

カルモデュリンと HIV-1 由来標的ペプチドとの相互作用解析

和泉義信、大里郁美、佐藤彰宏、山澤匡彦、神保雄次 山形大院理工

[1] カルモデュリン(CaM)は免疫細胞の生理機能、とくに細胞の活性化からアポトーシスにおよぶシグナル伝達経路において様々な機能を持つことが知られている。これまでの研究から、CaM はヒト免疫不全ウイルス(HIV)-1 の外被糖タンパク質 (gp160)、CD4 抗原への結合に関わるタンパク質(Nef)、構造タンパク質 (Gag、マトリックスタンパク質 (p17))に Ca^{2+} 依存的に結合し、複合体を形成することが報告されている。これら既報告は、いずれも CaM が HIV-1 の細胞内抑制因子として機能することを示唆している。HIV-1 由来の他のタンパク質と CaM との結合の有無を探索するために、CaM ターゲットデータベースを HIV-1 由来のタンパク質に適用したところ、CaM 結合部位をもつタンパク質が新たに予測された。これらは、Gag のキャプシドタンパク質 (CA)、Pol のプロテアーゼ (PR)とインテグラーゼ (INT)、さらに転写活性化因子 (TAT)である。本研究では、これら HIV-1 タンパク質の CaM 結合部位由来の標的ペプチドと CaM との相互作用解析のために放射光小角 X 線散乱法が適用された。

[2] CaM 試料は Hayashi らの方法(*Protein Express. Purif.*12(1998)25-28)で調製された。標的ペプチドは、固相合成法で合成され、表に 1 文字表記で記載された。CaM と標的ペプチドとの相互作用解析は、KEK/PF/BL10C/酵素回折計を用いてなされた。散乱データから各複合体の分子量比 (M_{exp}/M_{cal})、回転半径(R_0)および形状がそれぞれ評価された。

[3] 表 2 の分子量比がほぼ 1 であることから、 Ca^{2+}/CaM は各標的ペプチドと 1 対 1 の複合体を形成することが見て取れる。これら複合体の中で、 $Ca^{2+}/CaM/CAp$ 、 $Ca^{2+}/CaM/INTp$ 、 $Ca^{2+}/CaM/TATp$ 複合体の R_0 は 18.9-19.1 Å で、形状はコンパクトな球状構造をとることが示された。これら複合体が球状構造をとることから、各標的ペプチドは α ヘリックス構造を取り、表 1 記載のモチーフで Ca^{2+}/CaM と複合体を形成していることが示唆される。これら標的ペプチドの α ヘリックス構造は、CA (PDB:1M9Y)と INT (PDB:2ITG)の結晶構造における対応する CaM 結合部位がいずれも α ヘリックス構造をとることからも支持される。これに対し、 $Ca^{2+}/CaM/PRp$ 複合体の R_0 は 20.6 Å で、形状は球状構造とアレイ型構造の中間の新規構造をとることが示された。このことから、複合体において PRp が α ヘリックス構造を取っていないことが示唆される。PR の結晶構造 (PDB:1AAQ)の CaM 結合部位に相当する構造は β シート構造をとっている。このためアンカー残基間距離が長くなり、 $Ca^{2+}/CaM/PRp$ 複合体が新規構造を取ると考えられる。

Table 1	Target Peptide and Sequence
CAp	GE[YKR]W[I]GLNKI[RMYS] (1-14/1-10)
INTp	H[KTA]QMAV[IHN]K[RK] (1-10/1-14)
PRp	KPK[MIGG]GG[KVQRQ]DQ (1-14)
TATp	KKCC[HCO]CF[TKALG]SYGRKK (1-14)

Boxed letter: anchoring residues

Table 2 M_{exp}/M_{cal} , R_0 and shape for $Ca^{2+}/CaM/TP$			
$Ca^{2+}/CaM/TP$	M_{exp}/M_{cal}^*	$R_0/\text{\AA}$	Shape
CAp	1.03	18.9	Globular
INTp	1.03	19.1	Globular
PRp	1.05	20.6	Novel
TATp	1.08	19.1	Globular

$$*M_{cal} = M_{CaM} + M_{TP} + 4M_{Ca}$$