

電荷反転カルモデュリンの溶液構造

和泉義信, 神保雄次・山形大院理工, 林 宣宏・東工大院生命理工

[1] 最近, ゲノムワイドで提案されたアレイ型タンパク質の構築原理により, カルモデュリン(CaM)がアレイ型構造をとるのは、両ロブ間に働く負電荷の斥力が主原因であること, さらに両ロブに負電荷が遍在するのは, CaM とトロポニン C に特化していることが示された¹⁾。これら負電荷の斥力による反発力が CaM の広い標的分子認識機能に深く関わっていると考えられている。

本研究では, 野生型 CaM の正負電荷を完全に反転させたタンパク質(電荷反転 CaM)を用いて, アレイ型タンパク質の構築原理の更なる検証を試みた。

[2] 電荷反転 CaM は, 野生型 CaM の Arg と Lys を全て Glu に, Asp と Glu を全て Lys に置換したものである。電荷反転 CaM は, Tris バッファー中で不安定なため, 安定な溶液条件として, 20mM NaPi, pH=7.4, 0.5M NaCl, 25°C が選択された。参照実験は, 同条件下の野生型 CaM を用いてなされた。また, 電荷反転 CaM は放射線ダメージを受け易いことが分かったので, 照射時間をできるだけ短くし, 測定毎にフレッシュな試料を用い, 測定回数を重ね, データ解析に耐える統計精度を得るようにした。

[3] 電荷反転 CaM の Guinier プロットは小角側の ELS 領域とそれに続く領域に分かれた。前者から得られた R_g は 34.0 Å, 後者から得られた R_g は 24.2 Å であった。野生型 CaM の R_g (23.8 Å) と比較すると, 前者の R_g は, 数個の分子からなる会合体に相当し, 後者から得られた R_g は電荷反転 CaM の 1 分子に相当する。Kratky プロットからは, 両 CaM ともアレイ型構造をとることが見て取れる。 $P(r)$ から得られた電荷反転 CaM と野生型 CaM のドメインサイズと最大長は, それぞれ 24.8 Å と 68 Å, 21.3 Å と 69 Å となった。ドメイン間相関を表す”肩の存在”は野生型 CaM の方が顕著に現れた。DAMMIN モデルから, 電荷反転 CaM リンカー一部は真直ぐであるが, 野生型 CaM は, リンカー一部で曲がっていることが見て取れた。

以上の結果から, 電荷反転 CaM のリンカー一部は野生型 CaM のリンカー一部より屈曲性が小さいことが示された。PAPIA を用いた二次構造予測結果から, 電荷反転 CaM では, EF ハンド 2 と 3 の間のループと EF ハンド 3 の Ca^{2+} 結合部位に相当するループがヘリックス構造をとっていることが示された。その結果, 電荷反転 CaM は屈曲性が失われたために不安定化する。

[4] 電荷反転 CaM は野生型 CaM と同じように, Ca^{2+} 不在、標的分子不在の溶液条件下でアレイ型構造をとることが示された。本研究の結果から, アレイ型タンパク質の構築原理のうち, CaM の正負電荷を反転させた場合のアレイ型構造の予測が実験的に検証された。

1) N.Uchikoga, *et al.*, Protein Sci. 14 (2005) 74–80.