化させ、Tarでリガンド認識に関わるアミノ酸が保存されているにも関わらず、異なるアミノ酸を認識する理由が明らかになった。

また、TsrとTarはNiやLeuに対して異なる忌避応答を示すが、TsrとTarのキメラ受容体のITC測定から、Ni結合領域を絞りこむことができた。(論文発表済)

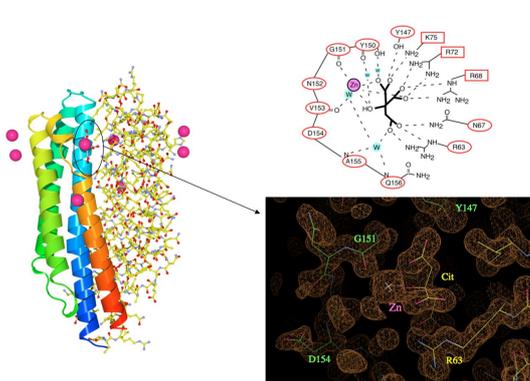
(2) Tcpリガンド結合ドメインの結晶構造とリガンド認識機構の解明

Tcpリガンド結合ドメイン-クエン酸複合体のX線結晶構造解析を行い、1.5Å分解能

の構造解析に成功した。Tcp は、クエン酸を認識し適応した後、さらに亜鉛に対する認識応答を行うことが知られているが、結晶化母液に亜鉛イオンを含んでいたため、亜鉛の吸収端の前後で回折測定を行うことで、Tcp に結合した亜鉛の位置を同定した。その結果、Tcp の構造はアミノ酸を認識する Tar や Tsr とリガンド結合部を含めてよく似ていること、亜鉛イオンの一つは基質クエン酸に配位し、亜鉛イオンがアミノ酸のアミノ基と同様の位置にあることで Tar や Tsr と同様の認識機構でクエン酸を認識していることが分かった。このことから、Tcp との結合に2価イオンが必須であると考えられた。そこで、ITC による結合解析を行ったところ、Tcp リガンド結合ドメインへのクエン酸の結合は二価金属イオン存在下でのみ検出され、二価金属イオンとの結合はクエン酸非存在下でも検出された。また、二価金属イオンの量が Tcp 発現大腸菌のクエン酸応答に影響した。以上の結果から、Tcp は二価金属イオンを結合してアミノ酸を模した構造となったクエン酸を認識して走化性を示すことが明らかになった。(投稿準備中)

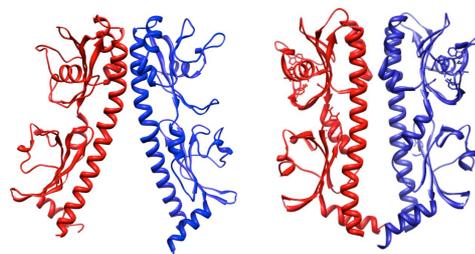


Tsr と Tar のリガンド結合部位と全体構造の比較



Tcp の全体構造とクエン酸結合部位

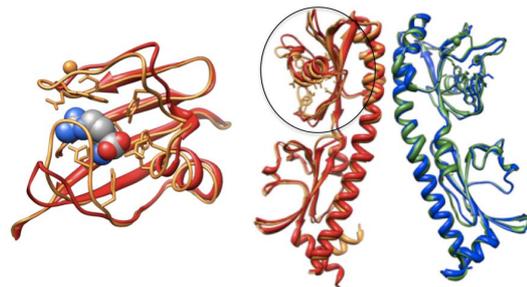
(4) Mlp24 リガンド結合ドメインの結晶構造
 コレラ菌のアミノ酸走化性センサーMlp24 は、Ser, Arg, Asn, Pro と性質の異なるアミノ酸を認識する。Mlp24 リガンド結合ドメインと Arg 結合時構造を X 線結晶構造解析により、それぞれ 2.4 Å 2.8 Å 分解能で解析した。Mlp24 は結晶中で2量体を形成していたが、その様子は近縁の Mlp37 のリガンド結合ドメイン2量体と大きく異なっていた。また、Arg を結合した構造との比較から、リガンド結合には Pas-like ドメインのループの開閉を伴うことが明らかになった。また、Mlp24 は Ca イオンの結合によりループが特異な主鎖構造をとることでリガンド結合ポケットが形成されていることから、2価イオンがリガンド認識に関わる可能性が示唆された。(投稿準備中)



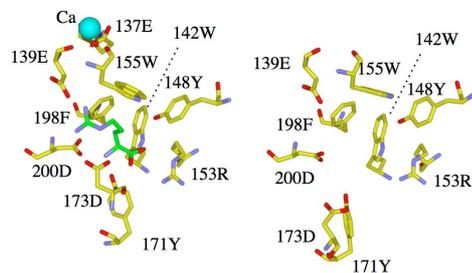
Mlp24

Mlp37

Mlp24 dimer と Mlp37 dimer の全体構造
 Dimer の形成様式が両者で異なる。



Arg の結合による Pas-like 構造変化
 上側の Pas-like ドメインがリガンドを結合する。ループが Arg の結合により閉じて Arg を包み込む。

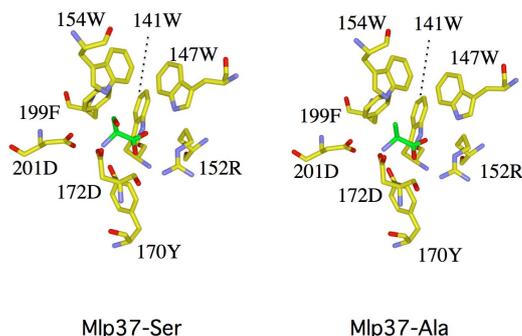


Mlp24-Arg

Mlp24-ligand free

Mlp24 のリガンド結合部位の構造
 ループ構造の変化により、Asp173 と Tyr171 が Arg と相互作用する。

(5) Mlp37 リガンド結合ドメインの結晶構造
 コレラ菌のアミノ酸走化性センサーMlp24
 は、アミノ酸の他にタウリンを認識する。
 Mlp37 リガンド結合ドメインの Ser およびタ
 ウリンを結合した構造を X 線結晶構造解析法
 により、それぞれ 1.9 Å、2.0 Å 分解能で解
 析した。構造が既知である Ala を結合した
 Mlp37 リガンド結合ドメインはの構造と比較
 すると、Ser の OH 基はポケットの外側を向き、
 リガンド認識は Ala と同じであることが明ら
 かになった。また、タウリンもアミノ酸と同
 じサイトにアミノ酸の形をまねるように結
 合していた。(投稿準備中)



Mlp37 の Ser 結合構造と Ala 結合構造の比較

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
 は下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Tajima H, Imada K, Sakuma M, Hattori F,
 Nara T, Kamo N, Homma M, Kawagishi, I.
 Ligand specificity determined by differentially
 arranged common ligand-binding residues in the
 bacterial amino acid chemoreceptors Tsr and Tar.
 (2011), *J. Biol. Chem.* 286:42200-42210. DOI:
 10.1074/jbc.M111.221887, 査読有

[学会発表](計 7 件)

城井哲也, 今田勝巳, 岩間智徳, 川岸郁
 朗. サルモネラ属細菌走化性受容体 Tcp
 によるクエン酸認識機構. 第 3 回日本生
 物物理学会関東支部研究会, 明治大学(東
 京), Mar. 6, 2014

Takahashi Y, Sumita K, Uchida Y, Nishiyama
 S, Kawagishi I, Imada K. Structural insight
 into the ligand recognition of chemoreceptor
 protein of *Vibrio cholerae*. 2013 年度べん毛
 交流会, 広島県民文化センター(広島県)
 , March 3, 2014.

Takahashi Y, Sumita K, Uchida Y, Nishiyama
 S, Kawagishi I, Imada K. Structure of a
 chemoreceptor protein of *Vibrio cholerae*,
 Mlp24, and its ligand complex. 日本生物物
 理学会第 51 回年会, 京都国際会議場(京

都), Oct. 29, 2013.

住田一真, 高橋洋平, 内田裕美子, 西山宗
 一郎, 川岸郁朗, 今田勝巳. コレラ菌走化
 性受容体 Mlp24 のリガンド認識機構. 第
 86 回日本生化学会大会, パシフィコ横浜
 (横浜), Sep 12, 2013.

住田一真, 内田裕美子, 西山宗一郎, 川岸
 郁朗, 今田勝巳. コレラ菌走化性受容体
 Mlp24 の X 線結晶構造解析. 第 13 回日本
 蛋白質科学会年会, とり銀文化会館(鳥取
 県), June 14, 2013.

住田一真, 内田裕美子, 西山宗一郎, 川岸
 郁朗, 今田勝巳. コレラ菌走化性受容体
 Mlp24 の結晶構造解析. 第 85 回日本生
 化学会大会, 福岡国際会議場・マリンメッセ
 福岡(福岡県), December 15, 2012

Sumita K, Uchida Y, Nishiyama S,
Kawagishi I, Imada K. X-ray
 crystallographic analysis of a
 chemoreceptor protein of *Vibrio cholerae*,
 Mlp24. 日本生物物理学会第 50 回年会, 名
 古屋大学(名古屋), Sep. 22, 2012.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ URL:

[http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/i
 mada/](http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/imada/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

今田 勝巳 (IMADA, Katsumi)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 40346143

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

川岸 郁朗 (KAWAGISHI, Ikuro)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号: 80234037

川口 辰也 (KAWAGUCHI, Tatsuya)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 10314353