

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 2

河尻幸治, 嶋田信彦, 神保雄次, 和泉義信 山形大院理工

[1] 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。Ca²⁺結合、Ca²⁺非結合に関わらず、CaM は、標的タンパク質と結合し、その機能を調節することが知られている。本研究では、CaM の標的タンパク質として、一酸化窒素合成酵素(NOS)を取り上げた。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 Ca²⁺結合 CaM (Ca²⁺/CaM)と Ca²⁺非結合 CaM(ApoCaM)のいずれにも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⁺存在下で行われてきたが、iNOSp が apoCaM 測定用バッファーで白濁するため、Ca²⁺非結合下では測定ができなかった。本研究ではこの白濁の原因を iNOSp のアミノ酸残基を変異させることにより明らかにする。その結果にもとづいて、CaM と変異型 iNOSp の複合体の溶液構造解析を試みる。

[2] CaM は遺伝子組み換え大腸菌により発現され、HPLC により精製された。合成されたペプチドを表 1 に示す。測定は、KEK/PF/BL10C に設置された酵素回折計を用いて行った。Guinier プロットから分子量(M_{exp})と回転半径(R_0)を、Kratky プロットから形状がそれぞれ評価された。

[3]

表 1 合成されたペプチドと溶解性

	一次配列	バッファーへの溶解性
iNOSp WT	KRREIPLKVLVKA VLFACMLMRK	白濁
iNOSp(V3K_L9K_M13K)	KRREIPLKKL VKA VLFACK LMRK	溶解
iNOSp(V3K_L9K)	KRREIPLKKL VKA VLFACMLMRK	溶解
iNOSp(V3K_M13K)	KRREIPLKKL VKA VLFACK LMRK	溶解
iNOSp(L9K_M13K)	KRREIPLKVL VKA VLFACK LMRK	白濁
iNOSp(V3K)	KRREIPLKKL VKA VLFACMLMRK	溶解
iNOSp(L9K)	KRREIPLKVL VKA VLFACMLMRK	白濁

* 枠内はアンカー残基

* 下線部は変異箇所

表 1 のうち白濁したものは 1 分間遠心し、上清のみを測定した。表 1 の複合体の中では、iNOSp WT の第 3 位の残基ロイシン(L)を塩基性残基リシン(K)に変異させたペプチド系のみが白濁せずに溶解した。さらに、この複合体の Guinier プロットの 小角側にアップターンが見られなかったことから、分子分散性が確認できた。この結果から、iNOSp の溶解には第 3 位の残基が深く関わっていることが示唆される。

表 2 より ApoCaM/変異型 iNOSp 複合体の R_0 値は apoCaM の値と同程度の大きさを示すことが見て取れる。また、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_0 値は 18~19 を示すこと、さらに各 iNOSp には 1、5、8、14 位にアンカー残基があることより、これらの複合体は 1-5-8-14 モチーフでコンパクトな球状構造をとることが示唆される。

今後は 3 位のみを変異させた iNOSp(M13K)系を用いて、不溶の原因の更なる特定を行う予定である。

表 2 各複合体の SAXS パラメータ

CaM	標的ペプチド	$R_0 / \text{\AA}$
ApoCaM	V3K_L9K_M13K	22.4
	V3K_L9K	23.8
	V3K_M13K	23.9
	L9K_M13K	23.8
Ca ²⁺ /CaM	V3K	22.1
	L9K	21.2
	V3K_L9K_M13K	18.2
	V3K_L9K	18.5
	V3K_M13K	18.6
	L9K_M13K	18.1
	V3K	18.3
	L9K	19.0