

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：12601
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790042
 研究課題名（和文）二成分制御系における連鎖的シグナル伝達機構の構造生物学的解明

研究課題名（英文）Structural elucidation of the sequential signal transduction mechanism in two-component system

研究代表者
 上田 卓見 (UEDA TAKUMI)
 東京大学・大学院薬学系研究科・助教
 研究者番号：20451859

研究成果の概要（和文）：
 本研究では、申請者らの開発した NMR 手法である交差飽和法を用いて、原核生物の走化性を制御する細胞内シグナル伝達タンパク質である CheA と CheY の複合体が、反応部位同士が互いに近接した状態と、離れた状態の平衡状態にあることを明らかにした。これにより、CheA が、シグナル伝達に必要な二つの反応を、一つの反応部位で、両方とも効率よく進めているメカニズムが解明された。

研究成果の概要（英文）：
 Our NMR study based on cross-saturation method revealed that the CheA-CheY complex, which regulates bacterial chemotaxis, exists in equilibrium between catalytic and non-catalytic states, in which their catalytic sites are close to and away from each other, respectively. This binding mode allows CheA to perform two signal transduction reactions with one catalytic site.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学
 科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学
 キーワード：構造生物学

1. 研究開始当初の背景

二成分制御系は、ヒスチジン残基のリン酸化を利用する特徴を持つ細胞シグナル伝達分子群であり、原核生物、酵母、植物の環境応答に広く利用されている。原核生物の走化性のシグナル伝達系 (bacterial chemotaxis) をはじめとする、多くの二成分制御系は、病原性微生物の感染部位への侵入や、バイオフィームによる抗生物質からの防御に重要であるため、多剤耐性菌にも作用する次世代抗生物質の主要な開発ターゲットである。

二成分制御系では、図 1 に示すように、catalytic and ATP-binding ドメイン(CA)に結合した ATP から histidine-containing phosphotransfer ドメイン(Hp)上の活性ヒスチジン残基へのリン酸の移動 (自己リン酸化反応)、および Hp から response regulator

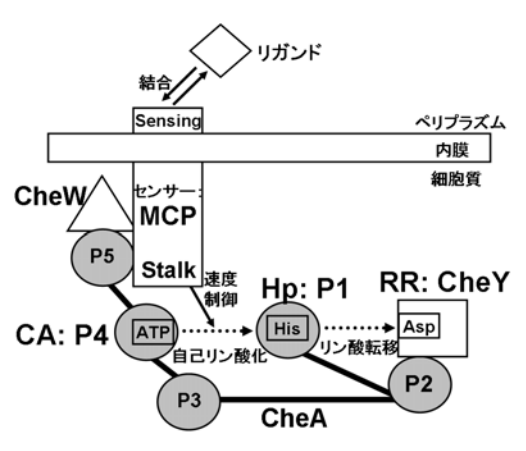


図 1 走化性制御分子群の模式図。

リン酸転移反応経路を点線矢印で示した。
 *多量体化状態は反映させていない。

(RR)上のアスパラギン酸残基へのリン酸の移動(リン酸転移反応)が連鎖的に進行する。さらに、センサー分子の sensing ドメインが環境変化を検知すると、stalk ドメインが構造変化して、その結果センサー分子と繋がった CA および Hp の間の自己リン酸化の速度が変化することにより、シグナル伝達が進行する。bacterial chemotaxis では、P1~P5 の5つの機能ドメインがリンカーで連結した構造を持つ、分子量 15 万の CheA 分子上の P4 ドメインと P1 ドメイン、および CheY 分子がそれぞれ CA, Hp, RR の役割を担い、アミノ酸等の栄養物質を認識する膜タンパク質である methyl-accepting chemotaxis protein (MCP)の細胞外領域が sensing ドメイン、膜貫通および細胞内領域が stalk ドメインの役割を担っている。なお、bacterial chemotaxis では、CA および Hp とセンサー分子の連結は、P5 ドメインと MCP の結合により達成されている。また、CheY は CheA の P2 ドメインと結合する。また、P5, MCP の両方に結合する CheW 分子が、MCP による CheA の活性制御に必須である。

二成分制御系のシグナル伝達機構を解明する上では、機能ドメイン間の結合様式を原子レベルで明らかにすることにより、Hp 上で、CA との自己リン酸化反応と RR とのリン酸転移反応が両方とも効率よく進行する機構や、センサー分子が自己リン酸化反応の速度を制御する機構を解明することが必要である。その際、CA, Hp, センサー分子のようなマルチドメインタンパク質では、機能ドメイン間の配置や他のドメイン間相互作用の影響により、特定のドメイン間相互作用が阻害されたり、弱い相互作用が重要となったりするため、全体構造を保持した状態における結合様式の解明が必須となる。しかし、従来の構造生物学的解析では、手法的な制限から、個々の機能ドメインを切り出した解析に限られていた。

申請者の所属する研究室は、タンパク質複合体の相互作用界面を精密に決定できる新規 NMR 測定手法(交差飽和法)の開発に成功し(Nature Struct. Biol.(2000))、交差飽和法の分子量制限を克服した「転移交差飽和法(TCS法)」へと発展させた(J. Mol. Biol.(2002), J. Magn. Res. (2010))。さらに、最近、申請者らは、本手法を用いて、ケモカイン上のケモカイン受容体結合部位を、原子レベルで同定することに世界で初めて成功した(J. Am. Chem. Soc. (2010), J. Biol. Chem. (2009))。転移交差飽和法は、巨大で、運動性に富む相互作用にも適用可能である。したがって、転移交差飽和法に基づく NMR 解析により、全長 CheA, CheY, CheW, および MCP における、機能ドメイン間の結合様式が解明できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、転移交差飽和法に基づく NMR 解析により、全長 CheA と CheY の結合様式を解明して、P1 の活性ヒスチジン残基上で、P4 との自己リン酸化反応と CheY とのリン酸転移反応が両方とも効率よく進行する機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

CheA の部位特異的標識を確立した上で、CheA の P1, P2 の NMR シグナルを帰属した。CheA の P1, P2 の運動性を NMR 解析した上で、全長 CheA-CheY 複合体の交差飽和実験を行った。得られた結果に基づいて、CheA の自己リン酸化反応、および CheA から CheY へのリン酸転移反応機構を考察した。

また、転移交差飽和法を用いて、MCP、CheA、CheW の三者複合体における結合様式、および三者複合体状態における、CheA の P1 と P4 の結合様式を解明することを念頭に置いて、P4 ドメインの NMR シグナルの観測および帰属を行った。

4. 研究成果

CheA 全長の ^1H - ^{15}N TROSY スペクトルを測定した結果、約 150 個のシグナルが高感度で観測された。各種三重共鳴実験を行った結果、観測されたシグナルは主に P1, P2 ドメインに由来することが明らかとなった。また、in vitro PTS 法により、P1 ドメイン、P2-5 ドメインの一方のみを選択的に標識する方法を確立した(図 2)。

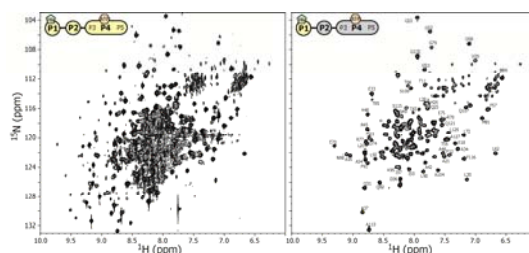


図 2 均一(左)および P1 ドメイン選択的(右) ^2H , ^{15}N 標識を施した、全長 CheA の ^1H - ^{15}N TROSY スペクトル。

そこで、全長 CheA, CheY それぞれを観測対象とする交差飽和実験を両方向行った。その結果、P2 ドメイン-CheY 複合体の結晶構造における結合界面上の残基の強度減少に加えて、その半分程度の大きさの強度減少が、P1 ドメインの His48 と CheY の Asp57 の周辺の残基にもそれぞれ観測された(図 3)。したがって、P1 ドメインと CheY が、反応部位同士で相互作用していることが示された。

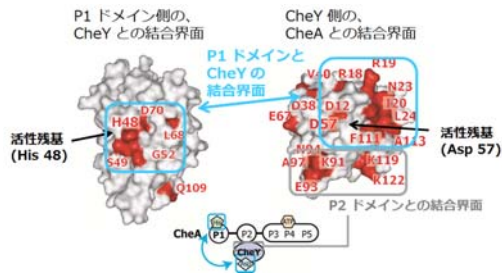


図 3 交差飽和実験により同定した、P1 ドメインおよび CheY 上の結合界面。

次に、全長 CheA ならびに P1 ドメイン単独に対して CheY を滴定する実験を行った。その結果、P1 ドメイン単独では解離定数が約 5×10^{-4} M に対応する化学シフト変化が観測された。一方、全長 CheA 中の P1 ドメインのシグナルには、見かけの解離定数が 10^{-6} M 程度と 5×10^{-4} M 程度に対応する、2 相性の化学シフト変化が観測された。

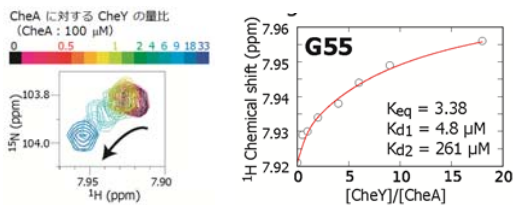


図 4 CheA と CheY の結合様式。
リン酸転移反応経路を点線矢印で示した。
*多量体化状態は反映させていない。

以上の結果より明らかになった、CheA と CheY の結合様式を図 5 に示す。P1 ドメインと CheY は、複合体内で結合することにより、はじめて生理的条件下において、反応部位同士が近接する、反応に有利な相互作用を形成すると考えた。このような結合様式は、結合と

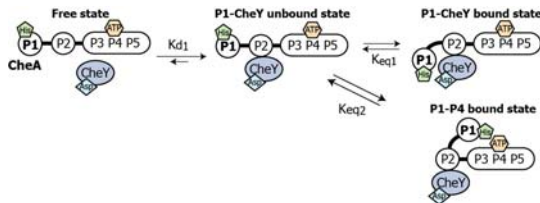


図 5 NMR 解析により明らかになった、CheA と CheY の結合様式。
生理的な濃度では、CheA は P1-CheY unbound state と P1-CheY bound state の平衡状態にある。

解離を迅速に繰り返して、その結果素早く次の反応を開始する上で重要であると考えた。

また、P1 ドメインと CheY の複体内相互作用は、平衡定数 $Keq1$ が 1 のオーダーの平衡にあることが示唆された。この平衡は、P1 ドメインが、CheY の活性部位とも、P4 ドメインの ATP 結合部位とも相互作用して、自己リン酸化反応とリン酸基転移反応の両方を効率よく進める上で重要であると考えた (図 6)。

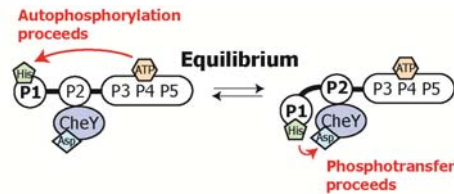


図 6 CheA が自己リン酸化反応とリン酸転移反応を両方とも効率良く進行させる機構。

次に、変異体による P3-5 ドメインの側鎖メチルシグナルの帰属を試みた。全長 CheA の P3-P5 ドメイン側鎖メチル基選択的標識体と、切り出した P3-P5 ドメインの 1H - ^{13}C HMQC スペクトルを比較したところ、両者でわずかに違いが観測されたが、特に Ala 領域では良く重なったため、P3-5 ドメインの大部分の帰属をそのまま全長に移すことが可能であると考えた。そこで、試料調製の簡便さを考慮し、まず切り出した P3-P5 ドメインに対して Ile, Ala, Met 残基に 1 つずつ変異を導入した変異体を作成し、消失したシグナルを変異導入残基として帰属した。次いで、その結果を全長に移すこととした。P3, P4, P5 の 3 つのドメインが比較的構造上独立しているため、3 つのドメイン同時に異なるアミノ酸に変異を導入することが可能であると考えて、1-3 残基同時に変異を導入した各種変異体を調製した。現在までに Ile, Met, Ala 71 残基中 63 残基に変異を導入した、27 変異体のスペクトルの取得を完了し、Ile 28 残基中 14 残基、Met 13 残基中 3 残基、Ala 残基 31 残基中 12 残基の帰属に成功した。帰属済みの残基の中には、A423, A434, A462, M475 などの ATP 結合部位近傍の残基も含まれており、これらの残基は今後 ATP 結合部位周辺の構造変化を調べるプローブとなることが期待される。

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 7 件)

1. Yutaka Kofuku, Takumi Ueda, Junya Okude, Yutaro Shiraishi, Keita Kondo, Masahiro Maeda, Hideki Tsujishita, and Ichio Shimada, “Efficacy of the β_2 -adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region”, *Nature Commun.* (2012) **3**, 1045 (査読あり)

2. Takumi Ueda, Naoko Nomoto, Masamichi Koga, Hiroki Ogasa, Yuuta Ogawa, Masahiko Matsumoto, Pavlos Stampoulis, Koji Sode, Hiroaki Terasawa, and Ichio Shimada, “Structural basis of efficient electron transport between photosynthetic membrane proteins and plastocyanin in spinach revealed using nuclear magnetic resonance”, *Plant Cell* (2012) **24**, 4173-4186 (査読あり)

3. Yuichi Minato, Takumi Ueda, Asako Machiyama, Ichio Shimada, and Hideo Iwai, “Segmental isotopic labeling of a 140 kDa dimeric multi-domain protein CheA from *Escherichia coli* by expressed protein ligation and protein trans-splicing”, *J. Biomol. NMR* (2012) **53**, 191-207 (査読あり)

4. Pavlos Stampoulis, Takumi Ueda, Masahiko Matsumoto, Hiroaki Terasawa, and Ichio Shimada, “Atypical membrane-embedded phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PI(3,4)P₂)-binding site on p47^{phox} Phox homology (PX) domain revealed by NMR”, *J. Biol. Chem.* (2012) **287**, 17848-17859 (査読あり)

5. Imai S., Osawa M., Mita K., Toyonaga S., Machiyama A., Ueda T., Takeuchi K., Oiki S., and Ichio Shimada, “Functional Equilibrium of the KcsA Structure Revealed by NMR”, *J. Biol. Chem.* (2012) **287**, 39634-39641 (査読あり)

6. Masanori Osawa, Koh Takeuchi, Takumi Ueda, Noritaka Nishida, and Ichio Shimada, “Functional dynamics of proteins revealed by NMR”, *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2012) **22**, 660-669.(査読あり)

7. Mitsuo Suga, Hidetoshi Nishiyama, Yuji Konyuba, Shinnosuke Iwamatsu, Yoshiyuki Watanabe, Chie Yoshiura, Takumi Ueda, and

Chikara Sato, “The Atmospheric Scanning Electron Microscope with open sample space observes dynamic phenomena in liquid or gas”, *Ultramicroscopy* (2011) **111**, 1650-1658

[学会発表] (計 2 件)

① Yuichi Minato, Takumi Ueda, Asako Machiyama, Hideo Iwai, Ichio Shimada, “Structural Elucidation of the Alternate Signal Transduction Mechanism of CheA”, International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2012 年 08 月 19 日～2012 年 08 月 24 日, リヨン(フランス)

② Takumi Ueda, Masahiko Matsumoto, Ichio Shimada, “Development of interferogram extrapolation method for NMR experiments that requires accurate peak height”, ISNMR2011, 2012 年 11 月 15 日～18 日, 横浜

[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]

ホームページ等

http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public_html/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 卓見 (UEDA TAKUMI)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：20451859