

論文内容の要旨

申請者氏名 林 ころ

細菌は、光や様々な化学物質、温度変化などの外部刺激を感知して「好ましい」環境に移動する、「走性」と呼ばれる性質を持っている。これらの外部刺激は MCP (Methyl-accepting Chemotaxis Proteins)と呼ばれる膜タンパク質によって細胞内へと伝達され、リン酸化カスケードを通して最終的に鞭毛モーターへと伝えられる。MCP の細胞内領域はリンカー領域、メチル化領域、シグナリング領域から成っている。細胞質ドメインについては、大腸菌の MCP においてメチル化領域およびシグナリング領域の立体構造が報告され、ヘリックスバンドル構造をとることが明らかになっている。一方、リンカー領域についてはシグナル伝達に重要であることが指摘されているにもかかわらず、MCP において立体構造の解析例がないため、MCP が外部刺激を細胞内へ伝えるシグナル伝達の機構はよく分かっていない。

高度好塩好アルカリ性菌 *Natronomonas pharaonis* は近紫外および紫光から逃げる負の走光性を示す。負の走光性に関与する七回膜貫通型のロドプシン様光受容体 ppR (*pharaonis* phoborhodopsin)は、MCP に属する二回膜貫通型タンパク質 pHtrII (*pharaonis* Halobacterial transducer protein II)と膜内で複合体を形成しており、ppR が受容した光シグナルは pHtrII を通して細胞質内へと伝達される。本研究では ppR-pHtrII を介したシグナル伝達機構における MCP のリンカー領域の役割を明らかにするために、核磁気共鳴(NMR)法および電子スピン共鳴(EPR)法を用いて pHtrII リンカー領域の構造解析を行った。またその過程で、コールドショックベクターと可溶性タグを組み合わせた、大腸菌による高効率な新規発現系(pCold-GST)の構築に成功した。

本研究では膜貫通領域とリンカー領域を含む pHtrII(1-159)を、大腸菌大量発現系を用いて発現精製し、トリプシン処理によるドメイン解析を行った。その結果、リンカー領域に一つの安定なフラグメントを見出し、NMR による立体構造解析の結果、残基番号 135-150 の領域が α -helix 構造をとることが明らかとなった。これらの結果は、これまでフレキシブルであると考えられていたリンカー領域にも安定な立体構造が存在することを示している。

pHtrII を含む MCP のリンカー領域には、膜直下に HAMP (Histidine kinases, Adenylyl cyclases, Methyl binding proteins, Phosphatases)と呼ばれる共通したドメインが見出されている。本研究において、データベースを用いて pHtrII リンカー領域におけるドメインの検索を行ったところ、膜直下とは別にもう一つ HAMP ドメインが存在することが見出された。本研究で明らかにした α -helix 構造は二つの HAMP ドメインの間に位置していた。そこで HAMP ドメインのモデル構造と本研究で決定した NMR 構造を組み合わせ構造モデルを構築したところ、ppR から微細な構造変化として伝えられた光シグナルを下流に伝達することが可能な構造を取り得ることが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 林 ころろ

本論文では、細菌の持つ、光や様々な化学物質、温度変化などの外部刺激を感知してより好ましい環境に移動する「走性」と呼ばれる性質の研究を行っている。一般に、「走性」に関する外部刺激は MCP (Methyl-accepting Chemotaxis Proteins) と呼ばれる膜タンパク質によって細胞内へと伝達され、リン酸化カスケードを通して最終的に鞭毛モーターへと伝えられる。MCP の細胞内領域はリンカー領域、メチル化領域、シグナリング領域から成っており、メチル化領域およびシグナリング領域については立体構造解析をはじめとする詳細な研究が進んでいる。しかし、リンカー領域についてはシグナル伝達に重要であることが指摘されているにもかかわらず、その研究は遅れており、結果として MCP が外部刺激を細胞内へ伝えるシグナル伝達の分子機構はよく分かっていない。

本論文では、高度好塩好アルカリ性菌 *Natronomonas pharaonis* の持つ、近紫外および紫光から逃げる「負の走光性」を取り上げ、負の走光性に関わる MCP である二回膜貫通型トランスデューサータンパク質 pHtrII について、生化学的なドメイン解析や、核磁気共鳴法 NMR および電子スピン共鳴法 EPR を用いた立体構造解析などを行うことで、MCP の分子機能、特にリンカー領域の構造と機能の解明を目指している。

本論文の成果は次の4点である。1) 大腸菌大量発現系を用いて調製した古細菌の MCP pHtrII にトリプシン処理を行い、これまでフレキシブルであると考えられていたリンカー領域において安定な構造ドメインを見いだした。2) この構造ドメインについて NMR による立体構造解析を行った結果、残基番号 135-150 の領域が α -helix 構造をとることを明らかにした。3) ドメイン検索により膜直下とは別にもう一つ HAMP ドメインが存在することを見だし、本研究で決定した α -helix 構造が二つの HAMP ドメインの間に位置することを明らかにした。EPR 測定の結果に基づきリンカー領域の構造モデルを構築し、負の走光性レセプターから伝えられた光シグナルを微細な構造変化を下流に伝達することが可能であることを示した。4) コールドショックベクターと可溶性タグを組み合わせた、大腸菌による高効率な新規発現系 pCold-GST の構築に成功し、リンカー領域などの NMR サンプル調製を可能にする新規技術の開発に成功した。

以上のように、本論文はバクテリアにおける外部環境のシグナル伝達において主要な役割を果たす MCP の分子機能の一端を立体構造や生化学的なデータから明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。