3K1530

カルモデュリン/リアノジンレセプター標的ペプチド複合体の分子認識機構

○杉浦 庸介、松藤 智洋、和泉 義信（山大院・理工学）

＜目的＞カルシウムリリースチャンネルであるリアノジンレセプター（以下 RyR1）は Ca^{2+} 非存在下のカルモデュリン (apoCaM) により活性化され、 Ca^{2+} 飽和 CaM (Ca^{2+} CaM) により阻害される。その際、RyR1 の CaM 結合部位は Ca^{2+} の有無によりシフトすることが報告されている。本研究では放射光小角 X 線散乱 (SR-SAXS) 法を用いて RyR1 の CaM 結合部位ペプチドと CaM 複合体の溶液構造から分子認識機構解明を試みた。

＜実験＞RyR1 の CaM の結合部位 (3614-3635) ペプチド (RyR1-B) は固相合成により合成した。CaM/RyR1-B 複合体の SR-SAXS 測定は、高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・放射光実験施設の BL-10C に設置された酵素回折計を用いて行った。結果は分子量、無限希釈濃度での回転半径 (R_0)、距離分布関数 $P(r)$ を用いて解析した。

＜結果と考察＞複合体の分子量がほとんど等しいことから、 Ca^{2+} の有無に関わらず、CaM は RyR1-B と複合体を形成する。 $P(r)$ の形から、apoCaM/RyR1-B 複合体はアレイ型構造をとる。これに対し、 Ca^{2+} CaM/RyR1-B 複合体もほぼアレイ型構造をとるが、 $P(r)$ の肩が小さく、最大長が apoCaM/RyR1-B のそれより若干小さい。さらに、前者の R_0 は後者のものより 1.4 Å 大きい。以上の結果は、 Ca^{2+} CaM の N、C 両ロブに RyR1-B が 1 分子ずつ結合するが、apoCaM では片方のロブにのみ RyR1-B が 1 分子結合するため両者の構造が少し異なると考えられる。以上の推論を確かめるために、さらに、3614-3634、3625-3644、3614-3643 のシーケンスを持つ標的ペプチドと CaM との複合体の SR-SAXS 測定を予定している。

Y.Sugiura, T.Matsufuji and Y.Izumi : Molecular Recognition of Calmodulin to Calmodulin Binding Site on the Ryanodine Receptor.

3L0900

ミオシン線維形成における静電的相互作用の役割

○芥川 亨¹、畑 安雄¹、大井 龍夫¹、片山 栄作² (¹京大・化研、²東大・医科研)

筋肉蛋白ミオシンは分子の規則的会合によって太い線維を形成する。会合では隣分子が軸方向に 1 4.3 nm またはその 3 倍である 4.3 nm の長さずれて並ぶ。太い線維形成の研究では、この 4.3 nm のずれがミオシンロッド部のどこで、如何にして起きるのかを示すことが、問題となって来た。私達はミオシンロッド部を酵素により限定分解し、長さや溶解性が異なる種々の断片を分離精製したが、会合能を持つ断片のうち、ある長さ以上のものはミオシンと同様の会合能を持ち、その準結晶の電鍵像から、4.3 nm のずれを持つことが示唆された。また、ロッド部 C-末端近くの領域が 4.3 nm ずれを起こす特別領域であることを実験的に示して来た。今回ロッド部の既知アミノ酸配列を用いて、軸に対して周期構造を持つ α ヘリックスを作り、2 本縊りあわせてコイルドコイルを作成した。このモデルを用いて、分子間のずれが如何にして起きるのかを検討した。＜方法＞コイルドコイル構造の安定性は 2 本のヘリックスの解離自由エネルギーにより求めたが、軸に対する周期が 2.80 nm のとき α ヘリックスの疎水基部分が 2 本のヘリックスの接触部に並んで、疎水の相互作用が有利になっていた。得られたコイルドコイル分子を 3.5nm 離して 2 本置き、他方に対して軸方向にずらせ、コイルドコイル分子間に働く静電的相互作用がどのように変化するかを pH 7.0、0.1M 塩濃度の条件で計算した。この条件で各分子の解離性アミノ酸残基の解離度が決められる。＜結果＞計算から得られた静電的相互作用のずれに対するグラフは幾つかのミニマムを持つが、1 4.3 nm と 4.3 nm のずれのとき静電的に強く引き付け合うことを示した。また、配列に沿って各部分がどこで相互作用し、正あるいは負の値を持つかを詳しく調べたところ、それぞれ特徴ある領域が 2 本のコイルドコイル分子の安定化に寄与していることが分かった。

T.Akutagawa, Y.Hata, T.Ooi, E.Katayama : Role of electrostatic interactions in myosin filament formation

3K1545

カルモデュリン/ニューロン特異的タンパク質 NAP22 複合体の溶液構造

○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札幌医大・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することが示唆される Neuron-specific acidic protein-22kDa (NAP22) の N 末端をミリスチル化した mNAP22 はカルシウム飽和カルモデュリン (CaM) と直接相互作用し、複合体を形成する。mNAP22 の CaM 結合部位 (mGGKLSKKKK) は、M13 や RS20 の塩基性両親媒性 α ヘリックス構造と全く異なる。このため、CaM の mNAP22 分子認識は新規なものと考えられる。本研究では、この新規な分子認識を構造面から明らかにすることを試みた。複合体の溶液構造解析は、コントラスト変調法小角中性子散乱 (SANS) と放射光小角 X 線散乱 (SR-SAXS) を用いて行われた。複合体中の CaM の構造を見るために重水素化 CaM (DCaM) を用いた。DCaM/mNAP22 のモル比が 1/1 と 1/2 のときの SANS のコントラストマッチングの条件下で得られた DCaM の回転半径 (R_g) はそれぞれ 20.9 Å と 18.9 Å となった。これらの R_g 値は CaM/M13 複合体の R_g 値 (17.9 Å) より明らかに大きいことから、複合体中の DCaM はコンパクトな球状構造をとらないことが示された。これらの結果は、混合物のモル比が 1/1 のときはモル比が 1/2 の複合体と標的分子非存在下の CaM との等モル混合物、モル比 1/2 のときは 1/2 の複合体のみが形成されたとするゲルシフトアッセイの結果と一致している。さらに、CaM/mNAP22 のモル比が 1/2 複合体の全体構造解析を SR-SAXS を用いて行った。これら SANS と SR-SAXS の結果を基に複合体の構造モデルを構築する。

Y.Izumi, N.Hayashi, Y.Jinbo, T.Matsufuji and N.Matsushima : Solution structure of calmodulin/neuron-specific protein NAP22 complex

3L0915

キャッチン-パラミオシン混合フィラメントからのキャッチン依存的なパラミオシンの可溶化

○百済 英則¹、大岩 和弘^{1,2}、山田 章² (¹姫工大・理・生命科学、²通信総研・関西先端研究センター)

キャッチン、パラミオシンは軟体動物平滑筋の太いフィラメントを構成しているフィラメント形成タンパク質である。今回のタンパク質の混合フィラメントを形成して、その可溶化条件を検討した。まず、キャッチンとパラミオシンを混合して重合させた合成共重合フィラメントを作った。電子顕微鏡観察の結果、共重合フィラメントの 14.5nm 周期の暗帯幅がキャッチンフィラメント、パラミオシンフィラメントの中間型だったことから、この共重合フィラメントは両タンパク質が一緒に混ざり合って形成したフィラメントであることが示唆された。一方、生体内の太いフィラメントは、パラミオシン核の表層にキャッチン、ミオシンが重合していると考えられている。この構成を模倣したフィラメントとして、パラミオシンフィラメント上にキャッチンを重合させたフィラメント（二段階重合フィラメント）を作成した。キャッチンフィラメントが完全に可溶化し、パラミオシンフィラメントは少ししか可溶化しない 0.35 M NaCl の条件で、共重合フィラメント、二段階重合フィラメントから可溶化する成分を調べた。その結果、両フィラメントともに、キャッチンの量比が大きいほどパラミオシンが多く可溶化した。また、共重合フィラメントの方がより多くのパラミオシンが可溶化した。混合フィラメントからパラミオシンが可溶化する原因として、以下の 2 つが考えられる。

- ・キャッチン可溶化後のパラミオシンフィラメントの不安定化
- ・可溶化したキャッチンによる可溶化パラミオシンの安定化

現在、これらの仮説を検討している。

H.Kudara, K.Oiwa and A.Yamada : Catchin affects on the solubility of paramyosin in high salt extraction.