

3A16

カルモジュリンの Ca^{2+} 結合における構造変化ダイナミクス検出の試み

(京大院理) 近藤正人・馬殿直樹・寺嶋正秀

【序】代表的な Ca^{2+} 結合蛋白質であるカルモジュリン(CaM)は、多くの生物の体内に存在し、 Ca^{2+} によるシグナル伝達の仲介を担っている。2つの球状ドメインが長い一本の α ヘリックスでつながれたダンベル型の構造をもち(図1)、それぞれのドメインは2つの α ヘリックスとそれらをつなぐループからなる構造(EFハンド構造)2組から構成される。ここが Ca^{2+} の結合領域であり、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大きく変わり、内に潜んでいた疎水部分が外側に露出する。この構造変化をうけて、CaMは活性化され、次なるターゲット蛋白質を活性化し、シグナルを伝えていく。伝達の鍵となるのは、 Ca^{2+} 結合による CaM の構造変化である。本研究では過渡回折格子(TG)法を応用し、この構造変化ダイナミクスを検出することを試みた。TG法では、分子体積や拡散係数の変化という観点から、溶液中での蛋白質全体の構造変化を時間分解でとらえることができ、蛋白質の構造変化をとらえるのに非常に適した方法であるが、今回のように光吸収をもたない蛋白質に適用するためには工夫が必要となる。本研究ではケージドカルシウムの Ca^{2+} 放出を光反応の開始に用いた。ケージドカルシウムは光照射によって Ca^{2+} を放出する(図2)。ここに CaM を加えることで、この放出された Ca^{2+} を CaM が取り込む過程を観測するわけである。

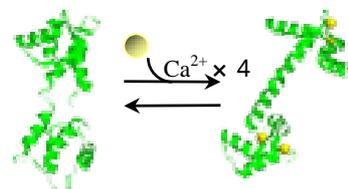


図1 カルモジュリンの構造 apo型(右)と Ca^{2+} 結合型(左)

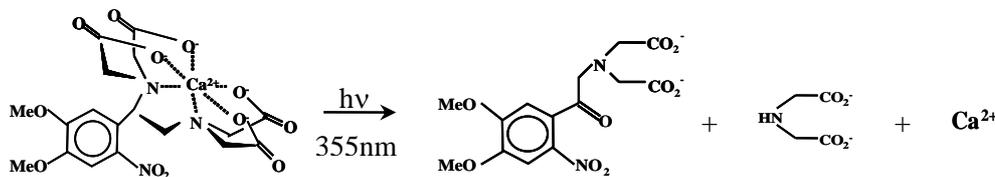


図2 DM-ニトロフェン(ケージドカルシウム)の構造とその解離反応

【実験】(i)過渡回折格子法(TG法)では、2本の pump パルス光で励起し、cw の probe 光を用いて濃度の空間変調を検出した。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、 $I_{\text{TG}} = \{ \sum_i \delta n_i \times \exp(-k_i t) \}^2$ で表される。j 番目の信号が拡散に対応するときは格子波数 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、 Ca^{2+} をケージしたケージド化合物、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 1 mM、50 μM に調節した。ケージド化合物には DM-ニトロフェンを用いた。これは光解離することによって配位した金属イオンを放出するケージド化合物である。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 He-Ne レーザー(633nm)を用いた。

【結果と考察】 ケージド化合物の光反応

図3(a)に Ca^{2+} を含まないケージド化合物の TG 信号を示す。光励起後、数 μs での信号減衰は熱拡散によるものである。その後の信号は、4成分の指数関数で再現された。格子波数 q を変えた測定により、光励起後 50 μs 、700 μs に見られる信号は q に依存せず現れており、これらはケージド化合物の解離反応に対応したものであることが分かった。残りの成分は q 依存性が見られ、親分子、生成分子の拡散を反映した信号となっている。これらの結果から、ケージド化合物は光励起後 50 μs 後、700 μs 後に解離し、その後、生成物と親分子はそれぞれ、

拡散係数 $D = 1.1 \times 10^{-9} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ 、 $4.9 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ 拡散していることが分かった。ここに CaM を加えると新たに立ち上がりと減衰からなる信号が現れた(図 3 (b))。この新しい成分は $D = 1.0 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ で表される拡散信号であった。この遅い拡散成分は明らかに CaM のものである(分子量 16.7kD)。 Ca^{2+} のない条件で信号が現れるのは奇妙であり、予想外であった。しかしこのことはケージド化合物の反応生成物が CaM と相互作用していることを示している。

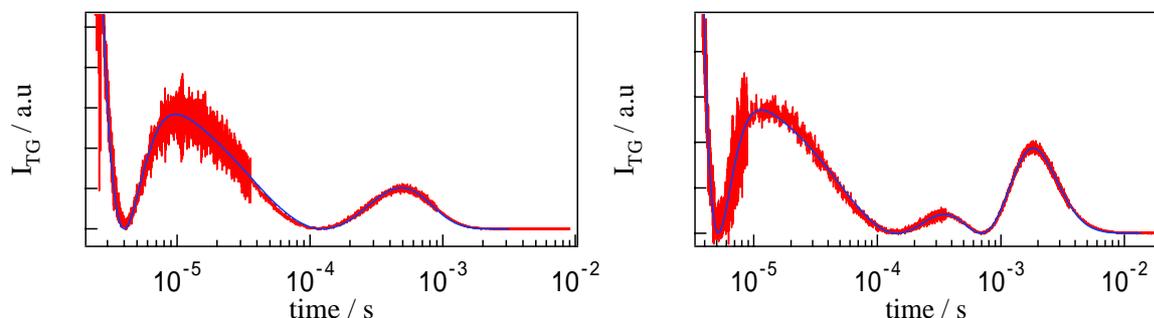


図 3 (a) ケージド化合物の TG 信号と (b) これに CaM を加えたときの信号の変化 ($q^2 = 4.7 \times 10^{12} \text{m}^{-2}$)

ケージドカルシウムの光反応とカルモジュリンの信号

DM-ニトロフェンに等量の CaCl_2 を加え、ケージドカルシウムを精製した。その TG 信号を図 4 (a) に示す。熱拡散による信号の減衰の後の挙動は Ca^{2+} を含まない場合(図 3 (a))とは大きく異なっている。この信号の変化こそが Ca^{2+} が新たな生成物として放出されたという事実を示している。また光励起後、200 μs 、500 μs に q 非依存の信号の存在が確認され、これが Ca^{2+} 放出過程を示しているものと考えられる。ここに CaM を加えると信号は大きな変化を見せた(図 4 (b))。際立った変化は遅い時間領域に現れる立ち上がりと減衰からなる信号である。これは分子拡散を反映した信号であり、 $D = 1.1 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ と決められた。と同様の議論により、CaM のものと同定した。

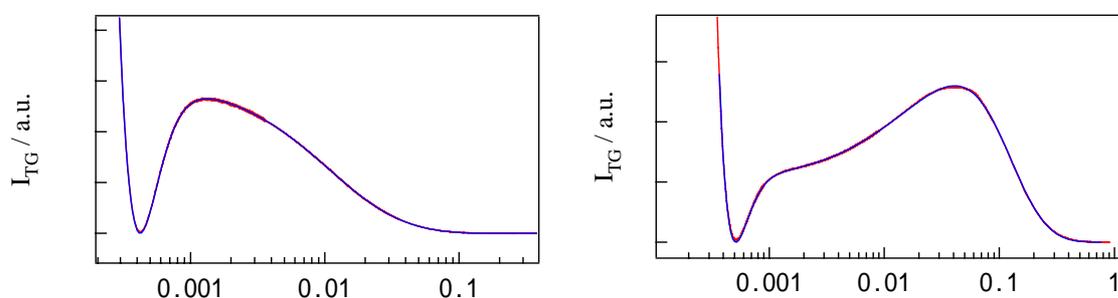


図 4 (a) ケージドカルシウムの TG 信号 (b) これに CaM を加えたときの信号 ($q^2 = 5.0 \times 10^{10} \text{m}^{-2}$)

構造変化ダイナミクスへのアプローチ

こうして観測された早い時間領域での TG 信号の挙動は Ca^{2+} を含む場合と含まない場合において、大きく異なっている。そのためここには Ca^{2+} 結合過程や構造変化の速度といった情報が含まれていることが期待される。そこで、 Ca^{2+} の拡散時間に注目して解析を行った。 Ca^{2+} の格子が拡散によって消失し、 Ca^{2+} が均一に溶液に広がった後では、CaM は Ca^{2+} と結合反応を起こしても格子を形成することはできず、CaM の TG 信号は観測されない。この観点から、格子波数を変えることで Ca^{2+} の拡散時間を変え、信号の形や強度の変化を観測した。得られた信号における q 非依存の成分の存在、CaM の拡散成分の信号強度に注目して、解析を進めている。 Ca^{2+} 結合過程や構造変化の速度といった情報を取り出すための様々な「試み」とともに、得られた信号の系統的な説明をするための、詳細な測定結果もふまえて講演で議論する。