2P009

Ca²⁺ 飽和型酵母カルモデュリンの両ドメイン接近の分子的要因

○横打 剛¹、和泉 義信¹、能野 秀典²、中島 謙一³、矢沢 道夫³ (¹山形大院・理工学、²札幌大・化学、³北大院・理学)

カルモデュリン (CaM) は酵母の CaM(YCM0) を除いて 90 % 以上の一次構造の相同性を示すが、YCM0 のそれは約 60 % の相同性しか示さない。また脊椎動物由来の CaM には 4Ca²⁺ 結合するが、YCM0 は結合部位 4 の構造が不完全な為、3Ca²⁺ しか結合しない。最近、矢沢らは、YCM0 が 3Ca²⁺ 結合に伴い、両ドメイン間に相互作用が働き、分子形態が変化することを報告した。本研究では、酵母とニトリのキメラ CaM の溶液構造を放射光小角 X 線散乱 (SR-SAXS) により調べ、Ca²⁺ 結合に伴う YCM0 の分子形態変化の分子的要因を解明することを試みた。特に 130I の欠損、140(E→Q) と M→L 置換の効果を調べた。4 種類のキメラ CaM (YC73、YC88Y、C129 及び YC130) は遺伝子工学の手法を用いて大腸菌から発現させたものを用いた。SR-SAXS 測定は KEK の PF の BL-10C に設置された酵素回折計を用いて行った。実験データから分子の回転半径、距離分布関数、相互作用パラメータを評価した。実験結果から、両ドメインは 130I の欠損と 140(E→Q) の置換の相乗効果により接近することが示された。さらに 130I と 140(E→Q) を含む C ドメインの疎水性パッチは M→L 置換により疎水性相互作用が強まるため、N ドメインと接近しやすくなるものと考えられる。

T.Yokouchi, Y. Izumi, H. Yoshino, K. Nakashima and M.Yazawa : Evidence for yeast calmodulin inter-domain compaction in solution induced by Ca²⁺ binding

2P011

ニューロン特異的タンパク質 NAP22 の 2 分子結合は Ca²⁺ 飽和カルモデュリンの劇的な構造変化を引き起こす

○和泉 義信¹、林 宣宏²、神保 雄次¹、松藤 智洋¹、松嶋 範男³ (¹山形大・院理工、²藤田保健大・総医研、³札幌大・保健医療)

神経成長円錐やシナプスに局在し、思考や記憶などの高次機能に関与していることが示唆されている Neuron-specific acidic protein-22kDa(NAP22) の N 末端のミリスチル基はカルモデュリン (CaM) と直接相互作用する。CaM と NAP22 の相互作用の分子機構は、既報告の CaM 結合部位タンパク質に存在する BAA 型の CaM 結合部位と CaM との相互作用の分子機構とは異なる新規のものであると考えられている。リコンビナント NAP22 を用いたゲルシフトアッセイにより、カルシウムイオン存在下で 1 分子の CaM に 2 分子の NAP22 が結合して複合体を形成することが明かとなった。NAP22 の N 末端領域に相当するアミノ酸配列を持ったミリスチル化ペプチド (mC/N9) と CaM 複合体の溶液 X 線小角散乱の結果は、2 分子の mC/N9 が CaM に結合するとアレキ型構造からよりコンパクトな構造をとることが明かとなった。本研究では 2 分子の NAP22 が CaM に結合したときの CaM の溶液構造を解明することである。このために重水素化 CaM と軽水素化 NAP22 の 1 対 2 の混合溶液が用いられた。中性子散乱測定は SANS/U を用いて行った。コントラストマッチングの条件下で複合体中の DCaM の回転半径は約 18Å であった。この値はコンパクトな球状複合体の値 (16.4Å) とは著しく異なる。また、Ca²⁺/CaM の回転半径は約 22Å でアレキ型構造をとる。本研究で得られた約 18Å の回転半径はこれらの中間的な値であり、CaM と NAP22 の相互作用の分子機構が新規なものであることを示唆している。これらの結果を基に複合体の構造モデルを検討する。

Y.Izumi, N.Hayashi, Y.Jinbo, T.Matsufuji, N.Matsushima : The binding of two moles of neuron-specific protein NAP22 induces a significant structural change in Ca²⁺/CaM

2P010

Calmodulin と mastoparanX の複合体形成過程についての静的・動力的研究

○村瀬 智彦、飯尾 隆義 (名古屋大・院理・物質理学)

Calmodulin (CaM) は全ての真核生物に存在する Ca²⁺ 結合タンパク質である。細胞内 Ca²⁺ 濃度がある量を超えると、CaM は Ca²⁺ を N 端・C 端にそれぞれ 2 個ずつ結合し、構造変化を起こす。これにより、CaM は数多くの CaM 依存性標的蛋白質と結合し、その生理的機能を制御している。

この CaM と標的蛋白質の複合体形成過程の分子メカニズムについて、多くの研究グループが数多くの静的・動力的な方法を用いて研究を行ってきた。特に、動力的研究においては CaM と標的蛋白質の複合体から Ca²⁺ を解離する過程を調べ、CaM または CaM-標的蛋白質複合体の特性を明らかにしてきた。

CaM の Ca²⁺ 結合能は N 端側が C 端側よりも約 2、3 倍弱い。他方、Ca²⁺ を解離する速度は N 端側が C 端側に比べて約百倍速いことがわかっている。これらから、Ca²⁺ を結合する速度は N 端側が C 端側よりも約三、五十倍速いことが計算で求められる。この結果より、CaM の C 端側は N 端側に比べて Ca²⁺ と強く結合し、N 端側は CaM 周辺の Ca²⁺ 濃度変化に素早く反応することがわかる。こうした CaM の特性から、CaM-標的蛋白質複合体形成過程の分子メカニズムがいくつかモデル化されてきた。

これらの研究に対して、CaM と標的蛋白質の Ca²⁺ 結合による動力的な複合体形成過程についてはほとんど研究が行われなかった。そこで我々は、この Ca²⁺ 結合の CaM-標的蛋白質複合体形成過程を動力的に調べた。標的蛋白質としてはスズメバチの毒素である mastoparanX (MasX) を用いて、3 つの実験手法 (蛍光アニソトロピー、Ca²⁺ 滴定蛍光法、ストップド・フロー法) で調べた。これらの静的・動力的実験結果をもとに、我々は CaM と MasX の Ca²⁺ 結合複合体形成についての動力的分子スキームを構築した。

T.Murase and T.Iio : Static and Kinetic Studies of the Complex Formation between Calmodulin and MastoparanX

2P012

ヘキシキナーゼのグルコース結合における水和変化の誘電測定

○鈴木 誠¹、カピルソヨド ラシェル¹、児玉 孝雄² (¹東北大院・工・金属、²九州工大・情報工・生化)

ヘキシキナーゼは D グルコース等のリン酸化酵素で D グルコースと結合するとき水和量がわずかに減少するという研究報告 (C. Reid et.al, Biophys. J., 72, 1022 (1997)) がある。彼らは PEG を用いて浸透圧測定により、60-100 個の水和変化があると述べている。われわれは、酵母ヘキシキナーゼの D グルコース結合時の水和変化を GHz 域 (0.2-20GHz) 誘電測定で検出することを試みた。ヘキシキナーゼ A (Sigma, E.C.2.7.1.1, Type F-300) の水溶液を TRIS-HCl (TRIS-HCl 20mM, pH 8.0, ATP-free) に対して透析し、測定サンプルとした。溶液の密度および外液の密度を Anton-Paar DMA-58 により測定し、またタンパク濃度は 280nm での吸光係数 0.89abs/mg/ml により決めた。水和測定に用いた周波数領域は 3-10 GHz で、解析方法の詳細は既報 (Suzuki et al. J. Phys. Chem, 100, 7279-7282, 1996) に述べている。測定方法は、20.0 度 C でヘキシキナーゼ溶液を 10 秒間隔でスペクトルを連続測定中に、一気に 14 倍モル量のグルコースを注入攪拌してその変化を見る。さらに過剰のグルコースの効果を見るために 70 倍モル量のグルコースを添加してスペクトルの変化を測定し、最初に投入した過剰グルコース分の効果を差し引いた。この方法では、グルコースの結合前後のスペクトルの時間差は混合攪拌時間を考慮して 30 秒しかないためマシンドリフトによる誤差を非常に小さくすることができた。これまで 2 回行った測定の結果、グルコース結合前で 1 個のヘキシキナーゼあたり 1100 個の水和水をもち、グルコースを添加した結果 60 個の水和水減少を確認した。測定では微小な誘電率変化をアつかうため、さらに測定回数を増やして平均した結果を報告する。

M. Suzuki, S.R.Kabir and T.Kodama : Hydration change of hexokinase for glucose binding by microwave dielectric measurement