

多機能蛋白質：カルモデュリンの 酵素活性化の作用発現機構 — X線溶液散乱からのアプローチ —

和泉義信、松嶋範男*、能野秀典**

北海道大学理学部

* 札幌医科大学衛生短期大学部

**札幌医科大学化学教室

Expression of Calmodulin Function Revealed from X-ray Solution Scattering
: A Model of the Calmodulin-Mastoparan Complex

Yoshinobu Izumi, Norio Matsushima*, and Hidenori Yoshino**

Department of Polymer Science, Hokkaido University, Sapporo 060

* School of Allied Health Professions, Sapporo Medical College, Sapporo 060

**Department of Chemistry, Sapporo Medical College, Sapporo 060

X-ray solution scattering data from calmodulin have been measured.

We propose a model for the interaction of calmodulin and mastoparan based on the scattering data.

Proposed model is characterized by a large bend in the central helix of calmodulin which means the large conformational changes induced by the relative approach of the two domains of calmodulin.

It is suggested that this general type of model may help explain calmodulin's ability to regulate the activities of its many different targets.

1. はじめに

カルモデュリンは、真核細胞にひろく分布し、分子量16,700の比較的小さな酸性蛋白質で4箇所のCa²⁺結合部位を持っている。これまで、Ca²⁺結合によるカルモデュリンの構造変化や標的酵素の

結合様式に関して、多くの研究が溶液状態でなされてきた。なかでも紫外線吸収・蛍光スペクトル、特定のアミノ酸残基の化学修飾、円偏光二色性(CD)、核磁気共鳴(NMR)などにより、多くの知見が得られてきた^{1~4)}。その結果、これらの

部位に全て Ca^{2+} を結合したカルモデュリン分子が、いろいろな酵素の活性化因子となり、 Ca^{2+} の情報伝達、運動、エネルギー代謝、細胞機能の調節など様々な機能を担うことが示されてきた⁵⁾。カルモデュリンは、これら多機能性を示すにもかかわらず、比較的単純な4つの繰り返し単位からなる一次構造を持っている。したがって、その原因は、結晶解析で明らかにされた亜鈴型の立体構造に帰されねばならない。それでは、結晶で亜鈴型のカルモデュリン分子が、溶液状態でどのような分子レベルの構造変化をし、酵素を活性化するのであろうか、その分子的機構はまだ明らかにされていない。X線溶液散乱による研究がこの点を明らかにするものと思われたが、これまでほとんどなされてこなかった。それは、カルモデュリンのように比較的低分子量の生体分子からの弱い散乱を、短時間で精度よく実験室で測定することが、これまで困難であったことに因る。最近、超強力X線源としての放射光の出現とこれに適合した溶液散乱装置の開発がこの間の事情を一変した^{6~8)}。

本稿では、この問題に対して、放射光を利用した溶液散乱測定から得られるカルモデュリンの構造的知見および熱力学パラメーター（第2ビリアル係数）について記述する。

2. 結晶構造

カルモデュリンの結晶構造は、Babuら⁹⁾ (1985年)、ついで Kretsinger ら¹⁰⁾ (1986年) により、それぞれ 3.0\AA と 3.6\AA の分解能で決定された。これらの分解能では各アミノ酸残基の識別は困難であるが、ペプチド鎖をトレースできる。

Babuらによると、カルモデュリンは、露出した一本の長い α ヘリックスで繋がれた二個の球状のドメインからなる構造、すなわち亜鈴型をしている。分子の長さは約 65\AA で、ヘリックス含量は63%であった。N末端とC末端のドメインをそれぞれNドメイン、Cドメインと名付けると、各ドメインは Ca^{2+} をそれぞれ結合した二個のEFハンド

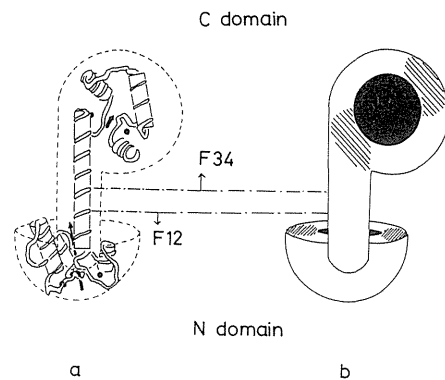


Fig. 1. Crystal Structure of calmodulin (3.6\AA resolution)¹⁰⁾

(a) a trace of the main chain: each α -helix is represented by a cylinder, the four calcium ions by black circles. The lower arrow represents the approximate two fold axis relating two EF hands in the N domain; the upper arrow relates those in the C domain.

(b) partial space filling:

the crystal structure is symbolized as "a ladle".

The two homologous hydrophobic regions are black and four clusters of aspartate and glutamate residues are indicated by cross hatching.

F12 and F34 represent proteolytic fragments.

構造からなっている。両ドメインの主鎖のコンホメーションは、 1\AA 以内でぴたりと重なった。また各ドメイン内の二個の Ca^{2+} イオン間の距離は等しく、 11.3\AA であった。中央ヘリックスの長さは約 40\AA で、これは、両ドメイン間の距離に対応している。各ドメイン内のEFハンドを構成するヘリックス間の角度は、 92 度から 107 度の範囲にあった。

Kretsingerらの提出した立体構造(図1)も分子の形と大きさに関し、Babuらのものと一致した。Kretsingerらは、さらに、Nドメイン内の二個のEFハンドを形成するヘリックスは、近似的に二回軸の方向を、これに対しCドメイン内のそれらは、二回軸に垂直な方向を向いており、カルモデ

Table 1. Radii of gyration of F12 and F34 fragments under different conditions

condition	Rg (Å)		
	F 12	F 34	Calculated values
EDTA	12.9±0.2	13.0±0.2	12.3 (0%), 13.2 (2.5%)
2Ca ²⁺	14.7±0.3	13.4±0.2	14.0 (5%)
2Ca ²⁺ + mastoparan	14.4±0.3	14.2±0.3	14.3 (0%)

ユリン分子の形は「亜鈴」型と言うよりは、むしろ「杓子」型(図1b)であるとした。図1bは、図1aの部分的な空間充填図形に相当する。NドメインとCドメインそれぞれがカップに、中央のヘリックス部が「杓子」の柄にあたる。Nドメインのカップの表面は柄と垂直に、Cドメインのカップの表面は柄と平行に付いている。二つのカップの中央には、疎水性のポケットがあり、これらの各ポケットを挟むように酸性アミノ酸のクラスターが配置している。カップの外径は約30Å、深さは約20Å、柄の長さは約15Åであった。

結晶化はいずれも酸性側のpH(5.6)で行なわれたものである。それ故、図1の結晶の分子構造が、生理的条件下にある溶液状態のカルモデュリンの構造をどの程度反映しているか、次節以降で調べてみよう。

3. フラグメントの溶液構造¹¹⁾

4個のCa²⁺を結合したカルモデュリンをトリプシンで加水分解すると、残基番号1~75までと、78~148までの二つのフラグメントに切断される。最初のフラグメントは、Nドメインを全て含む(F12と呼ぶ)。これに対し、二番目のフラグメントは、中央ヘリックスのリンカー部とCドメインとを含んでいる(F34と呼ぶ)。F12とF34の形態に関する知見を得るために、Ca²⁺を結合していない状態(EDTA中)、2個のCa²⁺を結合した状態、2個のCa²⁺とマストパランを結合した状態の三つの条件下で散乱プロファイル調べた。標

的ペプチドとして、マストパランが選ばれた理由は、カルモデュリンと一対一の複合体を形成し、その結合がきわめて強い(解離定数0.3nM)両親媒性のペプチドで、近年、酵素のモデル物質として注目され、CDやNMRなどによる研究成果^{2, 3)}が本実験の結果の解釈において有用であることに困る。

これらの各条件におけるF12とF34の回転半径は次のGuinierの式¹²⁾：

$$I(s) = I(0) \exp(-4\pi^2 R_g^2 s^2 / 3) \quad (1)$$

を用いて求めた。ここで、sは(2sinθ)/λである。回転半径の実験値と計算値とを表1にまとめて示した。計算には、結晶構造から決定された分子の外部表面に一番よく合うようにHeidornとTrehwellaとが評価したドメインのサイズ(回転円体の各半軸の積=20.5x13x13Å³)¹³⁾を使用した。

実験値は、EDTA中と2個のCa²⁺を結合した状態のいずれの場合も、計算値より大きな値を示した。特に、2個のCa²⁺を結合した状態でF12とF34の回転半径の値の間の違いは著しい。これらの不一致の原因は、ギニエ・プロットの小角領域の散乱挙動を詳細に調べることにより理解された。すなわち、測定した最小角度領域における散乱強度は直線から上側に逸脱する傾向を示し、これは、各フラグメント間に会合が生じていることを示唆している。この時、実験から得られる回転

半径と散乱関数はともに次の z 平均の式:

$$R_z^2 = \frac{\sum R_i^2 M_i^2 f_i}{\sum M_i^2 f_i}, \quad (2)$$

$$P_z(s) = \frac{\sum P_i(s) M_i^2 f_i}{\sum M_i^2 f_i} \quad (3)$$

で記述される¹²⁾。ここで、 R_i 、 f_i 、 M_i 、 $P_i(s) = I_i(s)/I_i(0)$ はそれぞれ i 量体の回転半径、モル分率、分子量、散乱関数((1)式を仮定した)である。(3)式の散乱挙動を再現するように会合の効果(f_i)を考慮して計算した回転半径の値を表1に併せて示した。この結果、EDTA中では、F12、F34両フラグメント共に約2%の二量体を、 2Ca^{2+} 結合下では、F12、F34とがそれより多くの%の二量体をそれぞれ含んでいることが示唆される。これら二量体は、トリプシンの加水分解によって得られる各フラグメントの疎水領域が互いに相互作用しやすくなるために形成されたと考えられる。さらに、EDTA中では、単量体として存在するフラグメントの疎水領域が中に埋もれてしまうので、二量体の量は少ないが、 2Ca^{2+} 結合下では、この疎水領域が露出してくるため、異なる単量体フラグメント間の疎水領域が相互作用しやすくなり、二量体の量が増加すると解釈される。2個の Ca^{2+} とマストパランを結合した状態では、前二者に較べて二量体の影響がより小さく現れる。これは、マストパランがフラグメントの疎水領域と相互作用するために、二量体の形成が困難になったためと思われる。

表1から、二量体の影響がなければ、EDTA中と 2Ca^{2+} 結合下のフラグメントの回転半径の値は、結晶構造のドメインのそれとほぼ等しく、 Ca^{2+} 結合によりほとんど変化しない。マストパラン結合時の回転半径の大きな値は、マストパランがF12とF34フラグメントそれぞれと結合している直接的な証拠である。マストパランのサイズは、マストパランが各フラグメントと結合したとき、ヘリックスを形成する(円筒形:半径7Å、高さ20Å)と仮定して評価した。マストパランと各フ

ラグメントの複合体の回転半径は、平行軸のまわりの慣性モーメントの間の関係式¹⁴⁾から導出した次式:

$$R_{GC}^2 = (R_{GF}^2 + R_{GM}^2)/2 + L_{FM}^2/4 \quad (4)$$

より評価した。ここで、 L_{FM} はフラグメント-マストパラン間の距離である。 L_{FM} の値は約20Åと見積もられた。この値からマストパランの各フラグメントに対する結合様式を推定することができる。

次に、中角散乱領域の散乱のプロファイルの解析から、上記の三条件下での各フラグメントの内部構造について調べてみよう。これらの散乱プロファイルに共通する特徴は、比較的低角度領域における、フラグメント全体の構造に由来するブロードな単一のピークと、 $s = 0.045 \text{Å}^{-1}$ 近傍における谷とそれに続く山の存在である。この中間の s 領域における谷と山の存在は、2個の Ca^{2+} とマストパランの存在下でも失われなければならず、ますます顕著になる。このことは、2個の Ca^{2+} とマストパランの存在下でもフラグメントの構造が破壊されなければならず、マストパランの形についての上記の仮定(ヘリックス)の正しさを裏付けていると考えられる。谷の位置からフラグメントの回転半径を評価すると、約12Åの値が得られる。この値は表1のドメインの回転半径の結果とほぼ一致している。

EDTA中でのF12とF34の散乱プロファイルは、 s が 0.03Å^{-1} 以上では異なる。このことは内部構造が異なることを意味している。これに対し、2個の Ca^{2+} 結合時のこれらの散乱プロファイルは、 0.04Å^{-1} より大きな s でほぼ重なる。このことは両フラグメントの内部構造がほぼ等しいことを意味している。また、これらの s 範囲における異なる二つの状態のプロファイルの違いは、 Ca^{2+} 結合に伴うドメイン内の構造変化に対応していると考えられる。マストパラン結合時の両フラグメントの散乱プロファイルは、実験した全 s の範囲内で一

致する。このことは両フラグメントに対するマストパランの結合様式がこのsの範囲ではほぼ等しいことを示唆している。

以上のことから、溶液状態のフラグメントの立体構造は、Ca²⁺結合により疎水領域を露出するような内部構造の変化を伴い、これに対し、マストパランは結合時においてヘリックス構造をとると考えられる。フラグメントとマストパランの複合体は、それらの疎水領域を介して形成されると考えられる。この立場は、Kresingerらの提唱した「杓子」型カルモデュリン分子のカップの立体構造が、少なくとも4Ca²⁺結合時と4Ca²⁺とマストパラン結合時の溶液状態でも保持され、疎水領域を結合部位とする立場である。

4. カルモデュリンの溶液構造^{15), 16)}

溶液中でのカルモデュリンの熱力学的パラメータおよび構造的知見を得るために、Ca²⁺を結合していない状態、4個のCa²⁺を結合した状態、4個のCa²⁺と1個のマストパランを結合した状態の、三つの状態でカルモデュリンの濃度を変えて、散乱プロファイル調べた。

熱力学的パラメータとして第2ビリアル係数、構造的知見として回転半径の二つの量を同時に評価するために、散乱データを、次の修正したZimmの式¹⁷⁾ :

$$Kc/I(s) = (1/M) \exp(4\pi^2 Rg^2 s^2/3) + 2A_2c + \dots, \quad (5)$$

に従って整理した。ここで、Kは定数、cはg/cm³単位で表わした濃度である。図2は、これら三つの状態でのZimmプロットを示したものである。絶対強度測定を行っていないで、s、cともにゼロ外挿したときの縦軸切片の値は、三つの状態での分子量を値を考慮して換算された。Kc/I(s)の角度依存性は、ギニエの式で近似できた。前節のフラグメントの場合と異なり、カルモデュリンの各状態

のギニエ・プロットには、会合が生じているような兆候はみられなかった。Kc/I(0)の濃度依存性は、データ点のバラツキを考慮して直線で近似した。このようにして得られたRgとA₂の値を表2にまとめて示した。カルモデュリン溶液の第2ビリアル係数は次の二つの項：

$$A_2 = A_{20} + A_{2e} \quad (6)$$

からなっていると仮定しよう。ここで、A₂₀は非静電的寄与を、A_{2e}は静電的寄与を表わしている。A₂₀は、幾何学的因子を除いて一般に分子の排除体積に比例する。Ca²⁺を結合していないときの排除体積を基準にして、他の二つの条件下でのこの項の寄与を評価した。その値も併せて表2に示した。表2から、4個のCa²⁺を結合することにより、A₂は約30%減少する。この時A₂₀は逆に増加する。このことは、A_{2e}の大きな減少を意味しており、Ca²⁺結合に伴って疎水領域が露出することに対応している。これに対し、マストパランが結合すると、A₂はさらに約50%減少する。この時A₂₀も大きく減少する。それ故、この時のA₂の変化はマストパランが結合することに伴う、カルモデュリン分子の全体的な立体構造の変化に対応していると考えられる。

図3は、ギニエの式を用いて得られた回転半径の二乗と濃度との関係をプロットしたものである。このプロットの縦軸切片から得られた回転半径は、実験誤差の範囲で、表2の回転半径の値と一致した。次に、この傾きから得られる知見と第2ビリアル係数との関連について記述しよう。Ca²⁺を結合していない状態の傾きの値を基準として、4個のCa²⁺を結合した状態と4個のCa²⁺と1個のマストパランを結合した状態との傾きのそれぞれの比の値を評価してみた。この比の値は、表2の、Zimmプロットから評価したA₂の値から得られる比の値と符号を除いてほぼ一致した。このことは、図3の直線の傾きがその符号を除いて、第2ビリ

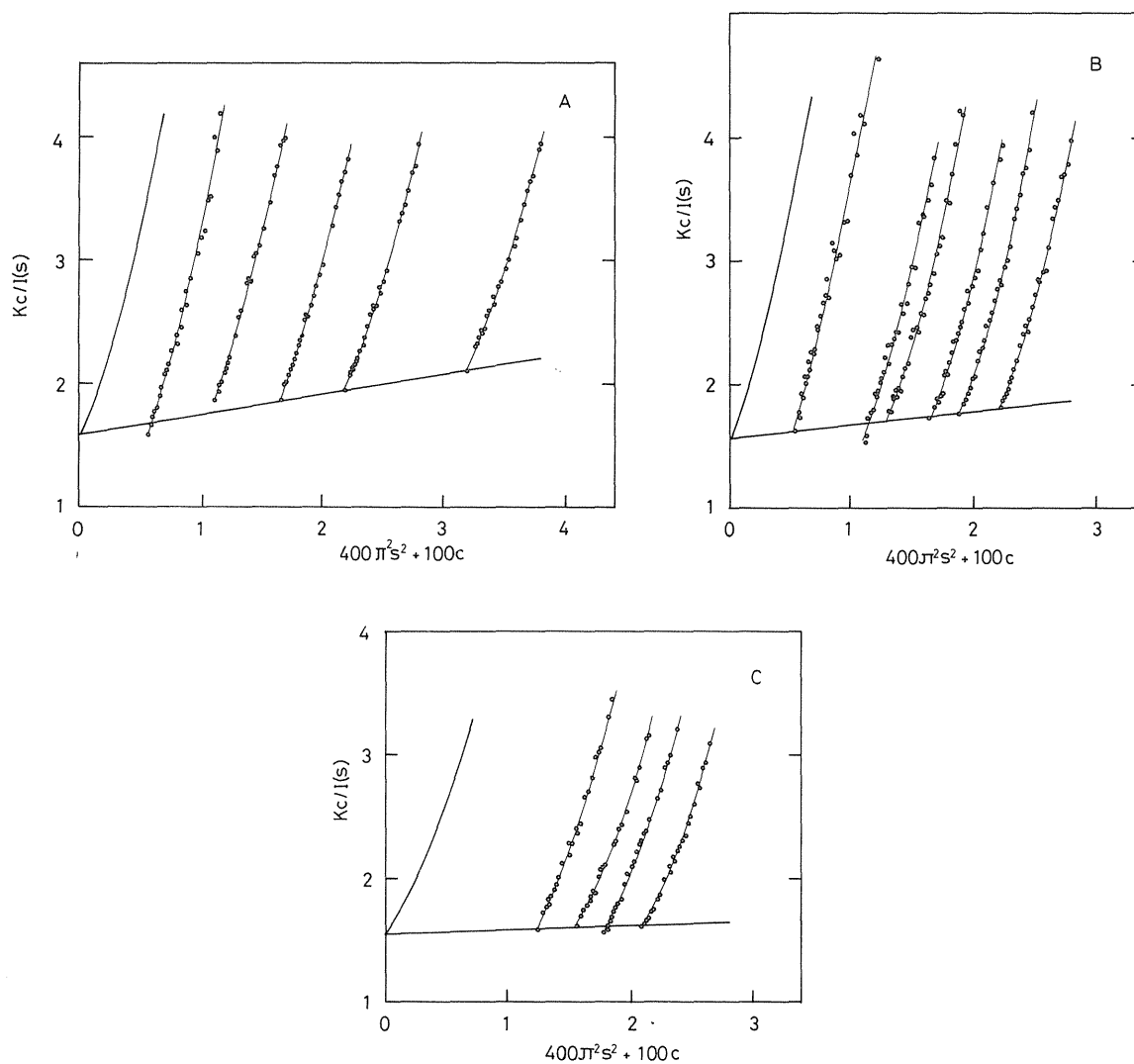


Fig. 2. Zimm plots for the observed small angle scattering for calmodulin at a series of protein concentrations at pH 7.6, where K is a constant.
 (A) in the absence of both Ca^{2+} and mastoparan,
 (B) in the presence of 5 mol Ca^{2+} / mol of protein,
 (C) in the presence of both 4 mol Ca^{2+} / mol of protein and 1 mol mastoparan / mol of protein.

Table 2 2nd virial coefficients and radii of gyration of calmodulin at infinite dilution under different conditions

condition	$10^3 B$ (ml · mol/g ²) ($B = A_2 M_2 / 1000$)	R_g (Å)	Ratio 1 (A_{20})	Ratio 2 (B)	Ratio 3 (Fig. 3)
EDTA	5.1 ± 0.5	20.9	1.00	1.00	1.00
4Ca^{2+}	3.5 ± 0.3	21.5	1.09	0.69	0.63
4Ca^{2+} + mastoparan	1.1 ± 0.1	17.8	0.62	0.22	0.17

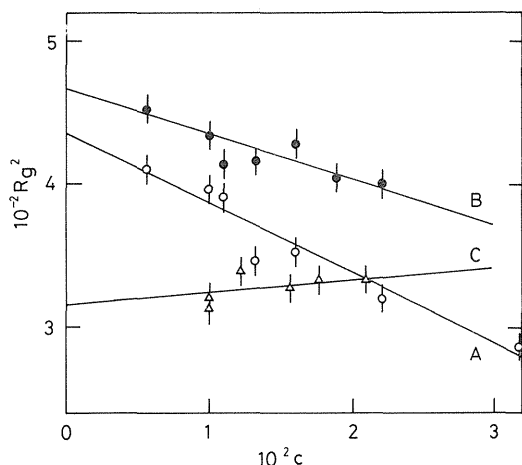


Fig. 3. Concentration dependence of the R_g values determined with the Guinier plots for calmodulin at pH 7.6.

- (A) in the absence of both Ca^{2+} and mastoparan.
 (B) in the presence of 5 mol Ca^{2+} /mol of protein.
 (C) in the presence of both 4 mol Ca^{2+} /mol of protein and 1 mol mastoparan/mol of protein.

アル係数の値と関係していることを示唆している。

前節で評価した三つの状態でのフラグメントの回転半径の値と表2の三つの状態のカルモデュリンの回転半径の値とを、(4)式と類似の式：

$$R_{gCM}^2 = 2M_D(R_{gD}^2 + L_{DD}^2/4)/M_T + M_L(R_L^2 + L_{DL}^2)/M_T, \quad (7)$$

に適用して、 L_{DD} とカルモデュリンのN、Cドメインの曲がりぐあい (α) を評価した。ここで、

M_D 、 M_L 、 R_{gD} と R_L は、それぞれドメインと、中央ヘリックス部の分子量と回転半径を、 M_T はカルモデュリンの分子量を、 L_{DD} と L_{DL} は、それぞれドメイン間とドメインと中央ヘリックス部間の距離を表わしている。 α 、 L_{DD} と R_{gCM} の計算値を表3にまとめて示した。比較のために、対応する結晶構造の値 ($\alpha = 0$) も示した。この表から Ca^{2+} を結合していない状態、4個の Ca^{2+} を結合した状態、4個の Ca^{2+} と1個のmastoparanを結合した状態の、三つの状態が、 α と L_{DD} の値を用いて記述できることが理解されよう。さらに、これらの L_{DD} の値とドメインサイズとを考慮して評価した分子の最大長 d_{max} の値もまた表3に示した。このように、回転半径の結果は、溶液中のカルモデュリンの立体構造が結晶中のそれと異なり、中央ヘリックス部で曲がっていることを要求している。そして、その曲がりぐあいは溶液の状態に強く依存していることが理解される。後述するように、このことは、カルモデュリンの酵素活性化の機構を議論する際、非常に重要な手掛りを与えることになる。

次に、中角散乱領域の散乱プロファイルの解析から、上述の三つの状態でのカルモデュリンの内部構造についてさらに詳しく調べてみよう。これら三つの状態での散乱プロファイルを図4に示す。まず、 Ca^{2+} を結合していない状態のプロファイル $s = 0.03 \text{ \AA}^{-1}$ 近傍の「肩」と $s = 0.046 \text{ \AA}^{-1}$ と 0.079 \AA^{-1} 近傍に二つの浅い極小値をもつブロードな山によって特徴づけられる。これに対し、4個の Ca^{2+} を結合した状態のプロファイルの「肩」

Table 3 Radius of gyration of calmodulin, bending angle (α) and center-to-center distance (L_{DD}) between two domains under different conditions

condition	R_g (\AA)	α ($^\circ$)	L_{DD} (\AA)	d_{max} (\AA)
crystal	22.9	0	38.8	70.5
EDTA	20.8	60	33.6	65.3
4 Ca^{2+}	21.4	50	35.1	66.9
4 Ca^{2+} + mastoparan	17.5	100	24.9	56.7

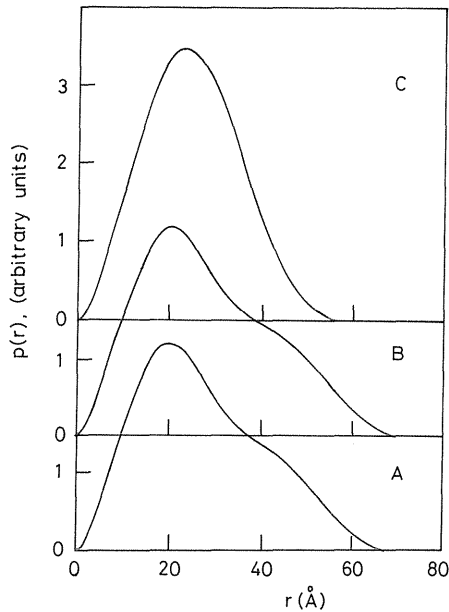


Fig. 4. Distance distribution function $p(r)$ for calmodulin at pH=7.6 (A) in the absence of both Ca^{2+} and mastoparan, (B) in the presence of 5 mol Ca^{2+} /mol of protein, (C) in the presence of both 4 mol Ca^{2+} /mol of protein and 1 mol mastoparan/mol of protein

の位置はほぼ同じであるが、 $s=0.045 \text{ \AA}^{-1}$ と 0.079 \AA^{-1} 近傍に二つの極小値をもつ山の存在がもっと明確になる。これら二つの状態における $s=0.03 \text{ \AA}^{-1}$ 近傍の「肩」は、表3からドメイン間の距離に対応する。二つの極小値の位置に、次式¹⁸⁾：

$$Rg_D = 0.56/s_{01} = 0.96/s_{02}, \quad (8)$$

を適用して、ドメインの回転半径を評価すると約 12 \AA の値が得られる。この値は、3節で評価したフラグメントの値とほぼ一致する。さらに、山の存在が明確化するのには、 Ca^{2+} 結合に伴うドメイン内の構造変化に対応している。これらに対し、4個の Ca^{2+} と1個のmastoparanを結合した状態のプロファイルでは、「肩」とブロードな山がともに消失している。これは、C、N両ドメインが互いにほぼ完全に近づいた形態を反映している。

最後に、距離分布関数 $p(r)$ を評価することに

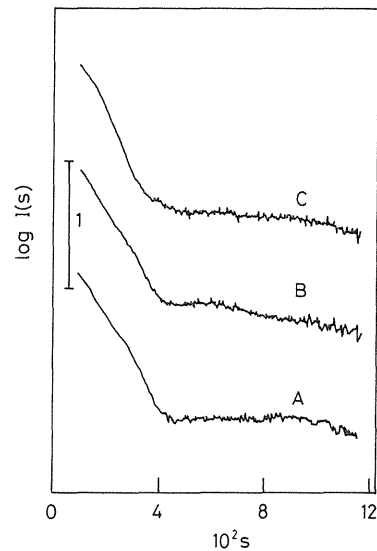


Fig. 5. Intermediate scattering regions for calmodulin at pH 7.6 (A) in the absence of both Ca^{2+} and mastoparan, (B) in the presence of 5 mol Ca^{2+} /mol of protein, (C) in the presence of both 4 mol Ca^{2+} /mol of protein and 1 mol mastoparan/mol of protein.

より、上述の三つの状態でのカルモデュリンの立体構造をさらに詳しく調べてみよう。 $p(r)$ と散乱強度 $I(s)$ とは次式のフーリエ変換：

$$p(r) = 8\pi \int I(s)sr \sin(2\pi sr)ds, \quad (9)$$

で結びつけられる¹⁹⁾。ここで、 $p(r)$ は、カルモデュリン内にある任意の2点間の距離が r である頻度を表わしている。結晶の亜鈴型分子に適用するならば、 r が一個のドメイン・サイズに相当するところで、まず頻度が高く、ついでドメイン間の距離に相当するところで再び頻度が高くなる。これら二つの頻度分布が重なりぐあいは、ドメインのサイズとドメイン間の距離の大きさに存在している。そして、 r が d_{max} をこえると、もはや $p(r)$ はゼロになる。

上述の三つの状態における $p(r)$ が、9式の直接フーリエ変換により評価され、図5に示された。

まず、 Ca^{2+} が結合していない状態の $p(r)$ は、 $r=20 \text{ \AA}$ 近傍の極大、 40 \AA 近傍の肩と d_{max} が約 67 \AA であることによって特徴づけられる。4個の Ca^{2+} が結合した状態の $p(r)$ においても、 $r=20 \text{ \AA}$ 近傍の極大と 40 \AA の近傍の肩とが現われるが、 d_{max} は約 69 \AA と大きくなる。これに対し、4個の Ca^{2+} と1個のマストパランが結合した状態の $p(r)$ においては、前二者で現れた $r=20 \text{ \AA}$ 近傍の極大と 40 \AA 近傍の肩はもはや消失し、 $r=22 \text{ \AA}$ 近傍の単一の極大と d_{max} の値が著しく減少する (d_{max} として約 55 \AA の値が得られた) ことによって特徴づけられる。直接フーリエ変換法の適用による d_{max} の誤差を考慮すると、これらの $p(r)$ のプロファイルから評価された d_{max} の値は表3の対応する値とほぼ一致している。このことから、(7)式の適用がほぼ妥当であると考えられる。

5. Ca^{2+} 結合数による構造変化^{20~22)}

Ca^{2+} 結合数を少しずつ変えて、1個のマストパランの非結合下と結合下の二つの状態でのカルモデュリンの構造変化を、回転半径と散乱プロファイルの変化より調べた。この研究は、カルモデュリンの酵素活性化の作用発現機構を解明するために特に重要である。

図6は、ギニエの式から求めたカルモデュリンの回転半径の Ca^{2+} 結合数依存性を示したものである。マストパラン非結合下では、回転半径は Ca^{2+} 結合数の増加につれ、わずかに増加する。この増加の傾向は Ca^{2+} 結合数が約2.5個で終了する。これに対し、マストパラン結合下では、回転半径は Ca^{2+} 結合数の増加につれ、著しく減少する。そして、この減少傾向は Ca^{2+} 結合数が約4個で終了する。

図6に対応するカルモデュリンの中角散乱プロファイルから、内部構造の変化を調べてみよう(図7)。マストパラン非結合時の散乱プロファイルは、 Ca^{2+} 結合数の増加について、以下のような変化を示した。中間角度におけるブロードな山は Ca^{2+} が1個結合すると少し高くなる。さらに、

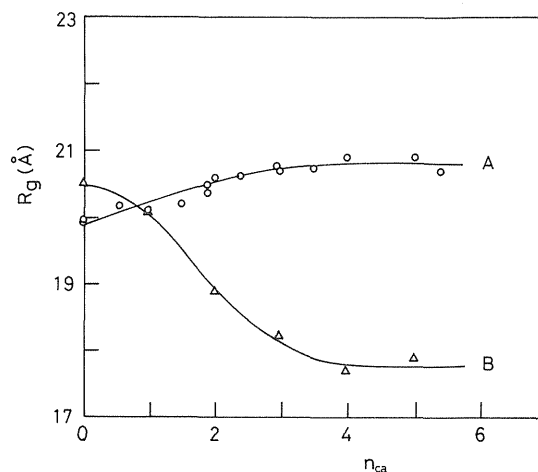


Fig. 6. Plots of the R_g values as a function of molar ratio of added Ca^{2+} per calmodulin at pH 7.6 in the absence (A) and in the presence (B) of 1 mol mastoparan / mol of protein.

2個、4個と Ca^{2+} 結合数が増加するにつれ、山の高さは顕著になる。この変化の特徴は、谷の位置がほとんど変化しないことである。このことから、 Ca^{2+} 結合数の増加に伴うドメイン内の構造変化は、その回転半径を変えずに起こっていると考えられる。 Ca^{2+} 結合数がほぼ2で、カルモデュリンの回転半径が一定となることから、マストパラン非結合時の構造変化は、Cドメインの構造変化が主体となると考えられる。また、4個の Ca^{2+} を結合した溶液を、EDTAでキレートすると完全にもとの散乱プロファイルと重なった。これに対し、マストパラン結合時の散乱プロファイルは、 Ca^{2+} 結合時の増加につれ以下のような変化をした。 $s = 0.03 \text{ \AA}^{-1}$ 近傍の肩は、 Ca^{2+} 結合数が0と1では存在するが、2以上では消失する。さらに、中間角度における山はほとんど変化しないが $s = 0.046 \text{ \AA}^{-1}$ 近傍の谷の高さが増加する。このことは、Cドメイン内の露出した疎水領域とマストパランとが先ず結合し、さらにこれがNドメイン内の露出した疎水領域と結合し、大きな構造変化を引き起こすことを示唆している。

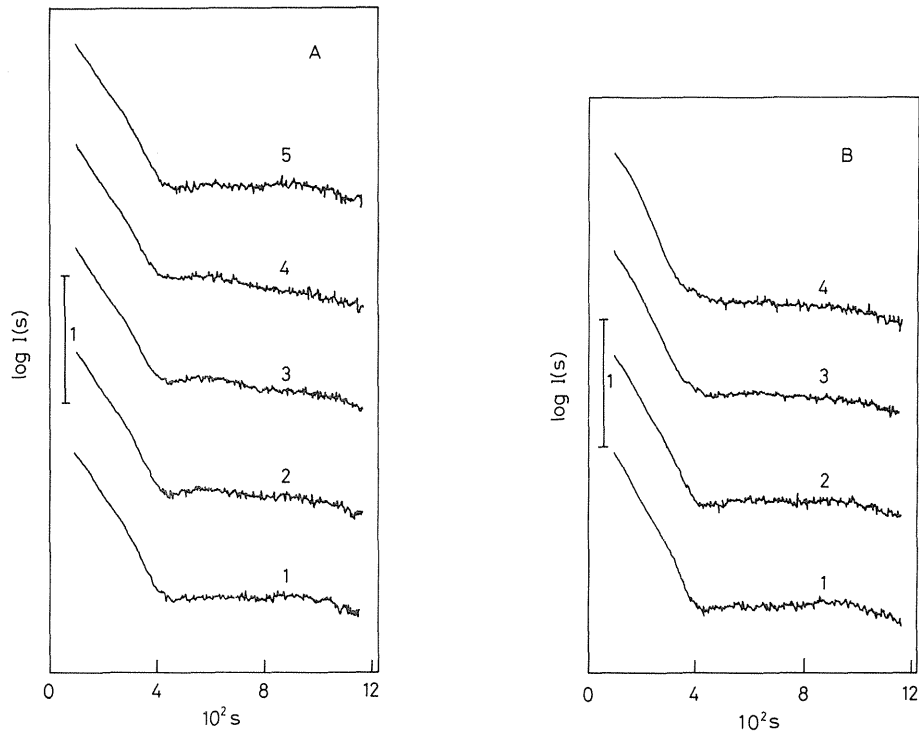


Fig. 7. Intermediate scattering regions for calmodulin at pH 7.6 in the absence (A) and in the presence (B) of 1 mol mastoparan/mol of protein.

6. 活性化の発現機構

以上の知見をもとに、カルモデュリンの酵素活性化の作用発現機構を描いてみよう。

結晶状態のカルモデュリンを溶液状態にした時の立体構造は、亜鈴型を保持している。この亜鈴型の構造は、ドメイン構造に関する限り結晶状態のそれを保持しているが、結晶状態とは異なる立体構造、すなわち露出した中央ヘリックス部のところで曲がった構造をしている。その結果、C、N両ドメインは結晶構造におけるよりも近づくと考えられる。Ca²⁺結合数を減らしていくと、カルモデュリンは曲がった構造のまま、まずNドメインの疎水領域が、ついでCドメインのそれが中に埋もれることにより、ドメインの構造変化が起こる。

Ca²⁺の結合していない溶液にmastoparanを加えると、カルモデュリンの回転半径は若干大きくなる。現時点では、この状態で、mastoparanがカルモデュリンに結合しているかどうかは明らか

でない。この溶液を透析したのち、Ca²⁺結合数を増やしていくと、まずCドメインの疎水領域が、ついでNドメインのそれが露出するのに伴い、両ドメインの疎水領域の間に、ヘリックス構造をしたmastoparanが挟まれて相互作用し合い、複合体を形成する。この複合体のサイズは、mastoparan非結合下で4個のCa²⁺を結合したカルモデュリンのそれに較べて、はるかに小さい。このことは、標的ペプチドの結合により、カルモデュリンは、さらに大きく立体構造を変化させることを意味している。

このように、標的酵素依存性のカルモデュリンの大きな形態変化が、酵素活性化の発現において重要であると考えられる。

7. おわりに

提案されたモデルの妥当性をさらに検討するために、結晶解析の座標を用いて、回転半径、 $p(r)$ 、散乱プロファイルなどの計算結果と実験

結果との比較が現在進行している。酵素活性化の作用発現機構に関する現在までの溶液散乱による研究は、標的ペプチドとしてマストパランに限定されてきた。カルモデュリンとの結合様式が互いに異なると考えられている標的ペプチドや標的酵素は、他にもたくさん見出されている。これらを用いた溶液散乱による研究は、酵素活性化の発現機構の詳細を分子構造の立場から解明するうえで非常に意義があり、新しい局面を開くものと期待される。

謝 辞

本実験は、P F 共同利用実験課題 (87-082) として、高エネルギー物理学研究所放射光利用施設 BL10C に設置された溶液散乱装置を用いて行われた。

本研究を遂行するに当たり、多くの方々に協力していただきました。とくに、植木龍夫 (阪大基礎工)、小林克巳 (高工研)、引地邦男 (北大理)、三宅康博 (北大理) の各先生方と松尾智幸と脇田政嘉 (北大理) の両君に感謝します。

文 献

- 1) 磯辺俊昭, 奥山典生, 蛋白質核酸酵素 **33**, 1955 (1988).
- 2) 伊倉光彦, 引地邦男, 蛋白質核酸酵素 **33**, 1944 (1988).
- 3) 八木康一, 蛋白質核酸酵素 **33**, 2083 (1988).
- 4) 矢沢道生, 蛋白質核酸酵素 **33**, 2019 (1988).
- 5) A. S. Manalan & C. B. Klee, Adv. Cyclic Nucleotide Res. **18**, 227 (1984).
- 6) T. Ueki, Y. Hiragi, Y. Izumi, H. Tagawa, M. Kataoka, Y. Muroga, T. Matsushita, & Y. Amemiya In KEK Progress Reports 83-1. Photon Factory Activity Report, 1982/1983, vi-70.
- 7) T. Ueki, Y. Hiragi, M. Kataoka, Y. Amemiya, T. Izumi, H. Tagawa, & Y. Muroga, Biophys. Chem. **23**, 115 (1985).
- 8) Y. Hiragi, H. Inoue, Y. Sano, K. Kajiwara, T. Ueki, M. Kataoka, H. Tagawa, Y. Izumi, Y. Muroga, & Y. Amemiya, J. Mol. Biol. **204**, 129 (1989).
- 9) Y. S. Babu, J. S. Sack, T. J. Greenhough, C. E. Bugg, A. R. Means, & W. J. Cook, Nature **315**, 37 (1985).
- 10) R. H. Kretsinger, S. E. Rudnick, & L. J. Weissman, J. Inorg. Biochem. **28**, 289 (1986).
- 11) Y. Izumi, H. Yoshino, & N. Matsushima, in preparation.
- 12) A. Guinier & G. Fournet, Small-Angle Scattering of X-Rays, p.126 & p.149 (1955), John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 13) D. B. Heidorn & J. Trehwella, Biochemistry **27**, 909 (1988).
- 14) H. Goldstein, Classical Mechanics, Addison-Wesley, Reading, Mass. (1962).
- 15) Y. Izumi, N. Matsushima, & H. Yoshino, in preparation.
- 16) N. Matsushima, Y. Izumi, T. Matsuo, H. Yoshino, T. Ueki, & Y. Miyake, J. Biochem. (1989) in press.
- 17) B. H. Zimm, J. Chem. Phys. **16**, 1093, 1099 (1948).
- 18) O. Glatter, Acta. Phys. Austr. **36**, 307 (1972).
- 19) O. Glatter, In Small Angle X-ray Scattering (eds. O. Glatter & O. Kratky), p.130 (1982), Academic Press, New York.
- 20) H. Yoshino, N. Matsushima, Y. Izumi, T. Matsuno, Y. Miyake, K. Kobayashi, & T. Ueki, In Calcium Signal and Cell Response (eds. K. Yagi & T. Miyazaki) p.322 (1988), Gakkai Shuppan Center/SpringerVerlag, Tokyo.
- 21) Y. Izumi, H. Yoshino, T. Matsuo, N. Matsushima, T. Ueki, K. Kobayashi & Y. Miyake, Rep. Prog. Polym. Phys. Jpn. **31**, 571 (1988).
- 22) H. Yoshino, O. Minari, N. Matsushima, K. Kobayashi, T. Ueki, Y. Miyake, T. Matsuo, & Y. Izumi, J. Biol. Chem. to be submitted.

