

学 位 論 文 題 名

NMR Study on Structure—Function Relationship of
Calmodulin

(NMR によるカルモデュリンの構造と機能と機能の相関についての研究)

学位論文内容の要旨

カルモデュリン (CaM) は真核生物の細胞に広く分布する蛋白質である。CaMは、4個のカルシウムイオン (Ca^{2+}) を結合してカルモデュリン標的酵素と呼ばれる酵素と相互作用し、標的酵素の活性を調節する。CaMの構造は、2つの球状ドメインが α ヘリックスでつながれた亜鈴型である。それぞれのドメインには2個ずつの Ca^{2+} 結合部位がある。標的酵素のモデルペプチドとCaMとの複合体は、CaMの中央のヘリックス部分が折れ曲がり、2つの球状ドメインが接近して α ヘリックス状の標的を包み込む構造をしている。

CaMの構造については良く研究されているが、構造変化と機能の相関については不明な点が多い。従って、この問題の解決に向けて本研究の大半は次のような方針で行われた。さまざまな Ca^{2+} もしくはペプチド濃度でのCaMのNMRスペクトルを測定した。それらの結果に基づき、 Ca^{2+} もしくはペプチドの結合によるCaMの構造変化を考察し機能との相関について検討した。

第1章では、CaMについて現在までに明らかになっていることと、本研究の目的について記述した。

第2章では、CaMのみとCaMとモデルペプチド (マストパラン; MP) の複合体について、いくつかの残基のアミドプロトンのH/D交換の速度を調べた結果を述べた。それぞれの Ca^{2+} 結合部位の5番目に位置するGly残基は同じ Ca^{2+} 結合部位内の1番目に位置するAspあるいはAsn残基と水素結合し、 Ca^{2+} 結合部位の構造の安定化に寄与している。このGly残基のH/D交換の速度は、CaM単体よりもCaM-MP複合体の方が遅かった。この結果から、CaM単体よりもCaM-MP複合体の Ca^{2+} 結合部位の方がより安定な構造を取っていることが示唆された。このことは、標的と共存する系でCaMの Ca^{2+} 結合能が上がることに関係していると考えられる。

第3章では、 Ca^{2+} 非結合状態であるアポCaM、Cドメインのみに Ca^{2+} を結合した 2Ca^{2+} -CaM、 Ca^{2+} 飽和型の 4Ca^{2+} -CaMのそれぞれに対してMPを滴定し、さまざまなMP濃度で ^1H -NMRスペクトルを測定した結果を示した。その結果を解析し、アポCaMもMPと弱い相互作用があること、 4Ca^{2+} -CaMではCドメインの方がNドメインよりもMP親和性が高いことを見いだした。さらに、 2Ca^{2+} -CaMにMPを滴定するとCaM分子間で Ca^{2+} の再分配が起こり、アポCaMと活性型の 4Ca^{2+} -CaM-MPが現れることを見いだした。このことは、標的と共存する系でCaMの見かけの Ca^{2+} 結合能が上がることに対応しており、複合体形成

前のCドメインのCa²⁺結合能よりも複合体形成後のNドメインのCa²⁺結合能の方が高いことを示している。このようなCaMの性質は、Ca²⁺濃度の上昇に鋭敏に応答して機能を発現することに密接に関係していると考えられる。

第4章では、第3章で見いだしたCa²⁺の再分配について、より生体内に近い状態で検討した。Ca²⁺の代わりにCd²⁺を用いて¹¹³Cd-NMRスペクトルを測定し、CaMに結合しているCd²⁺を直接モニターした。この章で用いたM13は26残基の標的モデルペプチドで、ミオシン軽鎖キナーゼのCaM結合部位である。¹¹³Cd-NMRスペクトルを測定すると2Cd²⁺-CaMはシャープな2本のシグナルを与える。2Cd²⁺-CaMにM13を加えると¹¹³Cd-NMRスペクトルは大きく変化し、4本のシグナルが観測された。この結果は、標的が加えられたことにより2Cd²⁺-CaMはアポCaMと4Cd²⁺-CaM-M13複合体になったことを示しており、第3章の結果と一致する。マグネシウムイオン(Mg²⁺)存在下で同様の実験をして¹¹³Cd-NMRスペクトルを測定すると、Cd²⁺の再分配は起こらず4Cd²⁺-CaM-M13複合体は現れないことを見いだした。生体内で刺激に応答したCa²⁺濃度の急激な上昇がCaM機能発現の引き金となるためには、低Ca²⁺濃度で活性型の4Ca²⁺-CaM-標的酵素の複合体が現れないことが必要である。そのための役割をMg²⁺が担っていることが明らかになった。

第5章では、酵母CaMのNドメイン(YCM0-N)の構造とCa²⁺結合に伴う構造変化を述べた。この章の実験には、一様に¹⁵Nラベルされた試料に対して3次元NMR法を適用した。

YCM0-Nは他のCaMと比較して1次構造の相同性が60%程度しかない。また、一般的なCaMに比べて酵母CaMの標的酵素活性化能力は半分程度しかない。従って、本章での結果を他のCaMの結果と比較検討することは、ある蛋白質がCaMとして機能するのに必要な性質についての知見をもたらしてくれるものと考えられる。

YCM0-NのMg²⁺結合型の2次構造は他のCaMのそれと同様に2つのヘリックス・ループ・ヘリックスからなっていることが明らかになった。また、2つのCa²⁺結合部位はループ部分で逆平行のβシート構造を形成していることが明らかになった。さらに、いくつかのPhe,Ile残基の側鎖が疎水性領域を形成していることが明らかになった。これらの結果は、既に明らかになっている他のCaMの構造の特徴と一致する。Ca²⁺結合型はMg²⁺結合型とほぼ同様の2次構造を取っているが、第1番目のCa²⁺結合部位の後半の部分(Bヘリックス部分)がヘリックス構造を形成していないことが明らかになった。これは、BヘリックスのN末端側部分のアミノ酸配列がSer-Serとなっていて、一般的なCaMとは異なることが原因であろうと考えた。既に明らかにされている4Ca²⁺-CaM-M13複合体の構造では、疎水性領域の他にBヘリックス部分のアミノ酸残基もM13と相互作用していることが報告されている。Bヘリックスが形成されていないことは、酵母CaMの標的酵素活性化能力が低いことの一因ではないかと考えられる。また、標的の結合部位である疎水性領域は、他のCaMと同様にCa²⁺結合に依存して分子表面に露出することが明らかになった。

さらに、一様に¹⁵NでラベルされたYCM0-NのMg²⁺結合型にCa²⁺を滴定し、さまざまなCa²⁺濃度での異種核(¹H,¹⁵N)2次元NMRスペクトル(HSQC)を測定した。その結果、YCM0-Nの2つのCa²⁺結合部位へのCa²⁺結合は段階的に起こり、Ca²⁺結合に伴う構造変化は分子全体で起こることが明らかになった。

最後の章で、ある蛋白質がCaMとして働くために備えていなければならない性質について検討した。Ca²⁺結合部位は水素結合で安定化されていること、標的と混在する系ではこの水素結合が強くなってCa²⁺親和性を高めること、ドメイン内の2つのCa²⁺結合部位はβシートで結ばれてペアになっていること、それぞれのドメインにCa²⁺結合に依存し

て分子の表面に露出する疎水性領域があることなどが、CaMとしての機能に必要な構造上の条件であると結論した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	引地邦男
副査	教授	新田勝利
副査	教授	田中 勲
副査	教授	矢澤道生

学位論文題名

NMR Study on Structure – Function Relationship of Calmodulin

(NMR によるカルモデュリンの構造と機能と機能の相関についての研究)

カルモデュリン (CaM) は真核生物の細胞に広く分布し、4 個の Ca^{2+} を結合して酵素の活性を調節する蛋白質である。CaM の構造は 2 つの球状ドメインが α ヘリックスでつながれた亜鈴型をしており、それぞれのドメインには 2 個ずつの Ca^{2+} 結合部位がある。CaM の構造は良く研究されているが、 Ca^{2+} 結合に伴う構造変化と機能の相関については不明な点が多い。申請者はこの相関を明らかにするために NMR を用いた研究を行った。本論文はその結果について述べたものであり、6 章からなる。

第 1 章では、CaM についてのこれまでの研究を概観し、この論文の目的について述べている。ついで、第 2 章では、CaM のみと CaM とモデルペプチド (マストパラン: MP) の複合体について、アミドプロトンの H/D 交換の速度を調べた結果について述べている。CaM-MP 複合体の H/D 交換速度は CaM 単体よりも遅く、CaM-MP 複合体の Ca^{2+} 結合がより安定であることを見出した。

第 3 章では、アポ CaM、C ドメインのみに Ca^{2+} を結合した 2Ca^{2+} -CaM、 Ca^{2+} 飽和型の 4Ca^{2+} -CaM のそれぞれに対して MP を滴定し、さまざまな MP 濃度でスペクトルを測定した結果について述べている。アポ CaM も MP と弱い相互作用があること、 4Ca^{2+} -CaM では C ドメインの方が N ドメインよりも MP 親和性が高いことを見いだした。 2Ca^{2+} -CaM に MP を滴定すると CaM 分子間で Ca^{2+} の再分配が起こり、アポ CaM と活性型の 4Ca^{2+} -CaM-MP が現れることを見いだした。このような CaM の性質が、 Ca^{2+} 濃度の上昇に鋭敏に応答して機能する生理活性を発現していると述べている。

第 4 章では、 Ca^{2+} の代わりに Cd^{2+} を用いて ^{113}Cd -NMR スペクトルを測定した結果について述べている。 2Cd^{2+} -CaM はシャープな 2 本のピークを与えるが、モデルペプチドである M13 を加えると、4 本のピークが観測された。M13 を加えたこと

により、 $2\text{Cd}^{2+}\text{-CaM}$ はアポ CaM と $4\text{Cd}^{2+}\text{-CaM-M13}$ 複合体になったと解釈している。 Mg^{2+} 存在下で同様の実験をすると、 $4\text{Cd}^{2+}\text{-CaM-M13}$ 複合体は現れないことを見いだした。生体内で、刺激に応答した Ca^{2+} 濃度の急激な上昇が CaM 機能発現の引き金となるためには、低 Ca^{2+} 濃度で活性型の $4\text{Ca}^{2+}\text{-CaM}$ -標的酵素の複合体が現れないことが必要で、そのための役割を Mg^{2+} が担っていると述べている。

第5章では、酵母 CaM の N ドメイン (YCM0-N) の構造と Ca^{2+} 結合に伴う構造変化を調べた結果について述べている。一様に ^{15}N でラベルした蛋白質を作成し、3次元 NMR スペクトルを測定した。YCM0-N は他の CaM と比較して1次構造の相同性が60%程度で、他の CaM に比べて酵素活性化能力は半分程度しかない。YCM0-N の Mg^{2+} 結合型の2次構造は他の CaM と同様に2つのヘリックス・ループ・ヘリックスからなり、2つの Ca^{2+} 結合部位はループ部分で逆平行の β シート構造を形成していることを見出した。さらに、疎水性のドメインがあることも明らかにした。これらの結果は、他の CaM の構造の特徴と一致する。一方、 Ca^{2+} 結合型は Mg^{2+} 結合型とほぼ同様の2次構造を取っているが、第1番目の Ca^{2+} 結合部位の後半の部分 (Bヘリックス部分) がヘリックス構造を形成していないことを見出した。BヘリックスのN末端側部分のアミノ酸配列が Ser-Ser となっており、これが酵母 CaM が低活性である理由の1つであろうと述べている。

最後の章では、CaM としての機能を発現するために蛋白質分子が持っているべき性質について議論している。 Ca^{2+} 結合部位は水素結合で安定化されていること、標的と混在する系ではこの水素結合が強くなって Ca^{2+} 親和性を高めること、ドメイン内の2つの Ca^{2+} 結合部位は β シートで結ばれてペアになっていること、それぞれのドメインに Ca^{2+} 結合に依存して分子の表面に露出する疎水性領域があること等が必要な構造上の条件であると結論している。

本論文で述べられた実験結果及び考察は、カルモデュリンの構造と機能の相関について有益な知見を与えるものと高く評価される。審査員一同は申請者が博士 (理学) の学位を得る十分な資格があると認めた。