

大腸菌走化性シグナル伝達機構 ～タンパク質局在と相互作用を中心に～

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻

川岸 郁朗, 入枝 泰樹, 坂野 聡美

概要

大腸菌走化性シグナル伝達系は、全ての構成タンパク質が同定されており、生化学的性質や立体構造に関する情報も蓄積していることから、一つのシステム全体を分子レベルで理解するという課題を追求するうえで秀れたモデル系である。細胞膜に局在する走化性受容体は、おもに膜の外側のドメインで刺激を受容し、細胞質側ドメインでヒスチジンキナーゼ CheA と相互作用してその活性を制御する。刺激の有無に関わらずホモダイマーを形成し、アダプタータンパク質 CheW を介して CheA と複合体を形成する。近年、この受容体・キナーゼ複合体が大腸菌の細胞膜中にランダムに存在するのではなく、クラスターを形成して桿状細胞の極に局在することがわかってきた。そこで、このクラスター形成により、シグナルの増幅や一定の刺激に対する適応が起こるのではないかと考えられている。私たちは、現在までに、受容体のクラスター形成や下流因子との相互作用に関して、緑色蛍光タンパク質(GFP)との融合タンパク質を用いた解析を行っている。また、部位特異的ジスルフィド架橋を用いた解析により、受容体ダイマー間相互作用を検出し、それがシグナル伝達に関与することを示唆する知見を得た。これらの成果を紹介し、走化性シグナル伝達系におけるタンパク質の局在と相互作用ネットワークの動態について議論する。

はじめに

大腸菌は、アミノ酸や糖などの栄養物質に向かって近づき、金属イオンやインドールなどの有害物質から遠ざかるという性質（走化性）をもっている。遺伝学的に解析しやすいことから、大腸菌走化性は、感覚応答のモデル系として1960年代以来精力的に研究されてきた。今では、シグナル伝達に働く全ての構成タンパク質が同定され、立体構造もほぼわかっている。このことから、生物のシステム全体の働きを分子レベルで理解するという観点からも新たな注目を集めている。また、走化性シグナル伝達の中心となるHis-Aspリン酸リレー系は、原核生物や高等植物などの環境応答に普遍的に用いられている。さらに、ヒスチジンキナーゼの活性を制御する走化性受容体の作動原理は、ホルモン受容体などと本

質的に同じとされている。ここでは、受容体や受容体修飾酵素の細胞内局在や相互作用を中心に、シグナル伝達の分子機構について議論したい。

1. 大腸菌走化性システムについて

大腸菌は、外環境の刺激を受容し、応答する。例えば、大腸菌の懸濁液にセリンを含むキャピラリを差し込み、しばらくおくと、菌は口の周りに集まってくる。この性質は走化性と呼ばれ、感覚受容-応答系のなかでも最も詳しく研究がなされているものの一つである (Falke *et al.*, 1997; Stock & Levit, 2000; Bourret & Stock, 2002; Sourjik, 2004)。菌を引き寄せる物質を誘引物質、遠ざける物質を忌避物質と呼ぶ。また、大腸菌は温度 (走熱性) や pH 変化などの刺激に対しても走性を示す。他の細菌には、光に対して走性 (走光性) を示すものもある。

大腸菌は数本のらせん状のべん毛をもち、直線的な泳ぎ (スムーズ・スイミング) と方向転換 (タンブリング) という 2 種類の泳ぎを使い分けて移動する (図 1)。べん毛が反時計回り (CCW) すると束ねられてスクリューのように推進力を発生し直線的な泳ぎを、時計回り (CW) するとほどけて推進力が失われ方向転換をする。周囲の誘引物質濃度の上昇や、忌避物質濃度の低下により方向転換頻度が減少し、逆に誘引物質濃度の低下や、忌避物質濃度の上昇により方向転換頻度が増加する。その結果、より好ましい環境へと進むことができるわけである。

大腸菌走化性シグナル伝達には多くのタンパク質が関与している。刺激を受容する受容体、運動器官であるべん毛モーター、および各種 Che タンパク質である。外界からのシグナルは受容体で認識され、自己リン酸化型ヒスチジンキナーゼ CheA から応答調節因子 CheY への His-Asp リン酸リレー系を介してべん毛モーターまで伝わる。このリン酸基転移系と相同なタンパク

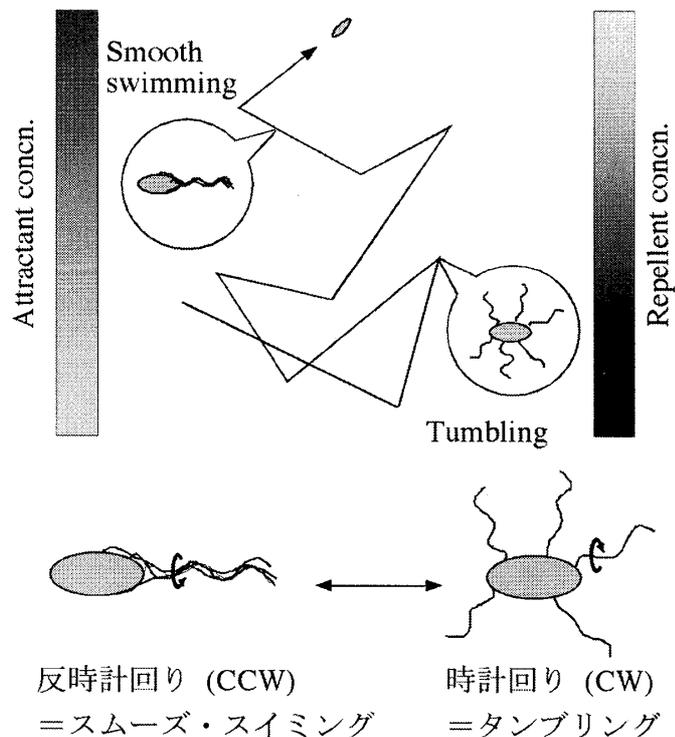


図 1 大腸菌の走化性 菌体あたり数本生えているべん毛が反時計回り (CCW) に回転すると、束ねられて推進力が発生し、菌は直線的に泳ぐ (スムーズ・スイミング)。一方、べん毛が時計回り (CW) に回転すると、束がほどけて方向転換する (タンブリング)。この二種類の泳ぎ方のバランスを、外界からの刺激に応じて調節することで、菌はよりよい環境へと移動する。

研究会報告

質を含むシグナル伝達系は、二成分制御系 two-component regulatory systems と呼ばれ、細菌のみならず、古細菌や真菌類の環境応答、高等植物のホルモン応答などに普遍的に用いられている (Stock *et al.*, 1989; Falke *et al.*, 1997; Mizuno, 1998; Stock *et al.*, 2000; West & Stock, 2001) (図2). このように、走化性には個々のタンパク質の機能だけでなく、各タンパク質間の相互作用がいくつも統合された高次のネットワークが重要である。

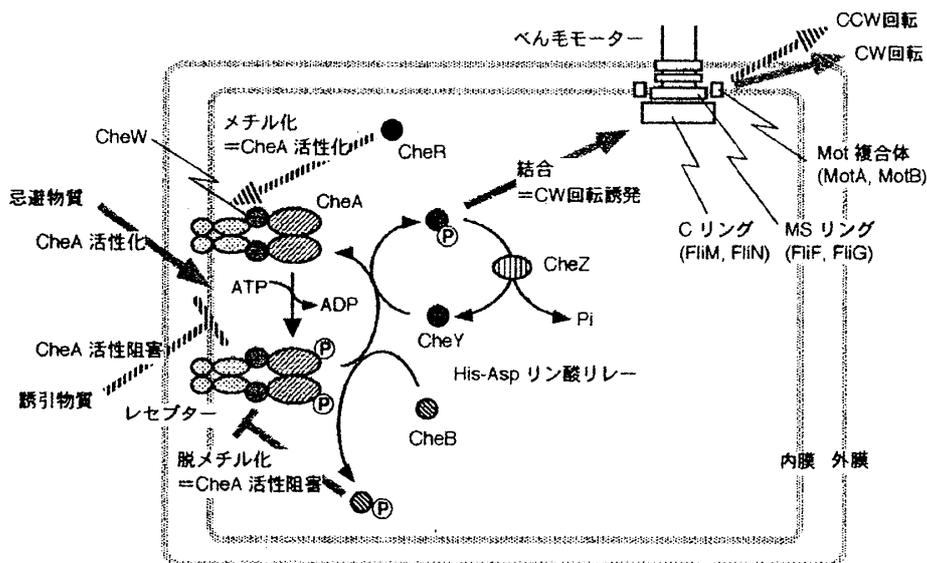


図2 大腸菌の走化性シグナル伝達経路 誘引物質と結合していない（あるいは忌避物質と結合した）受容体は、ヒスチジンキナーゼ CheA を活性化させる。自己リン酸化した CheA のリン酸基は、応答調節因子 CheY に転移され、リン酸化型 CheY はべん毛モーターのスイッチ複合体に結合し、べん毛を時計回りに回転させる。リン酸化型 CheY は CheZ の存在下で速やかに脱リン酸化する。受容体が誘引物質と結合すると、CheA が不活性化され、リン酸化型 CheY の細胞内濃度が低下するため、べん毛は反時計回りに回転する。リン酸化型 CheA は、脱メチル化酵素 CheB にもリン酸基を転移し、活性化させる。そのため、誘引物質が結合した受容体のメチル化レベルは上昇し、忌避物質が結合した受容体のメチル化レベルは低下する。このメチル化レベルの上昇・低下によって、誘引応答・忌避応答がそれぞれ打ち消され、適応が起こる（詳しくは本文参照）。

べん毛は、菌体外に突出したらせん状の線維、細胞表層に埋め込まれた基部体、および両者をつなぐフックからなる。線維とフックは、それぞれ単一の構成タンパク質が重合して出来た管状の構造物であり、この部分は力を発生せず、受動的に回転する。回転力を生み出すのは、細胞表層に埋め込まれたべん毛モーター（基部体はその一部）である。このモーターは、細胞膜の外から内へのイオンの流

れと共役して回転力を生み出すユニークな分子機械である。回転力発生メカニズムはまだよくわかっていないが、魅力的な生体ナノマシンの一つとして精力的に解析されている。べん毛モーターは、通常、反時計回り (CCW) に回転するが、リン酸化型 CheY が結合すると時計回り (CW) に回転する (図2)。回転方向を瞬時に切り替え得ることも、べん毛モーターの大きな特徴である。

2. 受容体の構造と機能

受容体は二回膜貫通型サブユニットが二つ会合したホモダイマーを形成し、ペリプラズム側のリガンド結合領域、膜貫通領域(TM)、細胞質側のリンカー領域、メチル化領域(MH)、シグナル産生領域から構成されている(図3)。受容体の各サブユニットのリガンド結合領域は4つ α ヘリックスの束($\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4$)から成っている。大腸菌のもつ二回膜貫通型受容体(MCP)は4種類で、セリン受容体(Tsr)、アスパラギン酸受容体(Tar)、リボース/ガラクトース受容体(Trg)、ジペプチド受容体(Tap)である。これらのうち菌体あたりの存在量が多いのはTsrとTarであるが、その絶対値(合計)は菌株や培養条件によって約3,000~40,000分子と大きくばらつき、Trgは常にその20分の1以下である(Li & Hazelbauer, 2004)。ただし、受容体と各Cheタンパク質のモル比は、条件によらずほぼ一定である(第4節参照)。どの受容体も単一の刺激を受容するのではなく、複数の刺激を受容できる。例えば、Tarは通常アスパラギン酸受容体と呼ばれるが、温度、pH、ニッケルイオン(Ni^{2+} 結合タンパク質を介するとされている)、マルトースとマルトース結合タンパク質の複合体も認識する多機能センサーである。このような多刺激受容性は、哺乳動物の受容体チャネルVR1(Caterina & Julius, 2001)などでもみられ、受容体が比較的普遍的にもつ性質と考えられる。

リガンドは受容体の片方のサブユニットのループ1-2($\alpha 1$ - $\alpha 2$ 間)と、もう片方のサブユニットのループ3'-4'($\alpha 3'$ - $\alpha 4'$ 間)の間に挟み込まれるようにして結合する(図3)。ホモダイマーを形成しているのでリガンド結合部位は二箇所存在し、両者は重ならないが、結合するリガンド分子は一分子のみである(Milbuern *et al.*, 1991; Yeh *et al.*, 1993; Jeffery & Koshland, 1993;

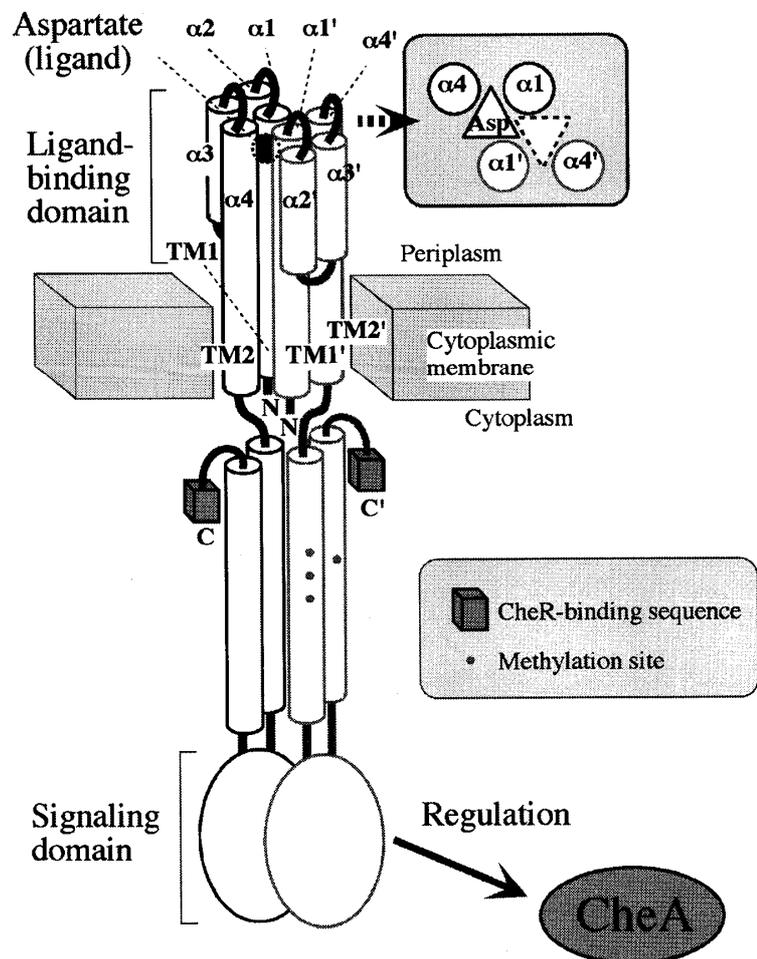


図3 大腸菌アスパラギン酸受容体 Tar の構造 Tar (およびその他の走化性受容体)は二回膜貫通型サブユニット二つからなるホモダイマーで、ペリプラズムのリガンド結合ドメイン、可逆的メチル化を受ける適応ドメイン、ヒスチジンキナーゼ CheA やアダプター CheW と相互作用するシグナル産生ドメインからなる。詳しくは本文参照。上右の挿入図は、アスパラギン酸結合部位を模式的に表したもの。

研究会報告

Biemann & Koshland, 1994; Lin *et al.*, 1994). 刺激物質が受容体のリガンド結合領域に結合すると、それに応じてシグナル産生領域がキナーゼ (CheA) の活性を調節する (Borkovich & Simon, 1991; Ninfa *et al.*, 1991). 一般的に、真核生物のチロシンキナーゼ型受容体などは、リガンド結合によるダイマー化が引き金となるとされている。しかし、大腸菌走化性受容体は、リガンド結合の有無にかかわらず常にダイマーで存在する (Milligan & Koshland, 1988) ことから、そのシグナル伝達には、モノマー-ダイマー変換ではなくダイマー内構造変化が重要であるとされている。実際に、架橋形成実験、結晶構造解析、電子スピン共鳴測定の結果から、「ピストンモデル」とよく一致する構造変化 (誘引物質結合により $\alpha 4$ が細胞質側へわずかに沈み込む) が示されている (Milburn *et al.*, 1991; Chervitz *et al.*, 1995; Chervitz & Falke, 1995; Chervitz & Falke, 1996; Hughson *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995; Ottemann *et al.*, 1999). Tar の全長サブユニットと細胞質を欠失したサブユニットのヘテロダイマーが受容体機能を保持していることも、片方のサブユニット内構造変化がとくに重要であることを示している (Tatsuno *et al.*, 1996; Gardina *et al.*, 1996). なお、TM 領域内の変異とその抑圧変異の解析から、このダイマー内構造変化はわずかなものであると推定され、これも「ピストンモデル」とよく合う (Umemura *et al.*, 1998).

走化性応答において、大腸菌は刺激物質の絶対的濃度ではなく濃度変化に対応する。すなわち空間的濃度勾配の中を自ら動き回ることにより、時間的変化として感知しているのである。このためには一定の刺激が持続すると応答を減衰させる適応という能力が必須で、適応により広いダイナミックレンジを確保することができるのである。適応は受容体のメチル化により達成される。メチル化を受けるのは細胞質領域の 4~5 個のグルタミン酸残基で、メチル化と脱メチル化を行うのはそれぞれメチル基転移酵素 CheR と脱メチル化酵素 CheB である。これまでに受容体がメチル化してもリガンド親和性が数倍しか低下しないことやキナーゼ活性が数倍しか上昇しないことがわかっており、どちらも適応を説明するには不十分である (Duntun & Koshland, 1991; Borkovich *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1994; Iwama *et al.*, 1997; Levit & Stock, 2002). 現在、受容体のメチル化はシグナル増幅率 (ゲイン) を制御すると考えられている (Levit & Stock, 2002; Sourjik & Berg, 2002b).

3. 極クラスター内でのダイマー間相互作用とシグナル増幅・ゲイン制御

大腸菌はわずかな刺激に対しても走化性応答を起こす。たとえば、*in vitro* で測定した Tar のアスパラギン酸に対する解離定数 K_d の値は約 1×10^{-6} M であるが、菌はわずか $\sim 3 \times 10^{-8}$ M のアスパラギン酸に応答し (Clarke & Koshland, 1979; Hedblom & Adler, 1983; Segall *et al.*, 1986), 受容体のリガンドによる占有率のわずかな変化 (1%以下) にも応答できる (Jasuja *et al.*, 1999). すなわち、シグナルの伝達過程において何らかの増幅が起こっているはずで

ある。しかし、CheA から CheY へのシグナル伝達は単純なリン酸基の転移で、実際の段階でシグナルの増幅が起こっているのか謎であった。近年この点についての解析が進み、モーターレベルと受容体レベルのそれぞれでシグナル増幅が起こると考えられている。モーターレベルの増幅機構として、べん毛モーターのスイッチ複合体タンパク質 FliM にリン酸化型 CheY が協同的に作用するということがわかっている (Cluzel *et al.*, 2000; Sourjik & Berg, 2002a)。しかし、これだけでは十分にシグナル増幅を説明できず、増幅はおもに受容体レベルで起こるとされている (Sourjik & Berg, 2002b)。免疫電子顕微鏡や蛍光顕微鏡での観察などから、受容体は、CheA やアダプタータンパク質 CheW と複合体を形成し、菌体の極に局在し巨大クラスターを形成していることがわかってきた (Maddock & Shapiro, 1993; Lybarger & Maddock, 1999; Skidmore *et al.*, 2000)。この事実を踏まえて、クラスター内での受容体ダイマー間の相互作用 (協同性など) によりシグナル増幅が起こるというモデルが提唱されている (Bray *et al.*, 1998)。実際、化学合成した多価のリガンドの方が一価のリガンドよりも応答の閾値が低いことや、CheY-YFP と CheZ-CFP の間の蛍光エネルギー共鳴(FRET) を出力シグナルにした解析などから受容体ダイマー間の協同性が示唆されている (Gestwicki *et al.*, 2000; Gestwicki & Kissling, 2002; Sourjik & Berg, 2004)。さらに近年、結晶構造解析によって Tsr ダイマーが細胞質側で特異的に相互作用してトライマーを形成し、“trimer of dimers” (六量体) 構造をとっているというモデルが提唱されている (Kim *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002) (図4)。このトライマー接触領域の変異が、受容体のシグナル産生能やクラスター形成能、キナーゼ調節能に影響を及ぼすことも、クラスター内での受容体ダイマー間相互作用がシグナルの伝達や増幅に重要な役割を果たしている可能性を示唆している (Ames *et al.*, 2002)。

上述したように、走化性における極クラスター内における受容体ダイマー間相互作用の

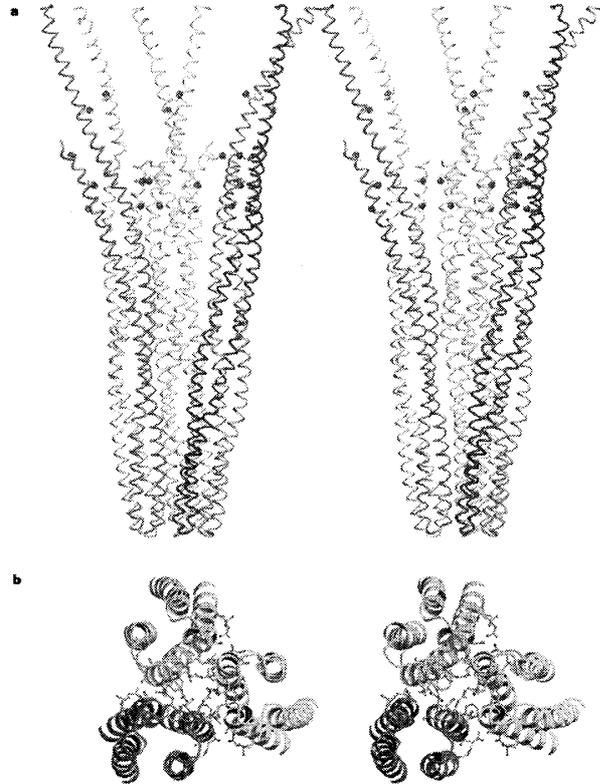


図4 受容体の“trimer of dimers” (六量体) 構造 Tsr 細胞質フラグメントの六量体結晶ユニット (ステレオ図)。三つのダイマーがシグナル産生ドメインの先端で接触し、六量体を形成している。下図は接触部位を拡大したもの。Kim *et al.*, (1999) より引用。

研究会報告

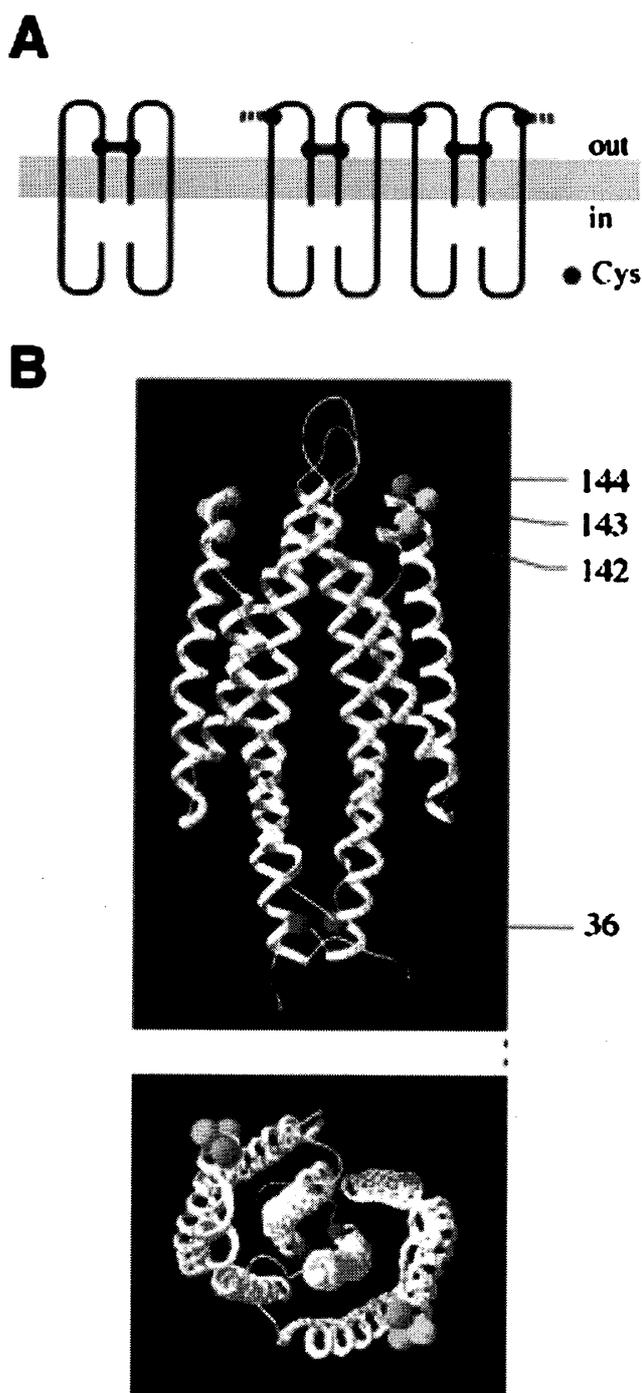


図5 *In vivo* S-S 架橋による Tar ダイマー間相互作用の解析 A. ダイマー内サブユニット界面に Cys を導入すると架橋ダイマーが得られる。そこで、ダイマー外表面にもう一つ Cys を導入すると架橋オリゴマーが得られるのではないかと考えた。B. Tar ペリプラズムドメインの立体構造（上、側面図；下、外膜側から見た図）と Cys 置換した残基の位置。

重要性が示唆されているが、直接的な相互作用はこれまで検出されていなかった。そこで、当研究室では、アスパラギン酸受容体 Tar がシステイン残基をもたない点に着目して、特定のアミノ酸残基をシステイン置換した変異体 Tar を構築し、*in vivo* で架橋形成を調べることにより、受容体ダイマー間相互作用について検討した (Homma *et al.*, 2004)。Tar ダイマー内のサブユニット界面 (S36) にシステインを導入すると S-S 架橋が形成されることはすでにわかっていた。そこで、リガンド結合ドメインの結晶構造を参考に、ダイマー外表面で、S36 からは充分遠い位置 (D142, Y143, G144) にシステインを導入した (図5)。その結果ダイマー間で S-S 架橋が形成されることがわかった。この結果は Tar ダイマー間での相互作用を初めて示したものである。また、ダイマー内架橋は CheA・CheW の有無によらず効率よく形成されたのに対して、ダイマー間架橋形成は CheA・CheW 非存在下で著しく低下した。これは受容体がある程度 CheA・CheW 依存的に菌体の極に局在するという観察結果と一致し、ダイマー間架橋が自然な受容体のクラスター状態を反映していることを示唆するものである。ダイマー内サブユニット界面とダイマー外表面の二箇所システイン残基を導入した二重変異体 Tar (S36C&D142C) では、S-S 架橋オリゴマーが検出された (図6)。

なかでも、推定六量体は四量体や八量体に比べて多く形成された。これは、Tsr 細胞質側の

結晶構造解析で得られた“trimer of dimers”構造 (Kim *et al.*, 1999) とよく一致する。また, Tar ダイマー内架橋形成がリガンドであるアスパラギン酸の影響を受けないのに対して, ダイマー間架橋形成はアスパラギン酸の添加により低下した(図6)。このリガンドの影響は, 部位特異的置換によってアスパラギン酸結合能をなくした変異 Tar では検出されなかった。また, Tar の C 末端に GFP を融合させた Tar-GFP の局在は, リガンドの有無によらず変化しなかった。これらの結果から, 極クラスターは“trimer of dimers”を構成単位として, 受容体が規則正しく配列した高次な構造であることが強く示唆され, クラスター内における受容体ダイマー間の相互作用の変化がシグナル伝達に重要な役割をしていると考えられた。

さらに, 当研究室では, 結晶構造的に Tar ダイマーから突出しているループ 2-3 領域の系統的なシステイン置換を行い, 各変異体の架橋効率の違いから極クラスター内での受容体ダイマーのおおよその配

向を推定した(未発表)。また, システイン置換とメチル化変異を組み合わせることで, 受容体のメチル化がペリプラズムのダイマー間架橋形成に影響すること, メチル化がリガンドの影響を緩和させることがわかった(未発表)。したがって, 受容体ダイマー間相互作用がゲイン・コントロールに関与している可能性は高い。しかし, メチル化が細胞質のダイマー間架橋に影響しないとの報告があることから (Studdert & Parkinson, 2004), より詳細な研究が必要である。

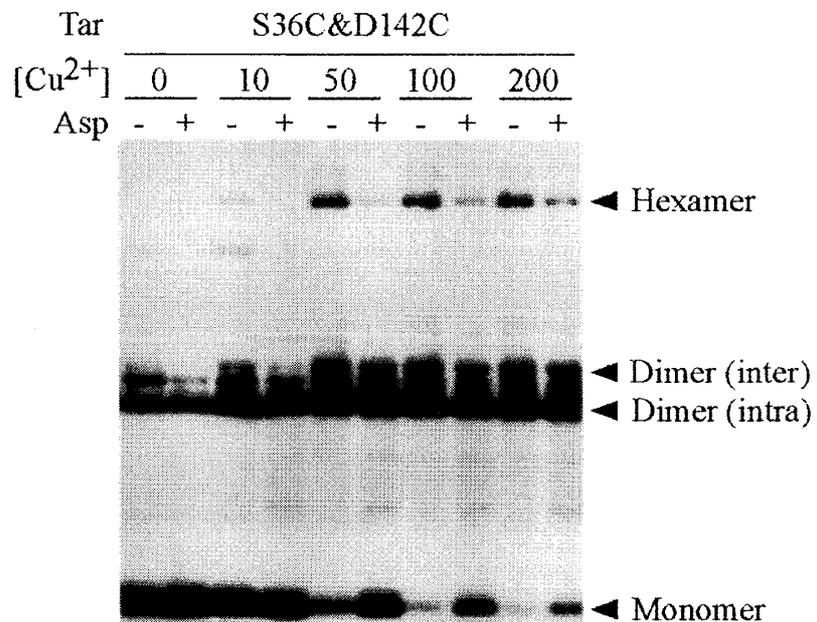


図6 誘引物質結合が受容体ダイマー間架橋に与える影響 誘引物質であるアスパラギン酸 (Asp) の添加は, 二重 Cys 変異体 (S36C&D142C) の架橋オリゴマー (推定六量体) 形成を低下させた。図は, 大腸菌全抽出液を SDS-PAGE で分離後, ウェスタンブロッティングにより Tar を検出したもの。ダイマー内 (intra) で架橋したダイマーとダイマー間 (inter) で架橋したダイマーは移動度が異なることに注意。[Cu²⁺] は酸化触媒として加えた銅フェナンスロリンの濃度 (M) を表す。

4. シグナル伝達タンパク質の受容体クラスターへのターゲティング

これまで述べたように, 受容体のメチル化は, クラスター内での受容体ダイマーを変化させ, シグナルゲイン (入出力の関係) を調節すると示唆された。では, 受容体の可逆的

研究会報告

なメチル化を引き起こす CheR や CheB はどのように調節されているのだろうか。

メチル化酵素 CheR は, *S*-アデノシルメチオニンから受容体メチル化部位であるグルタミン酸残基へのメチル基転移反応を触媒し (式 1), 脱メチル化酵素 CheB は, グルタミン酸メチルエステルの加水分解反応を触媒する (式 2)。



(R は受容体, SAM は *S*-アデノシルメチオニン, SAH は *S*-アデノシルホモセリンの略)

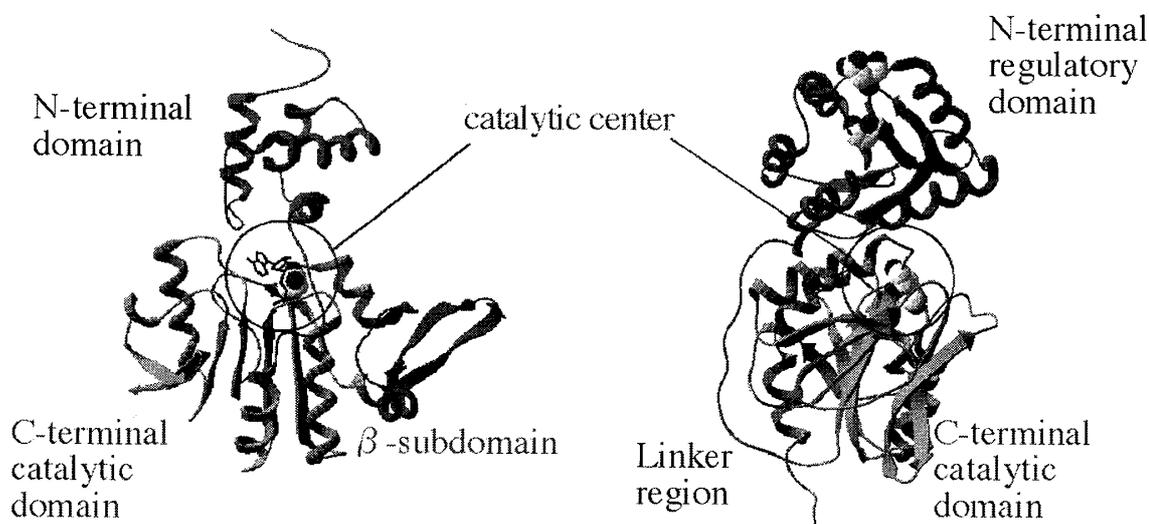


図7 メチル化酵素 CheR (左) と脱メチル化酵素 CheB (右) の立体構造 丸で囲んだ部分は活性中心. Djordjevic and Stock, (1997); Djordjevic *et al.* (1998)より引用.

このように, いずれの酵素も受容体の同じ部位に作用するものの, 触媒する反応は逆反応ではなく, タンパク質構造や活性制御も全く異なっている. CheR は, N 末端・C 末端の二つのドメインと, C 末端ドメイン内に存在する β-サブドメインから構成されている (Djordjevic & Stock, 1997). 一方, CheB も N 末端・C 末端ドメインをもつが, それらは 20 残基程度のリンカー領域によってつながれている (Djordjevic *et al.*, 1998) (図 7). どちらの酵素も活性部位は C 末端ドメインにあるが, CheB は, ヒスチジンキナーゼ CheA のレスポンスレギュレーターであり, N 末端ドメイン=調節ドメインが触媒ドメインの活性を制御する. すなわち, 非リン酸化型の N 末端ドメインは C 末端ドメインと相互作用してその活性を抑制するが, N 末端ドメインがリン酸化されると, 抑制がはずれて CheB が活性化されるのである. しかし, CheR はリン酸化による制御を受けない. つまり, 適応は, おもに CheB のリン酸化レベルにより制御されている.

最近, 菌体内における受容体などの数が正確に測定された (Li & Hazelbauer, 2004). それ

によると、各タンパク質の発現量は菌株や培養条件によって大きくばらつくが、互いのモル比はほぼ一定である。CheA ダイマーを 1 とすると、受容体ダイマーは 3.4 ± 0.8 , CheW は 1.6 ± 0.5 , CheY は 2.4 ± 0.4 , CheZ ダイマーは 0.5 ± 0.09 とほぼ同程度であるのに対し、CheR は 0.05 ± 0.01 , CheB は 0.08 ± 0.01 と、圧倒的に少ない。したがって、適応がスムーズに行われるためには、CheR や CheB が効率よく受容体クラスターに標的化することが重要ではないかと推測される。

先にも述べたように、受容体・CheA・CheW 三者複合体は菌の極に局在するが、この三者複合体は同時に、下流の走化性関連因子の標的にもなっている。例えば、べん毛モーターの回転方向を変換するレスポンスレギュレーター-CheY や、リン酸化型 CheY の自己脱リン酸化を促進する CheZ は、CheA を標的として菌極に局在する (Sourjic & Berg, 2000; Cantwell *et al.*, 2003)。では、CheR と CheB は、どこを標的として、どのように局在しているのだろうか。

CheR は、受容体側のメチル化部位とは異なる、C 末端 NWETF 配列と相互作用することが示され (Wu *et al.*, 1996), CheR と NWETF ペプチドの共結晶の構造解析も行われている (Djordjevic & Stock, 1998)。また、当研究室における *in vivo* 解析から、この相互作用が適応に重要であることも示されている (Okumura *et al.*, 1998; Shiomi *et al.*, 2000)。さらに、蛍光タンパク質 GFP を用いた解析より、CheR が受容体依存的に菌の極に局在すること、この局在には CheR

の β -サブドメイン
と受容体の

NWETF 配列との
結合が重要である

ことを示した

(Shiomi *et al.*,

2002)。CheR はメ
チル化酵素なので、
受容体のメチル化
部位とも相互作用
しているはずであ
るが、この相互作用

は弱く一時的なた
め、生化学的には検
出されてこなかつ
た。そこで、様々な

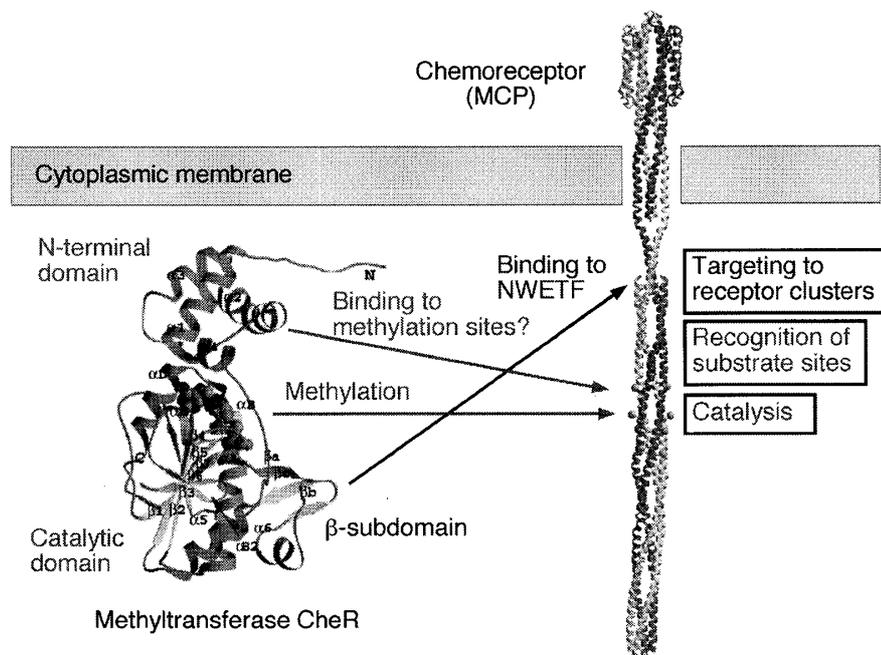


図8 CheRによる受容体の二重認識機構 CheR (左) の β -サブドメインが受容体 (右) の C 末端 NWETF 配列と、CheR の N 末端ドメイン (の $\alpha 2$ ヘリックス) が受容体のメチル化ヘリックスと相互作用する。これらの相互作用は、それぞれ CheR の極クラスターへの標的化と受容体メチル化部位の認識に重要である。

研究会報告

種の CheR の配列を比較解析し、高度に保存されている残基を置換した変異体を作製・解析した結果、機能未知であった CheR の N 端ドメイン内にある $\alpha 2$ ヘリックスが受容体メチル化ヘリックスと相互作用すると推定された。実際、CheR の $\alpha 2$ ヘリックスと Tar メチル化ヘリックスの間の *in vitro* 架橋実験により、これが証明された。このように、メチル化酵

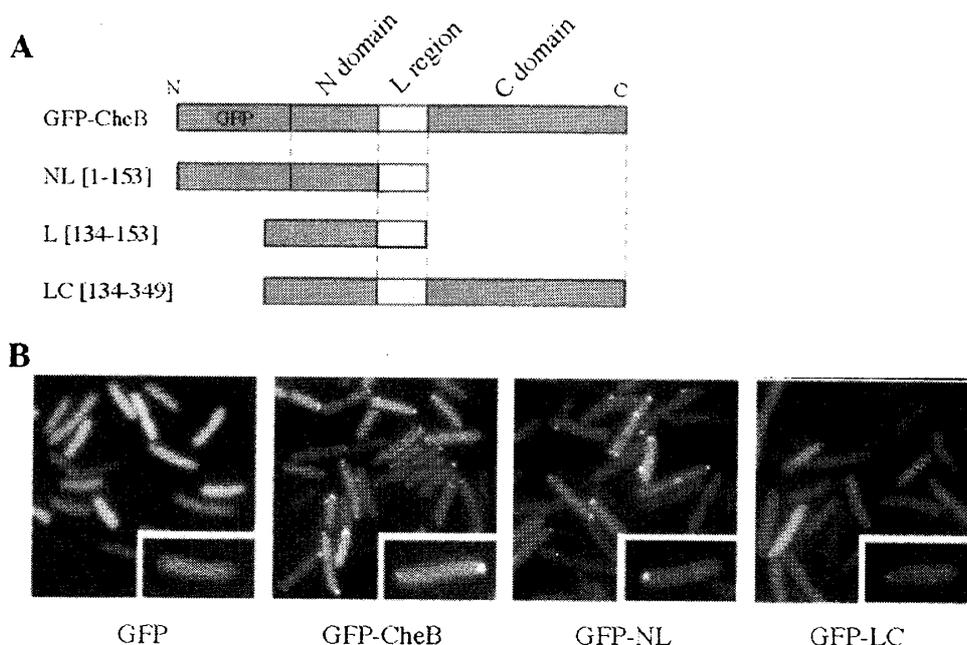


図9 CheB の細胞内局在 A. 脱メチル化酵素 CheB の全長または各領域を緑色蛍光タンパク質 GFP と融合させた。B. 構築した各種 GFP-CheB を *cheB* 遺伝子欠失株 ($\Delta cheB$) で発現させ、蛍光顕微鏡により観察した。全長 GFP-CheB のみでなく、GFP-NL や GFP-LC 融合タンパク質も、菌体の極に局在した。図にデータは示さないが、これらの局在には受容体の存在が必須であった。

素 CheR は、触媒ドメイン以外の（他のメチル基転移酵素には見られないが、全ての CheR に特異的に保存されている）二つの領域で受容体の別々の部分と特異的に相互作用するという「二重認識機構」をもつのである（図8）。

では、脱メチル化酵素 CheB についてはどうだろうか。GFP を CheB の全長または各領域（N 端調節ドメイン[N], C 端触媒ドメイン[C], およびリンカー[L]）と融合させ、細胞内局在を観察した (Banno *et al.*, 2004)。その結果、GFP-CheB（全長）および GFP-NL 融合タンパク質は極に局在し、GFP-LC もわずかではあるが極局在を示した（図9）。そこで、CheB の局在ターゲットを調べるため、もう一つのレスポンスレギュレーター-CheY の標的である CheA の P2 ドメインを欠失させると、GFP-CheB（全長）および GFP-NL の局在は失われた。その一方で、Tar-GFP や GFP-LC の局在は変化しなかった。In vitro 結合実験の結果も考え併せると、CheB の NL ドメインと CheA の P2 ドメインが結合することによって CheB が極の受容体・キナーゼ複合体と共局在すると示唆される。このように、同じ受容体修飾酵素

である CheR と CheB でも、局在機構が全く異なることが明らかとなった。CheB に関しては、2つのドメインから構成されている構造と、GFP-LC の局在パターンを考慮すると、図10のような、極クラスター内での作用機構が推測される。

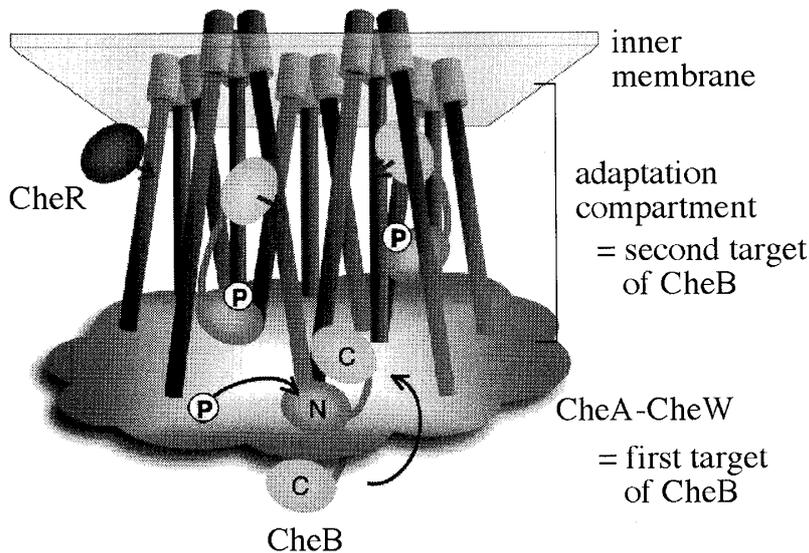


図10 走化性受容体クラスターにおける「適応コンパートメント」モデル 大腸菌細胞極には受容体・ヒスチジンキナーゼ CheA・アダプターCheW が巨大複合体を形成している。その構造ははっきりしていないが、現在の知見を総合すると、受容体メチル化部位を含むヘリックス領域は、CheA と CheW によって、バルクの細胞質領域とはある程度区切られていると推測される。この区画は「適応コンパートメント」と呼ばれている (Shimizu *et al.*, 2000)。メチル化酵素 CheR は、受容体 C 末端配列と直接結合することにより、この区画に留まるのだろう。一方、脱メチル化酵素 CheB は、CheA の P2 ドメインを標的として局在する。しかし、CheB はリン酸化されると CheA から解離して適応コンパートメントに移り、第二の標的である受容体メチル化ヘリックスと相互作用するのではないかと推測される。

以上述べたように、シグナル伝達に関わるタンパク質はすべて、細胞の極に局在することが明らかとなった。それでは、極への局在は静的なものなのか、それとも、何らかの制御が働いているのだろうか。そこでまず、GFP 融合した受容体の局在を解析ソフトによって定量化したところ、受容体のメチル化レベルが高い方が、極局在の程度がわずかであるが有意に高いことが明らかになった(未発表)。また、CheR, CheB 局在に対する受容体メチル化の影響も調べた。

その結果、CheR, CheB どちらも、メチル化された状態の受容体と共発現させた方がより極局在した。CheR 局在の変化はわずかで、受容体の局在変化を反映するものと推定されたが、CheB の場合は局在程度の変化が顕著であった(未発表)。したがって、CheB の極局在は性的なものではなく、何らかの制御を受けていると推測される。

おわりに

以上のように、大腸菌走化性シグナル伝達系において、個々のコンポーネントは細胞の中でばらばらに存在するのではなく、秩序だった配置をとっている。とくに、細胞の極に局在する巨大な受容体・キナーゼ複合体は、それ自身の立体構造(四次構造)の制御が膜の外から内へのシグナル伝達や適応におけるゲイン制御の鍵となるものである。また、受

研究会報告

容体・キナーゼ複合体は、他のシグナル伝達タンパク質の局在ターゲットにもなっており、それらの因子の局所的な濃度を高めることにより、効率よいシグナル伝達を実現している。シグナル伝達システム全体の働きを正しく理解するためには、このようなタンパク質局在と高次複合体形成による相互作用について、さらに詳細な知見を得ることが必須である。

謝辞

末尾になりましたが、たいへん興味深い研究会で発表する機会を与えていただいた柴田達夫先生に感謝します。

引用文献

- Ames, P., Studdert, C. A., Reiser, R. H. & Parkinson, J. S. (2002) Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7060-7065.
- Banno, S., Shiomi, D., Homma, M. and Kawagishi, I. (2004) Targeting of the chemotaxis methylesterase/deamidase CheB to the polar receptor-kinase cluster in an *Escherichia coli* cell. *Mol. Microbiol.* **53**, 1051-1063.
- Biemann, H. P., & Koshland, D. E. Jr (1994) Aspartate receptors of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* bind ligand with negative and half-of-the-sites cooperativity. *Biochemistry.* **33**, 629-634.
- Borkovich, K. A., Alex, L. A. & Simon, M. I. (1992) Attenuation of sensory receptor signaling by covalent modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6756-6760.
- Bourret, R. B. & Stock, A. M. (2002) Molecular information processing: lessons from bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **277**, 9625-9628.
- Bray, D., Levin, M. D. & Morton-Firth, C. J. (1998) Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity. *Nature* **393**, 85-88.
- Cantwell, B. J., Draheim, R. R., Weart, R. B., Nguyen, C., Stewart, R. C. and Manson, M. D. (2003) CheZ phosphatase localizes to chemoreceptor patches via CheA-short. *J. Bacteriol.* **185**, 2354-2361.
- Caterina, M. J. & Julius, D. (2001) The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci.* **24**, 487-517. Review.
- Chervitz, S. A. & Falke, J. J. (1995) Lock on/off disulfides identify the transmembrane signaling helix of the aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, 24043-24053.
- Chervitz, S. A. & Falke, J. J. (1996) Molecular mechanism of transmembrane signaling by the

- aspartate: a model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2545-2550.
- Clarke, S. & Koshland, D. E. Jr. (1979) Membrane receptors for aspartate and serine in bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **254**, 9695-9702.
- Cluzel, P., Surette, M. & Leibler, S. (2000) An ultrasensitive bacterial motor revealed by monitoring signaling proteins in single cells. *Science* **287**, 1652-1655.
- Djordjevic, S., Goudreau, P. N., Xu, Q., Stock, A. M. and West, A. H. (1998) Structural basis for methyltransferase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1381-1386.
- Djordjevic, S. and Stock, A. M. (1997) Crystal structure of the chemotaxis receptor methyltransferase CheR suggests a conserved structural motif for binding *S*-adenosylmethionine. *Structure* **5**, 545-558.
- Djordjevic, S. and Stock, A. M. (1998) Chemotaxis receptor recognition by protein methyltransferase CheR. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 446-450.
- Dunten, P. & Koshland, D. E. Jr. (1991) Tuning the responsiveness of a sensory receptor via covalent modification. *J. Biol. Chem.* **266**, 1491-1496.
- Falke, J. J., Bass, R. B., Butler, S. L., Chervitz, S. A. & Danielson, M. A. (1997) The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 457-512.
- Gardina, P. J. & Manson, M. D. (1996) Attractant signaling by an aspartate chemoreceptor dimer with a single cytoplasmic domain. *Science* **274**, 425-426.
- Gestwicki, J. E. & Kiessling, L. L. (2002) Inter-receptor communication through arrays of bacterial chemoreceptors. *Nature* **415**, 81-84.
- Gestwicki, J. E., Strong, L. E. & Kiessling, L. L. (2000) Tuning chemotactic responses with synthetic multivalent ligands. *Chem. Biol.* **7**, 583-591.
- Hedblom, M. L. & Adler, J. (1983) Chemotactic response of *Escherichia coli* to chemically synthesized amino acids. *J. Bacteriol.* **155**, 1463-1466.
- Homma, M., Shiomi, D., Homma, M. & Kawagishi, I. (2004) Attractant binding alters arrangement of chemoreceptor dimers within its cluster at a cell pole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 3462-3467.
- Hughson, A. G. & Hazelbauer, G. L. (1996) Detecting the conformational change of transmembrane signaling in a bacterial chemoreceptor by measuring effects on disulfide crosslinking *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11546-11551.
- Iwama, T., Homma, M. & Kawagishi, I. (1997) Uncoupling of ligand-binding affinity of the

研究会報告

- bacterial serine chemoreceptor from methylation- and temperature-modulated signaling states. *J. Biol. Chem.* **272**, 13810-13815.
- Jasuja, R., Lin, Y., Trentham, D. R. & Khan, S. (1999) Response tuning in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11346-11351.
- Jeffery & Koshland, (1993) *Vibrio cholerae hlyB* is a member of the chemotaxis receptor gene family. *Protein Sci.* **2**, 1532-1535.
- Kim, K. K., Yokota, H. & Kim, S. H. (1999) Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemoreceptor. *Nature* **400**, 787-792.
- Kim, S. H., Wang, W. & Kim K. K. (2002) Dynamic and clustering model of bacterial chemotaxis receptors: structural basis for signaling and high sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11611-11615.
- Lee, G. F., Burrows, G. G., Lebert, M. R., Dutton D. P. & Hazelbauer, G. L. (1994) Deducing the organization of a transmembrane domain by disulfide cross-linking. The bacterial chemoreceptor Trg. *J. Biol. Chem.* **269**, 29920-29927.
- Lee, G. F., Lebert, M. R., Lilly, A. A. & Hazelbauer, G. L. (1995) Transmembrane signaling characterized in bacterial chemoreceptors by using sulfhydryl crosslinking *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3391-3395.
- Levit, M. N. & Stock, J. B. (2002) Receptor methylation controls the magnitude of stimulus-response coupling in bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **277**, 36760-36765.
- Li, M. and Hazelbauer, G.L. (2004) Cellular stoichiometry of the components of the chemotaxis signaling complex. *J. Bacteriol.* **186**, 3687-3694.
- Lin, L. N., Li, J., Brandts, J. F. & Weis, R. M. (1994) The serine receptor of bacterial chemotaxis exhibits half-site saturation for serine binding. *Biochemistry* **33**, 6564-6570.
- Lybarger, S. R. & Maddock, J. R. (1999) Clustering of the chemoreceptor complex in *Escherichia coli* is independent of the methyltransferase CheR and the methyl-eraser CheB. *J. Bacteriol.* **181**, 5527-5529.
- Maddock, J. R. & Shapiro, L. (1993) Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science* **259**, 1717-1723.
- Milburn, M. V., Prive, G. G., Milligan, D. L., Scott, W. G., Yeh, J., Jacarik, J., Koshland, D. E. Jr. & Kim, S. H. (1991) Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand. *Science* **254**, 1342-1347.
- Milligan, D. L. & Koshland, D. E. Jr. (1988) Site-directed crosslinking. Establishing the dimeric structure of the aspartate receptor of bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **263**, 6268-6275.
- Mizuno, T. (1998) His-Asp phosphotransfer signal transduction. *J. Biochem. (Tokyo)*. **123**,

555-563.

- Ninfa, E. G, Stock, A., Mowbray, S. & Stock, J. (1991) Reconstitution of the bacterial chemotaxis signal transduction system from purified components. *J. Biol. Chem.* **266**, 9764-9770.
- Okumura, H., Nishiyama, S., Sasaki, A., Homma, M. and Kawagishi, I. (1998) Chemotactic adaptation is altered by changes in the carboxy-terminal sequence conserved among the major methyl-accepting chemoreceptors. *J. Bacteriol.* **180**, 1862-1868.
- Ottemann, K. M., Xiao, W., Shin, Y. K. & Koshland, D. E. Jr. (1999) A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor. *Science* **285**, 1751-1754.
- Segall, J. E., Block, S. M. & Berg, H. C. (1986) Temporal comparisons in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8987-8991.
- Shimizu, T. S., Le Novere, N., Levin, M. D., Beavil, A. J., Sutton, B. J. & Bray, D. (2000) Molecular model of a lattice of signaling proteins involved in bacterial chemotaxis. *Nat. Cell Biol.* **2**, 792-796.
- Shiomi, D., Okumura, H., Homma, M. and Kawagishi, I. (2000) The aspartate chemoreceptor Tar is effectively methylated by binding to the methyltransferase mainly through hydrophobic interaction. *Mol. Microbiol.* **36**, 132-140.
- Shiomi, D., Zhulin, I. B., Homma, M. and Kawagishi, I. (2002) Dual recognition of the bacterial chemoreceptor by chemotaxis-specific domains of the CheR methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **277**, 42325-42333.
- Skidmore, J. M., Ellefson, D. D., McNamara, B. P., Couto, M. M., Wolfe, A. J. & Maddock, J. R. (2000) Polar clustering of the chemoreceptor complex in *Escherichia coli* occurs in the absence of complete CheA function. *J. Bacteriol.* **182**, 967-973.
- Sourjik, V. and Berg, H.C. (2000) Localization of components of the chemotaxis machinery of *Escherichia coli* using fluorescent protein fusions. *Mol. Microbiol.* **37**, 740-751.
- Sourjik, V. & Berg, H. C. (2002a) Binding of the *Escherichia coli* response regulator CheY to its target measured *in vivo* by fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12669-12674.
- Sourjik, V. & Berg, H. C. (2002b) Receptor sensitivity in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 123-127.
- Sourjik, V. & Berg, H. C. (2004) Functional interactions between receptors in bacterial chemotaxis. *Nature* **428**, 437-441.
- Sourjik, V. (2004) Receptor clustering and signal processing in *E. coli* chemotaxis. *Trends Microbiol.* **12**, 569-576.

研究会報告

- Stock, J. B. & Levit, M. (2000) Signal transduction: hair brains in bacterial chemotaxis. *Curr. Biol.* **10**, R11-R14.
- Stock, A. M, Robinson, V. L. & Goudreau, P. N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem.* **69**, 183-215.
- Studdert, C. A. & Parkinson, J. S. (2004) Crosslinking snapshots of bacterial chemoreceptor squads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2117-2122.
- Tatsuno, I., Homma, M., Oosawa, K. & Kawagishi, I. (1996) Signaling by the Escherichia coli aspartate chemoreceptor Tar with a single cytoplasmic domain per dimer. *Science* **274**, 423-435.
- Umemura, T., Tatsuno, I., Shibasaki, M., Homma, M. & Kawagishi, I. (1998) Intersubunit interaction between transmembrane helices of the bacterial aspartate chemoreceptor homodimer. *J Biol Chem.* **273**, 30110-30115.
- West, A. H. & Stock, A. M. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends. Biochem. Sci.* **26**, 369-376.
- Wu, J., Li, J., Li, G., Long, D. G. and Weis, R. M. (1996) The receptor binding site for the methyltransferase of bacterial chemotaxis is distinct from the sites of methylation. *Biochemistry* **35**, 4984-4993.
- Yeh, J. I., Biemann, H. P., Pandit, J., Koshland, D. E. Jr & Kim, S. H. (1993) The three-dimensional structure of the ligand-binding domain of a wild-type bacterial chemotaxis receptor. Structural comparison to the cross-linked mutant forms and conformational changes upon ligand binding. *J. Biol. Chem.* **268**, 9787-9792.