

学 位 論 文 題 名

NMR Studies on the Structure-Function Relationship of Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Calmodulin

(NMR 法による出芽酵母カルモデュリンの構造と
機能の相関に関する研究)

学位論文内容の要旨

カルモデュリン(CaM)は、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴い、4 個の Ca^{2+} イオンを結合して活性化型構造へと変化し、非常に多くの標的酵素と相互作用することによりそれらの機能を調節する。CaM の立体構造は、最初に Ca^{2+} 結合状態の構造が X 線結晶構造解析によって解明され、EF-ハンドと呼ばれる Ca^{2+} 結合モチーフを 2 つ含む球状のドメイン構造を、N 末端部と C 末端部に持つ亜鈴型の構造であることが報告された。CaM は、脊椎動物、無脊椎動物、高等植物、菌類など多くの生物種から単離されており、アミノ酸配列の相同性は 90%以上と非常によく保存されている。しかし、出芽酵母から、これらとは約 60%の相同性しか持たない CaM が単離された。この出芽酵母 CaM(yCaM)は、CaM と似たような立体構造を形成していることが報告されてきたが、その機能面において、CaM とはまったく異なる特徴を示す。本研究は、yCaM の構造を NMR 法により解明し、その詳細を CaM と比較することにより、CaM を含む EF-ハンド Ca^{2+} 結合タンパク質の構造と機能の関係について新たな知見を得ることを目的に行った。その結果、N-ドメインの EF-ハンドに存在する、yCaM 独特のアミノ酸残基である His61 が Ca^{2+} 結合の高い協同性と親和性に関係があること、yCaM 特有のドメイン間相互作用は、C-ドメインの構造を大きく変化させ Ca^{2+} への親和性を増大させること、そして yCaM の柔軟性に欠ける標的酵素結合部位は、yCaM が認識できる標的酵素を制限していることが示唆された。

第一章

これまでに、報告されてきた、CaM と yCaM の構造と機能について簡潔にまとめた。

第二章

NMR 法を用いて、yCaM の N-ドメイン断片(77 アミノ酸残基)の構造を Ca^{2+} 結合状態と Ca^{2+} 非結合状態について解明した。 Ca^{2+} 非結合状態においては、二番目の Ca^{2+} 結合部位から β シート構造にかけて CaM とは大きく異なっていた。これは、CaM では Gly である 61 番目のアミノ酸残基が yCaM では His に置換されており、His の側鎖がループの内側に固定され、隣接する β シートが歪んでいるためと考えられる。 Ca^{2+} 結合状態では、この歪みを取り除かれ、CaM 同様、安定な β シート構造を形成している。二つの Ca^{2+} 結合ループを繋ぐ β シートが Ca^{2+} 結合に伴って安定化することは、N-ドメインの高い協同性の理由の一つとなり得る。また、 Ca^{2+} 結合状態において、標的酵素との相互作用に重要である疎水性面の構造に違いが見られた。CaM が多種多様の標的酵素を認識できるのは、この疎水性面に多く存在する Met によって実現される柔軟性のためであると考えられている。しかしながら、yCaM の疎水性面は、

Leu や Ile といった大きく柔軟性に欠ける疎水性アミノ酸残基で構成されている。このことは、 γ CaM が特定の酵素しか活性化できないことの主な理由となり得る。

第三章

^{13}C 及び ^{15}N 原子で二重標識した γ CaM (146 アミノ酸残基) に対して、複数の多次元異種核 NMR 実験を行い Ca^{2+} 非結合状態の全共鳴周波数の決定を行った。その結果、主鎖を構成する全 ^{13}C 及び ^{15}N 原子のうち 96% の共鳴周波数を決定することに成功した。

第四章

第三章で決定した共鳴周波数に基づき、 γ CaM の Ca^{2+} 非結合状態の全体構造を決定した。また、C-ドメインの Ca^{2+} 結合能を欠損させた変異体 E104Q に対して、 Ca^{2+} 滴定実験を行った。N-ドメインの構造は、第二章で決定したものと良く一致した。 γ CaM の C-ドメインは、 Ca^{2+} が一つしか結合できないが、CaM の C-ドメインと良く似た、ヘリックス-ループ-ヘリックス構造の対を形成していた。この N-ドメインと C-ドメインが非常に柔軟なリンカーで繋がれており、これまでに報告されてきたようなドメイン間相互作用は観測されなかった。一方で、E104Q の滴定実験から、N-ドメインへの Ca^{2+} 結合に伴い、C-ドメインは、 Ca^{2+} 非結合状態のまま N-ドメインへ結合し、構造を大きく変化させることが分かった。これまでの報告から、これによって、C-ドメインの Ca^{2+} への親和性は、10 倍近く増大していると考えられる。 γ CaM の C-ドメインは、 Ca^{2+} 結合能が 1 つ欠損しているために、CaM 同様に EF-ハンド間で協同的に Ca^{2+} を結合することはできない。そこで、かわりに N-ドメインとの協同性を持つことで、 Ca^{2+} への高い親和性を獲得しているといえる。

第五章

通常の EF-ハンドでは、ループの 6 番目のアミノ酸残基はほぼ例外なく Gly であり、 Ca^{2+} 結合状態のループ構造を安定に保つために理想的であると考えられている。N-ドメインの 2 番目の EF-ハンドにおいて、CaM ではやはり Gly61 であるが γ CaM では His61 である。それにもかかわらず、 γ CaM の N-ドメインは、 Ca^{2+} への親和性が CaM の N-ドメインよりもむしろ高い。そこで、Gly が His に変化したことによる不利を補う γ CaM 特有の機構があると予測した。His の pK_a 値を調べたところ、 Ca^{2+} 結合型と非結合型ともに通常よりも 1 ユニット以上高い値を示した。 Ca^{2+} 非結合型では、第二章と第四章の構造解析の結果から His61 の側鎖は、C-ヘリックスの C 末端部と静電相互作用を形成していることが分かった。第二章の Ca^{2+} 結合型の構造解析では、His61 に関する構造情報が十分に得られなかったが、構造上、C-ヘリックス上に存在する Asn49 と Asn53 の側鎖と相互作用し得る。これを確かめるために、Asn を Ala に置換した変異体を作成し、 pK_a 値の変化を調べた。その結果、どちらの Asn を Ala に置換しても pK_a 値の低下が見られたが、特に Asn53 を Ala に置換した変異体において顕著であった。これによって、 Ca^{2+} 結合状態では、His61 の側鎖は C-ヘリックス表面の極性基と相互作用していることが確認された。この相互作用により安定化された EF-ハンドの構造が、N-ドメインの Ca^{2+} への高い親和性の理由の一つと考えられる。

EF-ハンドにおける 6 番目の His の側鎖は、 Ca^{2+} 非結合状態では、EF-ハンドを構成する最初のヘリックスの C 末端部と相互作用しているが、 Ca^{2+} 結合状態では、大きく方向を変え、同ヘリックス表面の極性基と相互作用する。これによって安定化された EF-ハンド構造により、His でも高い Ca^{2+} への親和性を獲得できる。また、 Ca^{2+} 結合に伴う、この相互作用の切り替えは、第二章で述べた β シート構造の歪みの解消とも連動し得るので、高い協同性の理由となり得る。この機構は、CaM や他の EF-ハンド Ca^{2+} 結合タンパク質にも適応できるであろう。 γ CaM は、C-ドメインの高い Ca^{2+} への親和性を獲得するために N-ドメインとの協同性をもつが、その結果、 γ CaM は最終的に球状の構造を呈する。一方で、この球状の構造は、CaM と同様の標的酵素への結合様式にとっては、不利であると考えられる。しかしながら、

これらの詳細を明らかにするためには、 Ca^{2+} 結合状態の γ CaM の全体構造、及び、標的酵素との複合体の構造解析が必要であろう。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	中 田 允 夫
副 査	教 授	田 中 勲
副 査	教 授	矢 澤 道 生
副 査	助教授	出 村 誠

学 位 論 文 題 名

NMR Studies on the Structure-Function Relationship of Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Calmodulin

(NMR 法による出芽酵母カルモデュリンの構造と
機能の相関に関する研究)

カルモデュリン(CaM)は、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴い、4個の Ca^{2+} イオンを結合して活性化型構造へと変化し、多くの標的酵素と相互作用をしてそれらの機能を調節する。CaM は亜鈴型の構造をしていて、EF-ハンドと呼ばれる Ca^{2+} 結合モチーフを2つ含む球状のドメイン構造を、N末端部とC末端部に持っている。CaMのアミノ酸配列は、脊椎動物、無脊椎動物、高等植物、菌類などの多くの生物種で非常によく保存されていて、90%以上の相同性がある。しかし、出芽酵母から単離された CaM(yCaM)は、これらの CaM とは約 60%の相同性しか持たないが、似たような立体構造を形成し、その機能面では、CaM とは異なる特徴を示す。本研究では、yCaM の構造を NMR 法により解明し、CaM の構造と比較することにより、EF-ハンド Ca^{2+} 結合タンパク質の構造と機能の関係について新たな知見を得ることを目的とした。

NMR 法を用いて、yCaM の N-ドメイン断片(77 アミノ酸残基)の構造を Ca^{2+} 結合状態と Ca^{2+} 非結合状態について解明した。 Ca^{2+} 非結合状態においては、二番目の Ca^{2+} 結合部位から β シート構造にかけて CaM とは大きく異なっていた。これは、CaM では Gly である 61 番目のアミノ酸残基が yCaM では His に置換されており、His の側鎖がループの内側に固定され、隣接する β シートが歪んでいるためと考察した。 Ca^{2+} 結合状態では、この歪みを取り除かれ、CaM 同様、安定な β シート構造を形成する。二つの Ca^{2+} 結合ループを繋ぐ β シートが Ca^{2+} 結合に伴って安定化することは、N-ドメインの高い協同性の理由の一つと推察した。

^{13}C 及び ^{15}N 原子で二重標識した yCaM(146 アミノ酸残基)に対して、複数の多次元異種核 NMR 実験を行い Ca^{2+} 非結合状態において、主鎖を構成する全 ^{13}C 及び ^{15}N 原子のうち 96%の共鳴周波数を決定した。これに基づき、yCaM の Ca^{2+} 非結合状態の全体

構造を決定した。N・ドメインの構造は、先に決定した N・ドメイン断片の構造と良く一致した。yCaM の C・ドメインは、Ca²⁺が一つしか結合できないが、CaM の C・ドメインと良く似た、ヘリックス・ループ・ヘリックス構造の対を形成していた。この N・ドメインと C・ドメインが非常に柔軟なリンカーで繋がれており、その結果ドメイン間相互作用は観測されない事を明らかにした。一方、C・ドメインの Ca²⁺結合能を欠損させた変異体 E104Q に対して、Ca²⁺滴定実験を行なって、N・ドメインへの Ca²⁺結合に伴い、C・ドメインは、Ca²⁺非結合状態のまま N・ドメインへ結合し、構造を大きく変化させることを明らかにした。yCaM の C・ドメインは、Ca²⁺結合能が 1 つ欠損しているために、CaM 同様に EF・ハンド間で協同的に Ca²⁺を結合することはできない。その代わり、N・ドメインとの協同性を持つことで、Ca²⁺への高い親和性を獲得することを明らかにした。

通常の EF・ハンドでは、ループの 6 番目のアミノ酸残基はほぼ例外なく Gly であり、Ca²⁺結合状態のループ構造を安定に保つために極めて重要である。N・ドメインの 2 番目の EF・ハンドにおいて、CaM ではやはり Gly61 であるが yCaM では His61 である。それにもかかわらず、N・ドメインでの Ca²⁺への親和性は、yCaM の方が CaM よりもむしろ高い。そこで、Gly が His に変化したことによる不利を補うために、yCaM に特有な機構があると予測した。His の pK_a 値を調べたところ、Ca²⁺結合型と非結合型ともに通常よりも 1 ユニット以上高い値を示した。Ca²⁺非結合型の構造解析の結果は、His61 の側鎖が C・ヘリックスの C 末端部と静電相互作用を形成することを示していた。また、Ca²⁺結合型の構造解析の結果から、His61 は C・ヘリックス上に存在する Asn49 と Asn53 の側鎖と相互作用し得ることを構造上予想した。これを確かめるために、Asn を Ala に置換した変異体を作成し、pK_a 値の変化を調べた。その結果、pK_a 値の低下を測定して、Ca²⁺結合状態では、His61 の側鎖は C・ヘリックス表面の極性基と相互作用していることを示した。この相互作用により EF・ハンドの構造が安定化され、N・ドメインの Ca²⁺への高い親和性の理由を明らかにした。

本研究では、yCaM の N・ドメインの EF・ハンドに特有な His61 に起因する Ca²⁺結合の高い協同性と親和性、C・ドメインと N・ドメイン間の相互作用、その結果生じる C・ドメインの構造変化と Ca²⁺への親和性の増大を明らかにした。これらの結果は、yCaM 以外の EF・ハンド Ca²⁺結合タンパク質にも適応でき、タンパク質の構造と機能に関して新たな知見を提供している。よって審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。