

カルモデュリン/NO 合成酵素系標的ペプチド複合体の小角 X 線散乱

河尻幸治、和泉義信、神保雄次 山形大院理工

[緒言・目的] カルモデュリン(CaM)は真核細胞に存在する、アミノ酸 148 残基の酸性タンパク質で、2つの球状ドメインが中央リンカーで結ばれた亜鈴型構造をとっている。CaMはCa²⁺と結合(Ca²⁺/CaM)すると活性化し、その構造を大きく変化させ標的タンパク質と結合し、その機能を発現させる。また CaM の標的タンパク質は 100 種類以上あることが報告されており、その中にはCa²⁺非結合 CaM(ApoCaM)でも結合するタンパク質も存在する。

CaM の標的タンパク質の一つに一酸化窒素(NO)合成酵素(NOS)がある。NOS は、作動場所により内皮型、神経型と誘導型の 3 種類に分けられる。これらのうち誘導型 NOS (iNOS) は apoCaM と Ca²⁺/CaM の両方に活性が制御される酵素である。これまで iNOS の CaM 結合部位標的ペプチド(iNOSp)と CaM との複合体の構造解析が Ca²⁺存在下で行われたが、Ca²⁺非存在下では iNOSp が apoCaM 測定用バッファーで白濁するため、測定がなされていない。本研究ではこの白濁の原因の解明を CaM と変異型 iNOSp との複合体の構造解析より試みた。

[実験] CaM は遺伝子組み換え大腸菌により発現させ、精製にはアフィニティークロマトグラフィーを用いた。ペプチドは固相合成法で合成し、HPLCにより精製された。合成したペプチドは iNOSp の残基を 3 箇所(1 種類)と 2 箇所変異させたもの(3 種類)である。KEK PF BL10C に設置された酵素回折計を用いてこれらの複合体溶液を測定し、散乱データから分子量(M_{exp})、回転半径(R_g)およびKratkyプロットから形状を評価した。

表 1 各 iNOSp の一次配列

iNOSp	KRREIPLKVLVKA ³ VL ⁹ FACMLMRK ¹³
iNOSp(V3K_L9K_M13K)	KRREIPLK ³ KL ⁹ VKA ¹³ V ¹³ K ¹³ FACK ¹³ LMRK
iNOSp(V3K_L9K)	KRREIPLK ³ KL ⁹ VKA ¹³ V ¹³ K ¹³ FACMLMRK
iNOSp(V3K_M13K)	KRREIPLK ³ KL ⁹ VKA ¹³ V ¹³ FACK ¹³ LMRK
iNOSp(L9K_M13K)	KRREIPLK ³ VL ⁹ VKA ¹³ V ¹³ K ¹³ FACK ¹³ LMRK

* 枠内はアンカー残基

* 下線部は変異箇所

[結果と考察]

ApoCaM/L9K_M13K 複合体だけが完全に溶解しなかったため、遠心後の上清を測定した。このことから iNOSp の溶解には3位の残基(V)が重要である。

ApoCaM/変異型 iNOSp 複合体の R_g 値は、亜鈴型構造を示す apoCaM の値に近い。このことから、apoCaM/変異型 iNOSp 複合体の形状も亜鈴型構造をとることが示唆される。しかし、図1の結果は変異型 iNOSp 複合体の形状が apoCaM の形状とは明らかに異なることを示す。さらに、変異型 iNOSp の一次配列には IQ モチーフの特徴がないので、新規モチーフで、新規な複合体を形成していることが示唆される。これに対して、Ca²⁺/CaM/変異型 iNOSp 複合体の R_g 値はコンパクトな球状複合体である Ca²⁺/CaM/RS20 の値に近い。このことから、Ca²⁺/CaM/変異型 iNOSp 複合体の形状がコンパクトな球状構造をとることが示唆される。実際、Ca²⁺/CaM/V3K_L9K_M13K 複合体の Kratky プロットは、Ca²⁺/CaM/RS20 のそれとほぼ一致していることが、図1から見て取れる。さらに変異型 iNOSp のアンカー残基の位置より、1-5-8-14 モチーフで Ca²⁺/CaM と複合体を形成している。

今後は、1 変異と野生型 iNOSp とを用いて各複合体の形状を解析し、不溶の原因となるアミノ酸残基の特定を実施予定である。

表 2 各複合体の SAXS パラメータ

CaM	標的ペプチド	M_{exp}/M_{cal}	$R_g/\text{Å}$
	-	1.00	22.3
	V3K_L9K_M13K	1.04	22.4
ApoCaM	V3K_L9K	1.26	23.8
	V3K_M13K	1.13	23.9
	L9K_M13K	1.18	23.8
	-	1.00	22.1
	V3K_L9K_M13K	0.98	18.2
Ca ²⁺ /CaM	V3K_L9K	1.10	18.5
	V3K_M13K	1.18	18.6
	L9K_M13K	1.07	18.1
	RS20	1.04	18.3

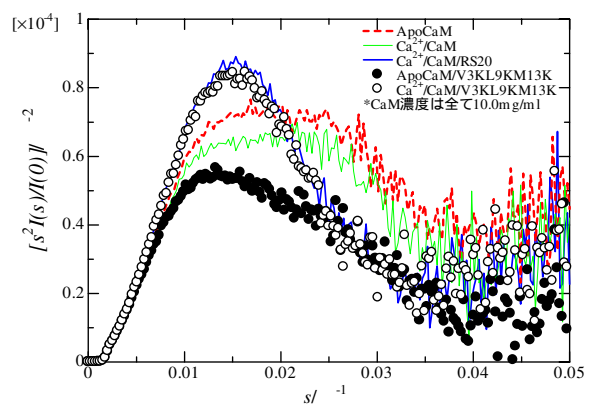


図1 各 Kratky プロットの比較