

【序】カルモジュリン(CaM)は多くの生物の体内に存在する代表的な Ca^{2+} 結合型蛋白質である。2つの球状ドメインが長い一本の α ヘリックスで結びついた構造をしており、各ドメインは2本の α ヘリックスとそれをつなぐループからなる構造(EF ハンド構造)2組から構成されている。ここが CaM の Ca^{2+} 結合領域であり、それぞれのループに Ca^{2+} が取り込まれることで、EF ハンドを構成するヘリックスの配向が変わり、そのために結合前に内側に潜んでいた疎水部分が外側に剥き出しになる。この構造変化を受けて、CaM は他のキナーゼやホスホジエステラーゼ等の蛋白質を活性化できるようになる。このように CaM は細胞内での Ca^{2+} 濃度変化を感知し、それを伝えるトランスデューサーとしての役割を果たしているため、生体内での役割の重要性や構造変化に興味を持たれ、発見以来様々な研究がなされてきた。拡散係数は蛋白質の形や大きさ、溶媒との相互作用に敏感であるため、このような大きな構造変化を検出するのに最適な物理量であると考えられる。これまで核磁気共鳴(NMR)測定により、遅い時間での構造変化については報告があるが、早い時間領域については報告が少ない。そこで、本研究では拡散係数を通して蛋白質全体の構造変化を高い時間分解能で検出可能な過渡回折格子(TG)法を用いて、ケージドカルシウムの光反応(図2)をトリガーに、CaM の Ca^{2+} 結合による構造変化ダイナミクスを調べた。TG 信号は光照射によって起こる化学反応や蛋白質構造変化による屈折率変化を時間分解で追跡したものである。測定の結果、CaM を加えるとケージドカルシウムのみを含む試料では見られなかった信号が遅い時間領域に観測された。



図1 CaM(Ca^{2+} 結合型)の構造(PDB:1CCL)

【実験】(i)過渡回折格子法(TG法)では、2本の pump パルス光をサンプル溶液に入れ、交差させることで干渉縞を作り出す。この光の干渉縞により化学反応を誘起すると、化学種の濃度が変調される。ここに cw の probe 光を入れると、この変調が回折格子のように振る舞い、Bragg 条件を満たす方向に第4の光、回折光が現れる。これが TG 信号で、この強度変化を光電子増倍管で検出した。本研究に関しては TG 信号への寄与は屈折率変化によるものだけであり、信号の時間発展は指数関数の和、 $I_{\text{TG}} = \{\sum_i \delta n_i \times \exp(-kit)\}^2$ で表される。j 番目の信号が拡散に対応する時は格子波数 q と拡散係数 D を用いて、 $k_j = D_j q^2$ と表される。

(ii)サンプルは4種類用意した。何もケージしていないケージド化合物(Cg)、 Ca^{2+} をケージしたケージド化合物(Cg- Ca^{2+})、そしてこれらにカルモジュリンを加えたものである。溶媒にはミリ Q 水を用い、濃度はケージド化合物、カルモジュリンそれぞれ 2mM、100 μM に調節した。カルモジュリンにはウシのものを用い、ケージド化合物には DM-ニトロフェンを用いた。これは、図2に示すように光照射によって共有結合が切断され、配位した金属イオンを放出する。Cg- Ca^{2+} については過剰の CaCl_2 を加え、透析によって、遊離の Ca^{2+} を除いた。ケージド化合物の光反応を開始させる励起光源には YAG レーザー(355nm)を用い、屈折率変化をモニターする probe 光にはサンプルに吸収のない He-Ne レーザー(633nm)を用いた。

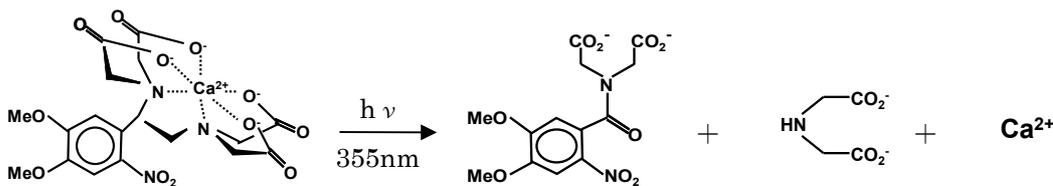


図2 DM-ニトロフェン(ケージドカルシウム)の構造とその光解離反応

【結果と考察】①ケージド化合物(Cg)の光反応

Ca^{2+} が結合した時の CaM 構造変化を調べる前に、 Ca^{2+} を含まない Cg の光反応を調べた。Cg のみの TG 信号を図 3(a)に示す。約 $10\ \mu\text{s}$ の時間スケールに見られる信号は熱拡散によるグレーティング信号の減衰である。この後の信号の時間変化は3成分の指数関数で再現できた。格子波数(q 値)を変えての実験により、この3成分のうち一つが q 依存しないことが分かった。この q に依存しない成分が、Cg の解離に対応し、そして残りの q 依存する成分は拡散に対応した信号である。この結果、ケージド化合物は光励起後 $10\sim 20\ \mu\text{s}$ で解離した後、解離物と親分子は拡散係数 $1.1\times 10^{-9}\text{m}^2/\text{s}$ 、 $4.5\times 10^{-10}\ \text{m}^2/\text{s}$ で拡散するということが分かった。これに CaM を加えると、遅い時間領域に新しく立ち上がり減衰からなる信号が現れた(図 3(b))。立ち上がりは Cg のみのときのものと同じであり、拡散係数にして $1\times 10^{-10}\ \text{m}^2/\text{s}$ 程度の成分が増えたとして信号は解釈できた。この小さい拡散係数をもつ成分は明らかに CaM(17kDa)のものと考えられる。 Ca^{2+} がない場合においても拡散が見えていることは、CaM に光反応がないことを考えると奇妙であり、予想外であった。しかしこの事実は解離したケージド化合物がカルモジュリンと相互作用していることを示している。

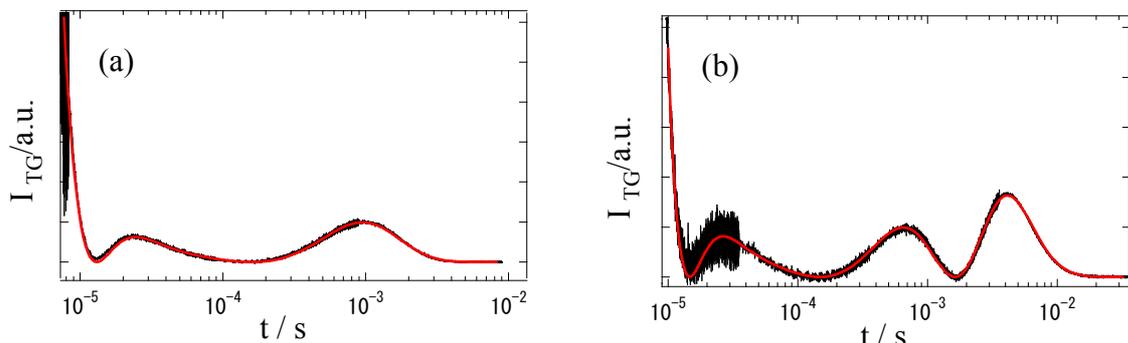


図 3 (a)ケージド化合物のみの TG 信号 (b)カルモジュリンを加えた場合の TG 信号

②カルシウムの放出過程とそれに伴うカルモジュリンの構造変化

Cg に Ca^{2+} を加えてケージドカルシウムにした場合の光励起後観測される TG 信号を図 4(a)に示す。CaM を加えた際の信号解析の結果と合わせると、 $10\ \mu\text{s}$ オーダーでの立ち上がりは解離ならびに Ca^{2+} 放出の信号であると思われる。最後の減衰はイオン種の拡散と考えている。CaM を加えると、立ち上がり減衰からなる信号が遅い時間領域に新しく現れた(図 4(b))。この新しい成分は2つの指数関数で再現され、その q 依存性よりそれぞれ拡散係数 $1\times 10^{-10}\ \text{m}^2/\text{s}$ 及び $2\times 10^{-10}\ \text{m}^2/\text{s}$ の拡散に由来する信号であることが分かった。前者は図 3(b)で見られた Ca^{2+} の結合していない apo 型 CaM の拡散係数に近いのでこれを親分子、後者を放出された Ca^{2+} が結合した Ca^{2+} 結合型 CaM の信号であると考えた。2倍と大きい拡散係数の変化は Ca^{2+} との結合によって、CaM の疎水部分が剥き出しになるために水との相互作用が小さくなるからと解釈できる。また、CaM を加えた場合は信号の形状が q 値によって劇的に変化した。現在この信号を CaM が Ca^{2+} を取り込み、その後構造変化が起こるというモデルで解析する試みを行っている。

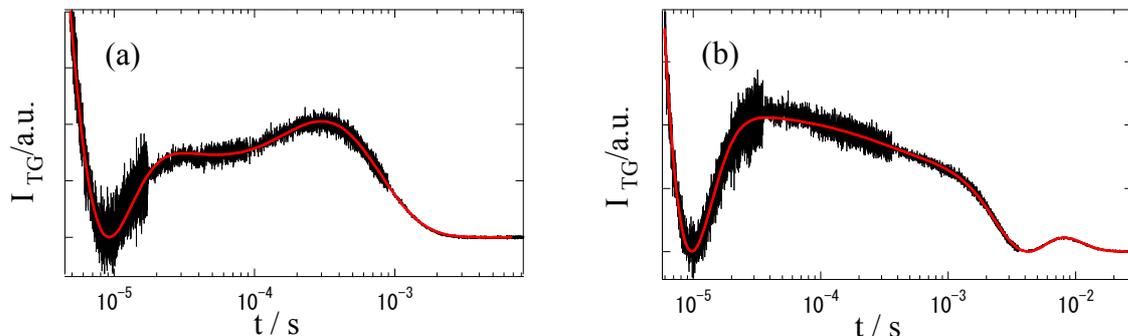


図 4 (a)ケージドカルシウムのみの TG 信号 (b)カルモジュリンを加えた場合の TG 信号