B097

ストップフロー小角散乱によるカルモデュリンの標的分子認識機構解明, 2

○松藤 智洋¹、神保 雄次¹、和泉 義信¹、能野 秀典²、藤澤 哲郎³ (¹山形大院・理工、²札幌大・医、³理研・播磨研)

全ての真核細胞に遍在し、様々な標的酵素の活性を制御するカルモデュリン (CaM) の機能は、Ca²⁺ 結合・解離に伴う形態変化と密接に関連している。しかし、Ca²⁺ 結合・解離機構を CaM 分子全体の構造変化から議論した例は、ほとんど無い。また、Ca²⁺ 解離に伴う CaM/標的ペプチド複合体の形態変化 (Ca²⁺ 解離過程) は、Ca²⁺ 結合過程と比較して2桁以上遅いことが知られており、本研究の過去の研究においても、Ca²⁺ 解離過程は秒オーダーの時間変化を示すことが確認されている。そこで、本研究では、ストップフロー小角 X 線散乱 (SF-SAXS) を用いて、Ca²⁺ 解離過程を直接追跡することにより、ミリ秒から秒オーダーの Ca²⁺ 解離機構の解明を試みた。

CaM 試料にはリコンビナント CaM を用いた。標的ペプチドには、骨格筋・平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼの CaM 結合部位に由来するペプチド (それぞれ、skMLCKp、smMLCKp) を用いた。測定は Spring-8 RIKEN beam line 45XU の SF-SAXS 装置を用いておこなった。SAXS データから、回転半径 R_g、散乱角度ゼロの散乱強度 I(0) および形状を反映する情報を得た。

Ca²⁺/CaM/skMLCKp と Ca²⁺/CaM/smMLCKp からの Ca²⁺ 解離過程における R_g および I(0) の時間変化は、著しく異なるということが示された。特に前者の系では、初期状態と最終状態の混合では説明できない、後者の系では現れない中間体の存在を示唆する結果が得られた。しかし、試料への放射線照射によるダメージの影響により、得られた SAXS の結果が歪められている可能性が示唆されており、特に、5 秒から 10 秒の遅延時間をかけた時にこの現象が顕著に現れた。これを回避することにより得られた結果について報告する。

T.Matsufuji, Y.Jinbo, Y.Izumi, H.yoshino and T.Fujisawa : Stopped-Flow SAXS Studies on Calmodulin Molecular Recognition Process ,2

B099

Ras の構造多型性の 1 分子イメージング

○新井 由之¹、和沢 鉄一²、横田 浩章³、岩根 敦子⁴、石井 由晴⁵、片岡 徹⁶、柳田 敏雄^{4,5} (¹阪大院・基礎工・システム人間系、²阪大院・生命機能・ナノデバイス基礎講座、³ECOLE NORMALE SUPERIEURE、⁴阪大院・生命機能・ナノ生体、⁵JST・CREST、⁶神大・医学系・第2生理)

低分子量 G タンパク質である Ras は、細胞増殖や分化の促進に重要な役割を果たしている。通常、Ras は GDP と結合した不活性型であるが、ホルモン等の細胞外刺激により GTP と結合した活性型へと交換される。これまでの生化学的な研究から、活性型 Ras は多様なエフェクターと相互作用し、様々なシグナル伝達経路に関与していることが明らかとされている。しかし、Ras がどのようにしてこれら多様なエフェクターを認識し、相互作用しているかは未だ明らかとされていない。

本研究では、全反射エバネッセント顕微鏡を用いた 1 分子蛍光エネルギー移動 (FRET) イメージングにより、溶液中において実時間で Ras 1 分子の構造変化の直接観察を行った。

組み換え体として得た野生型の H-Ras(1-171) のシステイン 51 残基のチオール基に、マレイミド化した蛍光色素 Cy3(ドナー) を特異的に標識した。また、Cy5-GTP(アクセプター) を合成し、蛍光標識した Ras に取り込ませた。その結果 GTP 結合型の Ras の FRET 効率は、少なくとも 3 状態以上を秒オーダーで自発的に遷移していることが示唆された。このことは、Ras には複数の準安定状態が存在し、Ras の機能に深く関与している可能性がある。

現在 Ras 1 分子の FRET および、ドナーの配向状態とプリンキング(アクセプターの明滅現象) の同時観察を行っており、より厳密に FRET 効率の変化と Ras の構造変化との関係を明確にしていく。

Y. Arai, T. Wazawa, H. Yokota, A. H. Iwane, Y. Ishii, T. Kataoka and T. Yanagida : Multiple conformations of activated Ras observed directly by single molecule FRET

B098

カルモデュリン標的分子認識におけるカルシニューリンペプチドの酸性残基の役割

○野口 正裕¹、和泉 義信¹、能野 秀典² (¹山形大学大学院理工学研究科、²札幌医科大学医学部)

カルシニューリン (CN) はカルモデュリン (CaM) 結合部位の N 末端側に酸性残基領域を有する。この酸性残基領域と酸性タンパク質である CaM との静電的な反発はコンパクトな球状複合体形成を妨げるものと予想される。本研究では放射光小角 X 線溶液散乱 (SR-SAXS) を用い、CN 系合成ペプチド (CNp) と CaM との複合体の相互作用解析から酸性残基の効果を検明することを目的とした。合成した CNp のシーケンスと SAXS の結果を表 1 に示す。CNp はすべて CaM と複合体を形成した。Ca²⁺ 存在下の R_g は CNp の長さ (酸性残基の数の増加に対応) が長くなるほど増加し、CNp の長さがそのまま反映されたと解釈できる。したがって、Ca²⁺ 存在下での CNp の酸性残基領域は CaM との複合体形成の障害とはならず、CaM 分子表面の負電荷との反発によって伸びた構造をとることが示唆された。apoCaM も CNp と複合体を形成するが Ca²⁺ 存在下の場合とは異なり、CNp の長さによらず R_g はほぼ一定の値となった。このことは CNp が分子内の静電的相互作用によって Ca²⁺ 存在下の場合より縮んだ状態で CaM と複合体形成することで R_g の増大方向への寄与が低減されたためと解釈できる。apo 状態では CaM の C ロープの一部が CNp と結合しており、CNp の分子内相互作用は影響を受けにくいと考えられる

表1 本研究で合成したCNp				
シーゲンス名	CNpのアミノ酸配列		R _g [Å]	
	酸性残基領域	CaM結合領域	Ca ²⁺ 飽和	apo
CNA361		ARKEVIRNKRRAIGKMARVFSVLR	18.3	21.8
CNA365		DGATAAARKEVIRNKRRAIGKMARVFSVLR	18.8	23.1
CNA360		EEDGFDGATAAARKEVIRNKRRAIGKMARVFSVLR	19.5	23.0
CNA374	DDELGSEEDGFDGATAAARKEVIRNKRRAIGKMARVFSVLR		20.4	23.4

M.Noguchi, Y.Izumi and H.Yoshino : Roles of acidic residues of calcineurin peptide in the calmodulin molecular recognition

B100

大腸菌外膜チャネルタンパク質、マルトポリンの計算機シミュレーション

○関 和彦¹、末永 敦²、成見 哲²、泰地 真弘人²、Danelon C³、Winterhalter M³、安藤 格士¹、目黒 俊幸¹、山登 一郎¹ (¹東理大 基礎工 生物工、²理研 ゲノム科学総合研究センター ゲノム情報科学研究グループ、³Universite P. Sabatier)

タンパク質の動的挙動を解析する際、実験・理論に次ぐ第三の方法として分子動力学 (MD) シミュレーションが注目されている。最近では膜タンパク質を含む大規模な系の機能シミュレーションも可能となっている。そのようなシミュレーションではスーパーコンピュータや MD 専用計算機の利用等の工夫がなされてきた。これまで私達は大腸菌外膜のチャネルタンパク質である OmpF ポリンのイオンのシミュレーションを行ってきた。本研究ではもうひとつのチャネルタンパク質であるマルトポリンの MD シミュレーションを報告する。マルトポリンは OmpF ポリンに類似のチャネルタンパク質である。しかもマルトデキストリンを特異的に透過させ、膜電位に依存してその親和性が変化することが知られている。したがって、膜電位によるチャネル狭窄部分の構造変化が予想される。またマルトポリンとマルトデキストリン複合体の結晶構造も得られている。シミュレーションプログラムは Amber6 を使い、マルトポリン 3 量体を脂質二重膜に配置し、さらに水を周囲に発生させた。また、NaCl の濃度が 1 M となるように Na イオンを 537 個、Cl イオンを 486 個配置し、系全体の総粒子数は 131945 となった。さらに計算機として MD 専用計算機である MDGRAPE-2 を使った。膜電位非存在下において、安定な MD シミュレーションを行った。タンパク質主鎖 C α の RMSD は 2 Å であった。チャネル部分に存在する荷電アミノ酸の dipole moment は膜電位がない状態に対応して平衡化する傾向が見られた。この先膜電位存在下のシミュレーションを行い、チャネル部分の構造変化を追跡したいと考えている。

K.Seki, A.Suenaga, T.Narumi, M.Taiji, Danelon, Winterhalter, T.Andou, T.Meguro and I.Yamato : Molecular dynamics simulation of outer membrane channel protein, maltoporin of E.coli