

2P023 タバコ由来カルモジュリン (NtCaM) の Ca^{2+} 結合による構造変化: 赤外, CD, 蛍光分光法による研究

(埼玉大理¹・東大院農²・東医歯大教養³・農業生物資源研⁴・東理大理工⁵・慈恵医大⁶)
○鈴木七緒^{1,2}・奈良雅之³・湯本史明^{2,6}・加藤有介²・永田宏次²・大橋祐子⁴・
朽津和幸⁵・坂本章¹・田之倉優²

【序論】

カルモジュリン (CaM) は真核生物の細胞質に存在する約 150 アミノ酸残基からなる Ca^{2+} 結合タンパク質で、 Ca^{2+} 依存性の情報伝達、相互作用制御などに重要な役割を果たしている。これまでに動物由来の CaM の構造と機能に関する研究は詳細に行われてきたが、植物由来の CaM に関する知見は十分に得られていない。本研究ではタバコ由来の 3 種類の CaM (NtCaM1/NtCaM3/NtCaM13) [1] について赤外, CD 並びに蛍光分光法を用いて Ca^{2+} 結合による構造変化を調べた。

【実験】

・ 目的タンパク質の培養・精製

NtCaM 遺伝子を pET-15b に挿入し、発現宿主として Rosetta (DE3) を用いた。集菌後、菌体破碎、熱処理 (90 °C, 5 分) し、Phenyl Sepharose カラムにより精製した。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により確認した目的タンパク質を含むフラクションを回収し 3 % TCA 処理および透析を行った後、ゲル濾過によって精製した。溶出フラクションを集め、超純水で透析した後、凍結乾燥を行い、各測定時にバッファーに溶解して利用した。

・ CD スペクトルと蛍光スペクトルの測定

タンパク質濃度は 10 μM とし、 Ca^{2+} -free 型と Ca^{2+} -bound 型、さらに pH と Ca^{2+} 濃度 (0–100 μM) の両方を変化させたサンプルで CD スペクトルと蛍光スペクトル (278 nm 励起) の測定を行った。

・ 赤外吸収スペクトルの測定と解析

重水素置換した凍結乾燥試料を用い、2 mM NtCaM, 0–20 mM Ca^{2+} (12 条件) のサンプルを調製した。測定条件は分解能 2 cm^{-1} , 200 回積算とした。得られたデータは Igor Pro 3.15 を用いて解析した。

【結果・考察】

・ CD スペクトル解析結果

Ca^{2+} -bound 型では 3 種の NtCaM 間で大きな違いは見られなかった。一方、 Ca^{2+} -free 型では NtCaM13 のスペクトルに大きな差が見られ、ヘリックス含量も大幅に減少していた。また Ca^{2+} -free 環境下において pH が下がるほど 222 nm の平均残基楕円率の大きさが顕著に大きく

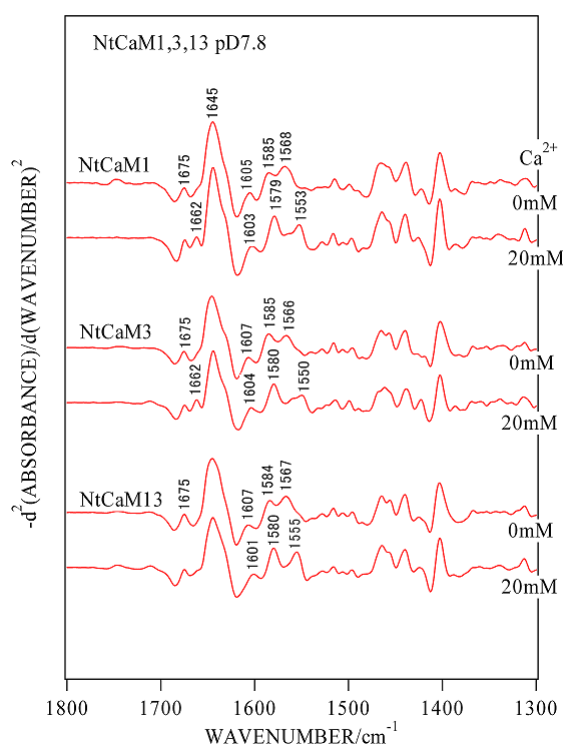


図1 NtCaM の二次微分赤外吸収スペクトル

なった。

・ 蛍光スペクトル解析結果

3種のNtCaMすべてでCa²⁺-bound型の蛍光強度はCa²⁺-free型よりも大きかった。3種類のNtCaMの中で比較するとNtCaM13がもっとも蛍光強度が大きかった。このことから、NtCaM13の三次構造が大きく変化していることが確認できた。

・ 赤外吸収スペクトル解析結果

二次微分スペクトル(図1)より、3種のNtCaM全てでCa²⁺結合に伴った1550 cm⁻¹付近のカルボキシル基(COO⁻)の逆対称伸縮振動バンドが観測された。このバンドは、COO⁻がCa²⁺に結合する際に二座配位型で結合することに由来しており、1-20 mMの濃度範囲でCa²⁺がNtCaMに十分に結合することが確認できた。また、NtCaM1, NtCaM3, NtCaM13の間でこのバンドの強度変化に差が見られ、Ca²⁺濃度1-8 mMの範囲内で強度の大きさを比較すると、NtCaM3 > NtCaM1 > NtCaM13であった。図2は二次微分スペクトルの差スペクトル((x mM Ca²⁺スペクトル) - (0 mM Ca²⁺スペクトル)。ただしx = 0.5-20 mM)をとった際に現れる1553-1551 cm⁻¹のピーク強度をプロットしたものである。この図から、特にNtCaM13では0-10 mMの間でNtCaM1とNtCaM3と比較してピーク強度の減少がみられるが、10 mM以上では他の2つと同じ程度の強度が観測された。このことから、10 mM以下ではNtCaM13は他の2つに比べてCa²⁺結合能が低いといえる。また、20 mM Ca²⁺濃度におけるCOO⁻逆対称伸縮振動のバンド強度が3つとも同程度であることから、4つの結合サイト全てにCa²⁺が結合していると考えられる。つまり、NtCaM13のCa²⁺結合の弱さは結合数ではなく、その感受性に由来するものである。また、上記のCDと蛍光スペクトルの結果も考慮すると、NtCaM13ではCa²⁺-free状態におけるコンフォメーションがNtCaM1やNtCaM3とは大きく異なっており、その影響で恒常的な環境下ではCa²⁺が結合しにくくなっているのではないかと考えられる。

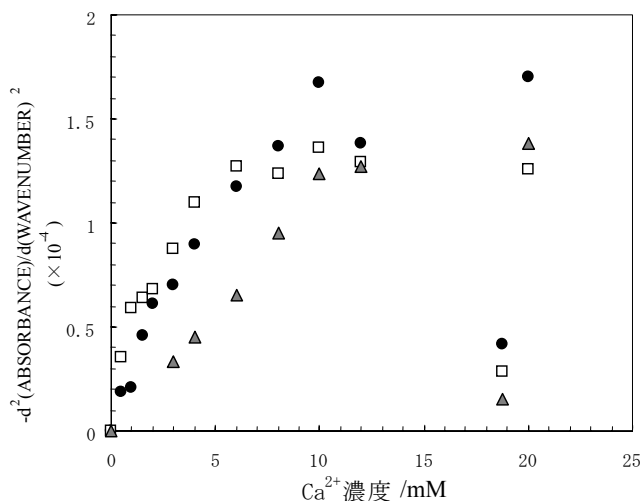


図2 NtCaMの1553-1551 cm⁻¹のバンド強度

Ca²⁺結合時に観測されるアミドIバンド領域(1700-1600 cm⁻¹)の1662 cm⁻¹バンドもマーカーバンドとして知られている[2]。このバンドは、タンパク質主鎖の二次構造と関係していると考えられており、本研究においてもNtCaM1とNtCaM3のスペクトルでCa²⁺の結合に伴いこのバンドが現れることが確認できた。しかし、NtCaM13では1662 cm⁻¹にピークとして観測されなかった。

以上のことから、Ca²⁺-free環境下におけるNtCaM13のCa²⁺結合サイト周辺の立体的な構造の違いによって、そのCa²⁺の結合性、さらにはその機能そのものにも大きな影響を与えていることが示唆される。

【参考文献】

[1] Yamakawa *et al.*, *Eur. J. Biochem*, **268**, 3916-3929 (2001).

[2] Nara *et al.*, *Biospectroscopy*, **1**, 47-54 (1995).