

最近の研究から

EF-hand 蛋白質 CBP40 の Ca^{2+} 結合および非結合状態の立体構造

岩崎わかな^{1,2}、田之倉優²

¹ 理研・播磨研・理論構造生物学研究室、² 東京大学大学院農学生命科学研究科

Metal-free and Ca^{2+} -bound structures of a multidomain EF-hand protein, CBP40, from the lower eukaryote *Physarum polycephalum*

Wakana IWASAKI^{1,2}, Masaru TANOKURA²

¹RIKEN Harima Institute, ²Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo

1. はじめに

カルシウムは全ての細胞と細胞外液に分布しており、分泌・代謝・発生・免疫・脳機能など、生体内の様々な刺激応答反応において、普遍的なシグナル物質として働いている。これら Ca^{2+} の作用は、 Ca^{2+} 結合蛋白質を介して発揮される。 Ca^{2+} 結合蛋白質は多岐に渡るが、 Ca^{2+} 結合様式の相違から、EF-hand 蛋白質、 Ca^{2+} /リン脂質結合蛋白質などに分類されている。中でも EF-hand 蛋白質は、細胞内の Ca^{2+} シグナルトランスデューサーとして主要な役割を担うものが多い。本稿で述べる Ca^{2+} -binding protein 40 (CBP40) は、下等真核生物である真性粘菌 *Physarum polycephalum* の変形体から精製された、新規の EF-hand 蛋白質である [1]。

真性粘菌は環境条件により、アメーバ、孢子、変形体と形状を変える。変形体は数十 cm にも達する巨大な多核の単細胞生物で、内部では非常に速い原形質流動が起こっているため、生体運動のモデル生物の一つとして古くから研究素材にされてきた。このような特徴を持つ変形体が外力により損傷を受けた場合、原形質が噴出し、単細胞であるために致命的な事態に陥ってしまうように思える。しかし実際には、膜が損傷を受けても迅速に修復がなされる。膜の修復機構については長年不明であったが、最近になって、変形体からトランスグルタミナーゼ (TGase) が発見され [2]、知見が得られ始めた。TGase は Gln と Lys 間での架橋形成を触媒する酵素であり、血液凝固や細胞接着などにおいて重要な役割を果たす。変形体の TGase の基質となるのが、CBP40 である。CBP40 および TGase は変形体に特異的に発現し、アメーバ体には発現していない。CBP40 は、損傷を受けた部位の膜直下や、膜の伸長部位には特に濃縮されて存在する [3]。変形体にダメージを与えると、TGase が活性化されて CBP40 が架橋され、会合体を形成する [2]。TGase が存在しなくても、CBP40 は Ca^{2+} を結合すると会合し、巨大な凝集体を形成する性質がある。変形体の迅速な膜修復には Ca^{2+} と CBP40 が必須であることが明らかにされている [3]。CBP40 は、 Ca^{2+} 依存的に凝集し、TGase に架橋されることによって、損傷

部位をふさぐ役割を果たしていると考えられる。

CBP40 は C 末端領域に 4 つの EF-hand モチーフを含み、その N 末端側に 220 残基の配列が付加している。変形体細胞においては、CBP40 の一部はプロテアーゼによって分解され、N 末端 32 残基を欠失した CBP40 Δ となる。CBP40 は Ca^{2+} を結合すると会合して沈殿するが、CBP40 Δ は Ca^{2+} を結合しても会合しない。CBP40 Δ は、カルモジュリンの 10 倍以上高い Ca^{2+} 親和性を示す [4]。本研究は、CBP40 Δ の Ca^{2+} 遊離型・ Ca^{2+} 結合型両構造の X 線結晶解析を行い、EF-hand と他のドメインの相互作用について、また、 Ca^{2+} 高親和性および CBP40 の会合機構について、知見を得ることを目的とした [5]。

2. 実験

2.1 発現・精製と結晶化

CBP40 Δ は、大腸菌内で大量発現させ、陰イオン交換・疎水・ゲルろ過カラムにかけて精製した。精製作業は全て、50 mM EDTA を加えた緩衝液中で行った。結晶化条件の探索は、リザーバーに EDTA 10 mM または CaCl_2 10 mM を加えた条件の 2 種類を試した。 CaCl_2 を加える場合は、EDTA 共存下で精製した CBP40 Δ 溶液を、バッファー交換によって EDTA を除いてから結晶化に使用した。検討の結果、EDTA 共存下で硫酸アンモニウムを沈澱剤とした条件において、直径 0.6 mm、厚さ 0.3 mm の六角板状の Ca^{2+} 遊離型結晶が得られた [6]。

Ca^{2+} 結合型結晶は、作成が非常に困難であった。沈殿剤として硫酸を用いた場合、 Ca^{2+} を共存させると、結晶が丸みを帯び、形が崩れる傾向があった。数十個のハンギングドロップの中から数個だけ六角板状結晶が得られたが、分解能 5.0 Å の反射しか与えなかった。他の条件を探索したところ、リン酸 Na, K 塩の条件において、六角柱状の結晶が析出した。蛋白質溶液とリザーバー溶液を混合すると、まずリン酸カルシウムの結晶が析出するが、インキュベートを続けるうちにリン酸カルシウムの結晶は次第に消滅し、2 年後に蛋白質の結晶が析出した。この結晶は分解能 4.4 Å、 Ca^{2+} 遊離型結晶と同じ空間群であり、格子定数も

ほとんど同じであった (Appendix)。条件最適化を試みたが、再現性よく結晶を得ることは困難であった。そこで、EDTA を加えずに精製した蛋白質を用いて、Ca²⁺ 遊離型結晶と同じ条件下 (ただし EDTA は加えない) で結晶を作成し、この結晶を 2 mM CaCl₂ 溶液中に 4 日間ソーキングすることにより、Ca²⁺ を導入した。ソーキングの間、結晶が割れたりひびが入ったりすることはなかった。

2.2 結晶構造解析

回折強度データの収集には、PF の BL-6A、BL-6B を利用した。本結晶は 3.0 Å 分解能までの反射しか与えなかったため、結晶化条件および精製法を更に検討したが、改善は見られなかった。回折データは、室温で収集したものを解析に用いた。100 K で測定した場合、分解能は 2.7 Å まで改善されたが、電子密度は室温のものの方が良好だったからである。Ca²⁺ 遊離型結晶の構造を、水銀誘導体とサマリウム誘導体を用いて、多重重原子同型置換法により決定した。Ca²⁺ 結合型結晶は、Ca²⁺ 遊離型構造をプローブとして用いて、分子置換法により構造を決定した。統計値の詳細を Appendix に示す。

3. 結果と考察

3.1 CBP40Δ の立体構造

Fig. 1 に Ca²⁺ 結合型の構造を示す。全体構造は、N 末端の coiled-coil、C 末端の EF-hand ドメイン、両者を連結する intervening ドメインから構成されていた (Fig. 1)。

coiled-coil ドメインの 2 本のヘリックスを、ヘリックス 1、2 と呼ぶことにする。ヘリックス 1 は 23 残基、ヘリックス 2 は 40 残基から成り、長さが大きく違うのが特徴である。

intervening ドメインは、6 本のヘリックスから成る。coiled-coil との連結部に、RGD 配列が存在する (Fig. 1a)。RGD 配列は、細胞接着活性を持つコンセンサス配列として知られているが、CBP40 の RGD が実際に機能を持つかについては、不明である。また、intervening ドメイン中には、グリコサミノグリカン鎖の結合配列 SGXG も存在するが、実際に糖鎖が付加するかどうかは不明である。

EF-hand ドメインは、4 つの EF-hand (EF1-EF4) から構成されていた。オミットマップを調べたところ、Ca²⁺ 結合型構造においては、4 つの EF-hand ループ上に、強い電子密度が現れた。一方、Ca²⁺ 遊離型構造においては、ほとんど電子密度が見られなかった。誘導プラズマ原子発光分析により残存 Ca²⁺ 量を定量したところ、結晶中の蛋白質対 Ca²⁺ のモル比は 1 対 0.094 であることが分かった。これは、4 つの Ca²⁺ 結合部位それぞれについて、平均して 2.4% の占有率で Ca²⁺ が残っていることに相当する。この量は無視できると判断し、得られた 2 つの構造を、それぞれ Ca²⁺ 遊離型構造および Ca²⁺ 結合型構造であると結論付けた。

Ca²⁺ 結合型構造においては、4 つの EF-hand は、いずれも典型的な pentagonal bipyramidal 様式で Ca²⁺ を配位していた (Fig. 2)。EF1 では、例外的に E ヘリックスがループとなっていたが、配位部位の局所構造は EF2-4 と変わら

ず、Ca²⁺ の電子密度も明瞭に認められた。典型的なヘリックスループヘリックス構造でなくても、配位部位の局所構造さえ保持されていれば、問題なく Ca²⁺ を結合できるのであろう。EF-hand ドメイン全体の構造は、カルパインなどの penta-EF-hand (PEF) ファミリーと似ていた (Fig. 3)。ただし、CBP40 では、PEF ファミリーと異なって、5 つめの EF-hand は存在しない。EF1 と EF2、EF3 と EF4 は、EF-hand ループ同士が短い逆平行 β-sheet を形成し、対を作っている。これらの対を、EF1/2、EF3/4 と表記することにする。カルモジュリンでは、EF1/2 と EF3/4 の間のリンカーが 8 残基と長い。このリンカーは、溶液中では柔軟なループ構造をとり、EF1/2 と EF3/4 が独立に運動できるようになっている [7, 8](Fig.3c)。一方、CBP40Δ や PEF ファミリーでは、EF1/2 と EF3/4 の間には、わずかに 1 残基があるのみである (Fig. 2ab)。その結果、EF1/2 と EF3/4 との間の独立性が失われているのが大きな特徴である。

3.2 Ca²⁺ 遊離型構造と Ca²⁺ 結合型構造の違い

両構造は、EF-hand ループにおいてわずかに違いが見られた以外は、ほぼ同じであった (Fig. 4)。Ca²⁺ 結合型構造は、Ca²⁺ をソーキングした結晶を用いて決定されたものであるから、結晶中のパッキングの影響により、Ca²⁺ 結合に伴う構造変化が抑えられている可能性は否定できない。しかし、2.1 で述べたように、わずかに得られた Ca²⁺ との共結晶は、Ca²⁺ 遊離型結晶と空間群が同じで格子定数もほぼ同じであったことから、本来 Ca²⁺ 結合による大きな構造変化はないと考えられる。構造変化が小さい理由としては、CBP40Δ は EF1/2 と EF3/4 の間のループが無く、EF1/2 と EF3/4 が相互作用して安定な球状構造を作っているため、カルモジュリンのような大きな構造変化が起こりづらいということが考えられる (Fig. 3)。実際、カルパインのドメイン VI も、CBP40Δ と同様に、Ca²⁺ を結合してもほとんど構造が変化しない。

3.3 EF-hand ドメインと、coiled-coil および intervening ドメインとの相互作用

現在までにおびただしい数の EF-hand 蛋白質の立体構造が決定されているが、それらの大部分が EF-hand ドメイン単独の構造解析である。CBP40Δ のように EF-hand が Ca²⁺ 依存的な調節機能を持ち、かつ EF-hand 以外のドメインを持つ蛋白質の立体構造解析例は、m-カルパイン [9, 10] や BM-40 [11] などにとどまり、例は少ない。CBP40Δ の EF-hand ドメインは、intervening ドメインと広面積で相互作用しており、分子全体では、やや扁平な円盤状の形状となっているのが特徴である (Fig. 5)。ドメイン間の疎水性相互作用が、EF-hand ドメインが構造を安定に保持し、高い Ca²⁺ 親和性を持つのに必要な役割を果たしていると考えられる。

CBP40 の 1-211 残基とカルモジュリンとのキメラ蛋白質は、カルモジュリン単独に比べて 100 倍以上高い Ca²⁺ 親和性を示すようになる [4]。この結果から、CBP40 の N

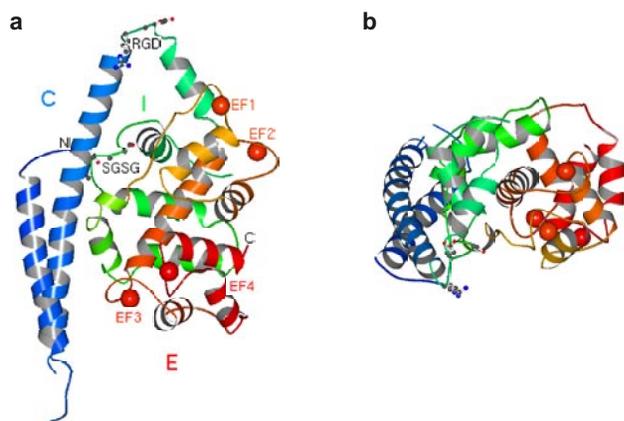


Figure 1
Overall fold of the Ca²⁺-bound form of CBP40Δ-Side (a) and top (b) views. The bound Ca²⁺ ions are represented as spheres. The coiled-coil (C) and intervening (I) domains are shown in blue and green, respectively. EF-hand motifs in the EF-hand (E) domain from EF1 to EF4 are represented by a gradation from orange to red.

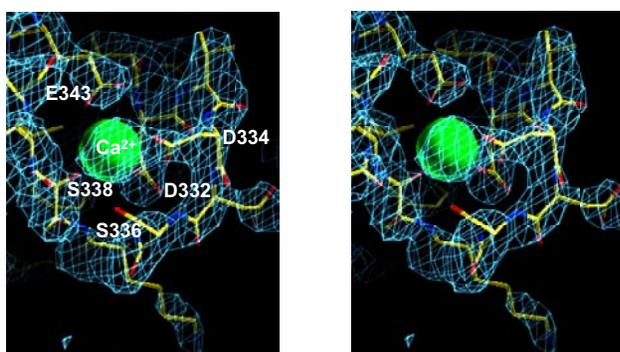


Figure 2
The final 2*Fo* - *Fc* map contoured at 1.2σ around the EF4-loop of the Ca²⁺-bound form. The residues involved in the Ca²⁺ coordination are labeled. Water molecules are not modeled for lack of resolution.

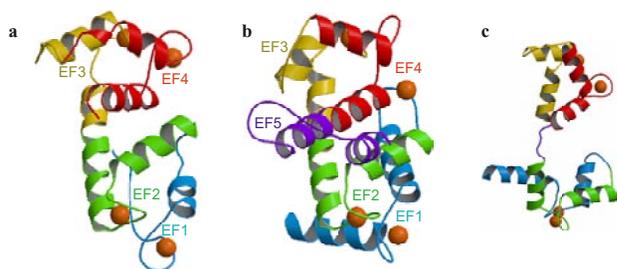


Figure 3
Comparison with other EF-Hand proteins. Ribbon representation of the EF-hand domain of CBP40Δ in the Ca²⁺-bound form (a), domain VI of calpain (b), and calmodulin (c) [7, 8]. EF-hand motifs are shown in cyan (EF1), green (EF2), yellow (EF3), red (EF4), and purple (EF5). In calmodulin, the eight-residue linker between EF2 and EF3 separates EF1/2 and EF3/4.

末端半分は、自己の EF-hand ドメインのみならず、キメラ中のカルモジュリンとも相互作用して、Ca²⁺ 親和性を上昇させることが明らかになった。カルモジュリンは、単独では Ca²⁺ 親和性はあまり高くないが、標的ペプチドが共存すると親和性が上昇する。180 種以上のカルモジュリン結合コンセンサス配列が同定されているが、CBP40 の N 末

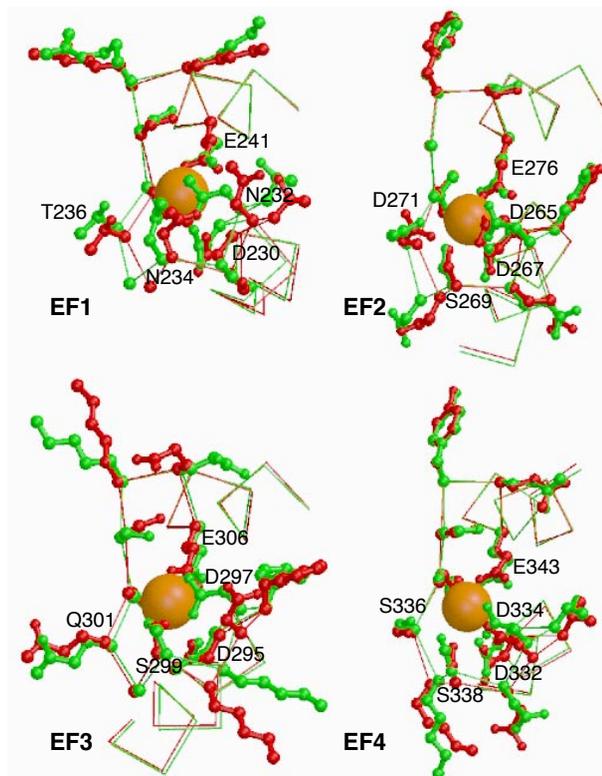


Figure 4
Superposition of the residues of four EF-hands involved in Ca²⁺ coordination in metal-free, in red, and Ca²⁺-bound, in green, forms.

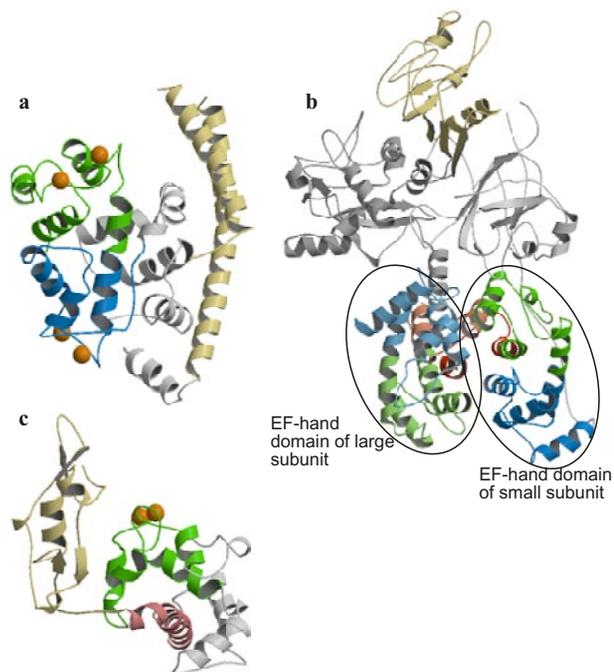


Figure 5
Interdomain contacts of the EF-hand domain within multidomain proteins. EF1/2, cyan; EF3/4, green; other regions, white and beige. (a) Globular structure of CBP40Δ. (b) The Ca²⁺-free form of m-calpain [9, 10]. The Ca²⁺-bound form of m-calpain has not been determined because of aggregation. (c) The Ca²⁺-bound structure of the folistatinlike (FS) domain (beige) and the EC domain of BM-40 [11]. The EC domain contains two EF-hands (green) and another three α helices (white and pink). The intramolecular interaction between the two EF-hands and the helix shown in pink resembles the intermolecular interaction formed by calmodulin and its target peptide.

端半分には、これらの配列は存在しなかった。CBP40には新規のカルモジュリン結合配列が存在するか、あるいは、既知の連続した配列とは異なり、立体構造に基づいてカルモジュリンを多点認識している可能性が考えられる。

3.4 Ca²⁺ 依存的な機能調節について

真性粘菌においては、細胞内のCa²⁺濃度は10⁻⁷ Mであるが、細胞外のCa²⁺濃度は10⁻³ M程度と高い。CBP40Δの4つのCa²⁺結合部位のうち、2か所が特にCa²⁺高親和性であることが知られている [4]。静状態の細胞内においては、CBP40は2つの高親和性部位のみにCa²⁺を結合しているが、細胞が損傷を受けると、損傷部位のCa²⁺濃度が上昇して残りの部位にCa²⁺が結合すると考えられる。その結果、CBP40は巨大な凝集体を形成して、損傷部位をふさぐのであろう。CBP40Δにおいて、Ca²⁺結合による構造変化はほとんど見られなかった。では、CBP40全長においては、どのようにCa²⁺依存的な会合がおこるのであろうか。CBP40には、カルパインのようなEF-hand以外のCa²⁺結合部位は存在しない。従って、Ca²⁺依存的な重合は、EF-handドメインのごく小さな構造変化によって制御されていると考えられる。我々は、会合機構について、以下の仮説を立てた。

3.1に述べたように、CBP40Δのcoiled-coilのヘリックス1は、ヘリックス2に比べて17残基短い。しかし、二次構造予測によると、CBP40全長においてはヘリックス1がN末端側に延長され、ヘリックス1とヘリックス2は同じ長さになると予想される。CBP40Δにおいては、ヘリ

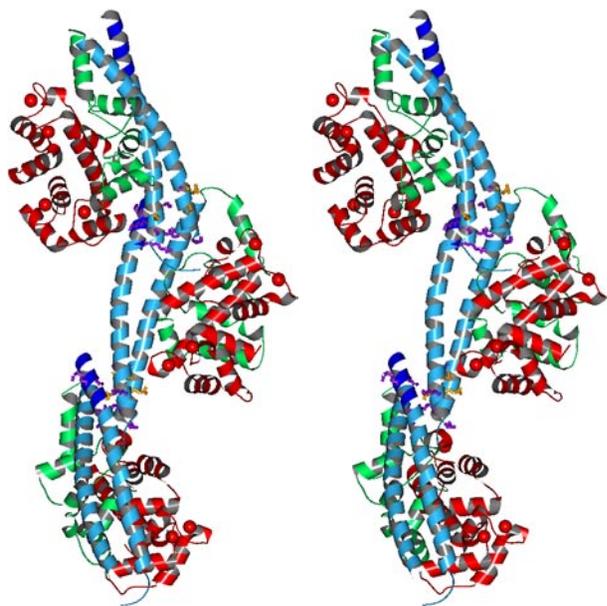


Figure 6
The model of the Ca²⁺-induced oligomer of CBP40 making intermolecular four-helix bundles, shown in stereo view. The coiled-coil, intervening, and EF-hand domains are shown in sky blue, green, and red, respectively. The additional N-terminal helix (Ala22-Lys32) is shown in navy. Residues 1-21 are not shown. Gln and Lys residues located on the intermolecular surfaces are shown as stick models in purple and yellow, respectively.

ックス1と2の長さが大きく違うので、両者間の相互作用が少ないため、標準的なcoiled-coilに比べて少しコイルが緩み、ヘリックス2はinterveningドメインとの相互作用によって安定化されている。しかしCBP40全長では、新たに加わったヘリックス1のN末端部が、ヘリックス2と多くの残基において疎水性相互作用およびイオン結合を形成することが、helical wheel analysisから分かった。そのため、CBP40全長では、CBP40Δに比べてcoiled-coilが安定化し、interveningドメインに対する独立性が増すと考えられる。溶液中においては、Ca²⁺結合によってヘリックス1と2の相対配置が少し変化し、分子間でcoiled-coil同士が4本のヘリックスから成るバンドルを形成し、会合するのではないかと考えている。ヘリックス1と2の相対配置がごくわずかに変化するだけで、分子間でヘリックスバンドルを作ることは可能になる。Fig. 6に会合モデルを示す。このモデルの分子間界面には、GlnとLysが互いに近距離に存在する。これらの残基は、TGaseによって架橋されて、会合体をより強固にすると考えられる。

4. まとめ

CBP40ΔのCa²⁺遊離型およびCa²⁺結合型構造を決定した。両者の構造はほとんど同じであったが、得られた構造から、CBP40全長のCa²⁺依存的な会合様式について考察し、分子間でヘリックスバンドルを形成する会合モデルを提唱した。この会合モデルは、Ca²⁺結合に伴う構造変化がごくわずかでも形成可能であり、また、TGaseによる架橋に適していることから、信頼性の高いものであると考えている。しかしながら、この会合モデルを直接的に支持する実験的事実はまだない。変異体の会合実験や立体構造解析、Ca²⁺を高親和性部位のみに結合した結晶の作成などが現在進行中である。変形体独自の膜修復機構を理解するためにも、また、Ca²⁺結合蛋白質および分子会合機構への一般的な興味からも、更に研究を進めていきたい。

引用文献

- [1] T. Okagaki, R. Ishikawa, and K. Kohama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**, 564-570 (1991).
- [2] J. Mottahedeh and R. Marsh, *J. Biol. Chem.* **273**, 29888-29895 (1998).
- [3] A. Nakamura, N. Miki, S. Ogihara, Y. Hanyuda and K. Kohama, *Suppl. to Mol. Biol. Cell* **12**, 481a (2001).
- [4] A. Nakamura, T. Okagaki, T. Takagi, K. Nakashima, M. Yazawa and K. Kohama, *Biochemistry* **39**, 3827-3834 (2000).
- [5] W. Iwasaki, H. Sasaki, A. Nakamura, K. Kohama and M. Tanokura, *Structure* **11**, 75-85 (2003).
- [6] W. Iwasaki, H. Sasaki, A. Nakamura, K. Kohama and M. Tanokura, *J. Biochem.* **126**, 7-9 (1999).
- [7] M. Zhang, T. Tanaka and M. Ikura, *Nat. Struct. Biol.* **2**, 758-767 (1995).
- [8] H. Kuboniwa, N. Tjandra, S. Grzesiek, H. Ren, C.B. Klee

- and A. Bax, Nat. Struct. Biol. **2**, 768-776 (1995)
- [9] C.M. Hosfield, J.S. Elce, P.L. Davies and Z. Jia, EMBO J. **18**, 6880-6889 (1999).
- [10] S. Strobl, C. Fernandez-Catalan, M. Braun, R. Huber, H. Masumoto, K. Nakagawa, A. Irie, H. Sorimachi, G. Bourenkow, H. Bartunik, K. Suzuki and W. Bode, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 588-592 (2000).
- [11] E. Hohenester, P. Maurer and R. Timpl, EMBO J. **16**, 3778-3786 (1997).

*Reprinted Structure, vol.11, Iwasaki et al and Tanokura, Metal-free and Ca²⁺-bound structures of a multidomain EF-hand protein, CBP40, from the lower Eukaryote *Physarum polycephalum.*, pp.75-85, Copyright (2003), with permission from Elsevier.

(2003年9月19日原稿受付)

著者紹介

岩崎わかな Wakana IWASAKI
理化学研究所播磨研究所 基礎科学特別研究員
〒679-5148 兵庫県佐用郡三日月町光都 1-1-1

TEL: 0791-58-2912

FAX: 0791-58-2913

e-mail: wiwasaki@spring8.or.jp

略歴：2000年東京大学大学院理学研究科博士課程修了、2000年理化学研究所播磨研究所協力研究員、2000年同基礎科学特別研究員。理学博士。

田之倉優 Masaru Tanokura

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻教授
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

TEL: 03-5841-5165

FAX: 03-5841-8023

e-mail: amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

略歴：1979年東京大学大学院理学研究科博士課程修了、1980年大分医科大学助手、1988年順天堂大学講師、1989年東京大学理学部講師、1994年東京大学生物生産工学研究センター教授、1998年東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻教授。

最近の研究：Ca結合タンパク質と生物分子モーターの構造生物学、発生・分化とDNAの複製・修復の構造ゲノム科学、発光マシーナリーの構造生物学。

(Appendix)

Table 1 Crystallographic statistics

Data collection	Native 1 (Metal-free)	Native 2 (Ca ²⁺ -bound)	Sm (NO ₃) ₃	HgCl ₂
Data set	Native 1 (Metal-free)	Native 2 (Ca ²⁺ -bound)	Sm (NO ₃) ₃	HgCl ₂
Space group	<i>P</i> ₃ ₂ ₁			
Unit cell parameters				
<i>a</i> (Å)	64.4	64.4	64.5	65.0
<i>c</i> (Å)	207.2	209.4	209.3	208.0
Resolution (Å)	3.0	3.1	3.1	3.3
Reflections				
(total / unique)	38752 / 9795	34014 / 13647	44752 / 10183	58759 / 10278
Completeness (%)	91.7	97.1	97.8	98.5
<i>R</i> _{merge} (%)	6.4	9.7	9.9	10.5
MIR Analysis				
<i>R</i> _{iso} (%) ^a			26.4	26.4
Phasing power (centric / acentric)			1.17 / 1.39	0.99 / 1.12
Refinement	Metal-free	Ca ²⁺ -bound		
<i>R</i> _{cryst} / <i>R</i> _{free} ^b	0.244 / 0.260	0.249 / 0.293		
Resolution range (Å)	10.0-3.0	10.0-3.1		
Rms deviations				
Bonds (Å)	0.013	0.010		
Angles (°)	1.92	1.38		
Average <i>B</i> -factors (Å ²)				
Main chain	41	33		
Side chain	42	34		
<i>B</i> -factors of the four Ca ²⁺ ions (Å ²)		31 (EF1), 22 (EF2), 35 (EF3), 30 (EF4)		

^a $R_{iso} = \sum |F_{derivative} - F_{native}| / \sum F_{native}$

^b $R_{cryst} = \sum_{hkl} |F_{obs} - F_{calc}| / \sum_{hkl} |F_{obs}|$. *R*_{free} was calculated as for *R*_{cryst} but on 5% of the data excluded from the refinement.