

### カルモデュリン/ミオシン V 系標的ペプチド複合体の小角散乱 3

海老沢大樹、神保雄次、和泉義信 山形大院理工

[緒言] カルモデュリン(CaM)は、IQ モチーフを持つ標的タンパク質と結合する。このモチーフを持つモータータンパク質の一つにミオシン V がある。ミオシン V はアクチン繊維上を移動し、小胞やオルガネラを輸送する。その構造は N 末端モーター領域である球状の頭部、6 個の IQ モチーフを持つレバーアーム、小胞を結合する C 末端の尾部とからなる。CaM はレバーアームの IQ モチーフに結合する。最近、1 と 2 番目の IQ モチーフ(IQ1 と IQ2)それぞれに、Ca<sup>2+</sup>非結合 CaM(ApoCaM)が結合した複合体の結晶構造が報告された。我々は、放射光小角 X 線散乱 (SR-SAXS)を用いて、これら複合体の溶液構造解析を行なった。その結果、ApoCaM/IQ1 と ApoCaM/IQ2 の溶液構造は回転半径で 4.8 と 3.8 も対応する結晶構造のものより大きく、これら複合体の形状も溶液中ではアレイ型構造に近いことが示された。さらに ApoCaM/IQ(1+2)の有限濃度での回転半径は結晶構造のものよりも小さく、形状も異なっていた。しかし、後者の系は白濁するため、より希薄な濃度領域での SAXS による確認が要求された。本研究では、より希薄な濃度領域における CaM と IQ(1+2)複合体の溶液構造を解析し、結晶構造と比較・検討することを目的とした。

[実験] CaM は大腸菌発現系により発現させ、生化学的に精製された。IQ(1+2)は、固相合成法により合成され、HPLC によって精製された。測定は KEK、物質構造科学研究所、PF の BL10C に設置された酵素回折計を用いてなされた。CaM/IQ(1+2)溶液の仕込み濃度は 3.0、4.0、5.0mg/ml であった。これらの溶液は白濁したため、遠心後、上清が測定された。分光学的に決定された上清の濃度は 2.26、2.99、3.16mg/ml であった。散乱データから、分子量、回転半径および形状が評価された。溶液構造との比較のために、結晶構造として PDB: 2ix7 が用いられた。

[結果・考察] 表は Ca<sup>2+</sup>存在下と非存在下の CaM 対 IQ(1+2)のモル比が 2 対 1 の結果を示している。Ca<sup>2+</sup>非存在下では、分子量比( $M_{exp}/M_{cal}$ )が仕込み比に近いことから、仕込み比で複合体を形成していることが見て取れる。Ca<sup>2+</sup>存在下では分子量比が 1 より小さいので、仕込み比で複合体が形成されず、フリーの CaM の存在が示唆される。2ApoCaM/IQ(1+2)複合体の回転半径の実験値 ( $R_0$ )は、計算値より 0.9 大きい。図 1 は 2ApoCaM/IQ(1+2)の Kratky プロットの実験と計算結果の比較を示している。溶液構造と結晶構造の Kratky プロットは  $0.01^{-1} < s$

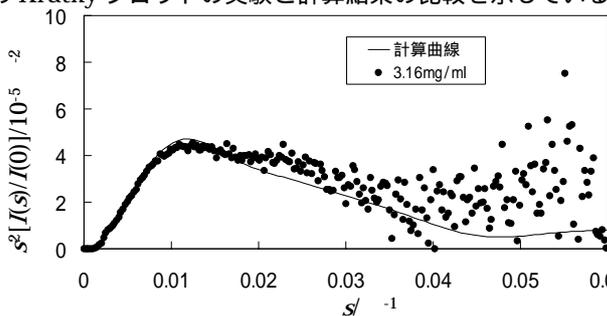


図 1 2 ApoCaM/IQ(1+2) の Kratky プロットの比較

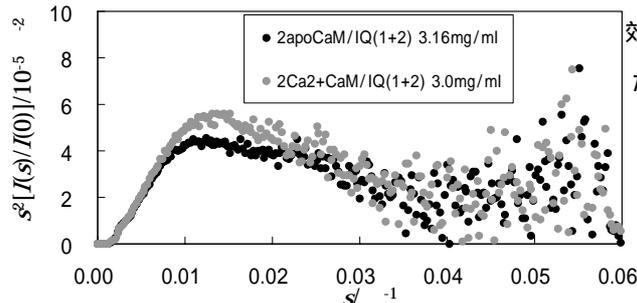


図 2 Ca<sup>2+</sup>存在下と非存在下での Kratky プロットの比較

の範囲で外れてくる。これらの結果は、2ApoCaM/IQ(1+2)複合体の溶液構造と結晶構造とが異なることを示唆している。結晶構造では、ApoCaM の N ドメインが IQ モチーフの C 末側と弱く結合しているので、溶液ではこの結合が切れていることも考えられる。2ApoCaM/IQ(1+2)複合体の白濁は IQ(1+2)ペプチド同士の大きなサイズの会合体に ApoCaM が結合することで、静電効果が弱められ、目視できるほどの凝集体が形成されたためと考えられる。

表  $M_{exp}/M_{cal}$  と  $R_0$

System	$M_{exp}/M_{cal}$	$R_0/$
2ApoCaM/IQ(1+2) (exp)	1.11	25.5
2ApoCaM/IQ(1+2) (cal)	-	24.6
2Ca <sup>2+</sup> CaM/IQ(1+2) (exp)	0.70	22.6