

細菌走化性受容体クラスターにおけるダイマー間相互作用の解析

山中, 咲樹 / YAMANAKA, Saki

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学・工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編 / 法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

57

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2016-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00013459>

細菌走化性受容体クラスターにおける ダイマー間相互作用の解析

INTERACTION BETWEEN BACTERIAL CHEMORECEPTOR DIMERS
WITHIN A CLUSTER

山中咲樹

Saki YAMANAKA

指導教員 川岸郁朗

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

Escherichia coli have very low threshold concentrations for attractant responses: e.g. $\sim 3 \times 10^{-8}$ M L-aspartate. Moreover, *E. coli* has high sensitivity, responding to a very small change (less than 1%) in the receptor occupancy with an attractant. Taken together, an input signal has to be amplified to produce a significant response. It is thought that this amplification involves the interdimer interaction of chemoreceptors within a huge receptor-kinase cluster at a cell pole. However, it is generally difficult to analyze spatial arrangements and interactions of integral membrane proteins. Previous site-directed disulfide cross-linking analyses of this laboratory showed that interdimer interaction is important for signal amplification. However, it has not been examined whether attractant binding to one receptor also affects neighboring receptor dimers in the cluster. In this study, I examined the interactions between dimers of the aspartate chemoreceptor Tar and the serine chemoreceptor Tsr, using *in vivo* disulfide cross-linking assay. I found that attractant binding to Cys-replaced Tar dimers not only affected cross-linking between Tar dimers but also influenced interdimer cross-linking of Tar-Tsr and Tsr-Tsr. These results suggest that a ligand-bound receptor dimer communicates with neighboring *apo* receptor dimers to trigger a cooperative conformational change, resulting in signal amplification.

Key Words : Chemotaxis, Interdimer interaction, Cross-link

1. 緒言

大腸菌は、外界の化学物質の濃度勾配を感知し、よりよい環境へと移動する走化性を示す。この応答は、細胞膜に局在する走化性受容体によって媒介される。走化性受容体は、刺激物質の結合に応じて細胞質のヒスチジンキナーゼ CheA の活性を調節し、最終的にべん毛モーターの回転方向が制御されることで、菌は好ましい環境へ移動することができる。大腸菌の走化性応答は感度が極めて高く、細胞にある全受容体分子の1%程度にリガンドが結合するだけでも十分な応答を示す [1]。このことから、シグナル伝達過程において何らかの増幅が起こっていると考えられる。走化性受容体の最小機能単位はホモダイマーであるが、受容体ダイマーは細胞膜中でばらばらに存在するのではなく、CheA とアダプタータンパク質 CheW とともに、細胞極で巨大なクラスターを形成する。このクラスター内では、受容体ダイマー3つが細胞質側で会合して形成する六量体 (trimer of dimers) が規則正しく

配列している。シグナル増幅はおもに受容体-キナーゼクラスター内で起こる (図1)。当研究室では、部位特異的架橋実験から、ペリプラズム側での受容体ダイマー間相互作用を検出してきた [3, 4]。このダイマー間架橋はリガンドの影響を受けたことから、受容体ダイマー間相互作用がシグナル増幅に重要な役割を果たすと推定された。

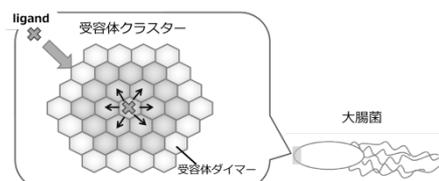


図1 クラスターにおける受容体間相互作用を介したシグナル増幅モデル

したがって、受容体間の横へのシグナル伝達がどのように起こるのかを知ることがシグナル増幅のメカニズムを解明する上で重要である。しかし、ある受容体が隣接

する受容体にどのように影響するのかを調べることは容易ではない。本研究では、誘引物質が結合した受容体が隣接する受容体に影響を与えているのかをアスパラギン酸受容体 Tar とセリン受容体 Tsr を用いて検討した。具体的には両受容体が混合クラスターを形成すること [2], アスパラギン酸が Tar には結合し、Tsr には結合しないことに着目し、Tar ダイマーのリガンド結合状態が Tar-Tsr および Tsr-Tsr ダイマー間相互作用に影響するか調べた。

2. 実験方法

TG (1% tryptone, 0.5% NaCl, 5% glycerol) で培養した菌を洗浄後、30°C で保温した。架橋形成は反応時間に影響を受けるため、試薬は秒単位の正確な時間で添加した。架橋反応の際には、酸化剤として Cu(II)(*o*-phenanthroline)₃ を用いた。架橋産物は、抗 Tar または抗 Tsr 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により検出した。

3. 実験結果と考察

まず、Tar と Tsr 共発現時において、Tar-Tsr の架橋産物が検出できるかどうか調べた。共発現時では、Tar, Tsr の架橋ダイマーの間に新たな Tar-Tsr の架橋産物らしきバンドが検出された。また、このバンドは Tar, Tsr の特異的抗体である α Tar-*peri*, α Tsr-*peri* でも検出されたことから、確かに Tar-Tsr の架橋産物であることが示された (図 2)。

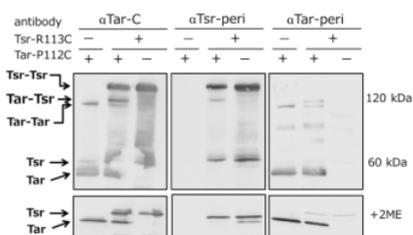


図 2 Tar, Tsr 特異的抗体を用いた検出

つぎに、loop2-3 領域の Tar-P112C と Tsr-R113C, loop3-4 領域の Tar-D142C と Tsr-G144C をそれぞれ共発現させ、1 mM メチルアスパラギン酸 (MeAsp) への影響を調べた。Tar-P112C, Tar-R113C のみ発現させた菌体では、MeAsp を加えると架橋効率が減少し、Tsr-R113C, Tsr-G144C のみ発現させた菌体では、MeAsp が Tsr には結合しないため、MeAsp を加えても架橋効率は変化しなかった (図 3)。しかし、Tar-P112C と Tsr-R113C を共発現させると Tar-Tar のみならず Tsr-Tsr の架橋ダイマーでも MeAsp の影響を受け、架橋効率が増加した (図 3-A)。Tar-D142C と Tsr-G144C を共発現させると、Tar-Tsr および Tsr-Tsr の架橋効率も減少した (図 3-B)。これらのことから、Tar と Tsr は確かに mixed cluster を形成し、そのクラスター内で Tar と Tsr のダイマーは相互作用していることが示された。また、リガンドが結合した受容体が隣接する受容体にもシグナルを伝えることで、シグナルを増幅していることが示唆された。

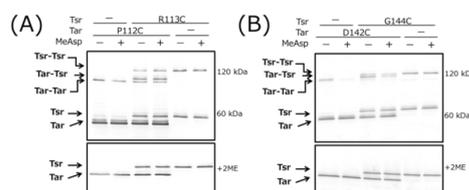


図 3 Tar, Tsr 共発現下での MeAsp 添加の影響

さらに、架橋効率の変化が受容体によるシグナル伝達と本当に相関しているのかを検討するために、細胞質側のトライマー接触領域に変異を加えた。この変異は野生型の受容体と共発現させると、変異受容体だけではなく、野生型受容体の機能も阻害する変異 (epistatic 変異) である [2, 3]。この変異がこれまで調べてきたペリプラズム側のトライマー接触領域に影響するかどうか、D142C と epistatic 変異の二重変異 Tar を発現させ、リガンド結合の影響をみた。その結果、MeAsp を加えても架橋効率がほとんど減少しなかった。また、Tsr-epistatic 変異と共発現させると、Tar-D142C 架橋効率が MeAsp による影響を受けなくなった。このことから、架橋効率変化がシグナル伝達に伴う受容体の相互作用変化を反映していることが示唆された。以上の結果は、クラスター内のダイマー間相互作用によって隣接する受容体にも影響を及ぼすことによりシグナル増幅が起こるといふ仮説を支持するものである。

4. 結言

Tar, Tsr を共発現させると、Tar-Tsr の架橋ダイマーが検出された。さらに、共発現下での MeAsp 添加による架橋効率の変化から、Tar ダイマーのリガンド結合状態が Tar-Tsr および Tsr-Tsr ダイマー間相互作用に影響することが示された。また、epistatic 変異発現下でリガンド結合の影響が見られなくなったことから、ダイマー間架橋効率の変化はシグナル伝達に伴う受容体の相互作用変化を反映していると考えられた。これらのことから、クラスター内の受容体ダイマー間相互作用による協同的構造変化がシグナル増幅を引き起こしていることが示唆された。

引用文献

- 1) Jasuja, R. et al. : Response tuning in bacterial chemotaxis, Proc. Natl. Sci. USA, Vol. 96, pp. 11346-11351, 1999
- 2) Ames, P. et al. : Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 99, pp. 7060-7065, 2002
- 3) Homma, M. et al. : Attractant binding alters arrangement of chemoreceptor dimers within its cluster at a cell pole, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 101, pp. 3462-3467, 2004
- 4) Irieda, H. et al. : Control of chemotactic signal gain via modulation of a pre-formed receptor array, J. Biol. Chem, Vol. 281, pp. 23880-23886, 2006