

氏名(本籍)	佐藤チエリ(茨城県)		
学位の種類	博士(学術)		
学位記番号	博甲第2204号		
学位授与年月日	平成11年7月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	STRUCTURAL STUDIES ON THE OSMOSENSOR ENVZ BY NMR SPECTROSCOPY (オスモセンサー EnvZ の NMR 構造解析)		
主査	筑波大学教授	理学博士	宗像英輔
副査	筑波大学教授	農学博士	田仲可昌
副査	筑波大学教授	P h . D .	多比良和誠
副査	筑波大学教授	農学博士	馬場忠

論文の内容の要旨

蛋白質リン酸化反応が、細胞内情報伝達、成長調節、物質代謝などの様々な生命現象に関与していることは広く知られている。細菌における環境刺激に応答した遺伝子発現制御の解析が進むにつれて、グラム陰性、陽性を問わず多種類の細菌に存在する、ヒスチジン-アスパラギン酸リン酸リレーシステム (Hit-Asp Phosphorelay System) が明らかになった。この情報伝達系に属する分子が次々と単離され、主要な保存された残基が同定されてきているが、分子機構の詳細な解明には至っていない。そこで、本研究では大腸菌の浸透圧変化に応答する EnvZ-OmpR リン酸リレーシステムの分子機構の解明を目的とし、細胞質内領域である EnvZ のドメイン A とドメイン B について核磁気共鳴法 (NMR) を用いた構造解析を行った。さらに、EnvZ と OmpR の相互作用についても検討した。

大腸菌の EnvZ はヒスチジンキナーゼに属し、浸透圧変化に伴って His243 を自己リン酸化し、直ちに OmpR の Asp55 にそのリン酸基を受け渡す。EnvZ は 450 残基からなる蛋白質で、細胞質内に位置する C 末端領域 (180-450) には、自己リン酸化領域 (223-289, ドメイン A) と、キナーゼ領域 (290-450, ドメイン B) がある。ドメイン A は、自己リン酸化部位である His243 を含み、OmpR に結合すると考えられている。また、ドメイン B は ATP 結合能を有し、kinase/phosphatase の活性中心であると共に、ヒスチジンキナーゼファミリーに保存された領域/残基の多くを保持している [G1 box (373-377), G2 box (403-405), N347, F387]。

ドメイン B は、5 本の β ストランド (strand B, D, E, F, G) で形成される β シートが、3 つの α ヘリックス ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$) によって裏打ちされた α/β サンドイッチ構造を取っていることを明らかにした。また、短い 2 本の β ストランド (strand A と C) からなる逆平行型 β シートが、このサンドイッチ構造の一方の端を押さえていることもわかった。さらに、短い α ヘリックス ($\alpha 3$) と長いループ (385-409) によって構成されているセントラルループが存在している。この領域の運動性は高く、 α/β サンドイッチ構造から大きくはみだしている。ATP の非加水分解型アナログである AMP-PNP は、 $\alpha 3$ ヘリックス、セントラルループの一部、そして β ストランド B と D に囲まれた部分に結合していることを確認した。そのアデニン環が N347, D373, I378, F387 といったヒスチジンキナーゼファミリーに保存されている残基に対して空間的に近く、これらの残基がリン酸リレーに重要な役割を果たしていることが予測された。さらに AMP-PNP のリン酸基は蛋白質表面に向いており、ATP のリン酸基が His243 に転移するという事実を裏付けた。

また、ドメインAはヘリックスループヘリックス構造からなり、シンメトリックなホモダイマーを形成することにより、4ヘリックスバンドルモチーフに属する全体構造を取っていることを明らかにした。各ヘリックスの内側には疎水性残基が配向し、これらの間の疎水性相互作用により4ヘリックスバンドルが安定化していることがわかった。N末端のヘリックスI (234-257) は、ヒスチジンキナーゼファミリーに高く保存されている配列を持っており、その中央に位置するHis243側鎖は溶媒に露出している。これは、His243がリン酸基を受け取る自己リン酸化反応において、有利な配置であると考えられる。また、His243の前後の領域(242-248)はヘリックスの特徴が弱く、柔軟性の高いヘリックスで構造を取っている。さらに蛋白質表面では、His243の付近に酸性残基(D244,D273,E277)がパッチを形成しているほか、疎水性残基からなる疎水性ベルトも存在している。これらは全て、二量体が形成する面に限られており、同じサブユニット内のヘリックスIとIIの間で形成される蛋白質表面には存在しない。これらのことから、二量体形成は、疎水性コアの形成による全体構造の安定化を行っているだけでなく、蛋白質分子間の認識に関与する領域を蛋白質表面に提示する役割もはたしていると考えられる。

OmpRのn末端側ドメインの構造は明らかになっていないため、ホモロジーモデリングを行った結果、EnvZのHis243からリン酸基を受け取るOmpRのAsp55は疎水性残基のクラスター、塩基性残基からなるパッチ(Lys85, Lys105)、また酸性残基パッチ(Asp12, Asp13)に囲まれていた。つまり、モデリングで予測されたOmpR分子表面のAsp55の周囲は、EnvZのHis243周辺を取り囲む分子表面と相補的であることが確認された。EnvZは基質の結合に関わらず二量体を形成し、リン酸転移反応には二量体のEnvZが必須であることが既に知られている。本研究の構造データから、EnvZは二量体を形成することでOmpRに対する特異的認識領域を持つ分子になり、その結果、浸透圧変化に伴った的確なシグナル伝達が成立すると考えられる。さらに、リン酸リレーの活性中心であるドメインBのセントラルループが、ドメインAのHis243に近づくことが容易に予想されること併せて、EnvZ-OmpRリン酸リレーにおける、ドメインA、ドメインB及びPmpRの相互作用機構が構造をもとに初めて示唆された報告である。

審査の結果の要旨

リン酸化を伴う情報伝達系の中でも、ヒスチジン-アスパラギン酸リン酸リレーシステムは、リン酸基を直接転移していくことで環境の変化を伝えるユニークな情報伝達系である。細菌をはじめとして、酵母や植物にもこのシステムを利用している例が見つかっており、その多様性と共通性という相反するテーマへの注目が高まっている。

著者はEnvZ-OmpRのシステムに対して構造生物学的手法を駆使し、大腸菌の浸透圧センサーであるEnvZの細胞質領域と、リン酸リレーの相手となるOmpRとの構造相関に基づく情報伝達作用機序を検討した。

その結果、EnvZの細胞質内領域を構成するドメインAとドメインBの各々の三次元構造を核磁気共鳴(NMR)法を用いて明らかにした。EnvZはATPをリン酸基の供与体として自己リン酸化反応を行う蛋白質であるが、ドメインBとATPの結合様式を明らかにした成果は、各ドメインの相関を知る上で非常に意義深い。さらにドメインBはヒスチジンキナーゼファミリーの中でもアミノ酸配列上良く保存された領域であることから、同属の蛋白質群にもこの構造モチーフが保存されていると予測され、ヒスチジンキナーゼ全般の分子機構解明にも貢献することが大いに期待される。またドメインAの構造結果から、EnvZは安定な二量体を形成することが確認されたうえ、蛋白質分子表面の解析によってEnvZ-OmpRの分子認識機構を考察し、EnvZの二量体形成の重要性を示した。

ヒスチジンキナーゼに属するいくつかの蛋白質について構造解析が試みられているが、特に保存された残基を含む自己リン酸化領域とATP結合やキナーゼ活性領域については結晶化が成功せず三次構造は得られていなかった。本研究によって、ヒスチジンキナーゼの中でも基本的な機能しか持ち合わせていないEnvZについてこれらの領域の三次構造が明らかにされたことは、リン酸基の移動による情報伝達機構の理解と解明に大きく貢献し、関連する他の蛋白質の機能研究までも多いに刺激するものと期待される。

よって、著者は博士(学術)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。