

Title	カルモジュリンのC末端残基の役割
Author(s)	黄, 多率
Citation	
Issue Date	2011-12
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/10051
Rights	
Description	Supervisor:大木 進野, マテリアルサイエンス研究科, 修士

カルモジュリンの C 末端残基の役割

黄 多率

【背景】 カルモジュリン (CaM) は真核生物細胞に普遍的に存在する Ca^{2+} 結合タンパク質である。 Ca^{2+} を結合した CaM が多様な標的酵素を活性化することにより様々な生理現象を調節する。CaM は EF ハンド型の Ca^{2+} 結合ドメインを 4 つ持つが、出芽酵母 CaM (yCaM) の最も C 末端側の EF4 は変異により Ca^{2+} 結合能を欠いている。それにも関わらず、yCaM の EF4 の F ヘリックスは標的酵素の活性化に必須である。そこで本研究では CaM の C 末端残基に注目し、それらが担う役割を調べることにした [1-4]。共同研究者らが測定した欠損変異体 (Figure 1) の Ca^{2+} 結合能と標的酵素活性化能の結果では、C 末端から 6 残基以上を欠損させた場合に顕著な機能低下が分かった。さらに、円二色性測定の結果からは C 末端残基を欠損するほど Ca^{2+} 依存的な構造変化が減少し、特に C 末端側から数えて 4 番目と 5 番目のアミノ酸残基まで欠損させた 2 種類の変異体の間に変化の境界となる部分が存在することが確認された。今回この結果を受けて、4 と 5 残基欠損の 2 種類の変異体を用いた各種 NMR 測定を行い、それら変異体の構造と Ca^{2+} 結合、標的ペプチドの結合と複合体構造についての知見を得た。

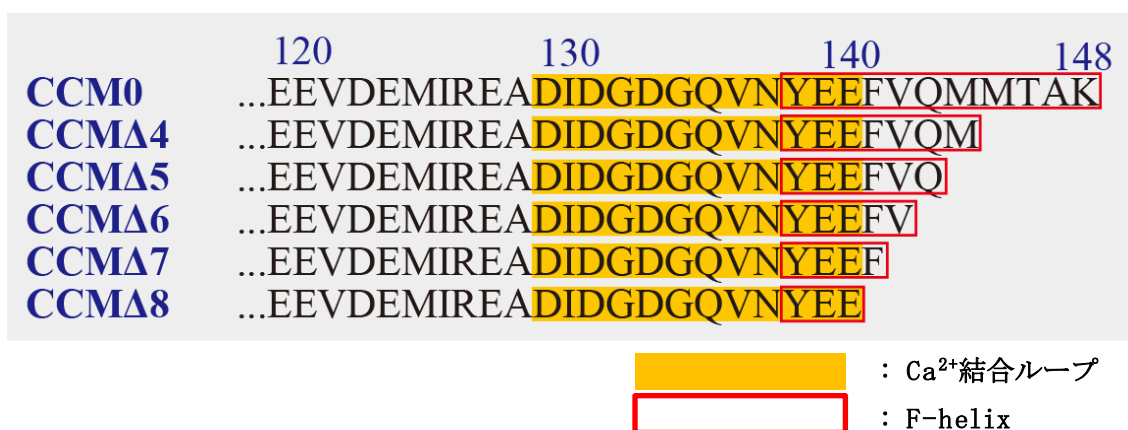


Figure 1 EF4 における CaM と欠損変異体のアミノ酸配列。Chicken CaM を CCM0 とし、 Δ 以下の数字は C 末端側の欠損された残基数を表す。

【実験】 全長の CaM およびその変異体は、大腸菌の発現系を用いて作製した。精製には各種クロマトグラフィを用いた。標的ペプチドは受託合成品を用いた。NMR の測定には Varian INOVA750, Bruker AVANCE III 500 および 800 を使い、298K で行った。構造情報を得るために、均一 ^{15}N 標識試料の ^1H - ^{15}N HSQC を測定した。また、EF ハンド型タンパク質の NMR 研究でしばしば Ca^{2+} の代わりに使われている ^{113}Cd を用いて 1 次元 NMR 測定を行った。測定データの処理には、NMRpipe を用いた。

【結果・考察】 SDS-PAGEの結果から、CCM0とCCM Δ 5の発現と精製が確認された。

CCM0、CCM Δ 4とCCM Δ 5の ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルから Ca^{2+} 依存的な構造変化が観察された (Figures 2 and 3)。 Ca^{2+} を結合していないCCM Δ 4とCCM Δ 5のNMRスペクトルのEF3とEF4に由来するピークでは強度の低下や線幅の増大などが観測された。このような不明瞭なピークを持つことから、両者のEF3とEF4は不安定な構造を持っており、しかもNMRスペクトルが良く似通っていることから、これらの構造は類似していると予想できる。

CCM Δ 4とCCM Δ 5が結合する Ca^{2+} の数を透析平衡法で調べたところ、3個か4個かを確定する明瞭な結果が得られなかった。しかし、CCM Δ 4とCCM Δ 5は全長CaMと同程度の標的酵素活性化能力を示した。そこで我々は ^{113}Cd -NMR実験を行い、これを詳細に調べた (Figure 4)。

Figure 4の左側と右側はそれぞれ標的ペプチド非存在下と存在下のスペクトルである。CCM0は4個の ^{113}Cd を結合するが、標的ペプチド非存在下の ^{113}Cd -NMRスペクトルでは Ca^{2+} 高親和性のEF3とEF4に結合した Cd^{2+} からの信号のみが観測される (Figure 4a)。CCM0と標的ペプチドとの複合体では見かけの Ca^{2+} 結合能が高くなるので、4本の信号が観測される (Figure 4d)。CCM Δ 4のスペクトル (Figures 4b and 4e) がCCM0のスペクトル (Figures 4a and 4d) とほぼ一致することから、CCM Δ 4は4個の Ca^{2+} を結合すること、標的ペプチドを結合した構造はCCM0の複合体構造に近いことが明らかになった。一方、CCM Δ 5のスペクトル (Figures 4c and 4f) はCCM0やCCM Δ 4のスペクトルとは大きく異なることが明らかになった。標的ペプチド非存在下のCCM0で確認されるC末端側の2本のピークと比べ、CCM Δ 5のスペクトルでは1本のピークのみ観察される。この結果から、欠損の影響によりEF4の Cd^{2+} 結合能が低下したと判断される。また、標的ペプチド存在下のCCM Δ 5のスペクトルでは2本の強いピークと2本の弱いピークが観察されるが、後者は欠損が存在するCドメインに結合した2個の Cd^{2+} からの信号であることが分かる。

この結果は、C末端側から5番目の残基 (Met144) が Ca^{2+} 結合や標的酵素との結合にとって重要であることを示唆している。

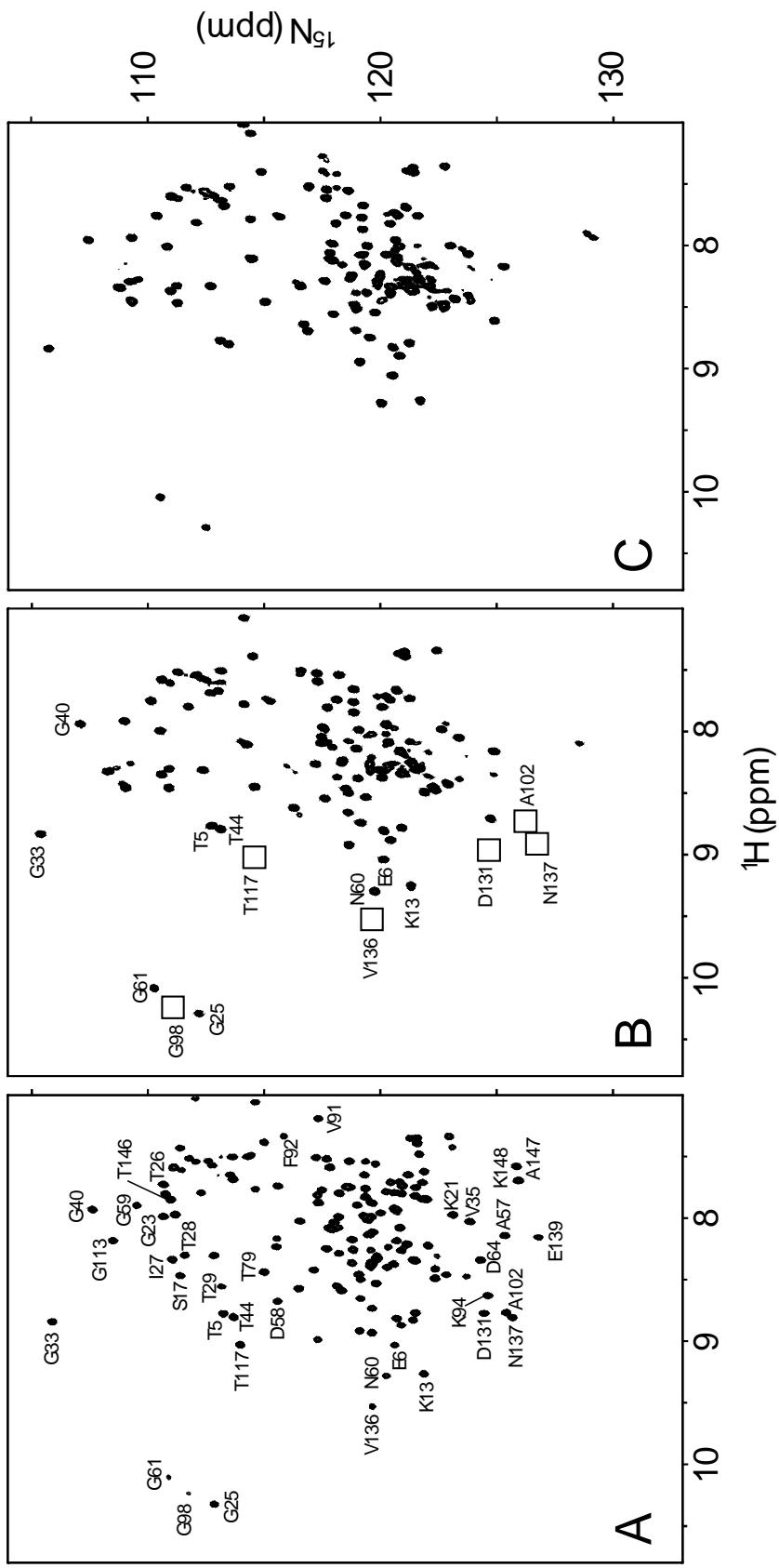


Figure 2 Ca^{2+} 非存在下の CCM0、CCM Δ 4 と CCM Δ 5 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。パネル B のボックスはパネル A と比べてなくなった残基を表す。

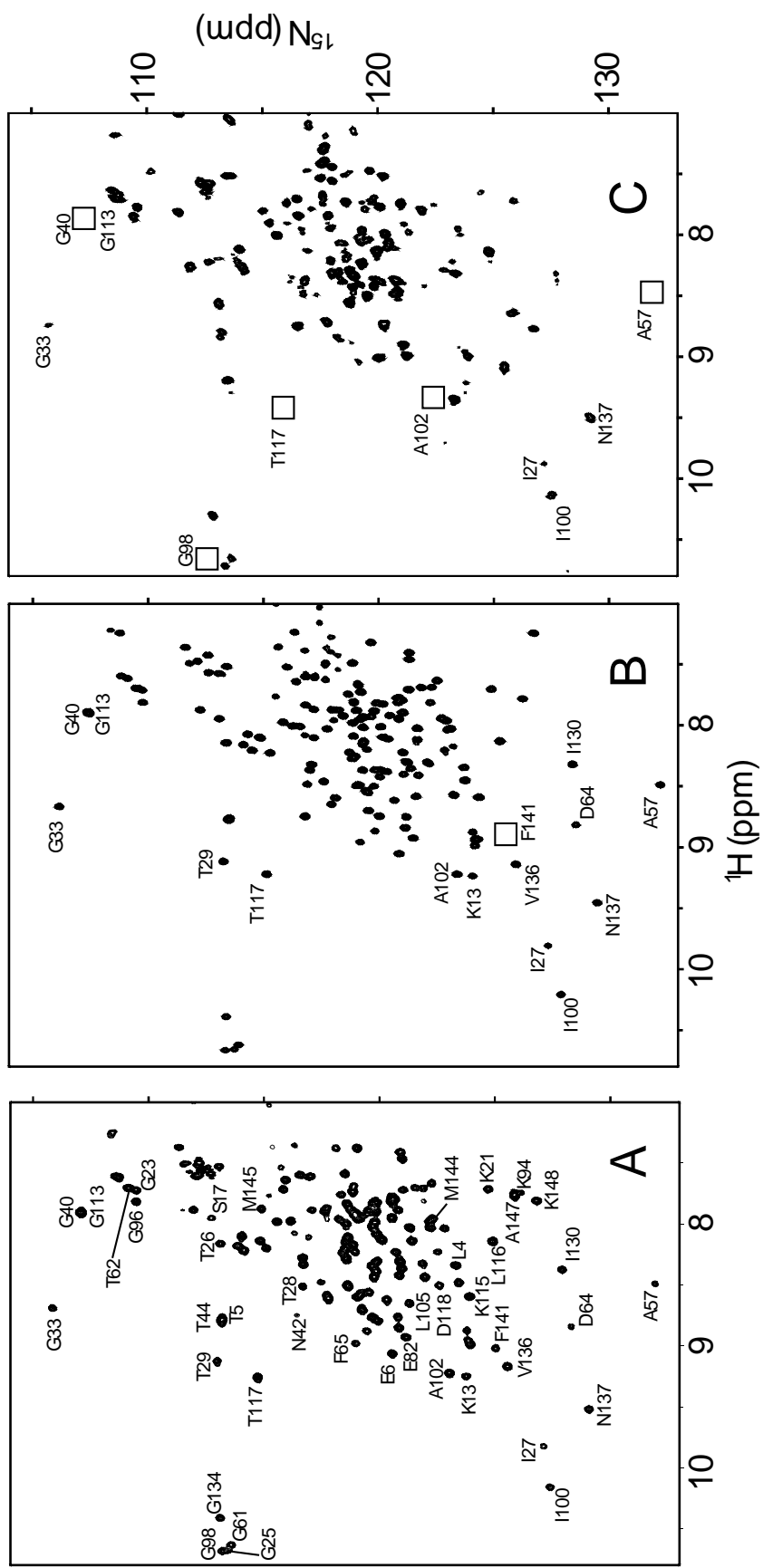


Figure 3 Ca^{2+} 存在下の CCM0、CCM Δ 4 と CCM Δ 5 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。パネル B と C のボックスはパネル A と比べてなくなった残基を表す。

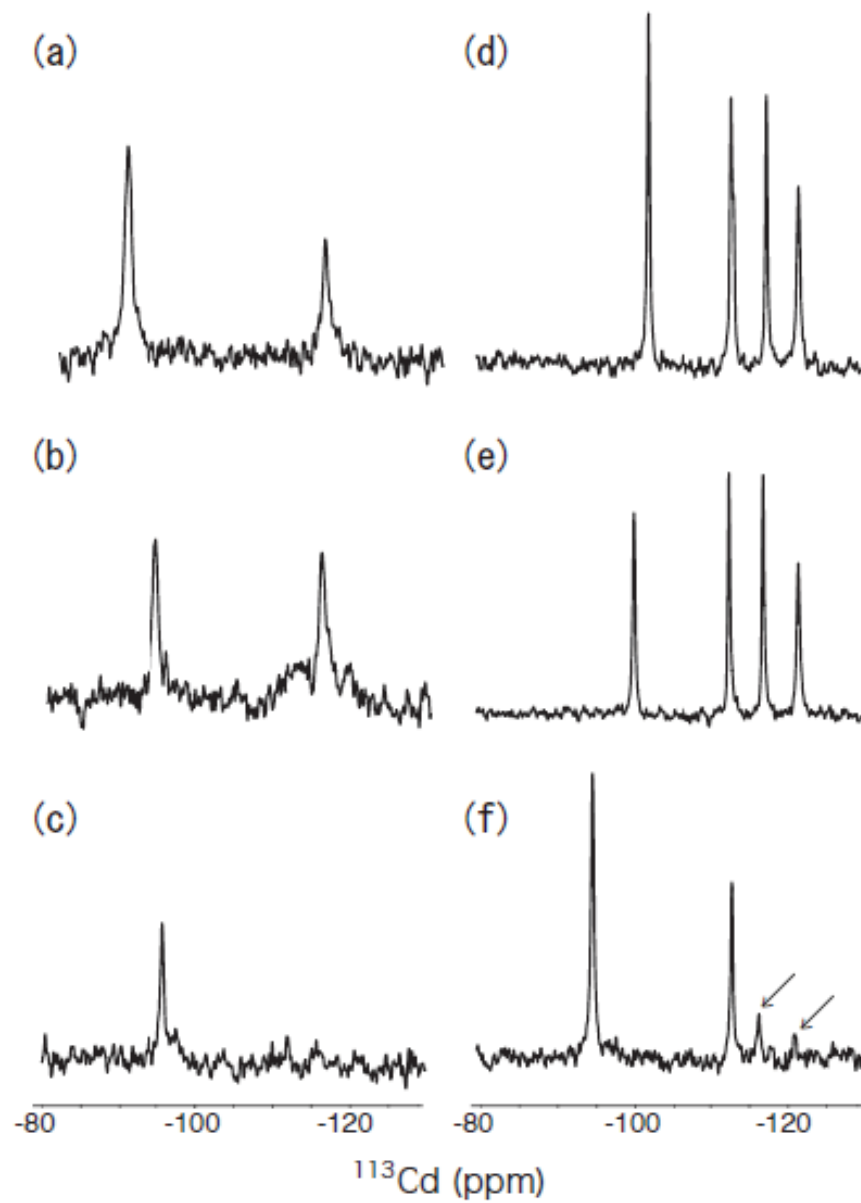


Figure 4 CCM0、CCM Δ 4 と CCM Δ 5 の ^{113}Cd -NMR スペクトル。左側 (a、b と c) と右側 (d、e と f) はそれぞれ標的ペプチド非存在下と存在下の CCM0、CCM Δ 4 と CCM Δ 5 のスペクトルを示す。CCM0 (a と b)、CCM Δ 4 (b と e) と CCM Δ 5 (c と f) である。

【参考論文】

- [1] Luan Y, Matsuura I, Yazawa M, Nakamura T & Yagi K. Yeast calmodulin: structural and functional differences compared with vertebrate calmodulin. *J. Biochem.* **102**, 1531-1537 (1987).
- [2] Yazawa M, Nakashima K & Yagi K. A strange calmodulin of yeast. *Mol. Cell. Biochem.* **190**, 47-54 (1999).
- [3] Forsén S, Thulin E, Drakenberg T, Krebs J & Seamon K. A ¹¹³Cd NMR study of calmodulin and its interaction with calcium, magnesium and trifluoperazine. *FEBS Lett.* **117**, 189-194 (1980).
- [4] Matsuura I, Ishihara K, Nakai Y, Yazawa M, Toda H & Yagi K. A site-directed mutagenesis study of yeast calmodulin. *J. Biochem.* **109**, 190-197 (1991).