

博士(理学) 中島謙一

学位論文題名

出芽酵母カルモジュリンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合と  
高次構造変化に関する研究

学位論文内容の要旨

カルモジュリン(CaM)は真核生物に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白質であり、外部からの刺激に応じた細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇に伴って  $\text{Ca}^{2+}$  を結合し、さまざまな標的酵素の活性を調節している。そのアミノ酸配列は多くの生物種間で90%以上の高い相同性を示すが、出芽酵母のCaMは脊椎動物と比べて60%の相同性しかない。特に最もC末端側の  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位に当たる領域に相違が多く見られ、そこには  $\text{Ca}^{2+}$  が結合しない。また、他の領域にも違いが見られ、脊椎動物由来の標的酵素を活性化する能力が劣っている。本研究の第一部では、出芽酵母CaMの標的酵素に対する低い活性化能力がいかなる理由によるかを調べた。第二部では出芽酵母のCaMの構造と機能の特異性を調べ、第三部では出芽酵母のCaMの  $\text{Ca}^{2+}$  結合と構造変化について詳しく検討した。

第一部：CaMは球状のNドメイン、Cドメインが中央のリンカーでつながった亜鉛型の立体構造をとっている。各々のドメインに2つずつの、1分子あたりでは計4個の  $\text{Ca}^{2+}$  を結合すると、多種多様な標的酵素と結合し、活性を調節する。出芽酵母のCaMは、脊椎動物CaMに対する相同性が低いので、脊椎動物由来の標的酵素を活性化する能力が低い。この理由を調べれば、活性化のメカニズムを知ることができる。そこで、ある  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位もしくはリンカーよりも、N末端側に出芽酵母、C末端側に鶏のCaMに相当する配列を持つキメラ分子を7種、遺伝子工学的に作製した。それらについて、標的酵素を活性化する能力を調べたところ、鶏の配列が多くなれば、より高い活性化能を獲得した。活性化能の低いキメラ分子と高い分子とを比較することで、標的酵素を活性化するために必要な領域が決定できた。ホスホジエステラーゼはCaMが結合しさえすれば高い活性を示したが、CaMが結合するためにはそのCドメインの寄与が大きいことが分かった。カルシニューリンにCaMが結合し、活性化されるためには、最もC末端側の第4  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位(サイトIV)に  $\text{Ca}^{2+}$  が結合することと、Nドメインが鶏型の  $\text{Ca}^{2+}$  結合特性を示すことが必要であった。また基質としてタンパク質を認識するためには、Ala88-Ala128の領域も必要であった。骨格筋、及び平滑筋ミオシン軽鎖リン酸化酵素にCaMが結合するためには、サイトIVに  $\text{Ca}^{2+}$  が結合し、さらにAla88-Ala128の領域が鶏由来の配列である必要があった。また活性化には骨格筋のものに対してはCドメインが、平滑筋のものに対してはNドメインが大きく関与していることが示された。以上の結果から、CaMは分子内の異なる領域を用いて、それぞれの酵素をすることが示され、CaMが多種多様な標的に対し、異なった認識機構を持っていることが示された。

第二部：CaMの中央リンカー部分は柔軟な構造であり、2つのドメインは  $\text{Ca}^{2+}$  を結合する上で独立して機能することが知られている。しかし、分子1mol当

たり3molしかCa<sup>2+</sup>を結合しない出芽酵母CaMは、協同的にすべてのCa<sup>2+</sup>を結合することから、ドメイン間相互作用の存在が示されている。その性質について調べるために、N末端及びC末端半分の断片を用いて、単独で存在する各々のドメインのCa<sup>2+</sup>結合特性を調べ、全長の配列を持つ分子と比較した。ドメインが独立して機能している一般のCaM分子全長のCa<sup>2+</sup>結合曲線は、それぞれのドメインだけを持った断片の結合曲線の和と、完全に一致する。出芽酵母CaM分子全長のCa<sup>2+</sup>結合曲線は、二つの断片の曲線の和と重ならず、各々のドメインが独立していないことが示された。また、出芽酵母CaMのサイトIV付近のアミノ酸配列は、一般のものとは特に異なっている。その領域の機能を検討するために、C末端17残基を欠損した変異体についてCa<sup>2+</sup>結合能を調べたところ、Ca<sup>2+</sup>に対する親和性はCaM分子よりも高いことが分かった。この17残基中にNドメインと相互作用する部位が含まれるため、すべての部位へのCa<sup>2+</sup>結合能が影響されたと考えられる。しかし、His107由来の<sup>1</sup>H-NMRシグナルについて、Ca<sup>2+</sup>濃度依存性を調べると、この変異体でも出芽酵母CaMと同様に二相性の変化を示した。Ca<sup>2+</sup>が1つしか結合しないCドメインに存在する残基由来のシグナルが、二相性の変化を示すのは、NドメインへCa<sup>2+</sup>が結合するとCドメインの構造が変化するためであると考えられ、C末端17残基以外にも両ドメインの相互作用に関係している領域があることが示唆された。

第三部：出芽酵母CaMのNまたはCドメインが他のドメインのCa<sup>2+</sup>結合に及ぼす影響を調べるために、一方のドメインにしかCa<sup>2+</sup>が結合しない変異体を作製し、Ca<sup>2+</sup>結合能を測定した。出芽酵母CaM分子全長と比較すると、N末端側半分の断片はCa<sup>2+</sup>に低い親和性を示したが、NドメインにしかCa<sup>2+</sup>が結合しない変異体は、同程度の親和性を示した。CドメインにしかCa<sup>2+</sup>が結合しない変異体は、出芽酵母CaMのCa<sup>2+</sup>結合曲線と、NドメインにしかCa<sup>2+</sup>が結合しない変異体の曲線との差よりも、Ca<sup>2+</sup>に低い親和性を示した。Ca<sup>2+</sup>非結合状態（アポ状態）で、これらの変異体は出芽酵母CaMと類似の構造をしていることを考慮すると、アポ状態でNドメインはCドメインから影響を受け、Ca<sup>2+</sup>の親和性が高い状態になっていると考えられる。まず、NドメインにCa<sup>2+</sup>が結合すると、Ca<sup>2+</sup>型のNドメインの影響を受けてCドメインは高親和性に変化し、最後のCa<sup>2+</sup>を結合することが示された。

次にC末端側から、1、2、3、6、9残基欠損している変異体を作製し、測定した。順に1、2、3残基と欠損させると、初めの2つのCa<sup>2+</sup>がより協同的に結合するようになり、さらに欠損させてもそれ以上変わらなかった。Ca<sup>2+</sup>はまずN末端に2つ結合することを考慮すると、アポ状態でC末端の3残基がNドメインのCa<sup>2+</sup>結合に影響を与えることが示された。また、C末端の2残基はCa<sup>2+</sup>結合状態においても、分子全体の構造形成に関与しており、その2残基の欠損により、出芽酵母由来のCaM依存性タンパク質リン酸化酵素を活性化する能力が低下した。標的酵素活性化因子として機能するためにも、C末端の2残基を含むドメイン間の相互作用が必要であることが分かった。

出芽酵母CaMを用いて、高等生物由来の標的酵素の活性化機構を調べることは非常に有効な方法である。さらに出芽酵母CaM自体の構造や性質の理解を深めれば、多くの情報が得られると考えられる。本研究により、出芽酵母CaMにCa<sup>2+</sup>が結合するとき、一般のCaMとは全く異なった構造変化を起こしていることが示された。生物進化の過程で、出芽酵母と他の生物が分化したときから今までに、多くのものはEFハンドの対を形成することで、また出芽酵母の場合は相互に影響しあったドメインを持つことで細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化に敏感に反応できる仕組みになったのではないかと考えられる。また分子1mol当たり、4molのCa<sup>2+</sup>を結合できるCaMを持つ生物種が非常に多いのに対し、3molしか結合できないCaMを持つ生物は非常に少ない。このことは、前者におけるCaMの柔軟な分子認識機構が生物の進化に深く結びついている可能性を示した。

# 学位論文審査の要旨

主査教授 矢澤道生  
副査教授 谷口和彌  
副査教授 田村守  
副査教授 引地邦男

## 学位論文題名

### 出芽酵母カルモジュリンの $\text{Ca}^{2+}$ 結合と 高次構造変化に関する研究

カルモジュリン (CaM) は、真核細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  受容タンパク質であり細胞外からの刺激に応じた細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇にともなって  $\text{Ca}^{2+}$  を結合して、様々な標的酵素を活性化する。細胞の刺激に対する応答はその結果として起きる現象である。CaMの標的酵素活性化の分子機構の概要は、CaMに  $\text{Ca}^{2+}$  が結合することで分子内の疎水性アミノ酸残基が分子表面に露出し、この疎水性領域が標的酵素分子を認識して結合し活性化につながるというものである。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のCaM (yCaM) は、高等生物CaMに比べアミノ酸配列の相同性は低く、分子内に4つあるEF-handとよばれる  $\text{Ca}^{2+}$  結合サイトのうち最もC末端のものは機能しない。このために高等生物由来の標的酵素を活性化する能力がきわめて低い。本研究では、yCaMの性質を詳細に調べることで標的酵素活性化の分子機構を解明することを目的的行われた。

本論文は、3部からなり、第1部では、CaMの酵素活性化の分子機構を明らかにする目的でyCaMと、ニワトリCaM (cCaM) のキメラタンパク質を7種類構築し、その性質を解析した結果について述べている。yCaMの機能ドメインをC末端から順にcCaMのものに交換し、それぞれについて種々の標的酵素活性化能を調べたところ、キメラタンパク質中のcCaMの機能ドメインが多いほど標的酵素活性化能が上昇すること、活性化に必要な機能ドメインは標的酵素ごとに異なることが明らかになった。また、標的酵素の認識に必要な領域と活性化に必要な領域が異なることも示され、CaMは異なる標的酵素に対して多様な認識機構をもち、酵素の活性化は2段階で生じることを明らかにした。

第2部では、yCaMのN末端、およびC末端側1/2に相当する分子を構築し、それぞれの機能を解析することでyCaM分子のNドメインとCドメインの間の相互作用（ドメイン間相互作用）について検討した結果が述べられている。  $\text{Ca}^{2+}$  結合およびNMRの測定結果からyCaMには、C末端17残基を介したもの、およびそれ以外の領域を介したもの計2種類のドメイン間相互作用が存在することを明らかにした。

第3部では、yCaMのドメイン間相互作用の機能的な意義を検討した結果が述べられている。EF-hand型  $\text{Ca}^{2+}$  結合ループの12番目に位置するGlu残基をGln残基に置換することで  $\text{Ca}^{2+}$  結合能を欠如させる手法を用い、yCaMのNドメインにのみ  $\text{Ca}^{2+}$  を結合できる変異タンパク質と、Cドメインにのみ  $\text{Ca}^{2+}$  を結合できる変異体を構築し、その機能をyCaMと比較した。その結果、yCaMの両ドメインは互いに相互作用しあって、それぞれの  $\text{Ca}^{2+}$  結合を

強め合っていることが明らかになった。また、C末端から順に1残基ずつ欠如させた変異タンパク質を構築し、C末端領域の機能を検討した。その結果、C末端3残基を介したドメイン間相互作用により、Nドメインの  $\text{Ca}^{2+}$  結合の協同性が強められることが明らかになった。同様に、C末端の2残基はyCaMの内在性標的酵素活性化構造の形成に必須であることを明らかにした。

以上の結果から、著者は、ドメイン間相互作用のない高等動物由来のCaMは、分子表面のアミノ酸残基をフルに活用して、30種類に及ぶ酵素を認識し活性化する多様性を備えているのに対して、yCaMは、 $\text{Ca}^{2+}$  を3モルしか結合できないけれども、複雑なドメイン間相互作用によって、数少ない内在性の標的酵素の活性化をなっているという見解を明らかにした。以上の結果は、タンパク質工学的手法と、タンパク質化学的手法を駆使して得られたものであり、著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。