

赤外分光法による固体基板上に固定化した Calmodulin の構造機能評価

(¹ 北大院理 ² 北大院先端生命)野口秀典 ¹・安達龍彦 ¹ 中富晶子 ²・矢澤道生 ²・魚崎浩平 ¹

【はじめに】 Calmodulin(CaM)は細胞内 Ca^{2+} 濃度変化のシグナルを伝達する Ca^{2+} 結合タンパク質である。このシグナル伝達系は筋収縮をはじめとする多くの生理現象に関わっており、CaM の酵素活性メカニズムの解明は非常に重要である。しかし、これまでの CaM の酵素活性に関する多くの研究は間接的手法によるもので、リアルタイムで直接観測した例は少ない。そこで本研究は CaM を固体基板上に固定化させ、 Ca^{2+} 濃度変化に応じた CaM の構造変化および CaM 結合ペプチドである Mastoparan(MP)との結合・解離のプロセスを実時間追跡することで、固体基板上での CaM の動的挙動を明らかにすることを目的とした。

【実験】 N 末端にオリゴヒスチジンタグを発現させた CaM を金基板上に修飾した nickel-chelating nitrilo-triacetic acid (Ni-NTA)と結合させることで基板に固定化した(図 1)。In situ 赤外吸収測定は半円筒 Si プリズム上に無電解メッキ法により作製した金薄膜表面で赤外光($1000 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$)を内部反射させ、金薄膜上の CaM、および MP の赤外吸収を測定した。全ての測定は溶液で行い、緩衝液には重水で作製した pH 7.4 の 10 mM リン酸緩衝液を用いた。

【結果と考察】 図 2 は金基板上に固定された CaM の各 Ca^{2+} 濃度のリン酸緩衝液中におけるアミド領域 ($1500 \sim 1750 \text{ cm}^{-1}$)の赤外吸収スペクトルである。リファレンスは Ca^{2+} を含まないリン酸緩衝液中で測定した結果を用いた。 Ca^{2+} 濃度が 10^{-7} M (図 2(a)) から 10^{-3} M (図 2(e))へ上昇するにつれて、 1550 cm^{-1} と 1634 cm^{-1} に上向きのピークが出現した。これらはそれぞれ CaM の EF ハンド内の酸性残基 (Asp、Gln) が Ca^{2+} と配位結合した際に出現するピークとセントラルヘリックスが伸びた構造をとる際に出現する

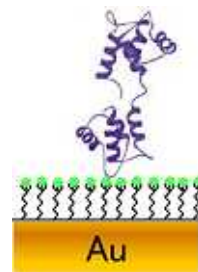


図 1 金基板上に Ni-NTA 分子を介して固定化した CaM。

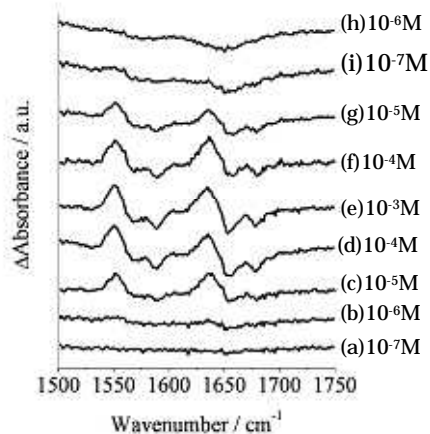


図 2 各 Ca^{2+} 濃度のリン酸緩衝液中における CaM の IR スペクトル。

ピークに帰属される。また再び Ca^{2+} 濃度が 10^{-3} M から 10^{-7} M (図 2(i)) へ減少するとこれらのピークは消失した。この結果は過去に報告されている均一系の結果と比べて同様なスペクトルの変化を示したことから固体基板上に固定化された CaM は均一系と同様に振舞っていることが分かった。このように作製した CaM 固定化基板を用いて、CaM の標的酵素のモデルペプチドとして用いられている MP との結合・解離過程を調べた。図 3 は、CaM 固定化基板および CaM なし基板にそれぞれ Ca^{2+} と MP を含むリン酸緩衝液中で測定した赤外吸収スペクトルである。リファレンスは MP を含まないリン酸緩衝液中で測定した結果を用いた。CaM あり基板では 1653 cm^{-1} に、また CaM なし基板では 1647 cm^{-1} にそれぞれ MP 由来のピークが観測された。両者のピーク波数の違いから、CaM 固定化基板では、MP は α -Helix 構造を保持した状態で CaM 内部に取り込まれており、一方 CaM を固定化していない基板では MP はランダムコイル状で固体基板上に吸着していることが示唆された。また、MP の濃度依存性の測定を行い、CaM と MP との解離定数を求めた。

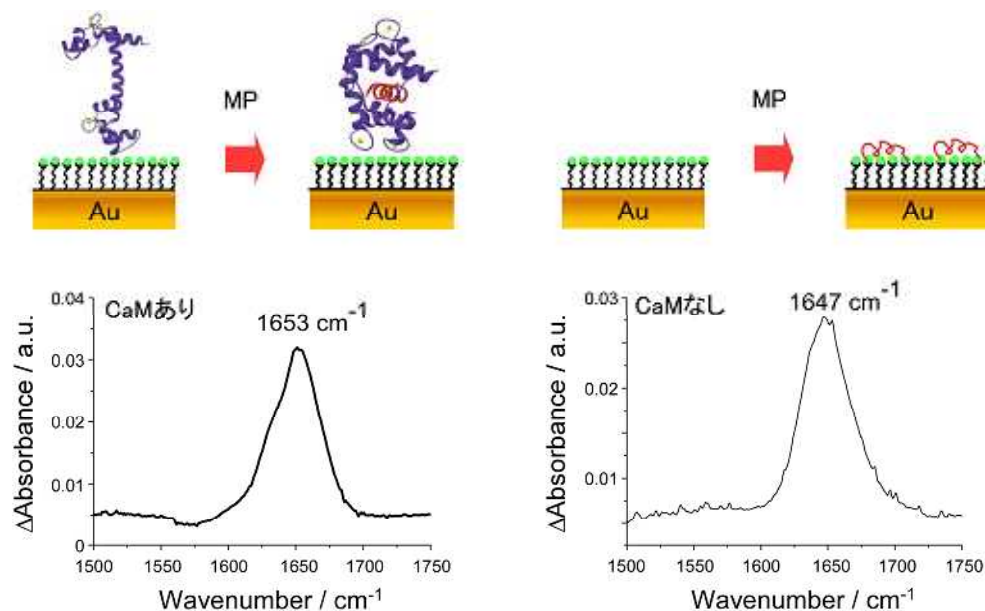


図 3 CaM 固定化および未固定化基板の Ca^{2+} 、MP を含むリン酸緩衝溶液中におけるアミド領域の IR スペクトル。