

## 酵素回折計 UG

### 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 3

河尻幸治, 神保雄次, 和泉義信 山形大院理工, 林 宣宏 東工大院生命理工

[1] 本研究では, CaM の標的タンパク質として誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)を取り上げた。iNOS は  $\text{Ca}^{2+}$ 結合 CaM ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ )と  $\text{Ca}^{2+}$ 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 結合部位ペプチド(WT\_1-14)と CaM との複合体の溶液構造解析を行ってきたが, 溶液が白濁するため測定ができなかった<sup>1)</sup>。この白濁は WT\_1-14 の 3, 9, 13 位の疎水性残基により誘引されると考えられた。さらに今回, WT\_1-14 の N 末端に隣接する箇所 IQ 様モチーフ部位(WT\_IQ)が存在することが見いだされた。

本研究ではこれら野生型ペプチド(WT\_1-14, WT\_IQ)および WT\_1-14 の変異体ペプチドを用いて CaM との複合体の溶液構造, 白濁の原因を明らかにすることを目的とした。

[2] CaM は遺伝子組換え大腸菌により発現され, 標的ペプチド(TP)は固相合成法により合成された後, HPLC により精製された。変異体ペプチドとしては WT\_1-14 の 3 位(V), 9 位(L), 13 位(M)の全てをリシン(K)に変異させた V3K\_L9K\_M13K, 二箇所変異させた V3K\_L9K, V3K\_M13K, L9K\_M13K, 一箇所変異させた V3K, L9K, M13K の全 7 種類が合成された。測定は KEK/PF/BL10C に設置された酵素回折計を用いて行われた。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。表 1 にはこれら野生型ペプチドの一次配列が示された。

[3]

表 1 野生型ペプチドと  $M_{exp}/M_{cal}$  と  $R_0$  値

| TP      | 一次配列  | $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{TP}$ |       | ApoCaM/TP         |       |
|---------|---|---------------------------------------|-------|-------------------|-------|
|         |   | $M_{exp}/M_{cal}$                     | $R_0$ | $M_{exp}/M_{cal}$ | $R_0$ |
| WT_1-14 | KRREIPLK <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">3</span> V L V K A V <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">9</span> L F A C <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">13</span> M L M R K | 1.94*                                 | 20.7* | 2.27*             | 23.2* |
| WT_IQ   | KTHVWQDEKRRPKRREIPLK  | 0.83                                  | 21.1  | 0.99              | 21.5  |

\*: 1 分間の遠心の後上清を測定した値を示す。

分子量比,  $R_0$  値, Kratky プロットにより,  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{WT}_1-14$  複合体は 2 量体を形成することが見て取れた。 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  と WT\_1-14 変異体との複合体では, 2 量体を形成せず, 1 量体からなるコンパクトな球状複合体が形成されたことから, 3, 9, 13 位の疎水性残基が 2 量体形成に関与するものと考えられた。図 1 はこれら 3 残基が関与する  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{WT}_1-14$  複合体の 2 量体構造モデルを示している。

このモデルでは 2 本の WT\_1-14 ヘリックスの N 末端と C 末端とが互いに逆平行で向かい合った配置を取っている。2 と 6 位の正電荷同士の反発が考えられるが, 円筒プロットにより, これら残基の高さが異なっていることが示されるので, 斥力効果は弱められるものと考えられる。

ApoCaM/WT\_1-14 は分子量比が 2 より大きいので, 2 量体以外のもも混在していることが示唆された。これは WT\_1-14 と ApoCaM との解離定数が  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  との場合より約 30 倍大きい<sup>2)</sup>ことが原因であり, ApoCaM/WT\_1-14 複合体以外の成分が混在しており, それらの平均量が観測されたためと考えられる。

ApoCaM/WT\_IQ は分子量比から 1 対 1 で複合体を形成する。この系の Kratky プロットが典型的な IQ モチーフをもつ ApoCaM/IQ1 複合体の Kratky プロットと重なることから, IQ 様モチーフで複合体を形成している。このことから iNOS と ApoCaM とは, この部位で複合体を形成している可能性が示唆される。

白濁はサイズの大きなペプチドの会合体に CaM が結合し, 結果として静電的効果が弱められることにより生じる。3, 9, 13 位の変異により白濁が抑制される。

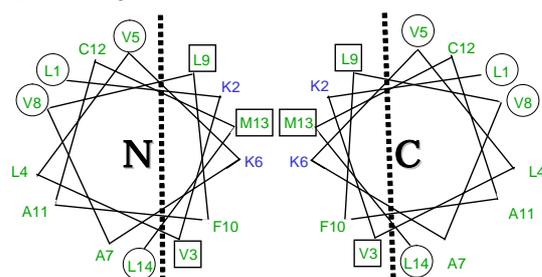


図 1  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{WT}_1-14$  の 2 量体構造モデル; 円で囲まれた残基は推定上のアンカー残基、四角で囲まれた残基は変位箇所、点線は  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  結合部と 2 量体形成部との境界線を示す。

#### 参考文献

- 1) 上野都子 (2005) 修士学位論文 (山形大学); 河尻幸治他: 第 24 回(2007) & 25 回(2008) PF シンポジウム要旨集
- 2) Matsubara.M., Hayashi.N., Titani.K., Taniguchi.H., (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 23050-23056.