

# カルモデュリン/リアノジンレセプター系標的ペプチド複合体の溶液構造

南波宏匡・杉浦庸介・松藤智洋・和泉義信  
山形大院理工

## [序論]

カルモデュリン(CaM)は  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存的に 100 種類以上の酵素・細胞骨格タンパク質(標的タンパク質)の機能を調節するタンパク質である。しかし、これら標的タンパク質の CaM 結合部位のアミノ酸配列にはほとんど相同性が見られない。標的タンパク質の中で、骨格筋型リアノジンレセプター(RyR1)は  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離型カルモデュリン(apoCaM)によって活性化され、 $\text{Ca}^{2+}$ 飽和型カルモデュリン( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ )によって阻害される。 $\text{Ca}^{2+}$ の CaM への結合に伴い、RyR1 の CaM 結合部位は 3614-3643 番目の配列内で C 末端側から N 末端側へシフトするモデルが報告されている<sup>1)</sup>。そこで本研究では RyR1 の  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  結合部位(RyR14-34)、apoCaM 結合部位(RyR25-43)、全配列(RyR14-43)に相当するペプチドと CaM の複合体の溶液構造を明らかにし、RyR1 の CaM 結合モチーフと報告されたモデルの妥当性を検証することを試みた。

## [実験]

CaM は遺伝子組み換え CaM を用い、林らの方法で精製された。標的ペプチドは固相合成法で合成し、逆相高速液体クロマトグラフィーで精製された。溶液を  $[\text{RyR14-34}]/[\text{CaM}]=1.1$ 、 $[\text{RyR25-43}]/[\text{CaM}]=1.0$ 、 $[\text{RyR14-43}]/[\text{CaM}]=1.0$  で調製し、小角 X 線散乱法により複合体の構造を評価した。測定には高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 放射光実験施設の測定ステーション BL - 10C に設置された酵素回折計を使用した。得られたデータをもとに回転半径  $R_0$  と形状が評価された。

## [結果および考察]

$\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  と各標的ペプチドは 1 対 1 で複合体を形成した。 $R_0$  の結果を表に示す。 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{RyR14-34}$  複合体と  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{RyR25-43}$  複合体の  $R_0$  値は、ペプチドに標準的な CaM 結合モチーフを持つコンパクトな球状複合体の  $R_0$  値に比べ大きくなっている。RyR14-34 は 1-5-8-14 モチーフの 8 番目の疎水性残基が欠損しており、RyR25-43 は 1-5-10 モチーフを持つが配列内にプロリン(P)を含むため完全な  $\alpha$ -ヘリックス構造をとることができない。大きな  $R_0$  値は以上の構造を反映したものと考えられる。また、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{RyR14-43}$  複合体の  $R_0$  値は  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{RyR14-34}$  複合体の  $R_0$  値に比べ小さい。このことから  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  が選択的に RyR14-34 と複合体を形成するモデルは否定されると考えられる。

apoCaM と RyR14-34、RyR25-43 は 1 対 1 で複合体を形成した。apoCaM と RyR14-43 は混合時に白濁を生じたため測定できなかった。RyR14-34、RyR25-43 の系は既報告<sup>2)</sup>と構造が類似しているが、その CaM 結合モチーフは適用できず、新規なモチーフの可能性が考えられる。

表 標的ペプチドのアミノ酸配列とその複合体の  $R_0$

peptide	sequence	$R_0$	
		(1)	(2)
CaM-binding site: RyR14-43	KSKKAVWHKLLSKQRRRAVVACFRMTPLYN	19.3	-
$\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -binding site: RyR14-34	KSKKAVWHKLLSKQRRRAVVA	19.9	20.9
apoCaM-binding site: RyR25-43	SKQRRRAVVACFRMTPLYN	18.7	22.7

(1)  $\text{Ca}^{2+}$ 存在下, (2)  $\text{Ca}^{2+}$ 非存在下

1) Rodney et al., *J. Biol. Chem.* **276**(2001)2069-2074.

2) Izumi et al., *FEBS Letters* **495**(2001)126-130