

博士論文

カルシウム依存的な鞭毛運動の
制御に関わるタンパク質
カラクシンの構造解析

生島 智樹

目次	1
略語表	4
第一章 序論	5
1-1 生物の生殖と受精	6
1-2 受精における精子の遊泳	7
1-3 鞭毛の構造	7
1-4 ダイニンと微小管の間の滑り運動	9
1-5 カルシウム結合タンパク質と EF-hand motif	9
1-6 カラクシンの分類と機能	11
1-7 カルシウムイオン結合型のカラクシンの結晶構造	12
1-8 カラクシン研究の課題と研究目的	13
図表	16
第二章 マグネシウムイオン結合型のカラクシンの結晶構造	31
2-1 マグネシウムイオン結合型のカラクシンの X 線結晶構造解析	32
2-1-2 実験方法	32
2-1-2-1 カラクシンの発現系構築	32
2-1-2-2 マグネシウムイオン結合型カラクシンの精製	33
2-1-2-3 マグネシウムイオン結合型カラクシンの結晶化	34
2-1-2-4 ITC 用アポ型カラクシンの精製	35
2-1-2-5 ITC を用いたバリウムイオン滴定	35
2-1-2-6 マグネシウムイオン結合型カラクシンの X 線結晶構造解析	36
2-1-3 実験結果	36
2-1-3-1 マグネシウムイオン結合型カラクシンの精製・結晶化	36
2-1-3-2 マグネシウムイオン結合型カラクシンの結晶構造	38
2-1-3-3 マグネシウムイオン結合型の open state と closed state の構造比較	39
2-1-3-4 カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型の構造比較	40
2-1-3-5 各 EF-hand におけるマグネシウムイオンの配位様式	41
2-1-3-6 金属イオンの EF-hand への配位距離	42
2-2 等温滴定型熱量測定	44
2-2-1 カラクシンのカルシウムイオンおよびマグネシウムイオンの結合の解析	44
2-2-2 実験方法	45
2-2-3 実験結果	45
2-3 SYPRO Orange を用いた熱安定性測定	47

2-3-1	C末端ヘリックスの熱安定性に対する寄与	47
2-3-2	実験方法	47
2-3-2-1	カラクシン変異体 $\Delta\alpha 11$ の作製	48
2-3-2-2	カラクシンの野生型と変異体の熱安定性測定	49
2-3-3	実験結果	50
2-4	考察	51
	図表	54
第三章 溶液中におけるカラクシンの構造変化の解析		84
3-1	X線小角散乱	85
3-1-1	X線小角散乱を用いたカラクシンの溶液中での構造変化の解析	85
3-1-2	実験方法	85
3-1-2-1	X線小角散乱実験とデータ解析	85
3-1-2-2	ゲル濾過クロマトグラフィーを用いたカラクシンの分子量の算出	87
3-1-3	実験結果	87
3-1-3-1	溶液中でのカラクシンの多量体形成の解析	87
3-1-3-2	溶液中でのカラクシンの慣性半径の算出	88
3-1-3-3	カルシウムイオン結合による溶液中での構造の遷移	88
3-2	1,8-ANS 蛍光によるカラクシンの疎水性表面の解析	89
3-2-1	金属イオン結合によるカラクシンの疎水性表面の変化の解析	89
3-2-2	実験方法	89
3-2-3	実験結果	90
3-3	考察	90
	図表	93
第四章 カラクシンの EF-hand のカルシウムイオン特異性		102
4-1	トリプトファン蛍光測定を用いた EF-hand の構造変化の解析	103
4-2	実験方法	103
4-2-1	トリプトファン蛍光測定用の変異体	103
4-2-2	トリプトファン蛍光測定	105
4-3	実験結果	105
4-4	考察	106
	図表	108
第五章 総合討論		112
5-1	本研究の概要	113

5-2	カラクシンの構造とダイニンとの結合に関する考察	114
5-3	生体内におけるカラクシンによる鞭毛運動の制御の考察	115
5-4	本研究の今後と応用	116
	図	118
	参考文献	119
	謝辞	125

略語表

GTP	<u>g</u> uanosine-5'- <u>t</u> riphosphate
GDP	<u>g</u> uanosine-5'- <u>d</u> iphosphate
MAPs	<u>m</u> icrotubule- <u>a</u> ssociated <u>p</u> roteins
ATP	<u>a</u> denosine -5'- <u>t</u> riphosphate
AAA ring	<u>A</u> TPases <u>a</u> ssociated with diverse cellular <u>a</u> ctivities <u>r</u> ing
MTBD	<u>m</u> icrotubule- <u>b</u> inding <u>d</u> omain
HC	<u>h</u> eavy <u>c</u> hain
IC	<u>i</u> ntermediate <u>c</u> hain
LC	<u>l</u> ight <u>c</u> hain
NCS	<u>n</u> euronal <u>c</u> alcium <u>s</u> ensor
CD	<u>c</u> ircular <u>d</u> ichroism
ITC	<u>i</u> sothermal <u>t</u> itration <u>c</u> alorimetry
SAXS	<u>s</u> mall- <u>a</u> nge <u>X</u> -ray <u>s</u> cattering
1,8-ANS	<u>1</u> - <u>a</u> nilin <u>o</u> naphthalene- <u>8</u> - <u>s</u> ulfonic acid
PDB	<u>p</u> rotein <u>d</u> ata <u>b</u> ank
OD	<u>o</u> ptical <u>d</u> ensity
NTA	<u>n</u> itrilo <u>t</u> riacetic <u>a</u> cid
Tris	<u>t</u> ris(hydroxymethyl)aminomethane
EDTA	<u>e</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etraacetic <u>a</u> cid
EGTA	<u>e</u> thylene glycol <u>t</u> etraacetic <u>a</u> cid
DTT	<u>d</u> ithio <u>t</u> hreitol
MES	2-(<u>N</u> - <u>m</u> orpholino) <u>e</u> thane <u>s</u> ulfonic acid
PEG	<u>p</u> oly <u>e</u> thylene glycol
MOPS	3-(<u>N</u> - <u>m</u> orpholino) <u>p</u> ropane <u>s</u> ulfonic Acid
SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
PAGE	<u>p</u> oly <u>a</u> crylamide gel <u>e</u> lectrophoresis
RMSD	<u>r</u> oot <u>m</u> ean <u>s</u> quare <u>d</u> eviation
DNA	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction

第一章

序論

1-1 生物の生殖と受精

生物は、同種の個体を増やし、子孫を繁栄させるため、生殖によって自身の遺伝情報およびその一部を受け継いだ個体を生み出す。生殖は大きく無性生殖と有性生殖に分類される。無性生殖では1つの個体から新しい個体が生み出され、子には親のものと同じ遺伝情報が受け継がれる。それに対して、有性生殖では2つの個体から新しい個体が生み出され、子に引き継がれる遺伝情報は、両親の遺伝情報の一部をそれぞれ引き継がれたものとなる。有性生殖においては、両親からそれぞれ遺伝情報を子に伝えるための配偶子と呼ばれる生殖細胞が提供される。両親から提供された配偶子の大きさが同じ場合にはそれらは同型配偶子と呼ばれ、配偶子の大きさが異なる場合にはそれらは異形配偶子と呼ばれる。異形配偶子の中でも、大きくて運動性を持たないものは卵、小さくて運動性を持つものは精子と呼ばれ、精子が卵と融合し遺伝情報を渡すことを受精と呼ぶ。動物と一部の植物においては、生殖のための手段として受精が行われる。有性生殖では子の遺伝情報が両親の遺伝情報の一部ずつが引き継がれるため、無性生殖と比べて遺伝情報の多様性が生まれやすいという特徴がある。しかし、有性生殖が成功するためには雄と雌の個体が出会い、さらに雄の配偶子と雌の配偶子が上手く出会わなければならない、生殖の効率は低い。逆に言えば、雄性配偶子と雌性配偶子の出会いの効率が生殖の成功率に関わっていると言う事ができる。

1-2 受精における精子の遊泳

受精の過程において、運動性を持つ精子が運動性を持たない卵の元まで遊泳する。精子は鞭毛と呼ばれる小器官を有しており、鞭を振るように鞭毛を動かすことで遊泳のための推進力を得ることができる。しかし、仮に精子が何の指標もなくでたらめに遊泳しているとすると、卵の元に到達することが非常に困難になり、受精の効率が著しく低くなってしまふ。そのため、精子が卵まで効率よく到達するための機構を生物は備えている。

効率の良い受精の達成のため、生物は誘引物質を用いた機構を備えている(図 1-1)。まず、卵は表面から外部に向かってある種の誘引物質を放出している。この誘引物質は種特異的な化合物で、既に同定されている化合物のみを見ても、ステロイド化合物(Yoshida *et al.*, 2002)、タンパク質(Olson *et al.*, 2001)、ペプチド(Ward *et al.*, 1985)、アミノ酸(特にトリプトファン)(Riffell *et al.*, 2002)、炭化水素(Coll *et al.* 1994)というように、種によって誘引物質の構造は大きく異なる(図 1-2)。卵は外に向かって誘引物質を放出しているため、卵の周辺には誘引物質の濃度勾配が形成されている。すなわち、卵の周辺は誘引物質の濃度が高く、卵から離れるにつれて濃度が低くなる。

続いて、精子が遊泳して卵に近づいた場合に、精子は誘引物質の濃度勾配を感受することができる。精子が誘引物質を感受するためには、誘引物質の受容体が精子に発現している必要があると考えられるが、この受容体の同定はほとんど進んでいない。誘引物質の受

容体について唯一研究が進んでいるものが、ウニの一種である *Arbacia punctulata* のものである(Ward *et al.*, 1985). *A. punctulata* においては, Resact というペプチドが誘引物質であると同定され, さらにグアニル酸シクラーゼが Resact の受容体であることが知られている. 精子は非常に小さいため, 周辺の誘引物質の濃度勾配を感受するためには, 自身が移動し続ける必要がある. その際, 精子は緩く円を描くような軌道で遊泳をする. そして, 精子が遊泳物質の濃度の極小点を感じると, 精子に存在するある種のカルシウムチャンネルが活性化される(Shiba *et al.*, 2008). 哺乳類においては CatSper というカルシウムチャンネルが活性化され, 精子内のカルシウムイオン濃度が上昇する(Ren *et al.*, 2001 ; Strünker *et al.*, 2011). この現象はカルシウムスパイクと呼ばれる.

カルシウムスパイクによって精子内のカルシウムイオン濃度の上昇が起こると, 精子は卵の方へ遊泳方向を変えることができることが知られている(Shiba *et al.*, 2008) (図 1-1). 精子の遊泳方向は, 鞭毛の動きの変化によって制御される. 定常状態, すなわち精子内のカルシウムイオン濃度が低い状態では, 精子の鞭毛は対称的に動かされる. 対称的な鞭毛運動によって, 精子は一定の方向に直線状で泳ぐことができる. ただし, 実際には鞭毛はわずかに非対称に動かされるので, 精子はらせん状の軌道で遊泳する. しかし, 精子内のカルシウムイオン濃度が上昇すると, 精子の鞭毛運動が非対称的な動きに変化し, それによって精子は遊泳方向を大きく変えることができる. 遊泳方向を変える際には, 精子は誘引物質の濃度が高くなる方向, すなわち卵の方向に近づくことが知られる.

以上のように, 精子の誘引物質の感受, 精子内のカルシウムイオン濃度の上昇, 精子の遊泳方向の変化を何度も繰り返すことによって, 精子は卵の位置まで効率良く進むことが可能となる.

1-3 鞭毛の構造

精子の鞭毛の内部では, 中心に存在する 2 本の中心微小管と, それを取り囲むように 9 本の周辺微小管が円状に配置されている(図 1-3). この特徴的な構造は「9+2 構造」と呼ばれる. 微小管は, 細胞の形態維持や物理的な力を生む役割を担う細胞骨格の一種であり, 微小管の屈曲運動が鞭毛の運動をもたらす. 微小管上には鞭毛ダイニンが存在しており, 鞭毛の中心に近いものを内腕ダイニン, 中心から遠いものを外腕ダイニンと呼ぶ. ダイニンは 2 本の隣り合う微小管の間をつなぐように相互作用しており, 微小管とダイニンの間で起こる滑り運動が微小管の屈曲を生む. 鞭毛の外縁の微小管は A 小管と B 小管によるダブルレット微小管として存在するが, 隣り合ったダブルレット微小管を架橋するようにネキシンと呼ばれるタンパク質が dynein regulatory complex を構成して存在している. また, 鞭毛の中心部にはラジアルスポークと呼ばれるタンパク質複合体が存在する. ラジアルスポークの機能や構造についてはあまり研究が進んでおらず不明な点が多い.

微小管はチューブリンと呼ばれるタンパク質が多数重合することにより形成される(図

1-4). 鞭毛の微小管を形成しているのは α -チューブリンと β -チューブリンの 2 種類であり、互いに立体構造が類似している。 α -チューブリンと β -チューブリンは互いに結合しあってヘテロ 2 量体を形成しており、このヘテロ 2 量体が微小管の端から結合することで微小管が伸長していく。伸長面から見ると、微小管は 13 個のチューブリンが並んで輪を形成している。また、微小管の側面から見ると、 α -チューブリンと β -チューブリンは交互に並んでおり、微小管が伸長する際も α -チューブリンと β -チューブリンが交互に並ぶようにヘテロ 2 量体が結合して伸長する。 α -チューブリンと β -チューブリンは常に 2 量体を形成しているため、微小管の両端の片方には α -チューブリン、もう片方には β -チューブリンが位置しており、 α -チューブリンが位置している方をマイナス端、 β -チューブリンが位置している方をプラス端と呼ぶ。実際には微小管の両端ではチューブリン 2 量体の重合と脱重合が起きているが、プラス端の重合速度はマイナス端の重合速度よりも速い。そのため、微小管が伸長する際はプラス端の方から伸びていく。微小管の伸長は GTP 依存的であり、 α -チューブリンと β -チューブリンそれぞれに GTP が結合できる。ただし、 α -チューブリンには常に GTP が結合しているが、 β -チューブリンには GTPase 活性があり GTP 結合型と GDP 結合型が存在する。微小管を形成しているチューブリン 2 量体の β -チューブリンのほとんどには GDP が結合しており、この状態では比較的脱重合が起こりやすい。しかし、新たに微小管に取り込まれるチューブリン 2 量体の β -チューブリンには GTP が結合しており、プラス端では GTP 結合型のチューブリンが蓄積している。GTP 結合型のチューブリンでは構造が安定化されているため(GTP キャップ)、新たなチューブリン 2 量体が結合しやすく伸長速度が速い。微小管に取り込まれた GTP 結合型のチューブリンは、しばらくして β -チューブリンの GTPase としての働きによって GDP 結合型のチューブリンに変換される。

微小管には微小管結合タンパク質(microtubule-associated proteins, MAPs)と呼ばれるタンパク質群が結合しており、微小管の重合および脱重合の制御や、微小管の構造を安定化といった機能を持つ(Maccioni & Cambiasso, 1995)。例えば、最も有名な微小管結合タンパク質のひとつに、Tau というタンパク質がある。Tau はチューブリンのヘテロ 2 量体の間に結合することで、微小管の構造の安定化に寄与することが知られている(Kadavath *et al.*, 2015)。

ダイニンは、細胞内での機械的な動きを担う分子モーターの 1 種として知られており、細胞質に存在する細胞質ダイニンと鞭毛に存在する軸糸ダイニンがある。ダイニンは ATP の加水分解により得たエネルギーを使って、微小管に沿って化合物の輸送を行う。軸糸ダイニンは分子量が 150 万以上の非常に大きなタンパク質複合体であり、全体の X 線結晶構造は決定されていないが、ダイニン断片の X 線結晶構造や電子顕微鏡による構造解析から、ダイニン重鎖の結晶構造モデルが提唱されている(Schiavo *et al.*, 2013)。細胞質ダイニンと軸糸ダイニンではいずれにおいても共通の構造を持ち、その構造は Motor domain, Linker, Tail domain の 3 つのドメインに分けられる(図 1-5)。Motor domain は、AAA ring (ATPases associated with diverse cellular activities ring)と Stalk で構成されていて、Stalk の先には微小管結合ドメイン(microtubule-binding domain, MTBD)が存在する。AAA ring は 6 つのドメイン

で構成されており、ATP の結合と加水分解によるエネルギーの獲得の役割を担っている。鞭毛においては、ダイニンの Tail domain と Stalk が2つの微小管の間をつなぐように相互作用している。Linker は Tail domain と Motor domain の間をつなぐ役目を担っている。また、上述した3つのドメインでの呼称とは別に、ダイニンの構造の骨格を形成している部分を重鎖(heavy chain, HC)と呼ぶ。そして、重鎖の一部である Tail domain は中間鎖(intermediate chain, IC)や軽鎖(light chain, LC)といったタンパク質が結合し、ダイニンの2量体形成に必要なと考えられている(Cianfrocco *et al.*, 2015)。

1-4 ダイニンと微小管の間の滑り運動

ダイニンの Tail domain には、ダイニンが輸送する化合物が結合する。細胞質ダイニンの場合には膜小胞やタンパク質複合体などが Tail domain に結合して輸送されるのに対して、軸糸ダイニンの場合には Tail domain はもうひとつの微小管と相互作用をして、物質を輸送する代わりに、微小管との間で滑り運動を起こす(Roberts *et al.*, 2013) (図 1-6)。この滑り運動が続けて起こるだけであれば、ダイニンが微小管に沿ってスライドするように移動するだけになってしまうが、微小管の間がネキシンで架橋されていることで微小管の滑り運動が制限され、結果的に微小管の屈曲につながる。鞭毛内の局所的な部位で発生した微小管の屈曲は時間的・空間的に制御されて鞭毛全体に伝播し、結果的に鞭毛の屈曲を引き起こす(Heuser *et al.*, 2009)。つまり、軸糸ダイニンと微小管の間の滑り運動が鞭毛運動の駆動力となる。また、前節でも述べたとおり、ダイニンの運動は Motor domain で起こる ATP の加水分解によって得られるエネルギーが使われるため、滑り運動は ATP 依存的である(Mogami *et al.*, 2007)。

鞭毛運動の制御には、鞭毛に存在するカルシウム結合タンパク質が関わっていると考えられている。カルシウム結合タンパク質は、カルシウムイオンと結合することで、カルシウムシグナリングに関与するタンパク質群である。精子の鞭毛においては、カルモジュリンなどのカルシウム結合タンパク質がダイニンと相互作用をすることで、ダイニンと微小管の間の滑り運動を制御していると考えられている(Smith, 2002)。そして、カルシウムイオンのカルシウム結合タンパク質への結合およびその後のダイニンとの相互作用が、カルシウムイオン依存的な鞭毛運動に寄与していると考えられている。

1-5 カルシウム結合タンパク質と EF-hand motif

カルシウム結合タンパク質に頻出するモチーフとして、EF-hand motif と呼ばれるモチーフがある。EF-hand motif はヘリックス-ループ-ヘリックスの二次構造の繋がりで形成されるモチーフで、カルシウムイオンやマグネシウムイオンなどの金属イオンを結合させることができるモチーフである(Kretsinger & Nockolds, 1973) (図 1-7 A)。ヘリックス-ループ-ヘリ

ックスの構造のうち、N 末端に近い方のヘリックスは E ヘリックス、C 末端に近い方のヘリックスは F ヘリックスと呼ばれる。通常、ループは 12 残基で構成され、実際に金属イオンが配位するのはループ部分である。EF-hand のループ部分はある程度保存性が高いコンセンサス配列が知られている(Gifford *et al.*, 2007)。金属イオンは座標軸の X, -X, Y, -Y, Z, -Z 方向の 6 つの方向から配位されており、アミノ酸残基の側鎖や主鎖のカルボニル基、水分子が配位に関与する(Szebenyi & Moffat, 1986)。実際には、カルシウムイオンが配位する時には、コンセンサス配列の 12 番目の Glu 残基(-Z)の 2 つの酸素原子が配位に関わっているので、双五角錐のような 7 カ所の相互作用によって配位している。EF-hand motif のコンセンサスのうち、側鎖がイオンとの結合に直接関与している残基(X, Y, -Z)は保存性が特に高い(表 1-1)。-X, -Y 方向からのイオンの配位には、それぞれ水分子と主鎖のカルボニル基が関与しており、アミノ酸の側鎖が直接には配位に関与していないため、このふたつのアミノ酸残基は他の残基に比べると保存性が低い。また、コンセンサス配列の 6 番目に該当する残基には Gly 残基が高く保存されているが、これはループ構造がイオンの配位のために大きく曲がる必要があり、側鎖が小さい残基が好まれることが原因である。

また、カルシウムイオンとマグネシウムイオンではイオン半径の大きさが異なるため、配位の様式が異なることが知られている(Lewit-Bentley & Réty, 2000 ; Shannon, 1976)。先述の通り、カルシウムイオンが配位する場合には双五角錐状の配位様式を示し、酸素原子と金属イオン間の配位距離は平均で約 2.4 Å である(図 1-7 B)。対して、マグネシウムイオンが配位する場合には、配位に関与する酸素原子あるいは水分子が正八面体の頂点上に位置しており(図 1-7 C)、さらに配位距離が平均で約 2.1 Å であり、カルシウムイオンの配位距離よりも短い。そのため、金属イオンの配位様式の違いから、カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型では EF-hand の構造は異なることが知られている。

EF-hand motif には、カルシウムイオンとマグネシウムイオンの両方が結合するものと、マグネシウムイオンが結合できずにカルシウムイオンのみが結合できるものが存在する。前者は構造的(structural) EF-hand、後者は調節的(regulatory) EF-hand とよばれる(Aravind *et al.*, 2008)。しかし、現在までのところ、EF-hand motif の配列だけを見て、構造的か調節的かの判断をすることはできていない。

細胞内においては、マグネシウムイオンとカルシウムイオンの 2 つが、金属イオンの中では豊富に存在するイオンであることが知られている。特に、マグネシウムイオンは他の 2 価金属イオンに比べて非常に高い濃度で存在し、約 2 mM ほどの濃度で定常的に存在することが知られている(da Silva *et al.*, 1995)。EF-hand に対しては、カルシウムイオンとマグネシウムイオンは競合的に結合することが知られている(Malmendal *et al.*, 1999)。カルシウムイオンの場合には濃度の変動が激しく、定常状態では 10 nM から 100 nM 程度の低い濃度に抑えられている。いくつかの研究での報告から、カルシウムイオンの EF-hand への結合について、その解離定数は、数 nM から数十 nM であることが知られており、細胞内のカルシウムイオンの濃度とほぼ同じ値である(Schwaller, 2010)。それに対して、マグネシウムイオンの

EF-hand への結合の解離定数は $10\ \mu\text{M}$ から $1\ \text{mM}$ ほどであり、細胞内のマグネシウムイオン濃度はこの解離定数の値の 10 倍から 100 倍程度である(Schwaller, 2010). そのため、定常状態では EF-hand にはマグネシウムイオンが結合していると考えられる. しかし、細胞が何らかのシグナルを受容すると、細胞内のカルシウムイオン濃度が $10\ \mu\text{M}$ 程度まで上昇して、後の細胞内におけるシグナル伝達に関与できる(Ikura, 1996). そうすると、解離定数より高い濃度のカルシウムイオンの存在により、EF-hand に結合していたマグネシウムイオンがカルシウムイオンに置換されて結合すると考えられる. このように、EF-hand のカルシウムイオンおよびマグネシウムイオンとの結合の解離定数の違い、そして細胞内におけるカルシウムイオン濃度の変動が、EF-hand タンパク質のカルシウムイオン結合状態とマグネシウムイオン結合状態の変化を引き起こしていると考えられる(Ikura, 1996).

カルシウムイオンおよびマグネシウムイオンの結合状態によって、EF-hand タンパク質は様々な機能を発現する. 例えば、最も有名な EF-hand タンパク質のひとつにカルモジュリンがある. カルシウムイオン結合型のカルモジュリンはアデニル酸シクラーゼの活性化(Mons *et al.*, 1999)やホスホジエステラーゼの活性化(Sonnenburg *et al.*, 1993)など、他のタンパク質の活性制御に関わることが知られている. こうしたカルシウムイオンに依存的な EF-hand タンパク質の機能は、マグネシウムイオン結合型(定常状態)とカルシウムイオン結合型(活性型)のタンパク質の構造の違いによってもたらされると考えられる. そして、カルシウムイオンの EF-hand への結合が EF-hand タンパク質の機能の発現にとって重要である.

1-6 カラクシンの分類と機能

ダイニンと相互作用すると考えられているカルシウム結合タンパク質のひとつに、「カラクシン(calaxin, calcium-binding axonemal protein)」というタンパク質が存在する. カラクシンは、カタユウレイボヤの精子の鞭毛で発見されたタンパク質で、ヒトやマウスを含む後生生物において、鞭毛や繊毛(構造的には鞭毛と同じ)にホモログが存在することが明らかになった(Mizuno *et al.*, 2009). また、カラクシンはカタユウレイボヤの精子や精巣に多く発現しているほか、鰓籠や内柱といった組織でもわずかに存在していることが報告されており、精子の運動中は常に鞭毛全体にカラクシンが発現している(Mizuno *et al.*, 2009). カラクシンはその配列から、neuronal calcium sensor (NCS) protein family というファミリーに属することが知られる(Mizuno *et al.*, 2009) (図 1-8). NCS protein family に属するタンパク質は、ヘリックス-ループ-ヘリックス構造の EF-hand motif を 4 つ持つことが知られている(Lim *et al.*, 2014) (図 1-9). NCS protein family では 4 つの EF-hand motif のうち一番 N 末端側のもの以外の 3 つではコンセンサス配列が保存されていて金属イオン結合能を有するが、一番 N 末端側の EF-hand は cryptic EF-hand motif と呼ばれ、ヘリックス-ループ-ヘリックス構造ではあるもののコンセンサス配列は保存されておらず、金属イオン結合能も持たない(Burgoyne, 2007). また、一般的に、NCS protein family に属するタンパク質には N 末端にミ

リストール化モチーフ(Met-Gly-X-X-X-Ser-X-X-X)が存在し、ミリストイル化される Gly 残基が存在する(Towler *et al.*, 1988). タンパク質のミリストイル化は、N末端のグリシン残基とのアミド結合により脂質であるミリスチン酸が結合する翻訳後修飾の一種で、ミリスチン酸の疎水的な炭化水素基によって細胞膜との親和性を上昇させる機能があることが知られている。しかし、カラクシンに関してはこのミリストイル化モチーフが無く、Gly 残基の代わりに Ser 残基が存在していて、カラクシンの翻訳後修飾についての情報は現在までに研究で報告されていない。

カラクシンは、カルシウムイオン依存的にダイニンと相互作用をすることが知られている。先行研究におけるファーウェスタブロットイングにより、カルシウムイオン非存在下においてカラクシンは外腕ダイニン中間鎖(IC2)や β -チューブリンと相互作用をするが、カルシウムイオン存在下では IC2 と外腕ダイニン重鎖と相互作用をする、ということが示されている(Mizuno *et al.*, 2009) (図 1-10)。そして、精子の鞭毛運動の速度の解析により、カラクシンは高濃度のカルシウムイオン存在下で、ダイニンと微小管の間の滑り運動を抑制することで、鞭毛運動の非対称性を生じさせている事が明らかにされた(Mizuno *et al.*, 2012)。また、NCS protein family の多くに結合し、アンタゴニストとしてタンパク質の機能を阻害するレパグリニドと呼ばれる化合物が知られている(Okada *et al.*, 2003) (図 1-11)。レパグリニドはカラクシンと結合し、さらにそれによって非対称的な精子の鞭毛運動が安定して行えなくさせ、精子の正常な遊泳を阻害するということが示されている(Mizuno *et al.*, 2012)。さらに、カラクシンの遺伝子をノックダウンさせたウニの胚の場合、繊毛を協同的に動かすことができなくなり、繊毛の動く範囲が狭くなることで、遊泳速度が遅くなるということが示された(Mizuno *et al.*, 2017)。このことから、カラクシンは精子内のカルシウムイオン濃度が上昇することでダイニンと結合し、非対称的な鞭毛運動を促進することで、正常に精子の遊泳方向の変化を行わせることができる、というモデルが提唱されている。しかし、カラクシンのダイニンへの結合様式や、なぜダイニンへの結合がカルシウムイオン依存的なのか、ということに関しては未だ明らかにされていない。

1-7 カルシウムイオン結合型のカラクシンの結晶構造

カラクシンのカルシウムイオン結合型の立体構造は、当研究室(食品工学研究室, 現食品生物構造学研究室)の卒業生である高橋裕輔らによって、X線結晶構造解析によって解明された。その結果から、カラクシンの立体構造は11つの α -ヘリックス($\alpha 1$ - $\alpha 11$)によって構成されており、さらに立体構造はN-terminal domain ($\alpha 1$ - $\alpha 5$, $\alpha 11$)とC-terminal domain ($\alpha 6$ - $\alpha 10$)の2つの構造に分けられることが明らかにされた(図 1-12)。その立体構造から、ヘリックス-ループ-ヘリックスの二次構造で形成されるEF-hand motifを4つ含んでいたが(EF0-EF3)、それらのうちの一番N末端に近いEF0以外の3つのEF-hand motif (EF1-EF3)にカルシウムイオンが結合していることが明らかになった。この4つのうちの3つのEF-hand motifがカ

ルシウムイオン結合能をもつという特徴は、既存の NCS protein family と同じである。また、カルシウムイオン結合能をもたない cryptic EF-hand motif は他の NCS protein family と同様に、コンセンサス配列とは異なる配列を有している(表 1-1)。

カラクシンのカルシウムイオン結合型の立体構造で特徴的な点は、結晶構造中では非対称単位中に 2 つの分子が存在していたが、それらの 2 つの分子の構造が互いに異なっていたことである(図 1-13 A)。具体的には、C-terminal domain を構成している $\alpha 7$ と $\alpha 8$ の配向が異なっており、それに伴って片方の分子では C-terminal domain の中央の疎水性ポケットが露出していた(図 1-13 B)。この疎水性ポケットが露出している方の分子の状態は open state、もう片方の分子の状態は closed state と呼ばれている。結晶構造中においては、closed state での構造の 3 つの α -ヘリックス($\alpha 8$, $\alpha 9$, $\alpha 10$)が、open state の構造で露出している疎水性ポケットと接していたため、結晶中のパッキングによって open state と closed state の 2 状態が見られたということが予想された。しかし、この結晶構造から、open state での構造で見られた疎水性ポケットが closed state の状態の分子の α -ヘリックスと相互作用していたように、カラクシンがダイニンと相互作用をする可能性が示唆された。

1-8 カラクシン研究の課題と研究目的

上述の通り、カラクシンはカルシウムイオン依存的なダイニンへの結合によって、精子の鞭毛運動の制御に関与していることが示されている。また、当研究室における先行研究において、カラクシンのカルシウムイオン結合型の構造が X 線結晶構造解析によって解かれ、カラクシンの立体構造の情報が得られた。しかし、カラクシンのカルシウムイオン結合型の構造だけでは、ダイニンがカラクシンのどの領域に結合するのか、そしてなぜダイニンへの結合がカルシウムイオン依存的に起こるのか、ということに関して明らかにすることはできない。

カラクシンはマグネシウムイオン結合時には微小管やダイニン中間鎖と結合するが、カルシウムイオン結合時にはダイニン中間鎖とダイニン重鎖と結合できるようになる。一般的にシグナル伝達によって濃度が上昇したカルシウムイオンによって EF-hand タンパク質は活性化することが知られているので、EF-hand タンパク質に対するカルシウムイオンの作用に関する研究は豊富に存在する。それに対して、マグネシウムイオンの EF-hand タンパク質に対する作用についてはあまり報告がない。EF-hand タンパク質である GCAP や KChIP においては、マグネシウムイオンが EF-hand タンパク質の構造の安定性や活性を向上させたり、特定の相互作用パートナーとの結合を促進させるといった報告がされているが、生体におけるマグネシウムイオン結合型のタンパク質の構造と機能の関係性についての議論は乏しい(Marino *et al.*, 2015 ; Peshenko *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2006)。また、前任者によるカラクシンの先行研究における円二色性測定(circular dichroism, CD)の結果から、カルシウムイオンやマグネシウムイオンの結合によって、カラクシンの α -ヘリックスの含有率が上

がり安定したフォールディングがなされることが示された(図 1-14). マグネシウムイオンは生体内の環境に依らずほぼ一定の濃度を常に保っているため、生体内のタンパク質は常に高濃度のマグネシウムイオンに晒されていると言ってもよい. 特に EF-hand タンパク質の場合は EF-hand motif にマグネシウムイオンが結合することから、マグネシウムイオンが EF-hand タンパク質に常に何かしらの作用を与えているのではないかと考えられる. そこで本研究では、カルシウムイオン結合時におけるカラクシンの構造や機能だけでなく、マグネシウムイオン結合によってカラクシンにどのような構造的あるいは機能的な影響を与えるか、さらに、マグネシウムイオンの存在がカラクシンのカルシウムイオン応答性にも何らかの寄与をしているのではないかという点についても着目し、カラクシンのカルシウムイオン依存的な機能のメカニズムの追究を目指した.

本研究では、引き続きカタユウレイボヤ由来のカラクシンを用いて、カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型の構造の違いを解析することで、カラクシンがどのような様式によってカルシウムイオン依存的にダイニンと結合するのかを明らかにすることを目的とした. カタユウレイボヤは比較的単純な体の構造をしており、解析に必要な精子を得ることも容易なため、精子の研究材料としては適している. 加えて、カタユウレイボヤはヒトと同じ後生生物に分類されるため、カラクシン(とそのホモログ)のタンパク質が両者に保存されており、基本的な精子の鞭毛運動の制御メカニズムは共通している点が多いと予想されるため、カタユウレイボヤの精子の研究結果がヒトにも応用されうるという点でもカタユウレイボヤは精子の研究に適した素材であると考えられる.

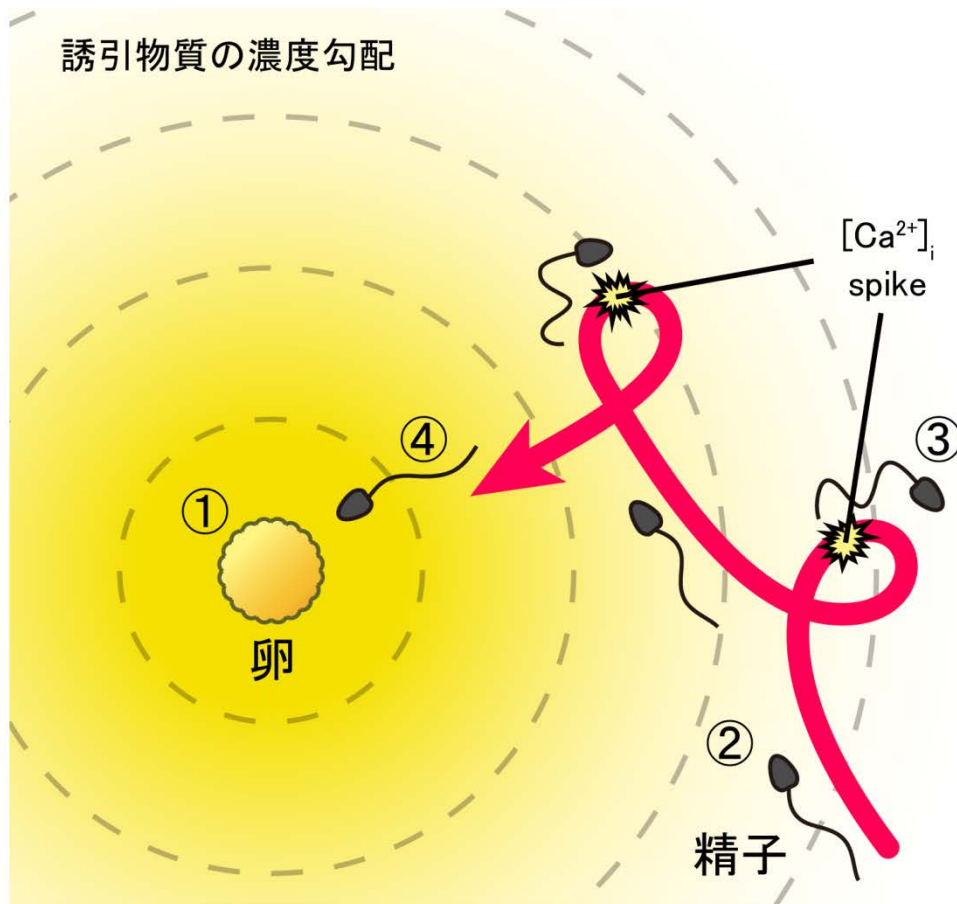
研究目的の達成のために、初めにカルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型のカラクシンの構造の違いを明らかにするため、カラクシンのマグネシウムイオン結合型の立体構造の解明を目指し、X 線結晶構造解析を試みた. カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型の間で構造の違いが見られれば、その構造変化が現れている部分がダイニンとのカルシウムイオン依存的な相互作用に関わっていると推定することができる. 次に、カラクシンのカルシウムイオン結合能やマグネシウムイオン結合能の解析のために、等温滴定型熱量測定(isothermal titration calorimetry, ITC)を用いた解析を行った. ITC によってカラクシンのカルシウムイオンやマグネシウムイオンに対する結合力を解析し、生体内のイオン濃度と比較することで、カラクシンのカルシウムイオン結合状態とマグネシウムイオン状態がどのように制御されているかを検証することが可能になる. さらに、カルシウムイオンやマグネシウムイオンの結合による、溶液中での構造の変化を観測するために、X 線小角散乱(small-angle X-ray scattering, SAXS)を用いて分子の慣性半径の算出を行ったほか、1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid (1,8-ANS)の蛍光強度を測定することで、分子表面のダイニンと結合すると考えられる疎水性ポケットの大きさを解析した. 溶液中での構造変化を解析することで、生体内での条件により近い状態での構造変化を確認できることが期待される. また、カルシウムイオンやマグネシウムイオンの結合による各 EF-hand motif の局所的な構造変化を解析するために、トリプトファン蛍光(Trp 蛍光)測定を行った. カルシ

ウムイオン結合時とマグネシウムイオン結合時で大きく構造変化をする EF-hand がもし存在すれば、生体におけるカルシウムイオン濃度上昇時のカラクシンの構造変化に大きく寄与する EF-hand を特定することが可能となる。最終的には、これらの実験結果と既存の NCS protein family タンパク質の研究結果から、カルシウムイオン結合によるカラクシンの構造変化とカルシウムイオン依存的なダイニンとの相互作用機構を関連付けることを目標とした。

表 1-1 EF-hand motif のコンセンサス配列

Position	most common		
1	D	100%	X
2	K	29%	
3	D	76%	Y
4	G	56%	
5	D	52%	Z
6	G	96%	
7	T	23%	-Y
8	I	68%	
9	D	32%	-X
10	F	23%	
11	E	29%	
12	E	92%	-Z

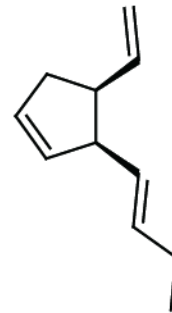
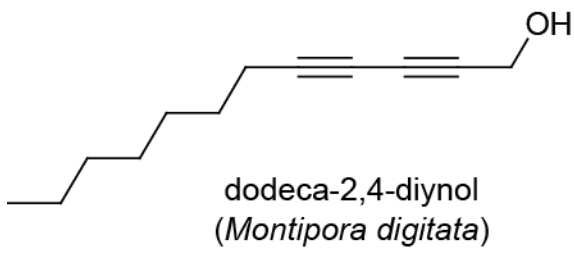
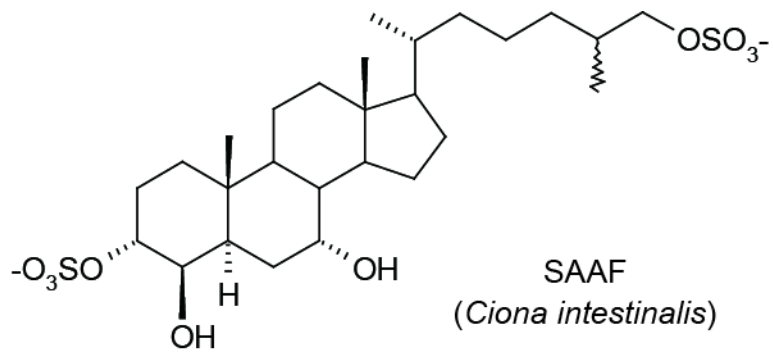
EF-hand motif のループ構造のコンセンサス配列の各場所において、最も出現率の高い残基を示した。X, -X, Y, -Y, Z, -Z はイオンの配位方向を表す。「Position」は EF-hand motif のループ領域のアミノ酸残基の並びを示す。アミノ酸残基の右には出現確立を記した。「most common」は当該の残基で最も出現頻度の高いアミノ酸残基を表す。特に保存性の高い残基は黄文字で示した。



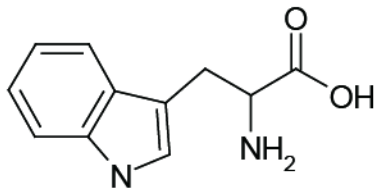
- ① 卵が誘引物質を放出
- ② 精子が近づき、誘引物質を感受
- ③ 精子内の Ca^{2+} 濃度が上昇 ($[Ca^{2+}]_i$ spike)
- ④ 精子が方向転換をして卵まで遊泳

図 1-1 受精の過程における精子の走化性

卵は外部にむけて種特異的な誘引物質を放出する。卵の近くに遊泳してきた精子は周辺を泳ぎ続けることで誘引物質の濃度勾配を感受することができる。誘引物質を感受した精子は、チャネルを通して精子内にカルシウムイオンを流入させ、精子内のカルシウムイオン濃度が上昇する。その後、精子の鞭毛運動が非対称な運動に切り替わることで、精子の遊泳が卵に近づく方向へ変わる。



multifidene
(*Zonaria angustata*)



tryptophan
(*Haliotis rufescens*)

CVTGAPGCVGGGRL-NH₂

resact
(*Arbacia punctulata*)

図 1-2 構造が同定された種々の誘引物質

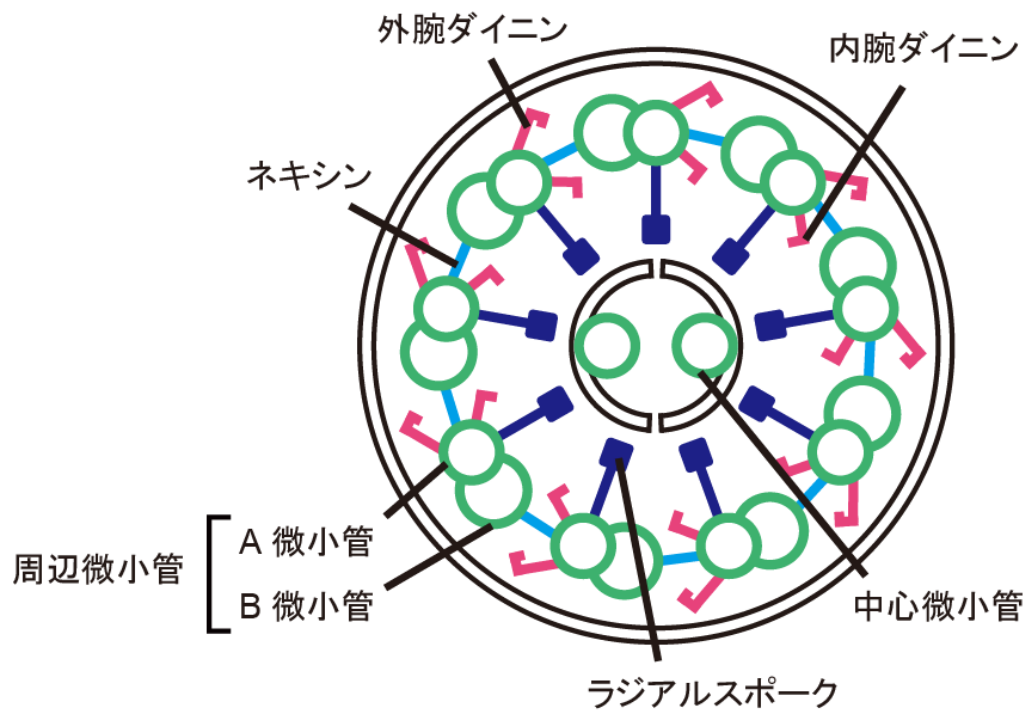


図 1-3 精子の鞭毛の断面図

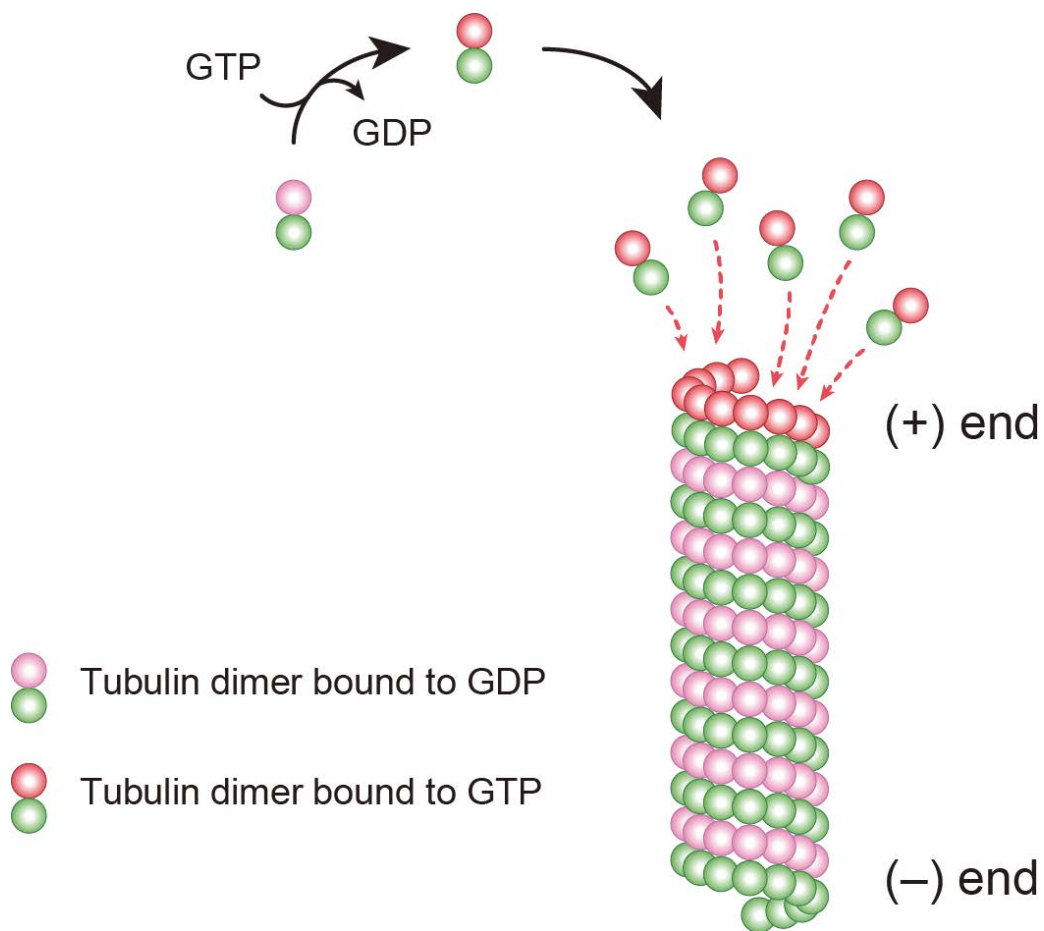


図 1-4 チューブリンの重合による微小管の形成

チューブリンはヘテロダイマーを形成しており、GDP 結合型と GTP 結合型の 2 種類が存在する。GTP 結合型のチューブリンダイマーは微小管のプラス端から重合することで、微小管が伸長させる。

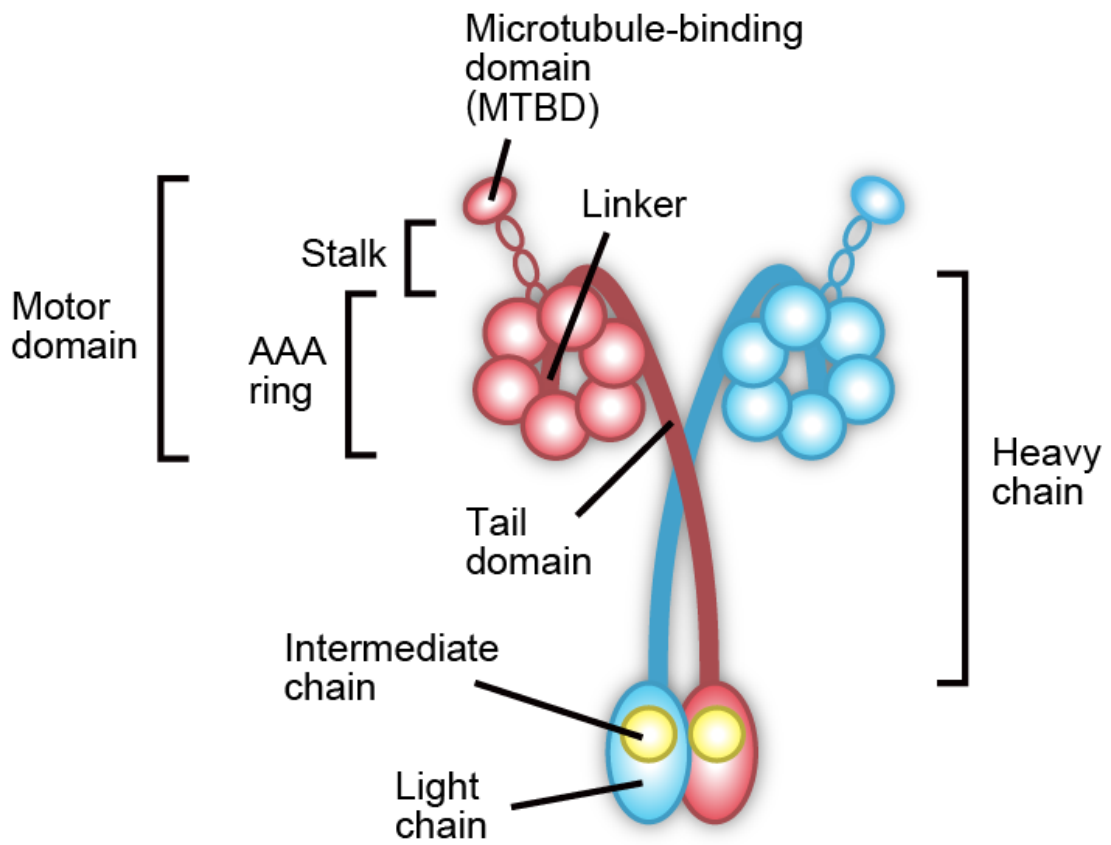


図 1-5 ダイニンの構造

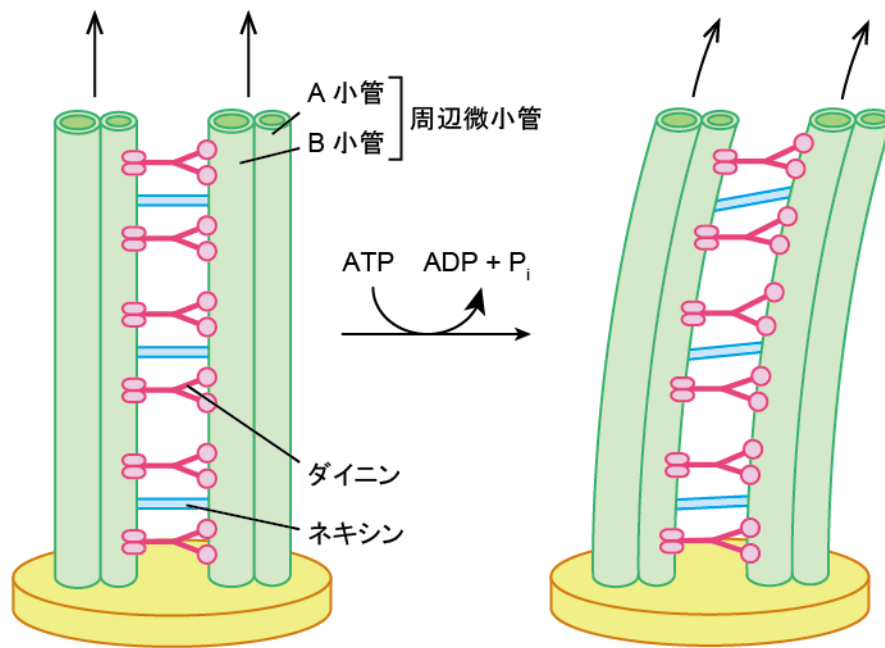


図 1-6 鞭毛におけるダイニンと微小管の滑り運動

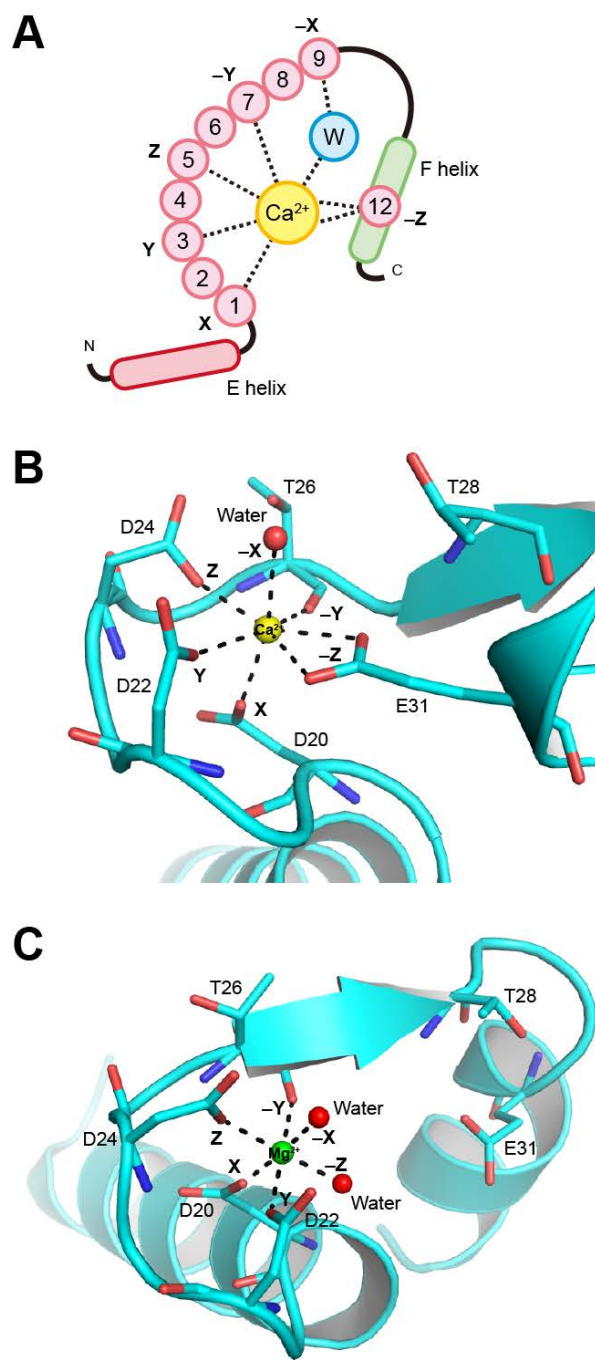


図 1-7 EF-hand motif の構造とイオン配位様式

(A)EF-hand motif の構造とカルシウムイオン配位様式. 数字は EF-hand motif のコンセンサス配列を構成するアミノ酸残基の順番を表す. W は水分子を表す. X, -X, Y, -Y, Z, -Z はカルシウムイオン配位の方法を示す. (B)カルモジュリンの EF-hand motif のカルシウムイオン配位様式(PDB ID: 1CLL). (C)カルモジュリンの EF-hand motif のマグネシウムイオン配位様式(PDB ID: 3UCW).

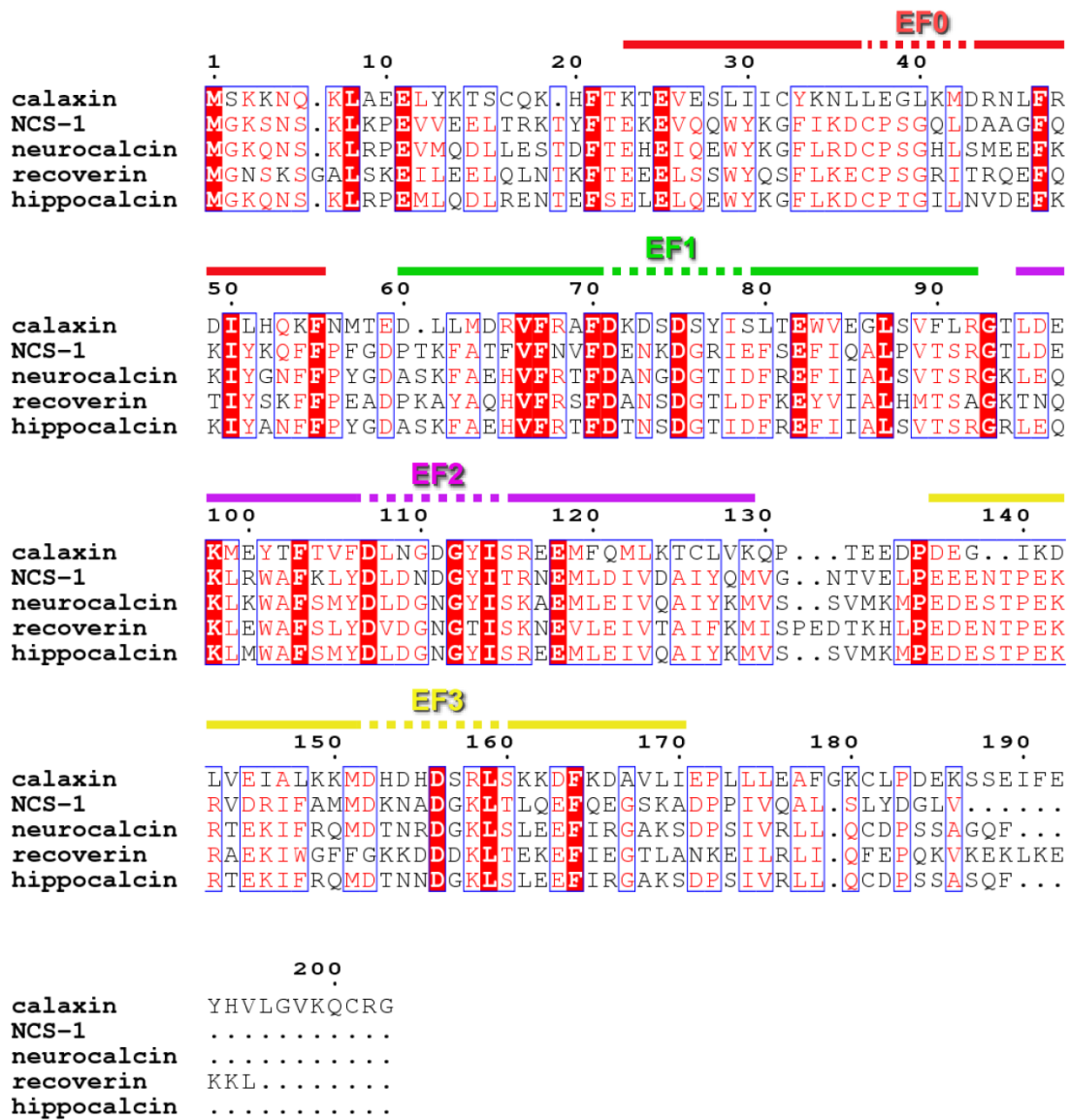


図 1-8 NCS protein family に属するタンパク質のアミノ酸配列アラインメント
 カラム上部の EF0, EF1, EF2, EF3 は、カラクシンにおける EF-hand motif の位置を表し、
 実線はヘリックス、点線はループ領域を表す。

	X		Y		Z		-Y		-X		-Z	
calaxin	K	N	L	L	E	G	K	M	D	R	N	L
NCS-1	K	D	C	P	S	G	Q	L	D	A	A	G
neurocalcin	R	D	C	P	S	G	H	L	S	M	E	E
recoverin	K	E	C	P	S	G	R	I	T	R	Q	E
hippocalcin	K	D	C	P	T	G	I	L	N	V	D	E

EF0

	X		Y		Z		-Y		-X		-Z	
calaxin	D	K	D	S	D	S	Y	I	S	L	T	E
NCS-1	D	E	N	K	D	G	R	I	E	F	S	E
neurocalcin	D	A	N	G	D	G	T	I	D	F	R	E
recoverin	D	A	N	S	D	G	T	L	D	F	K	E
hippocalcin	D	T	N	S	D	G	T	I	D	F	R	E

EF1

	X		Y		Z		-Y		-X		-Z	
calaxin	D	L	N	G	D	G	Y	I	S	R	E	E
NCS-1	D	L	D	N	D	G	Y	I	T	R	N	E
neurocalcin	D	L	D	G	N	G	Y	I	S	K	A	E
recoverin	D	V	D	G	N	G	T	I	S	K	N	E
hippocalcin	D	L	D	G	N	G	R	I	S	R	E	E

EF2

	X		Y		Z		-Y		-X		-Z	
calaxin	D	H	D	H	D	S	R	L	S	K	K	D
NCS-1	D	K	N	A	D	G	K	L	T	L	Q	E
neurocalcin	D	T	N	R	D	G	K	L	S	L	E	E
recoverin	G	K	K	D	D	D	K	L	T	E	K	E
hippocalcin	D	T	N	N	D	G	K	L	S	L	E	E

EF3

図 1-9 NCS protein family に属するタンパク質の EF-hand motif の配列

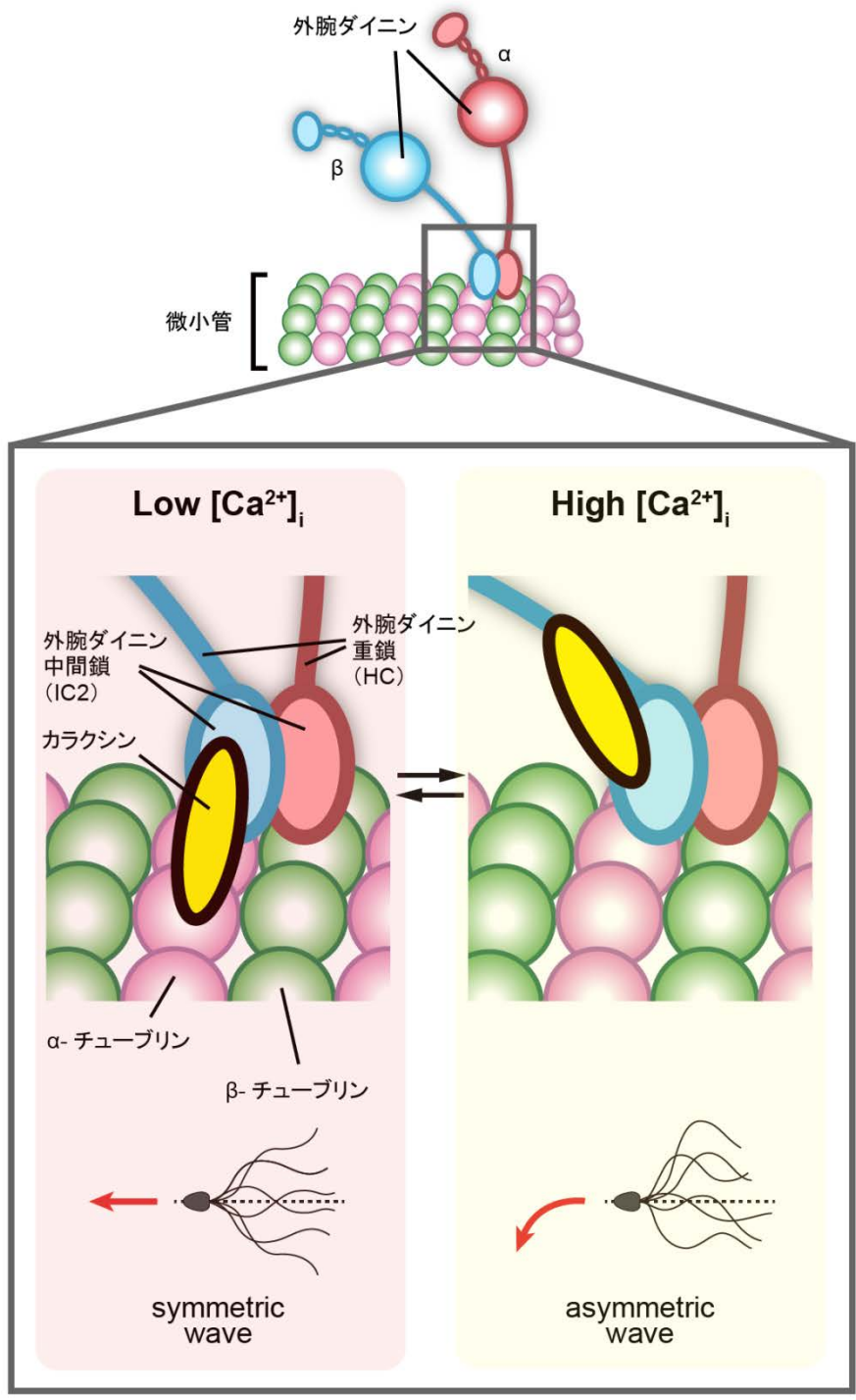


図 1-10 カラクシンによる精子の鞭毛運動制御
 低カルシウムイオン濃度下では、カラクシンはβ-チューブリンや中間鎖(IC2)と相互作用し、この時の鞭毛は対称的に動かされる。対して高カルシウムイオン濃度下では、カラクシンは IC2 や外腕ダイニン重鎖と相互作用し、鞭毛運動が非対称な運動に変化する。

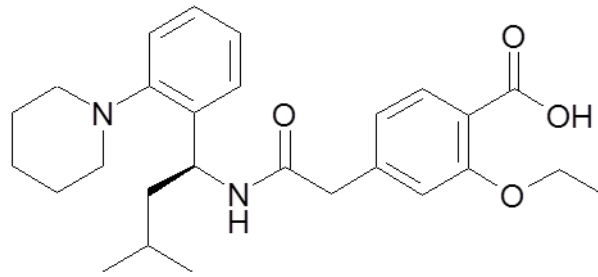


図 1-11 レパグリニドの構造式

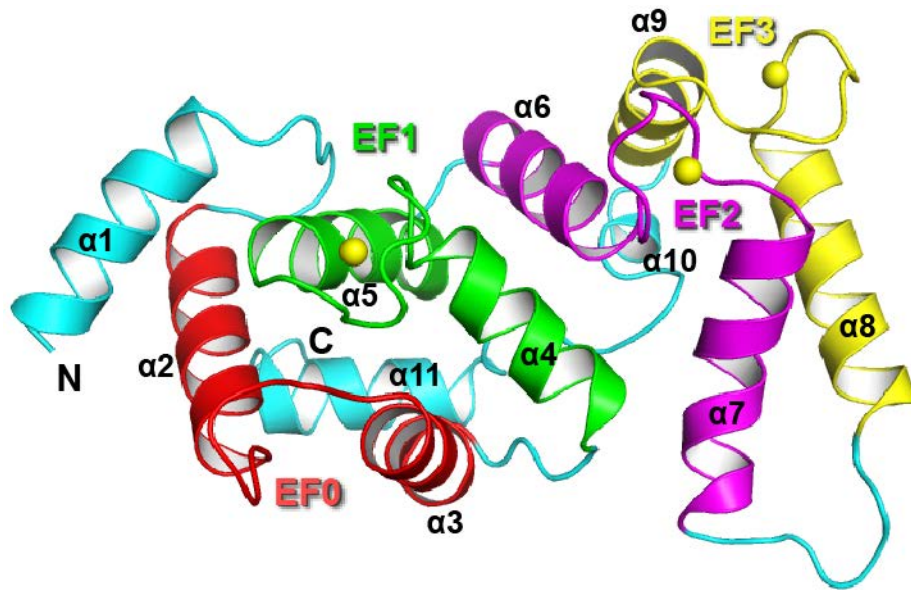


図 1-12 カルシウムイオン結合型のカラクシンの結晶構造

カラクシンのアミノ酸配列のうち、2-199 の領域を cartoon モデルで示した。また、非対称単位中の 2 分子のうち、B 鎖(open state)の方のみ示した。タンパク質の N 末端と C 末端はそれぞれ「N」と「C」で示した。構造中の α -ヘリックスは N 末端から $\alpha 1$ - $\alpha 11$ で示し、カラクシンに含まれる 4 つの EF-hand motif である EF0 (23-55), EF1 (60-92), EF2 (95-129), EF3 (137-170)をそれぞれ red, green, magenta, yellow で色分けして示した。カルシウムイオンは yellow の sphere モデルで示した。

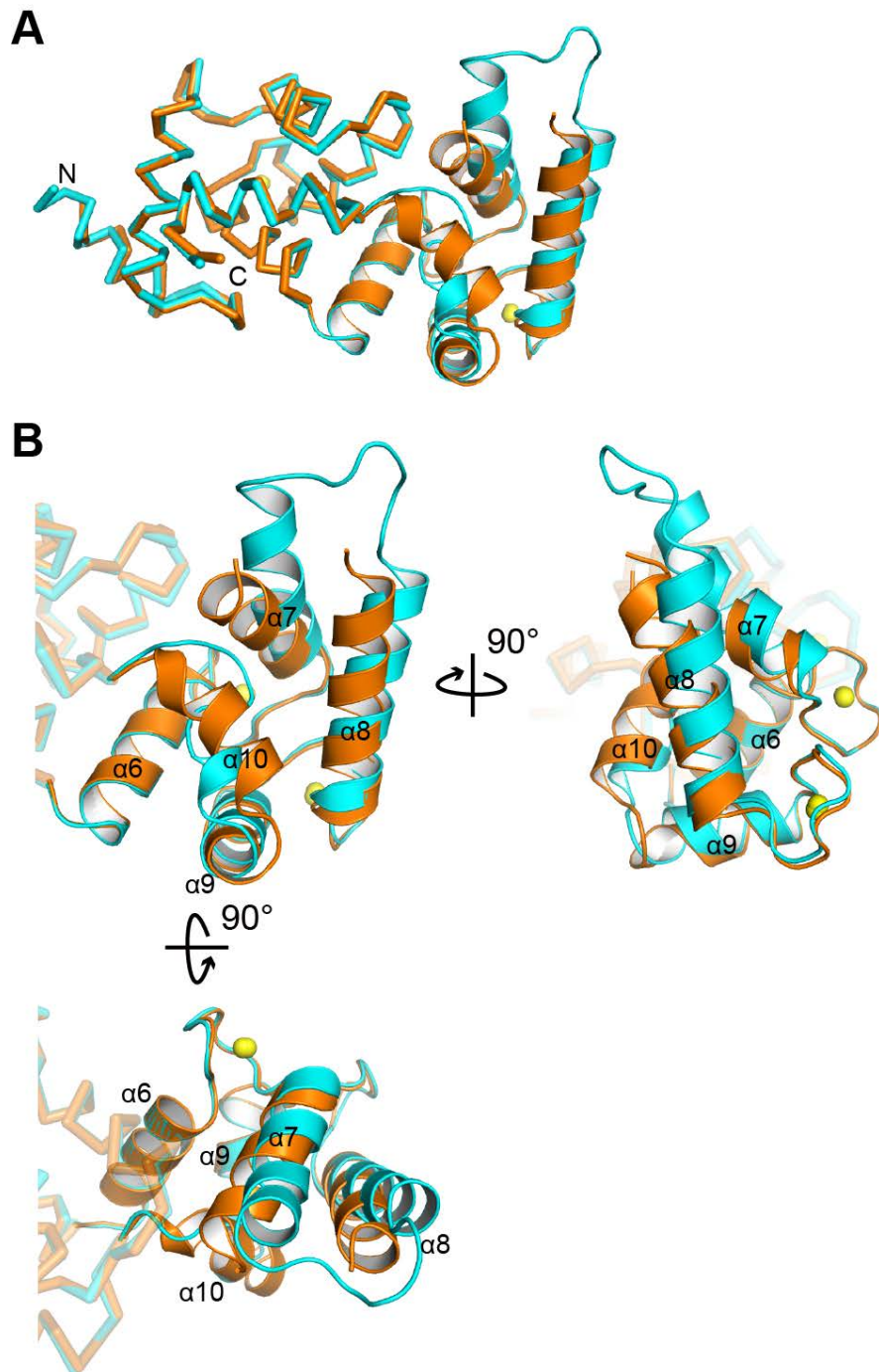


図 1-13 カルシウムイオン結合型カラクシンの open state と closed state の構造
 (A)open state (cyan)と closed state (orange)の状態の結晶構造の重ね合わせ。 N-terminal domain を ribbon モデル, C-terminal domain を cartoon モデルで示した。タンパク質の N 末端と C 末端はそれぞれ「N」と「C」で示した。カルシウムイオンは yellow の sphere モデルで示した。
 (B)C-terminal domain の拡大図。カルシウムイオンは yellow の sphere モデルで示した。

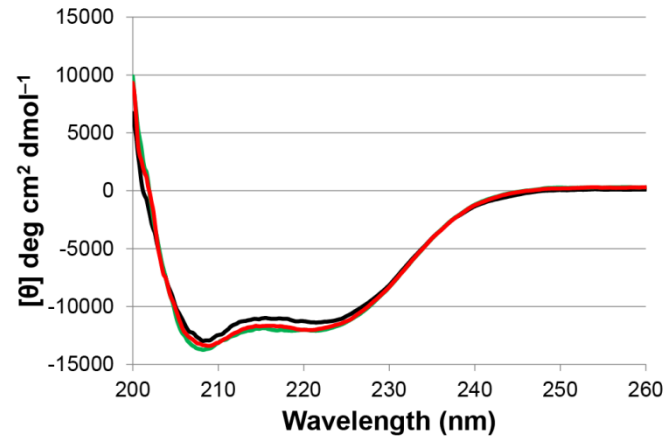


図 1-14 カラクシンの CD スペクトル

アポ型, マグネシウムイオン結合型, カルシウムイオン結合型のスペクトルをそれぞれ黒, 緑, 赤の実線で示した.

第二章

マグネシウムイオン結合型の カラクシンの結晶構造

2-1 マグネシウムイオン結合型のカラクシンの X 線結晶構造解析

カラクシンのマグネシウムイオン結合型の構造を明らかにするために、X 線結晶構造解析法を試みた。X 線結晶構造解析とは、X 線のある物質の結晶に照射し、その X 線が回折を観測することによって、結晶内部における原子の三次元的な位置情報を明らかにする手法である。この手法はタンパク質の立体構造解析にも古くから用いられており、タンパク質の立体構造のデータベースである Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)には、X 線結晶構造解析法で決定されたタンパク質の立体構造が 10 万件以上登録されている。タンパク質においては、タンパク質の結晶に X 線を照射することで、その X 線の回折から検出器でデータ収集をし、コンピューターによる解析を経て立体構造が決定される。

今回は、カルシウムイオン結合型のカラクシンの場合と同様に、マグネシウムイオンが添加されたカラクシン溶液を用いて結晶を作製し、その結晶を使って X 線結晶構造解析を試みた。

2-1-2 実験方法

2-1-2-1 カラクシンの発現系構築

タンパク質の結晶の取得には高濃度のタンパク質溶液が必要となるため、大量のカラクシンを得るために大腸菌を用いたタンパク質の大量発現系を構築した。大腸菌用のタンパク質発現プラスミドは前任者によって構築された。使用したプラスミドは pET-28a(+)で、*NdeI* と *BamHI* の 2 種類の制限酵素処理によって、両制限酵素の切断配列の間にカラクシンの配列を挿入することによって発現系が構築された(表 2-1)。このカラクシンの配列が挿入されたプラスミドを用いて、大腸菌 K12 株由来の KRX (promega)を形質転換させることで、大腸菌による発現系を構築した。pET-28a(+)には *NdeI* の認識配列の上流に 6 つの His が連続で並んだ His タグがコードされた塩基配列と、thrombin により切断されるアミノ酸配列がコードされた塩基配列が含まれているため、発現させたカラクシンの N 末端には His タグとその His タグを切断するための thrombin 認識配列が付加されている。また、KRX はラムノースプロモーターで制御される T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有する大腸菌株で、対数増殖期にラムノースが添加されることで、T7 RNA ポリメラーゼの発現が誘導され、その結果として大腸菌に導入したプラスミド内の T7 プロモーターが活性化し、プロモーター下流にコードされた目的タンパク質の発現が誘導される。

形質転換においては、初めに 1 μL のプラスミド溶液(濃度は特に調整しない)に対して 50 μL のコンピテントセルと混合して、10 min 氷冷をした。その後、42°C のウォーターバス内で 45 sec インキュベートした後、すぐに 5 min 氷冷をした。そして、250 μL の LB 培地を

添加した後に 37°C で 1 時間振とう培養を行った。培養後の菌体から 100 μ L を使って LB 寒天プレートに塗り、37°C で 1 晩静置培養を行うことで、コロニーを成長させた。

カラクシンの大量発現のために、初めに前培養のために試験管内に 10 mL の LB 培地を用意し、各試験管に終濃度 20 μ g/ μ L のカナマイシンを添加した。そして、形質転換させた KRX のコロニーを各試験管に植菌し、30°C で一晩振とう培養を行った。次に、タンパク質を大量発現させるための本培養用の培地として、5 L 容のフラスコ内に 2 L の LB 培地を用意し、各フラスコに終濃度 20 μ g/ μ L のカナマイシンを添加した。その各フラスコに、大腸菌が対数増殖期に達した前培養液(本培養用培地 1 L につき 10 mL の前培養液)を添加し、37°C で振とう培養を開始させた。そして、600 nm の波長の光によって菌体濁度(OD₆₀₀)を測定し、OD₆₀₀ が 0.6–0.8 の範囲に達した時点でフラスコを氷冷させた。培地を冷やした後、各フラスコに終濃度 0.1% の L-(+)-Rhamnose を添加し、20°C で振とう培養を一晩行い、カラクシンの大量発現の誘導を行った。誘導時間が 16-18 時間になったところで、6,000 rpm, 10 min, 4°C の条件で遠心を行い、集菌を行った。菌体は液体窒素で凍結させ、使用するまで -80°C で保存をした。

2-1-2-2 マグネシウムイオン結合型カラクシンの精製

初めに、Ni アフィニティカラムを用いて、His-tag アフィニティ精製を行った。まず、-80°C 内で保存していた菌体を室温で自然融解させ、培地 1 L 分の菌体につき 60 mL の Binding buffer で菌体を懸濁させた。この菌体破砕液に対し、超音波破砕機 Sonifier 250D (Branson)を用いて菌体破砕を行った。菌体破砕後の溶液を、40,000 \times g, 30 min, 4°C で遠心、上清の可溶性画分を分取した。次に、エコノパックカラム(Bio-Rad)に 2 mL の Ni-NTA Superflow (Qiagen)を詰め、20 mL の Binding buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole)をカラムに流すことによって樹脂を平衡化させた。そして、可溶性画分をカラムに流し、画分内のタンパク質を樹脂に吸着させた。その後、20 mL の Binding buffer をカラムに流し、樹脂を洗浄して夾雑タンパク質を溶出させた。続いて、より高濃度の imidazole を含んだ 20 mL の wash buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole)をカラムに流し、さらに夾雑タンパク質を取り除いた。最後に、250 mM の高濃度の imidazole が含まれた 20 mL の Elution buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole)をカラムに 2 回流し、His-tag 融合のカラクシンを溶出させた。

カラクシンを溶出させた後は、NaCl と imidazole を除去するために、2 L の Dialysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1mM DTT)中で 3 時間の透析を行った。NaCl は次の陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行うために除去し、imidazole は His-tag を切断させるための Thrombin の活性を阻害させないために除去した。3 時間経過した後は、透析内液に 50 units の Thrombin を添加し、同じ Dialysis buffer 中で引き続き一晩透析を行った。

透析後の透析内液は、 $8,000 \times g$, 10 min, 4°C の条件で遠心をし、遠心後の上清をさらにフィルター処理することによって、溶液中の沈殿やゴミなどの不純物を取り除いた。その後、ÄKTA (GE Healthcare) と陰イオン交換樹脂 RESOURCE Q 6 mL (GE Healthcare) を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。陰イオン交換クロマトグラフィーでは、Buffer A (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 10 mM MgCl_2) に対し、Buffer B (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 10 mM MgCl_2 , 300 mM NaCl) による塩濃度の濃度勾配をかけることによって、目的タンパク質を溶出させた。溶出液は、280 nm の波長の光と 260 nm の波長の光を照射してそれらの吸光度により検出をした。陰イオン交換クロマトグラフィーによって確認された 2 つのピーク部分(塩濃度の低い方から peak 1_{Mg}, peak 2_{Mg}) に関して、SDS-PAGE によって精製純度の確認を行った。その後、peak 1_{Mg} を回収してひとつにまとめ、遠心濃縮チューブ VIVASPIN 20 MWCO 10,000 PES を用いて、 $5,000 \times g$, 4°C の条件で遠心をし、液量が 1 mL になるまで遠心濃縮を行った。

濃縮後の溶液から沈殿やゴミなどの不純物を取り除くために 15,000 rpm, 5 min, 4°C の条件で遠心をして、その上清を使ってゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行った。ゲル濾過クロマトグラフィーは、ÄKTA とゲル濾過クロマトグラフィーカラム Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) を用いて、SEC buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM MgCl_2) をカラムに流すことで行った。溶出液は、280 nm の波長の光と 260 nm の波長の光を照射することで、それらの吸光度により検出をした。精製によって確認されたピーク部分に関して SDS-PAGE を行い、純度の確認を行った。

2-1-2-3 マグネシウムイオン結合型カラクシンの結晶化

2-1-2-2 で得られたマグネシウムイオン結合型のカラクシンに終濃度 100 mM の MgCl_2 を添加し、VIVASPIN 20 MWCO 10,000 PES を用いて 12 mg/mL の濃度になるまで濃縮して結晶化に用いた。結晶化においては、初めに結晶化条件の一次スクリーニングとして、PEGs Suite (Qiagen), PEGs II Suite (Qiagen), Crystal Screen (Hampton Research) の結晶化キットを試した。ドロップの作製の際は、500 nL のタンパク質溶液と 500 nL のリザーバー溶液を混合した。プレートは 20°C のインキュベーター内に置き、結晶の作製を行った。その結果、PEGs II Suite の G2 のウェルの条件(0.2 M ammonium sulfate, 0.1 M MES pH 6.5, 30% (w/v) PEG 5000 MME) で微細な結晶が得られた。その後、PEGs II Suite の G2 の条件を基に、MES の pH と沈殿剤である PEG 5000 MME の濃度を変えて結晶化条件の最適化を行った。その結果、0.2 M ammonium sulfate, 0.1 M MES pH 6.3, 26% (w/v) PEG 5000 MME のリザーバー条件で結晶の大きさの改善が見られた。さらに、大きさの改善を行うために、Additive Screen (Hampton Research) キットを用いて、上記のリザーバー溶液に添加物を加えることで結晶の改善を試みた。その結果、A1 の条件(10 mM Barium chloride) で複数の結晶が得られ、X 線照射によって回折斑点を観測することができた。

2-1-2-4 ITC 用アポ型カラクシンの精製

アポ型カラクシンの透析とタグの切断のステップまでは、2-1-2-2 のマグネシウムイオン結合型のカラクシンの精製と同じ精製を行った。

その後、透析後の透析内液を $8,000 \times g$, 10 min, 4°C の条件で遠心し、遠心後の上清をフィルター処理することによって、溶液中の沈殿やゴミなどの不純物を除去した。その後、ÄKTA と陰イオン交換樹脂 RESOURCE Q 6 mL を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。陰イオン交換クロマトグラフィーでは、Buffer A (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT) に対し、Buffer B (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 500 mM NaCl) による塩濃度の濃度勾配をかけて目的タンパク質を溶出させた。溶出液は、280 nm の波長の光と 260 nm の波長の光を照射した際の吸光度により検出をした。陰イオン交換クロマトグラフィーによって確認されたピーク部分に関して、SDS-PAGE によって精製純度の確認を行った。その後、ピークを回収してひとつにまとめ、遠心濃縮チューブ VIVASPIN 20 MWCO 10,000 PES を用いて、 $5,000 \times g$, 4°C の条件で液量が 1 mL になるまで遠心濃縮を行った。

濃縮後の溶液から沈殿やゴミなどの不純物を取り除くために 15,000 rpm, 5 min, 4°C の条件で遠心をした。遠心後の上清を使って ÄKTA とゲル濾過クロマトグラフィーカラム Superdex 75 10/300 GL を用いてゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行った。ゲル濾過クロマトグラフィーでは、SEC buffer (25 mM MOPS-KOH pH 7.8, 200 mM NaCl, 1 mM DTT) をカラムに流すことで行った。溶出液に対しては、280 nm の波長の光と 260 nm の波長の光を照射することで、それらの吸光度により検出をした。精製によって確認されたピーク部分に関して SDS-PAGE で純度の確認を行った。

2-1-2-5 ITC を用いたバリウムイオン滴定

マグネシウムイオン結合型カラクシンの結晶化の際には、バッファー中に MgCl_2 を含んだ状態で結晶化を行ったが、リザーバー中に BaCl_2 が含まれていたため、カラクシン中のマグネシウムイオンが同じ 2 価イオンのバリウムイオンに置き換わっていないかどうかを調べるために ITC を行った。測定は、MicroCal iTC200 (GE Healthcare) を用いて行い、 25°C の条件で滴定を行った。サンプルセルには $200 \mu\text{L}$ の $35 \mu\text{M}$ カラクシン溶液を入れ、初めにシリンジから 0.8 mM BaCl_2 を $0.4 \mu\text{L}$ 滴下し(捨て滴定)、その後は $1.5 \mu\text{L}$ ずつ 25 回滴定することで、反応熱を測定した。測定パラメーターは以下の条件を用いた。

Total Injections	26
Reference Power	5
Initial Delay	60
Stirring Speed	1000

また、サンプルセルにバッファー(タンパク質が含まれていない)を入れ、同様に 0.8 mM BaCl₂を滴定したデータをコントロールとした。データの解析は Origin 7 を用いて行い、捨て滴定のデータは消し、カラクシンに BaCl₂を滴定した測定値からコントロールの測定値を引いたものについて解析を行った。

2-1-2-6 マグネシウムイオン結合型カラクシンの X 線結晶構造解析

2-1-2-3 で得られた結晶を用いて、X 線結晶構造解析を行った。X 線照射実験の際は、X 線による結晶のダメージを軽減させるために窒素ガスで結晶を凍結させて測定する 경우가しばしばあるが、その際に水の結晶が発生することでタンパク質の結晶が破壊されたり、アイスリングと呼ばれる水の結晶由来の回折像が出現して構造解析を困難にさせてしまう問題が生じうる。そのため、氷の結晶生成を防ぐためにタンパク質の結晶を抗凍結剤と呼ばれる試薬で処理することがある。今回の実験では、X 線照射前に結晶を抗凍結剤である 20% ethylene glycol に浸し、95 K の窒素ガスによって凍結させた。構造解析のためのデータは、Photon Factory のビームライン AR-NW12A にて取得した。結晶に照射した X 線の波長は 1.0 Å のものを用い、検出器には ADSC Quantum 270 を用いてデータセットを取得した。X 線照射の際は、カメラ長を 500 mm、露光時間を 0.5 sec、振動角を 0.5°で 720 枚のデータを取得した。得られたデータセットは XDS を用いてデータ処理を行った(Kabsch, 2010)。データ処理後、位相決定のために、カルシウムイオン結合型のカラクシンからカルシウムイオンを除いた結晶構造を鋳型として、分子置換用のプログラムである Molrep によって分子置換を行った(Vagin & Teplyakov, 2010)。位相決定を行った後は、構造のモデリングのプログラムである Coot を使った構造の手動によるモデリング(Emsley *et al.*, 2010)と、構造の精密化のためのプログラムである Refmac を使った精密化(Murshudov, 2011)を繰り返し、最終的なマグネシウムイオン結合型カラクシンの構造を決定した。精密化の際には、結晶が単結晶でない twin になっていた可能性があったことから(twin fraction = 0.15), twin refinement を適用した。本論文中に示したカラクシンとその他のタンパク質の結晶構造の図は、全て PyMOL (<https://pymol.org/>)を用いて作成した。

2-1-3 実験結果

2-1-3-1 マグネシウムイオン結合型カラクシンの精製・結晶化

マグネシウムイオン結合型のカラクシンを精製するために、初めに His-tag を利用したアフィニティ精製を行った(図 2-1). SDS-PAGE の結果から、菌体破砕液および遠心後の上清に His-tag 融合のカラクシンの分子量(25935.63)に合ったバンドが確認でき、目的タンパク質が可溶性に発現していることが確認された。また、His-tag 融合のカラクシンを Ni-NTA Superflow に吸着させた後、50 mM imidazole の含まれたバッファーで樹脂を洗浄し(Wash), 250 mM imidazole の含まれたバッファーでタンパク質を溶出させ(Elution 1, Elution 2), His-tag 融合のカラクシンが 250 mM imidazole の含まれたバッファー条件で溶出されたことを確認した。溶出後、Thrombin をタンパク質溶液に添加し、His-tag が切断されたことを確認した。

続いて、His-tag 切断後のカラクシン溶液を用いて、陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った(図 2-2 A, B). 陰イオン交換クロマトグラフィーの結果、NaCl の濃度勾配をかけたところで、2つの大きなピークが現れた。塩濃度の低い方のピークを「peak 1_{Mg}」、塩濃度の高い方のピークを「peak 2_{Mg}」と名付け、それぞれのピークを別々に回収した(図 2-2 A). また、SDS-PAGE の結果、どちらのピークもカラクシンのピークであることを確認した(図 2-2 B). 前任者のゲル濾過クロマトグラフィーによる解析から、peak 1_{Mg} は単量体、peak 2_{Mg} は 2 量体を形成していることが明らかになった(図 2-3). その後、各ピークのタンパク質画分を濃縮し、それぞれを結晶化させた。一次スクリーニングを試した時点で、peak 1_{Mg} の画分は微結晶が得る条件が見つけれられたが、peak 2_{Mg} の画分は全く結晶が形成されなかった。そのため、以降の結晶化では peak 1_{Mg} の画分のみを用いることにした。

次に、peak 1_{Mg} の純度の改善のため、ゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行った(図 2-4 A, B). ゲル濾過クロマトグラフィーの結果、大きい単分散のピークより溶出体積が小さい所に、もうひとつ小さいピークが現れた(図 2-4 A). SDS-PAGE の結果から、どちらのピークもカラクシンのピークであり、純度も高いものであることを確認した(図 2-4 B). よって、これらのピークはカラクシンの会合状態の違いにより、溶出体積の異なる場所で溶出されたと考えられる。同じタンパク質であっても、会合状態の異なるものが混在していると結晶形成が阻害されうると考え、大きいピークのみを回収し、濃縮した後、結晶化を行った。一次スクリーニングの段階では、PEGs II Suite の G2 のウェルの条件(0.2 M ammonium sulfate, 0.1 M MES pH 6.5, 30% (w/v) PEG 5000 MME)で微結晶が得られた(図 2-5 A). その後、一次スクリーニングの結晶化条件を基に Additive Screen (Hampton Research) を用いた二次スクリーニングを行い、0.2 M ammonium sulfate, 0.1 M MES pH 6.3, 26% (w/v) PEG 5000 MME, 10 mM Barium chloride のリザーバー条件で一次スクリーニングでの結晶よりも大きい結晶を得ることが出来た(図 2-5 B, C).

バリウムイオンはマグネシウムイオンと同じ 2 価の金属イオンであるため、EF-hand motif にはバリウムイオンが結合する場合がある(Kumar *et al.*, 2012). そのため、得られたカラクシンの結晶ではバリウムイオンではなくマグネシウムイオンが結合していること

を示すために、ITCによってマグネシウムイオンを結合させたカラクシンにバリウムイオンを滴下することでイオンの置換による反応熱が生じるかどうかを確認した。まず初めに、アポ型のカラクシンを調製し、His-tag アフィニティ精製、陰イオン交換精製(図 2-6 A, B), ゲル濾過精製を経て(図 2-7 A, B), 純度の高いタンパク質を得ることに成功した。サンプルセル中の 200 μL の 35 μM カラクシン溶液(終濃度 1 mM の MgCl_2 が含まれている)に対し、0.8 mM BaCl_2 を 1.5 μL ずつ 25 回滴定した結果、有意な反応熱は生じなかった(図 2-8)。この結果は、カラクシンに結合したマグネシウムイオンはバリウムイオンに置き換わることがない、ということを示唆している。ITC 終了時でのカラクシン、マグネシウムイオン、バリウムイオンの終濃度はそれぞれ 29.5 μM , 842 μM , 126 μM であり、結晶構造中のカラクシン、マグネシウムイオン、バリウムイオンの終濃度はそれぞれ 505 μM , 100 mM, 10 mM である。つまり、ITC 中でのカラクシン、マグネシウムイオン、バリウムイオンの終濃度の比は約 5:140:21, 結晶構造中のカラクシン、マグネシウムイオン、バリウムイオンの終濃度の比は約 1:200:20 (5:1000:100)となる。ITC 中での条件と比べて、結晶中でのバリウムイオンに対するマグネシウムイオンの比は高く、ITC ではマグネシウムイオンからバリウムイオンへの置換が起きなかったことから、結晶中でもバリウムイオンへの置換は起きず、結晶にはマグネシウムイオンが結合していたと考えられる。

また、結晶中に結合しているイオンがバリウムイオンでないことを示すため、結晶に X 線を当てることで、バリウムイオンの異常分散シグナルが見られるかどうかを確認した(図 2-9)。その結果、1.0 Å の X 線の照射においては、バリウムイオンによる異常分散シグナルは確認できなかった。この結果からも、バリウムイオンがカラクシンに結合していないことがしめされた。以上の ITC と異常分散シグナルの検証結果から、今回得られた結晶はマグネシウムイオン結合型のカラクシンの結晶であると決定した。

2-1-3-2 マグネシウムイオン結合型カラクシンの結晶構造

Photon Factory で取得したデータセットを用いて、マグネシウムイオン結合型のカラクシンの結晶構造解析を行った。はじめにプログラム XDS を用いて X 線回折データの積分と規格化を行った。そして、マグネシウムイオン結合型のカラクシンの結晶構造の空間群として、カルシウムイオン結合型のカラクシンの結晶構造の空間群と同じ $P4_3$ であると決定した。また、格子定数は $a = b = 65.3 \text{ \AA}$, $c = 113.2 \text{ \AA}$ であり、カルシウムイオン結合型のカラクシンとほぼ同じ格子定数の値が得られた。構造のモデリングと精密化の結果、構造精密化の指標である R_{work} と R_{free} の値がそれぞれ 16.3, 21.2 まで下がり、また各アミノ酸の構造の立体的な許容範囲を示すラマチャンドラプロットにおいても 95.84% が「Most favorable」に指定されたことから、決定した構造は妥当であると判断した。その他の X 線回折データに関する各統計値は表にまとめて記した(表 2-2)。

マグネシウムイオン結合型のカラクシンの結晶構造は、カルシウムイオン結合型のカラ

クシンの結晶構造と同様に 11 つの α -ヘリックス($\alpha 1$ - $\alpha 11$)によって構成されていた(図 2-10 A-C). また, マグネシウムイオン結合型の結晶構造においても, 4 つの EF-hand の構造が確認された(EF0: 23-55, EF1: 60-92, EF2: 95-129, EF3: 137-170). カルシウムイオン結合型と同様に, マグネシウムイオン結合型のカラクシンの結晶構造には非対称単位中に 2 つの分子が存在しており, さらにそれぞれの分子が open state と closed state の 2 状態の構造をとっていた. open state (PDB ファイル上での Chain B)においては主鎖の電子密度が 5-125 および 136-198 の残基, closed state (PDB ファイル上での Chain A)においては 4-127 および 138-198 の残基で確認され, モデリングを行うことが出来た. open state の 126-135 および closed state の 128-137 の残基の電子密度が見られなかったのは, この領域で構造の揺らぎが大きく, 特定の立体構造をとっていないことが原因であると考えられる.

マグネシウムイオン結合型のカラクシンの構造はカルシウムイオン結合型と同様, 構造のまとまりから N-terminal domain ($\alpha 1$ - $\alpha 5$, $\alpha 11$)と C-terminal domain ($\alpha 6$ - $\alpha 10$)の 2 つのドメインに分けることが出来た(図 2-10 B). なお, C 末端のヘリックス($\alpha 11$)は, 位置している場所の都合上, N-terminal domain に含まれている. N-terminal domain と C-terminal domain の間は, $\alpha 5$ と $\alpha 6$ の間のリンカーと $\alpha 10$ と $\alpha 11$ の間のリンカーの, 2 つのリンカーによって接続されていた. 各ドメインは 2 つずつの EF-hand motif によって形成されており, EF0 と EF1 がループ部分で接することで N-terminal domain を形成し, 同様に EF2 と EF3 がループ部分で接することで C-terminal domain を形成していた.

2-1-3-3 マグネシウムイオン結合型の open state と closed state の構造比較

マグネシウムイオン結合型のカラクシンの結晶構造はカルシウムイオン結合型と同様に, 非対称単位中に open state と closed state の 2 つの状態の分子が見られた(図 2-10 A, C). マグネシウムイオン結合型の open state と closed state の構造を重ね合わせた結果, RMSD (Root Mean Square Deviation)の値は 0.507 Å であり, 全体的に似た構造をとっていた(図 2-10 C). しかし, 重ね合わせた構造を見ると, N-terminal domain の構造はよく重ね合わせることができたが, C-terminal domain は $\alpha 7$ と $\alpha 8$ の配向が異なっていた. また, 結晶構造中のパッキングを見ると, closed state における $\alpha 8$, $\alpha 10$, そして $\alpha 9$ と $\alpha 10$ の間のループが open state の状態の構造において露出している疎水性ポケットと接していた. カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型を比較して, 類似した open state と closed state のふたつの状態の構造が見られ, さらに結晶中のパッキングも同様な配向で形成されていることから, 結晶構造で見られた open state と closed state のふたつの状態は, 結合している金属イオンの種類に依るものではなく, X 線結晶構造解析における結晶のパッキングの影響が大きく, カルシウムイオン結合型とマグネシウム結合型の全体構造の違いが現れなかったのではないかと考えられる. また, マグネシウムイオン結合型の結晶構造の構造因子(B-factor)に着目すると, N-terminal domain は全体的に B-factor の値が小さいのに対し, C-terminal domain では

全体的に B-factor の値が高くなっていった(図 2-11). B-factor は原子の熱運動の大きさを表し, B-factor の値が大きいほど構造のゆらぎが大きいと解釈ができる. このことから, C-terminal domain は構造の中でもゆらぎの大きい部分であることが考えられ, カルシウムイオンやダイニンの結合によってもたらされる構造変化が起きやすい領域ではないかと考えられる.

結晶構造を見ると, N-terminal domain と C-terminal domain のそれぞれに, 疎水性のポケットが存在していた(図 2-12 A-C). これらのポケットはカルシウムイオン結合型でも同様に存在していた. C-terminal domain の疎水性ポケットを形成している残基のうち, closed state あるいは open state で電子密度が見えなかったものを除いたアミノ酸残基は, L123, G139, I140, L143, I146, A147, M151, L173, L174, A177, F178, G179 であった. これらのアミノ酸残基を結晶構造中でマッピングすることで疎水性ポケットの形状を調べたところ, open state と closed state において, C-terminal domain の $\alpha 7$ と $\alpha 8$ の配向の違いによって, 疎水性ポケットの形状に違いが生じていた(図 2-12 B, C). closed state と比べて, open state では L173 の位置がシフトし, 疎水性ポケットを少し広げていた. また, closed state と比べて, open state では $\alpha 7$ と $\alpha 8$ の配向がより分子の外側へ向き, それに伴って $\alpha 10$ の一部がループになったことで, A177, F178, G179 の 3 つのアミノ酸残基が $\alpha 7$ と $\alpha 8$ に引きずられるように分子の表面に移動し, 疎水性ポケットを広くしていた. また, それと同時に, $\alpha 7$ に存在する疎水性残基 L123 が分子表面に移動し, open state の疎水性ポケットをより大きく広げていた.

マグネシウムイオン結合型の結晶構造のパッキングにおいては, open state と closed state の 2 状態の構造が, C-terminal domain の疎水性ポケットが互いに向かい合うような形で接していた(図 2-13). 両者のパッキングの様式において特徴的な点は, open state での $\alpha 7$ は接触界面に存在してパッキングに関与しているが, closed state での $\alpha 7$ はほとんど関与していない. 実際に, $\alpha 7$ の疎水性残基(L123, C126, L127)は, closed state では open state に比べてポケット表面に露出している面積が小さくなっていた. また, closed state では $\alpha 7$ と $\alpha 8$ の間のループの残基の位置が決められていなかったが, 電子密度が見られなかったということはその部分の構造が特定の位置をとらずに揺らぎが大きいということを示唆しているため, これらの残基がパッキングに影響している可能性は低いと考えられる. 今回得られた結晶構造は, カラクシンが相互作用パートナーと結合する際には, その結合には複数の様式が存在するというを示唆している. 実際に生理的環境下でカラクシンが open state あるいは closed state での構造によって相互作用をするかどうかは厳密には明らかではないが, カラクシンはダイニンや β -チューブリン, ダイニン中間鎖(IC2)といった複数の種類の分子と結合することが知られているため, カラクシンの結合様式が複数存在するという可能性は理にかなっていると考えられる.

2-1-3-4 カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型の構造比較

カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型の構造を重ね合わせ, RMSD を計

算した結果、0.516 Å と計算され、両者の構造は非常に似ていることが明らかになった(図 2-14 A). また、カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型の closed state 同士あるいは open state 同士の構造を重ね合わせると、RMSD はそれぞれ 0.334 Å, 0.272 Å となった(図 2-14 B).

カラクシンのマグネシウムイオン結合型はカルシウムイオン結合型と同様に、構造中に 4 つの EF-hand motif を含んでいた(図 2-10). しかし、マグネシウムイオン結合型のカラクシンにおいては、open state においては EF1, EF2, EF3 の 3 箇所 EF-hand にマグネシウムイオンの電子密度が確認できたが、closed state においては EF1 と EF2 にのみマグネシウムイオンの電子密度が見られ、EF3 には電子密度が存在していなかった(図 2-15 A, B). また、closed state の EF3 の側鎖はイオンを配位できるような配向をとっていないことも、電子密度から明らかになった. open state と closed state の両方の状態の分子で EF1, EF2, EF3 の 3 箇所にイオンが結合していたカルシウムイオン結合型の構造を比べて、この結果は大きな違いであった.

また、カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型において見られた違いは、EF0 のループ領域の構造であった(図 2-16). EF0 は EF-hand motif のコンセンサス配列が保存されておらず、結晶構造中においてはカルシウムイオンもマグネシウムイオンも結合していなかった. それにもかかわらず、両者の EF0 のループ領域は構造が異なっており、さらに電子密度も確認できることから、ループ領域は結晶中である程度特定の構造をとっていることが考えられる. 結晶構造中のパッキングを確認すると、カルシウムイオン結合型では open state と closed state の 2 つ状態の分子の Glu38 の側鎖が、2 つの分子の $\alpha 3$ の間に挟まるように存在していた. それに対して、マグネシウムイオン結合型では、closed state での構造の Glu38 の側鎖は、closed state での構造の $\alpha 2$ と open state での構造の $\alpha 11$ の間に挟まるように位置していた. このことから、EF0 のループは結晶形成のパッキングの際に 2 種類の配向をとりうるが、その違いは金属イオンの種類に依るものではないと考えられる.

2-1-3-5 各 EF-hand におけるマグネシウムイオンの配位様式

カラクシンには 4 つの EF-hand motif が含まれており、そのうち EF1, EF2, EF3 において金属イオン結合のコンセンサス配列が保存されていて、金属イオン結合能を有している. open state の状態の構造にはマグネシウムイオンが EF1, EF2, EF3 の 3 か所に結合していたが、closed state の状態の構造には EF1, EF2 の 2 か所でのみ結合していた.

EF1 においては、open state と closed state のいずれの状態においても、-Z 位の Glu 残基の側鎖による結合が二座配位ではなく一座配位となっていた(図 2-15 A, B). これは、カルシウムイオンに比べてよりイオン半径の小さいマグネシウムイオンを配位させるために、Glu 残基の側鎖のカルボン酸の片方の酸素原子をできるだけ α 炭素から遠くに伸ばすような構造をとったためと考えられる. また、通常-X 位には水分子などの酸素原子がイオンの配位

に関与するために存在するが、今回のカラクシンの結晶構造中には-X 位に電子密度は見られなかった。

EF2 におけるマグネシウムイオンの配位においては EF1 とは異なり、open state と closed state のいずれの状態においても、-Z 位の Glu 残基の側鎖による結合が二座配位となっていた(図 2-15 A, B)。EF1 と EF2 で大きく異なることは、EF1 のループのコンセンサス配列の 6 番目の残基は Ser であるのに対し、EF2 においては Gly であるという点がある。EF-hand のループの配列の 6 番目は、ループを大きく曲げられるように側鎖の小さい Gly 残基が高く保存されている。EF2 はループの配列の 6 番目の残基が Gly であることで、同じ位置の残基が Ser である EF1 よりもループをコンパクトに曲げることができ、-Z 位の Glu 残基の側鎖が二座配位でマグネシウムイオンと結合できる可能性がある。

EF3 においては、closed state ではマグネシウムイオンが配位していなかったが、open state では配位していた(図 2-15 A, B)。open state では EF1 と同様に、-Z 位の Glu 残基の側鎖による結合が一座配位であった。また、EF1 と同様、-X 位にはマグネシウムイオンとの結合に関わる原子の電子密度は見られなかった。closed state では、イオンの存在するであろう位置に電子密度が存在しておらず、さらにマグネシウムイオンの配位に関与する残基の側鎖の電子密度も不明瞭であった。このことから、closed state の状態における EF3 はマグネシウムイオンを配位する構造をとっておらず、マグネシウムイオンを配位することができなかつたと考えられる。さらに、イオンの配位によるループ構造の安定化が起きているかを調べるため、open state と closed state の 2 状態における、マグネシウムイオン配位に関与するアミノ酸残基の B-factor の値を比較した(表 2-3)。その結果、EF1 と EF2 の各残基では open state と closed state の 2 状態の構造で B-factor の値に大きな違いはなかったが、EF3 では closed state の状態では open state の状態の構造に比べて顕著に大きい B-factor の値を示した。このことから、closed state の状態での EF3 ではマグネシウムイオンが結合しないことで、open state の状態と比べて構造のゆらぎが大きく、B-factor の値が大きくなったと考えられる。以上のことから、closed state では open state と比べてマグネシウムイオンの親和力が低いことが示唆される。また、EF3 へのマグネシウムイオンに対する結合が限定的であるということは、EF1 や EF2 と比べると EF3 のマグネシウムイオンに対する結合力は低いということが考えられる。

2-1-3-6 金属イオンの EF-hand への配位距離

カルシウムイオンとマグネシウムイオンはイオン半径が異なり、カルシウムイオンのイオン半径は 1.06 Å、マグネシウムイオンのイオン半径は 0.72 Å である(Shannon, 1976)。イオンの存在する環境によってイオン半径に多少の変動はあるものの、マグネシウムイオンはカルシウムイオンに比べるとイオン半径は小さいことが知られる。結晶構造中では、カルシウムイオンと配位する酸素原子との距離の平均は約 2.4 Å であることが報告されている

(Einspahr & Bugg, 1981). 本研究では、構造が解かれたカルシウムイオン結合型およびマグネシウムイオン結合型のカラクシンについて、各金属イオンと配位に關与する酸素原子の距離を測定した。また、結晶構造が解かれている他の EF-hand タンパク質についても、金属イオンと酸素原子の配位距離を測定し、カラクシンとの比較を試みた。

初めに、カラクシンにおける金属イオンの配位距離を測定した(表 2-4)。カルシウムイオン結合型に関してみると、多くの配位距離は 2.2–2.4 Å の範囲に収まっていることが明らかになった。この距離は、上述したカルシウムイオンの配位距離とほとんど一致している。また、open state と closed state の 2 状態の結晶構造を比較しても、EF1 同士、EF2 同士、EF3 同士では配位距離にほとんど変化がないことも明らかになった。このことから、カラクシン分子の構造の違いにかかわらず、カルシウムイオンの配位距離には大きな変化は起きないということが示唆された。

続いて、マグネシウムイオン結合型のカラクシンについて、マグネシウムイオンの配位距離を測定した。マグネシウムイオン結合型ではカルシウムイオン結合型の場合に比べて、2.0–2.2 Å の短い配位距離が観測された(表 2-4)。これは、マグネシウムイオンのイオン半径がカルシウムイオンのイオン半径よりも小さいことで、EF-hand のループがよりコンパクトになって配位するようになったと考えられる。しかし、カルシウムイオンの配位距離と比べると、マグネシウムイオンの配位距離は残基ごとで比較的ばらつきが大きかった。ばらつきが大きい原因としては、マグネシウムイオン結合型の結晶構造はカルシウムイオン結合型と比べると分解能が低く、金属イオンやアミノ酸残基の側鎖の位置のぶれが大きくなってしまったことが考えられる。

続いて、EF-hand タンパク質のうち、カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型の両方の構造が解かれているカルモジュリンに着目し、カルモジュリンの各金属イオンの配位距離を測定した。カルシウムイオン結合型のカルモジュリンでは、カラクシンとほぼ同様に多くの配位距離は 2.2–2.4 Å の範囲に収まっていた(表 2-4)。また、マグネシウムイオン結合型のカルモジュリンにおいては、一番 N 末端の EF-hand にしかマグネシウムイオンは結合していないが、イオンの配位距離が全て 2.0–2.2 Å の範囲に収まっており、カルシウムイオンの場合と比べて明らかに配位距離が短くなっていることが明らかになった(表 2-4)。マグネシウムイオン結合型の結晶構造の分解能は 1.8 Å と高い分解能であることから、結晶構造中の 4 つの chain において配位距離のばらつきはほとんどなかった。このことから、カルモジュリンにおいても、マグネシウムイオンの配位距離はカルシウムイオンに比べると短いということが示された。

また、EhCaBP1 (赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)由来のカルシウム結合タンパク質)においては、カルシウムイオン結合型とバリウムイオン結合型の結晶構造が決定されており、EhCaBP1 についても各金属イオンの配位距離を測定した。カルシウムイオン結合型においては、多くの配位距離は 2.4–2.5 Å の範囲に収まっていた(表 2-4)。それに対してバリウムイオン結合型では、一番 N 末端の EF-hand にのみバリウムイオンが結合しており、その配位

距離は 2.4–3.1 Å に収まっていた(表 2-4). ただし, バリウムイオンの結晶構造の分解能は 3.2 Å であり, 異なる chain において配位距離のばらつきが大きいことが明らかになった. バリウムイオンのイオン半径は 1.35 Å であり (Shannon, 1976), カルシウムイオンのイオン半径よりも大きいので, バリウムイオンの配位距離がカルシウムイオンの配位距離よりも長くなったと考えられる. 本研究で決定されたカラクシンのマグネシウムイオン結合型の結晶構造のイオン配位距離と比較すると, EhCaBP1 のイオン配位距離は長いことから, このことから今回のカラクシンの結晶にはバリウムイオンではなくマグネシウムイオンが配位していると考えられる.

2-2 等温滴定型熱量測定

2-2-1 カラクシンのカルシウムイオンおよびマグネシウムイオンの結合の解析

EF-hand タンパク質は, EF-hand motif にカルシウムイオンやマグネシウムイオンを結合させる. また, 実際にカラクシンの結晶構造においても, カルシウムイオンやマグネシウムイオンが結合している様子が確認された(図 2-15). そこで, カラクシンに対するカルシウムイオンやマグネシウムイオンの結合力を解析するために, 等温滴定型熱量測定(ITC)を行った.

ITC の原理を以下で説明する. まず, サンプルをある一定の温度に保てるような装置に充填する. そのサンプルに対し, 外からリガンド溶液を滴定する. もしサンプルとリガンドが結合することができれば, その結合によって反応熱(吸熱あるいは発熱)が生じる. 反応熱が生じた場合, その反応熱を打ち消してサンプルの温度を一定にするような外部電力が装置から与えられる. その外部電力を反応熱に換算し, サンプルとリガンドの結合の反応熱を測定する. 実際は, サンプルとリガンド溶液を混ぜた際の希釈熱も発生するため, リガンドが含まれないバッファーをサンプルに添加したものをブランクとし, リガンド溶液の滴定の際の反応熱から差し引くことで, サンプルとリガンドの反応熱を算出する. 実際の測定では滴定の回数は 1 回ではなく, 少量の滴定を複数回行ってそれぞれの反応熱を測定する.

ITC によって直接観測するのは, サンプルとリガンドの反応のエンタルピー変化(ΔH)と結合定数(K_a)である. さらに, 反応熱と結合定数から, 以下の式を用いることによってギブズの自由エネルギー変化(ΔG)とエントロピー変化(ΔS)を算出することができる.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = RT \ln K_a$$

なお, R は気体定数($1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T は温度(K)を表す.
また, 結合定数(K_a)と解離定数(K_d)は以下の関係がある.

$$K_a = \frac{1}{K_d}$$

カルシウムイオンやマグネシウムイオンの結合力を明らかにすることで、細胞内のイオン濃度と比較することでカラクシンが生体内でどちらのイオンと結合しているのかを推定することができる。

2-2-2 実験方法

ITC用のサンプルとして、アポ型のカラクシン溶液を調製した。アポ型のカラクシンの調製は、2-1-2-4に記載した方法で行った。

ITCには、MicroCal iTC200 (Malvern)を装置として用いた。カルシウムイオン滴定の際には、サンプルセル内に35 μM のカラクシン溶液を200 μL 取って注入して、1 mM CaCl_2 をリガンド溶液として用いた。また、マグネシウムイオン滴定の際には、40 μM のカラクシン溶液を200 μL 取ってサンプルセル内に注入し、そこに0.6 mM MgCl_2 を0.4 μL 滴下した後、25回1.5 μL ずつ滴下した。カルシウムイオンとマグネシウムイオンのいずれの滴定においても、測定は25°Cで行い、以下のパラメーターによって測定を行った。

Total Injections	26
Reference Power	5
Initial Delay	60
Stirring Speed	1000

測定後のデータの解析は、解析用のソフトウェア Origin (Malvern)を用いて行った。

2-2-3 実験結果

初めに、カルシウムイオンをアポ型のカラクシン溶液に滴下し、熱量変化を観測した(図2-17 A)。アポ型のカラクシンにカルシウムイオンを滴下した場合には、下向きの大きなピークが観測された。エンタルピー変化は負(下向きのピーク)では発熱、正(上向きのピーク)では吸熱を表すので、カラクシンへのカルシウムイオンの結合は発熱反応であることが示された。また、滴定を続けていくにつれて発熱量が下がっていき、滴定の中盤から後半にかけてはほとんど発熱が起こらないことが示された。これは、カルシウムイオンを添加していくことで、カラクシンへのカルシウムイオンの結合が飽和に達し、カルシウムイオンの結合による発熱が観測されなくなったことが原因だと考えられる。結晶構造中には1分

子のカラクシンに対して 3 つのカルシウムイオンが結合していたことから、データのフィッティングの際は「Sequential Binding Sites 3 sites」を用いてフィッティングカーブを描いた。また、測定結果を基に、カルシウムイオンがカラクシンに結合する際の K_d , ΔG , ΔH , ΔS を算出した(表 2-5)。3 sites でのフィッティングのため、熱力学パラメーターも 3 つ算出され、各結合サイトの解離定数は $2.75 \times 10^{-7} \text{ M}$, $4.27 \times 10^{-6} \text{ M}$, $1.14 \times 10^{-5} \text{ M}$ となった。EF-hand へのカルシウムイオン結合の際の結合力はタンパク質によって範囲が広く、解離定数の値が 10^9 M から 10^4 M ほどの値のばらつきがあることが知られている(Gifford *et al.*, 2007)。今回のカラクシンの場合でも、カルシウムイオンの解離定数はこの範囲に収まっていた。

続いて、アポ型のカラクシン溶液にマグネシウムイオンを滴下した際の熱量変化を観測した(図 2-17 B)。マグネシウムイオン結合の際もカルシウムイオン結合と同様に、下向きの大きなピーク、すなわち発熱反応が観測された。しかし、カルシウムイオン結合の場合とは異なり、滴定の後半でマグネシウムイオンの結合が完全に飽和に達することがなく、発熱量が緩やかに低下していった。データのフィッティングの際は「Sequential Binding Sites 3 sites」を用いてフィッティングカーブを描き、3 sites でのフィッティングにより、3 つの熱力学パラメーターを算出した。その結果、マグネシウムイオンの解離定数は $1.32 \times 10^{-6} \text{ M}$, $8.93 \times 10^{-6} \text{ M}$, $1.46 \times 10^{-5} \text{ M}$ となった。EF-hand タンパク質へのマグネシウムイオンの結合力はカルシウムイオンのものと比べると研究例が少ないが、カルシウムイオンよりも低いことが知られている。例えば、EF-hand タンパク質である 3 つのタンパク質、ミリストイリ化 NCS-1, visinin-like protein, CaBP1 のマグネシウムイオンに対する解離定数の値はそれぞれ $17 \mu\text{M}$ (Cox *et al.*, 1994), $208 \mu\text{M}$ (Cox *et al.*, 1994), $300 \mu\text{M}$ (Wingard *et al.*, 2005)である。今回の ITC の結果から算出されたカラクシンのマグネシウムイオンに対する解離定数の値も、概ね数 μM から百 μM の範囲に収まっていた。

カルシウムイオンとマグネシウムイオンは、金属イオンの中でも生体内に豊富に存在するものとして知られる。しかし、これら 2 種類の濃度を比較すると、マグネシウムイオンは恒常的に 2 mM 程度の濃度で生体内に存在するが、カルシウムイオンは定常状態では 10 nM 程度の濃度であり、マグネシウムイオンの方が十万倍ほど高い濃度で存在する。そのため、生体内では通常はカラクシンにはマグネシウムイオンが結合していると考え、マグネシウムイオンを結合させたカラクシンに対してカルシウムイオンを滴下し、その熱量を測定した(図 2-17 C)。ITC の結果、アポ型へのカルシウムイオン滴下あるいはマグネシウムイオン滴下の場合と同様に、発熱を生じることが明らかとなった。そして、「Sequential Binding Sites 3 sites」のフィッティングモデルを使ってフィッティングカーブを描き、解離定数を算出した。その結果、マグネシウム結合型のカラクシンへのカルシウムイオン滴下の際の結合定数は、アポ型のカラクシンへのカルシウムイオン滴下の際の結合定数に比べて全体的に高くなり、それぞれ $5.41 \times 10^{-8} \text{ M}$, $5.62 \times 10^{-7} \text{ M}$, $1.58 \times 10^{-6} \text{ M}$ となった。先行研究より、EhCaBP においては、マグネシウムイオンの結合によって、アポ型の場合よりもカルシウムイオンの結合がエネルギー的に有利になる結合サイトがあるということが示された

(Mukherjee *et al.*, 2007). 熱量測定の場合、 ΔH や $-T\Delta S$ が正の値をとることは、結果として ΔG の値が高くなり、 K_a の値が小さくなるので、エネルギー的に不利になることを示す。カラクシンの場合は、アポ型にカルシウムイオンを滴下した場合、3つの結合サイトのうち1つで ΔH が正の値をとり、別の結合サイトで、 $-T\Delta S$ が正の値をとった(表 2-5)。それに対して、マグネシウムイオン結合型にカルシウムイオンを滴下した場合は、3つ全ての結合サイトにおいて、 ΔH および $-T\Delta S$ が負の値をとった(表 2-5)。このことから、マグネシウムイオンはカラクシン分子全体に対して、カルシウムイオンの結合をエネルギー的に有利に働かせ、その結果として、カルシウムイオンの結合力が上昇したと考えられる。

2-3 SYPRO Orange を用いた熱安定性測定

2-3-1 C 末端ヘリックスの熱安定性に対する寄与

結晶構造から、N-terminal domain と C-terminal domain のそれぞれにおいて疎水性残基の集中した疎水性ポケットが存在することが明らかとなった。そのうち、N-terminal domain の疎水性ポケットは、 $\alpha 2$ (Leu29, Cys32, Leu36), $\alpha 3$ (Ile50), $\alpha 5$ (Trp83, Val84, Leu87) の各疎水性残基によって構成されていた(図 2-12 C)。また、この疎水性ポケットは、 $\alpha 11$ によって塞がれており、 $\alpha 11$ の疎水性残基(Phe191, Val195, Leu196)と疎水性相互作用を形成していることが明らかになった(図 2-18)。既に知られている NCS protein family のタンパク質の立体構造を比較すると、カラクシンの $\alpha 2$ - $\alpha 10$ に相当する構造のコアとなる部分は良く重ね合わせることができるが、C 末端の α -ヘリックスはタンパク質の種類によって様々な配向をとっていることが明らかになった(図 2-19 A-C)。そのことから、C 末端の α -ヘリックスの配向は、NCS protein family のタンパク質の機能や物性の違いに関わりがあるのではないかと考えた。NCS protein family の一種である NCS-1 の C 末端の α -ヘリックスの機能について調べられた研究があり、NCS-1 の C 末端の α -ヘリックスを削除した変異体では、変性剤であるグアニジン塩酸塩の添加による変性が野生型に比べてより低濃度で起こることが報告されている(Heidarsson *et al.*, 2012)。つまり、C 末端の α -ヘリックスは NCS-1 の構造の、変性剤への曝露に対する安定性に寄与しているということが示唆されている。なお、NCS-1 の C 末端の α -ヘリックスは C-terminal domain の疎水性領域と相互作用をしており、C 末端の α -ヘリックスが N-terminal domain と相互作用しているカラクシンとはその点は異なる。本研究ではカラクシンの C 末端の α -ヘリックスが N-terminal domain との疎水性相互作用によって構造の安定性に寄与していると仮定して、C 末端の α -ヘリックスを削除した変異体($\Delta\alpha 11$)を用いて熱安定測定を行った。

2-3-2 実験方法

2-3-2-1 カラクシン変異体 $\Delta\alpha 11$ の作製

熱安定性測定用の変異体として、カラクシンの 183 番目のアミノ酸残基から C 末端の残基までの領域のタンパク質, すなわちカラクシンの C 末端のヘリックスを削除した変異体 ($\Delta\alpha 11$) を作製した. 初めに, 以下の組成で反応液を調製し, 37°C のウォーターバス内で 1 晩制限酵素処理を行った.

<i>Nde</i> I (Takara)	1 μ L
10 \times H buffer (Takara)	2.89 μ L
pET-28a(+)	25 μ L
計	28.89 μ L

その後, アガロースゲル電気泳動を行って線状のベクターをゲルから切り出し, QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いてゲルからベクターを抽出した.

次に, カラクシンの N 末端から 182 番目のアミノ酸残基までの DNA を増幅するために PCR を行った. PCR のために, 以下の組成で反応溶液を PCR 用チューブ内に調製した.

10 μ M プライマー forward	1.5 μ L
10 μ M プライマー reverse	1.5 μ L
5 \times PrimeSTAR buffer (Takara)	10 μ L
dNTP Mix (Thermo Fisher)	4 μ L
4 ng/ μ L 野生型プラスミド	0.5 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
MilliQ	32 μ L
計	50 μ L

プライマーの配列は表 2-6 に記した.

続いて, PCR 反応液を用いて以下の条件で PCR を行った.

98°C	2 min	
↓		
98°C	10 sec	5 cycles
55°C	5 sec	
72°C	1 min	
↓		
98°C	10 sec	30 cycles
70°C	5 sec	
72°C	1 min	
↓		
72°C	5 min	
4°C	∞	

PCR 後の溶液は, QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)を用いて精製した.

続いて, 制限酵素処理した線状の pET-28a(+)と PCR 後の目的配列(インサート)を用いて, In-Fusion クローニングを行った. 初めに, 以下の組成で In-Fusion 反応液を調製した.

5 × In-Fusion HD Enzyme Premix (Takara)	2 μL
<i>Nde</i> I 処理後 pET-28a(+)	4 μL
20 ng/μL インサート	4 μL
<hr/>	
計	10 μL

In-Fusion 反応液は, 50°C のウォーターバス内で 15 min インキュベートした. そして, In-Fusion 後の溶液を用いて DNA のクローニングに用いられる大腸菌株 XL1-blue を形質転換させた. その後, Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega)を用いて XL1-blue からプラスミドを抽出した. 抽出したプラスミドの配列については, 株式会社ファスマックの DNA シーケンスの受託解析サービスを利用することで, 目的の DNA 配列が挿入されたことを確認した.

2-3-2-2 カラクシンの野生型と変異体の熱安定性測定

熱安定性測定には, real time PCR 用の装置と, タンパク質の疎水性表面に結合して蛍光を発する試薬である SYPRO Orange (Life Technologies)を用いた(Biggar *et al.*, 2012). タンパク質と蛍光試薬を混合した溶液に徐々に熱を加えていき, タンパク質が変性すると, タンパク質の内側に隠れていた疎水性残基が溶媒に露出してそこに蛍光試薬が結合し, 蛍光強度が上昇する. そして, 各温度に対する蛍光強度をプロットし, 蛍光強度曲線を作成し

た. この蛍光強度曲線を温度に対して一次微分をとり, 微分曲線を描いた. 元の蛍光強度曲線における, 低温時の初めの蛍光強度と最大の蛍光強度の中央の強度の温度が, 微分曲線における負の向きに大きなピークに相当するので, この微分曲線のピークをタンパク質の変性温度として示した.

熱安定性測定のサンプルを調製するために, 初めにアポ結合型のカラクシン溶液を調製した. アポ型のカラクシン溶液は, 野生型と変異体の両方について, 陰イオン交換精製までのステップは 2-1-2-4 で記した方法により調製をした. その後, カラクシン溶液を VIVASPIN 20 MWCO 10,000 PES を用いて, $5,000 \times g$, 4°C の条件で遠心をし, 液量が 1 mL になるまで遠心濃縮を行った. この濃縮液を沈殿やゴミなどの不純物を取り除くために 15,000 rpm, 5 min, 4°C の条件で遠心をして, その上清を使ってゲル濾過クロマトグラフィーによってバッファー交換(20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT)を行った. その後, 0.3 mg/mL に調製したカラクシン溶液を用いて, 20 μL のカラクシン溶液に対して 2.22 μL の SYPRO Orange を混合した. カラクシンと SYPRO Orange の混合溶液をプレートに入れ, real time PCR 用の装置である CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad)を用いて蛍光を検出した. 励起には 450-490 nm の波長の光を用い, 560-580 nm の検出波長において蛍光強度を測定した.

2-3-3 実験結果

図 2-20 A に温度を加えていった際の SYPRO Orange の蛍光強度を記した. 野生型のカラクシン(カルシウムイオン結合型)では, 50°C 付近までは直線的に蛍光強度が緩やかに低下していった. これは, 温度の上昇によって, SYPRO Orange がタンパク質から解離しやすくなったからだと考えられる. しかし, 50°C から 60°C までの範囲において蛍光強度の上昇が確認された. これはタンパク質の変性によって, タンパク質の内部の疎水性領域が露出し, SYPRO Orange が疎水性領域に結合して蛍光強度が上昇したからだと考えられる. 60°C より高温になると, 再び蛍光強度の低下が確認された. この温度の範囲ではタンパク質が凝集を起こしており, 再び SYPRO Orange が解離しやすくなっていると考えられる (Hirano *et al.*, 2015).

野生型と比べて $\Delta\alpha 11$ (カルシウムイオン結合型)では, 測定を行った温度範囲において全体的に蛍光強度が高かった(図 2-20 A). 特に, 60°C 以下の低温の領域では顕著に $\Delta\alpha 11$ の蛍光強度の方が高かった. これは, $\alpha 11$ が欠失したことで, $\alpha 11$ に塞がれていた N-terminal domain の疎水性領域が露出したことが原因ではないかと考えられる. また, 25°C から 30°C 付近において, 蛍光強度の上昇が確認された. そのことから, $\Delta\alpha 11$ ではこの温度の領域で変性し, 内部から疎水性領域が露出することで蛍光強度が上昇したことを示唆している. さらに, 40°C を超えると, 蛍光強度が大きく減少していく様子が見られた. この温度領域では, 凝集による SYPRO Orange の解離が起こっていると考えられる. また, 60°C より高い

温度では野生型でも $\Delta\alpha 11$ でも蛍光強度にわずかな違いしか見られなかった。これは、両者とも 60°C 以上の高温で凝集してしまっており、両者による有意な構造の違いがなくなったということを示唆している。

図 2-20 B に SYPRO Orange の蛍光強度の微分曲線を示した。初めに、野生型のカラクシン(カルシウムイオン結合型)では、 56°C に負の向きの大きいピークが現れた。このピークの位置は、図 2-20 A の蛍光強度の曲線において、 50°C から 60°C までの範囲で見られた蛍光強度の上昇の midpoint に相当する位置である。そして、この負のピークの位置はタンパク質の変性温度を示すものである。しかし、 $\Delta\alpha 11$ (カルシウムイオン結合型)では、 28°C に熱変性を示す負の向きのピークが現れた(図 2-20 B)。この負のピークの位置は、蛍光強度の曲線で見られた、 25°C から 30°C 付近での蛍光強度の上昇の midpoint に相当する。また、 50°C から 60°C 付近において、正の向きの裾の広いピークが確認された。このピークはタンパク質の凝集によって蛍光色素が解離してしまったことを示していると考えられる。これらのことから、野生型のカラクシンは 50°C 付近でも構造を保っていることができるが、 $\alpha 11$ と N-terminal domain の疎水性ポケットとの相互作用をなくしてしまうことで、その温度では立体構造が崩れて凝集をしてしまうということが明らかになった。

熱変性温度が低下したということは、タンパク質の熱に対する安定性が下がったことを意味する。このことから、 $\alpha 11$ の欠失によって、カラクシンの熱安定性が大きく低下したことが示唆される。つまり、 $\alpha 11$ はカラクシンの分子の構造の安定性に寄与していることが考えられる。

上述の通り、NCS-1 においては C 末端の α -ヘリックスが C-terminal domain の疎水性領域と相互作用をすることで変性剤であるグアニジン塩酸塩への曝露に対する安定性を高めていた。カラクシンでは、C 末端の α -ヘリックスが N-terminal domain の疎水性領域と相互作用をすることで熱安定の向上に寄与していることが示された。本研究の結果は、NCS protein family のタンパク質の C 末端ヘリックスと構造の熱安定性の関係について初めて追究したものである。NCS protein family に属するタンパク質の C 末端の α -ヘリックスの機能のひとつとして、N-terminal domain あるいは C-terminal domain の疎水性ポケットと相互作用することで構造の安定性に寄与しているということが示唆された。

2-4 考察

本章ではマグネシウムイオン結合型のカラクシンの結晶構造を決定することができた。この結晶構造から、マグネシウムイオン結合型の結晶構造はカルシウムイオン結合型の結晶構造を全体構造が類似しており、構造のコアを形成している 4 つの EF-hand の構造にも大きな違いがないことが明らかになった。また、カルシウムイオン結合型のカラクシンの結晶構造の非対称単位中で見られた open state と closed state の 2 つの分子が、マグネシウムイオン結合型の結晶構造においても同様に存在することが明らかになった。しかし、EF3 にお

いて、カルシウムイオンは open state と closed state の両方の状態における分子に結合していたが、マグネシウムイオンは open state での構造にのみ結合していることが明らかになった。このことから、EF3 はマグネシウムイオンに対する結合力が低く、生体内でカルシウムイオン濃度が低い定常状態であっても EF3 にはマグネシウムイオンが結合していないのではないかと考えられる。

ITC の結果では、カラクシンにはカルシウムイオンおよびマグネシウムイオンが結合することが示され、得られた反応熱の大きさに対してフィッティングカーブを描くことで、各 EF-hand に対する結合力(解離定数)を算出することができた。さらに、アポ型に対してカルシウムイオンが結合する場合よりも、マグネシウムイオン結合型に対してカルシウムイオンが結合した場合のほうが、カルシウムイオン結合の結合力が増加することも明らかになった。ITC によるフィッティングでは、複数の EF-hand motif の解離定数を独立に算出することができるものの、どの解離定数の値がどの EF-hand と対応するのかということは判別することができない。そのため、各 EF-hand でカルシウムイオン結合とマグネシウムイオン結合で結合力が何倍の差があるのかということは明らかにできない。しかし、今回の解離定数算出の結果では、マグネシウムイオン結合型に対するカルシウムイオン結合の解離定数 ($5.41 \times 10^{-8} \text{ M}$, $5.62 \times 10^{-7} \text{ M}$, $1.58 \times 10^{-6} \text{ M}$)が、いずれのアポ型に対するマグネシウムイオン結合の解離定数($1.32 \times 10^{-6} \text{ M}$, $8.93 \times 10^{-6} \text{ M}$, $1.46 \times 10^{-5} \text{ M}$)よりも小さい値をとっていたため、いずれの EF-hand においてもカルシウムイオンの結合力がマグネシウムイオンの結合力よりも強いことが示された。生体内のマグネシウムイオン濃度は常に 2 mM に保たれ、カルシウムイオン濃度は定常状態では 100 nM ほどである。定常状態ではカルシウムイオン濃度がカラクシンのカルシウムイオン結合の解離定数の値の 0.185 倍, 0.0178 倍, 0.00633 倍なのに対し、マグネシウムイオン濃度はカラクシンのマグネシウムイオン結合の解離定数の値の 1515 倍, 224 倍, 137 倍となる。このことから、2 か所の EF-hand においてはマグネシウムイオンがカルシウムイオンよりも優先的に結合することが示唆される。それに対して、精子が誘引物質の濃度勾配を感知して内部にカルシウムイオンを流入させると、カルシウムイオン濃度が 10 μM まで上昇する。この状態ではカルシウムイオン濃度がカラクシンの解離定数の値の 185 倍, 17.8 倍, 6.33 倍となり、カラクシンの一部において EF-hand に結合していたマグネシウムイオンがカルシウムイオンに置換されると考えられる。カラクシンの各 EF-hand のカルシウムイオン結合の解離定数は 10^{-8} M から 10^{-6} M の範囲で大きく異なるため、生体内では 3 か所の EF-hand に同時にカルシウムイオンが結合するのではなく、結合力の強い EF-hand に優先的にカルシウムイオンが結合し、EF-hand が 1 か所ずつカルシウムイオンで占められていくといった機構が考えられる。そして、カルシウムスパイクが終了し、精子のカルシウムイオン濃度が再び低下すると、カルシウムイオンよりも濃度が高いマグネシウムイオンによるカラクシンへの結合が再び優勢になり、カラクシンはマグネシウムイオン結合型に戻ると予想される。

SYPRO Orange を用いた熱安定性測定によって、C 末端ヘリックスである $\alpha 11$ の欠失によ

ってカラクシンの変性温度が低下した。結晶構造において、 $\alpha 11$ は N-terminal domain によって形成されている疎水性ポケットと疎水性相互作用を形成していた。このことから、 $\alpha 11$ の欠失によって $\alpha 11$ と N-terminal domain との間の疎水性相互作用が失われたことで、カラクシンの熱安定性が低下したということが示唆された。

NCS protein family に属するタンパク質の中では、そのタンパク質と相互作用するパートナーであるペプチドとの共結晶構造が決定された研究が報告されている。シロイヌナズナのカルシウムイオンシグナリングに関与するタンパク質である AtCBL2 の場合、相互作用パートナーであるキナーゼ AtCIPK の一部の α -ヘリックスが AtCBL2 の N-terminal domain と C-terminal domain の両疎水性ポケットをまたがるようにして相互作用している(Akaboshi *et al.*, 2008) (図 2-21 A)。また、NCS-1 では 2 種類の共結晶構造が決定されており、dopamine D2 receptor (D2R) の C 末端領域のペプチドとの共結晶構造では、NCS-1 の N-terminal domain と C-terminal domain の各疎水性ポケットにひとつずつの D2R ペプチド(計 2 つ)が結合していた(Pandalaneni *et al.*, 2015) (図 2-21 B)。しかし、同じ NCS-1 と G-protein-coupled receptor kinase 1 (GRK1) との共結晶構造では、GRK1 の N 末端領域のペプチドが NCS-1 の N-terminal domain と C-terminal domain の中央あたりに位置して相互作用しており、しかも 1 分子の NCS-1 に対して 1 分子の GRK1 ペプチドしか結合していなかった(Pandalaneni *et al.*, 2015) (図 2-21 C)。これらの両共結晶構造における NCS-1 の構造を重ね合わせて比較すると、GRK1 との複合体においては C 末端ヘリックスが GRK1 を覆うように位置しているが、D2R との複合体においては C 末端ヘリックスの中央がループ構造に変化しており、そのループが NCS1 の N-terminal domain と C-terminal domain の中央部分に差し込まれるような位置をとっている。このループの位置は、ちょうど GRK1 の結合部位と一致している。すなわち、D2R との複合体の場合には、C 末端ヘリックスの一部の構造がループに緩み、NCS-1 の疎水性表面の中央に挿入されることで、N-terminal domain と C-terminal domain の疎水性ポケットを明確に分画することで、各疎水性ポケットにひとつずつ D2R のヘリックスが相互作用することが可能になる、と考えることができる。以上の AtCBL2 や NCS-1 の場合では、それらの分子の疎水性ポケットに相互作用パートナーが結合している。カラクシンの結晶構造を AtCBL2 および NCS-1 の構造と比較すると、カラクシンの C-terminal domain の疎水性ポケットの場所が、AtCBL2 や NCS-1 のパートナーとの相互作用に関わる疎水性ポケットの一部と一致した(図 2-22)。このことから、カラクシンの C-terminal domain の疎水性ポケットも β -チューブリンやダイニンとの結合に関与するのではないかと考えられる。しかし、カラクシンの疎水性ポケットは C 末端の $\alpha 11$ によって塞がれていることで面積が小さくなっている。この疎水性ポケットの大きさの違いにより、相互作用パートナーの多様性が生まれると考えられる。

以上の結晶構造と熱安定性測定の結果から、 $\alpha 11$ は N-terminal domain との疎水性相互作用によって熱安定性への寄与や、C-terminal domain への相互作用パートナーの選択に寄与しているのではないかと考えられる。

表 2-1 カラクシンの各パラメーター

DNA 配列 (終始コドンまで)	ATGAGCAAAAAGAATCAAAAACCTCGCCGAAGAGCTTT ACAAAACGTCATGTCAAAAGCACTTCACAAAGACTGA AGTTGAATCGTTGATTATTTGCTACAAGAAGCTTGTTAGA AGGATTGAAAATGGATCGGAATTTATTCCGTGATATTTT GCACCAAAAGTTCAACATGACGGAAGATTTGCTCATGG ATCGAGTGTTTCGAGCTTTTGATAAAGACAGCGATTCTT ACATAAGTTTGACTGAGTGGGTAGAAGGATTGTCAGTT TTTCTGAGGGGAACACTGGATGAAAAAATGGAATATAC CTTCACTGTTTTTGATTTAAACGGTGATGGTTACATTTCT CGTGAAGAAATGTTTCAAATGTTGAAGACATGTCTCGT TAAACAACCAACAGAAGAAGATCCAGATGAAGGAATA AAAGACCTCGTTGAAATTGCACTGAAAAAATGGACCA TGATCATGACAGCAGATTATCAAAAAAAGATTTCAAAG ATGCCGTTCTTATTGAACCTCTACTGTTGGAAGCTTTCG GGAAATGTTTACCCGATGAAAAATCATCAGAAATATTTG AATATCATGTCTTGGCGTTAAGCAGTGCAGGGGATGA
アミノ酸配列	MSKKNQKLAELYKTSCQKHFTKTEVESLIICYKNLLEGL KMDRNLFRDILHQFNMTEDLLMDRVFRAFDKSDSYIS LTEWVEGLSVFLRGTLDKMEYFTVFDLNGDGYISREE MFQMLKTCLVKQPTEEDPDEGIKDLVEIALKKMDHDHDS RLSKKDFKDAVLIEPLLEAFGKCLPDEKSSEIFEYHVLGV KQCRG
等電点	5.09
モル吸光係数($M^{-1} cm^{-1}$)	14,440
分子量	23,772

表 2-2 カラクシンの構造解析における統計値

	Sm calaxin	Ca calaxin	Mg calaxin
Data collection			
Space group	$P4_3$	$P4_3$	$P4_3$
Unit Cell a, b, c (Å)	65.0, 65.0, 113.3	65.5, 65.5, 113.5	65.3, 65.3, 113.2
Wavelength (Å)	1.6000	1.5418	1.0000
Resolution (Å) ^a	20.0–2.00 (2.05–2.00)	20.0–1.85 (1.90–1.85)	46.1–2.64 (2.77–2.64)
$R_{\text{meas}}^{\text{a,b}}$ (%)	5.5 (36.1)	4.4 (37.9)	12.4 (75.5)
$CC_{1/2}$	99.8 (89.5)	100 (88.3)	99.7 (81.7)
$\langle I/\sigma(I) \rangle^{\text{a}}$	16.6 (3.5)	32.1 (3.8)	17.2 (3.2)
Completeness (%) ^a	97.1 (92.1)	98.9 (89.0)	100 (99.9)
Redundancy ^a	3.7 (3.5)	6.6 (3.0)	7.6 (7.5)
Reflections/unique	223469/60617	268522/40393	107108/14030
Wilson B factor (Å ²)	27.1	17.2	26.5
Refinement			
Resolution (Å)	–	19.8–1.85 (1.90–1.85)	42.8–2.64 (2.71–2.64)
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}^{\text{c}}$ (%)	–	17.7/21.9 (23.0/29.3)	16.3/21.2 (21.4/33.6)
No. Protein atoms	–	3170	3036
No. non-protein atoms			
Metal	–	7	5
Solvent	–	225	21
Others	–	4	0
Mean B -factor (Å ²)	–	26.3	50.3
Root mean square deviations			
Bond lengths (Å)	–	0.020	0.015
Bond angles (°)	–	1.988	1.761
Ramachandran plot			
Most favorable (%)	–	98.42	95.84
Allowed (%)	–	1.58	4.16
Disallowed (%)	–	0.00	0.00

^aValues in parentheses are for the highest resolution shell.

^b $R_{\text{meas}} = \sum_{hkl} [\{n/(n-1)\}^{1/2} (\sum_i |I_i - \langle I \rangle|) / \sum_i |I_i|]$, where I_i is the i th intensity measurement of reflection hkl , including symmetry-related reflections, and $\langle I \rangle$ is its average.

^c R_{free} was calculated using 5% of the reflections omitted from the refinement.

表 2-3 マグネシウムイオンの配位に関わる残基の B-factor

	X	Y	Z	-Y	-Z
EF1	D71	D73	D75	Y77	E82
closed	29.5	33.3	34.7	40.8	35.1
open	31.2	34.4	25.2	41.0	28.1
EF2	D107	N109	D111	Y113	E118
closed	44.2	51.2	57.1	56.2	44.1
open	33.1	36.3	38.8	53.0	36.5
EF3	D152	D154	D156	R158	D163
closed	119.3	115.2	110.8	73.9	68.2
open	55.8	59.1	65.1	57.1	45.8

表中の B-factor 数値の単位は全て \AA^2 である.

表 2-4 結晶構造中の EF-hand タンパク質の各 EF-hand motif における金属イオン配位距離

タンパク質名	イオンの種類	距離 (Å)						PDB ID	分解能 (Å)	備考
		X	Y	Z	-Y	-X	-Z			
calaxin	Ca ²⁺	D71	D73	D75	Y77	Water	E82		1.9	open state
		2.3	2.4	2.4	2.2	2.2	2.4 2.6			
calaxin	Ca ²⁺	D107	N109	D111	Y113	Water	E118		1.9	open state
		2.3	2.2	2.3	2.2	2.4	2.4 2.5			
calaxin	Ca ²⁺	D152	D154	D156	R158	Water	D163		1.9	open state
		2.2	2.5	2.2	2.4	2.1	2.5			
calaxin	Ca ²⁺	D71	D73	D75	Y77	Water	E82		1.9	closed state
		2.3	2.2	2.4	2.3	2.2	2.4 2.7			
calaxin	Ca ²⁺	D107	N109	D111	Y113	Water	E118		1.9	closed state
		2.3	2.4	2.3	2.3	2.3	2.4 2.4			
calaxin	Ca ²⁺	D152	D154	D156	R158	Water	D163		1.9	closed state
		2.2	2.8	2.2	2.5	2.4	2.4			
calaxin	Mg ²⁺	D71	D73	D75	Y77		E82		2.6	open state
		2.1	2.2	2.3	2.1		2.1			
calaxin	Mg ²⁺	D107	N109	D111	Y113		E118		2.6	open state
		2.2	2.1	2.5	2.2		2.2 2.4			
calaxin	Mg ²⁺	D152	D154	D156	R158		D163		2.6	open state
		2.4	2.2	2.0	1.9		2.0			
calaxin	Mg ²⁺	D71	D73	D75	Y77		E82		2.6	closed state
		2.3	2.0	2.4	2.2		2.2			
calaxin	Mg ²⁺	D107	N109	D111	Y113		E118		2.6	closed state
		2.3	2.7	2.4	2.3		2.3 2.5			
calaxin	Mg ²⁺								2.6	closed state イオンは結合していない
EhCaBP1	Ba ²⁺	D10	N12	D14	A16	Water	E21	3ULG	3.2	chain A
		3.0	2.2	2.8	2.7	2.7	3.1 3.1			
EhCaBP1	Ba ²⁺	D10	N12	D14	A16	Water	E21	3ULG	3.2	chain B
		2.7	2.4	2.8	2.4	2.9	2.8 3.1			
EhCaBP1	Ca ²⁺	D10	N12	D14	A16	Water	E21	3LI6	2.5	chain A
		2.5	2.5	2.5	2.4	2.7	2.6 2.7			
EhCaBP1	Ca ²⁺	D46	D48	N50	E52	Water	E57	3LI6	2.5	chain A
		2.5	2.7	2.6	2.6	2.9	2.6 2.6			
EhCaBP1	Ca ²⁺	D10	N12	D14	A16	Water	E21	3LI6	2.5	chain D
		2.5	2.6	2.4	2.4	2.5	2.6 2.6			
EhCaBP1	Ca ²⁺	D46	D48	N50	E52	Water	E57	3LI6	2.5	chain D
		2.5	2.8	2.5	2.4	2.5	2.5 2.6			
EhCaBP1	Ca ²⁺	D10	N12	D14	A16	Water	E21	3LI6	2.5	chain G
		2.4	2.6	2.5	2.4	2.5	2.6 2.6			
EhCaBP1	Ca ²⁺	D46	D48	N50	E52	Water	E57	3LI6	2.5	chain G
		2.6	2.8	2.6	2.5	2.6	2.5 2.6			
EhCaBP1	Ca ²⁺	D10	N12	D14	A16	Water	E21	3LI6	2.5	chain J
		2.5	2.4	2.5	2.3	2.6	2.6 2.7			
EhCaBP1	Ca ²⁺	D46	D48	N50	E52	Water	E57	3LI6	2.5	chain J
		2.6	2.6	2.6	2.5	2.6	2.6 2.6			

タンパク質名	イオンの種類	距離 (Å)						PDB ID	分解能 (Å)	備考
		X	Y	Z	-Y	-X	-Z			
parvalbumin	Ca ²⁺	D90	D92	D94	K96	Water	D101	1B8R	1.9	
		2.4	2.5	2.4	2.4	2.5	2.5 2.6			
parvalbumin	Mg ²⁺	D90	D92	D94	K96	Water	D101	1B8C	2.5	chain A
		1.9	2.1	2.1	2.0	2.3	2.0			
parvalbumin	Mg ²⁺	D90	D92	D94	K96	Water	D101	1B8C	2.5	chain B
		1.9	2.2	2.2	1.9	2.0	2.0			
calbindin	Ca ²⁺	D54	N56	D58	E60	Water	Water	4ICB	1.6	
		2.4	2.3	2.4	2.4	2.5	2.5 2.5			
calbindin	Mg ²⁺	D54	N56	D58	E60	Water	Water	1IG5	1.5	
		2.1	2.0	2.1	2.0	2.1	2.0			
calmodulin	Ca ²⁺	D20	D22	D24	T26	Water	E31	1CLL	1.7	
		2.4	2.5	2.4	2.3	2.6	2.4 2.4			
calmodulin	Ca ²⁺	D56	D58	N60	T62	Water	E67	1CLL	1.7	
		2.1	2.3	2.4	2.3	2.3	2.4 2.6			
calmodulin	Ca ²⁺	D93	D95	N97	Y99	Water	E104	1CLL	1.7	
		2.2	2.5	2.3	2.2	2.6	2.4 2.6			
calmodulin	Ca ²⁺	D129	D131	D133	Q135	Water	E140	1CLL	1.7	
		2.3	2.4	2.3	2.3	2.6	2.6 2.6			
calmodulin	Mg ²⁺	D20	D22	D24	T26	Water	Water	3UCW	1.8	chain A
		2.0	2.1	2.1	2.2	2.1	2.1			
calmodulin	Mg ²⁺	D20	D22	D24	T26	Water	Water	3UCW	1.8	chain B
		2.1	2.1	2.1	2.2	2.1	2.1			
calmodulin	Mg ²⁺	D20	D22	D24	T26	Water	Water	3UCW	1.8	chain C
		2.0	2.1	2.0	2.1	2.1	2.0			
calmodulin	Mg ²⁺	D20	D22	D24	T26	Water	Water	3UCW	1.8	chain D
		2.0	2.1	2.0	2.1	2.1	2.1			
neurocalcin	Ca ²⁺	D73	N75	D77	T79	Water	E84	1BJF	2.4	chain A
		2.3	2.0	2.4	2.5	2.4	2.3 2.4			
neurocalcin	Ca ²⁺	D109	D111	N113	Y115	Water	E120	1BJF	2.4	chain A
		2.6	2.2	2.1	2.5	2.5	2.4 2.6			
neurocalcin	Ca ²⁺	D157	N159	D161	K163	Water	E168	1BJF	2.4	chain A
		2.4	2.3	2.0	2.4	2.3	2.3 2.7			
neurocalcin	Ca ²⁺	D73	N75	D77	T79	Water	E84	1BJF	2.4	chain B
		2.2	2.0	2.5	2.5	2.4	2.2 2.3			
neurocalcin	Ca ²⁺	D109	D111	N113	Y115	Water	E120	1BJF	2.4	chain B
		2.5	2.2	2.2	2.4	2.2	2.3 2.5			
neurocalcin	Ca ²⁺	D157	N159	D161	K163	Water	E168	1BJF	2.4	chain B
		2.5	2.3	2.1	2.3	2.4	2.3 2.8			
recoverin	Ca ²⁺	D110	D112	N114	T116	Water	E121	1OMR	1.5	
		2.3	2.4	2.3	2.3	2.6	2.5 2.6			
NCS-1	Ca ²⁺	D73	N75	D77	R79	Water	E84	5AEQ	2.0	chain A
		2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3 2.3			
NCS-1	Ca ²⁺	D109	D111	D113	Y115	Water	E120	5AEQ	2.0	chain A
		2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3 2.3			
NCS-1	Ca ²⁺	D157	N159	D161	K163	Water	E168	5AEQ	2.0	chain A
		2.3	2.3	2.3	2.3	2.4	2.3 2.3			
NCS-1	Ca ²⁺	D73	N75	D77	R79	Water	E84	5AEQ	2.0	chain B
		2.4	2.3	2.3	2.3	2.0	2.3 2.3			
NCS-1	Ca ²⁺	D109	D111	D113	Y115	Water	E120	5AEQ	2.0	chain B
		2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3 2.3			
NCS-1	Ca ²⁺	D157	N159	D161	K163	Water	E168	5AEQ	2.0	chain B
		2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3 2.3			

配位距離中の色は、距離が短いものほど濃い赤色、距離が長いほど濃い緑色、中間は黄色になるように色分けを行った。

表 2-5 ITC により算出された各熱力学的パラメーター

Titration	Sites	ΔG (kcal mol ⁻¹)	ΔH (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹)
Ca²⁺ versus	1	-8.95	-13.72	4.77
apo	2	-7.30	4.62	-11.92
	3	-6.74	-2.63	-4.11
Mg²⁺ versus	1	-8.02	-2.69	-5.33
apo	2	-6.87	-1.06	-5.81
	3	-6.60	-0.403	-6.20
Ca²⁺ versus	1	-9.93	-5.55	-4.38
Mg²⁺-bound	2	-8.54	-2.79	-5.75
	3	-7.93	-4.20	-3.73

Titration	Sites	K_a (M ⁻¹)	K_d (M)
Ca²⁺ versus	1	$3.63 \times 10^6 \pm 7.3 \times 10^5$	2.75×10^{-7}
apo	2	$2.34 \times 10^5 \pm 6.7 \times 10^4$	4.27×10^{-6}
	3	$8.77 \times 10^4 \pm 3.7 \times 10^4$	1.14×10^{-5}
Mg²⁺ versus	1	$7.57 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5$	1.32×10^{-6}
apo	2	$1.12 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^4$	8.93×10^{-6}
	3	$6.87 \times 10^4 \pm 1.1 \times 10^4$	1.46×10^{-5}
Ca²⁺ versus	1	$1.85 \times 10^7 \pm 3.4 \times 10^6$	5.41×10^{-8}
Mg²⁺-bound	2	$1.78 \times 10^6 \pm 2.7 \times 10^5$	5.62×10^{-7}
	3	$6.31 \times 10^5 \pm 8.3 \times 10^4$	1.58×10^{-6}

表 2-6 $\Delta\alpha 11$ 作製に用いたプライマー配列

	sequence
$\Delta\alpha 11_forward$	CGCGCGGCAGCCATATGAGCAAAAAGAATCAAAAACCTCG
$\Delta\alpha 11_reverse$	GTCATGCTAGCCATATTATAAACATTTCCCGAAAGCTTCCAAC

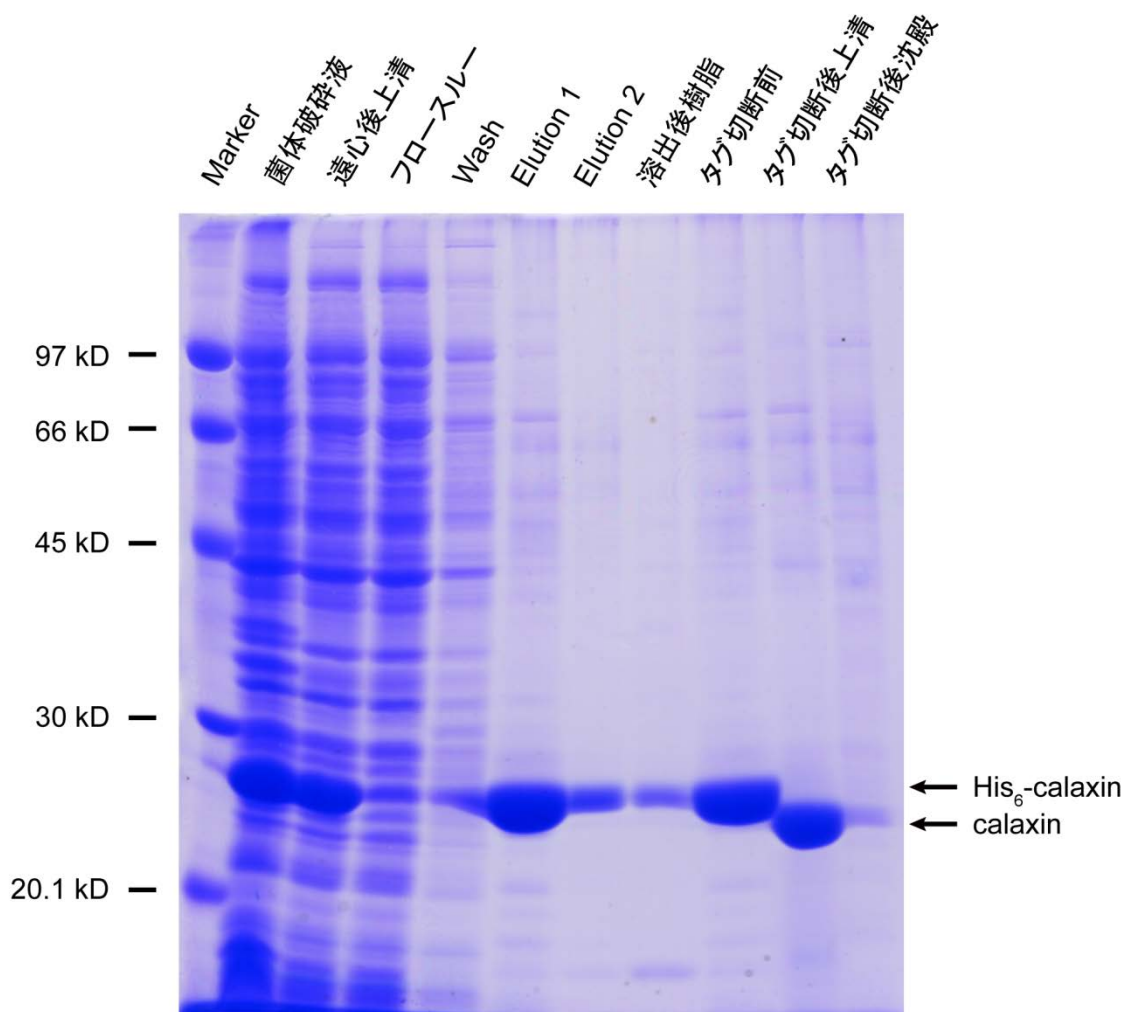


図 2-1 マグネシウムイオン結合型カラクシンの His-tag アフィニティ精製

菌体破碎液：菌体破碎直後の溶液

遠心後上清：菌体破碎後の遠心後の上清

フロースルー：遠心後上清を Ni-NTA Superflow に流した後の溶出液

Wash：タンパク質吸着後のカラムに Wash buffer を流した後の溶出液

Elution 1：Wash 回収後にカラムに Elution buffer を流した後の溶出液

Elution 2：Elution 1 回収後にカラムに Elution buffer を流した後の溶出液

溶出後樹脂：Elution 2 回収後のカラムに残った樹脂の懸濁液

タグ切断前：Elution 1 と Elution 2 を合わせた溶液

タグ切断後上清：透析，Thrombin 処理後の溶液を遠心した後の上清

タグ切断後沈殿：透析，Thrombin 処理後の溶液を遠心した後の沈殿

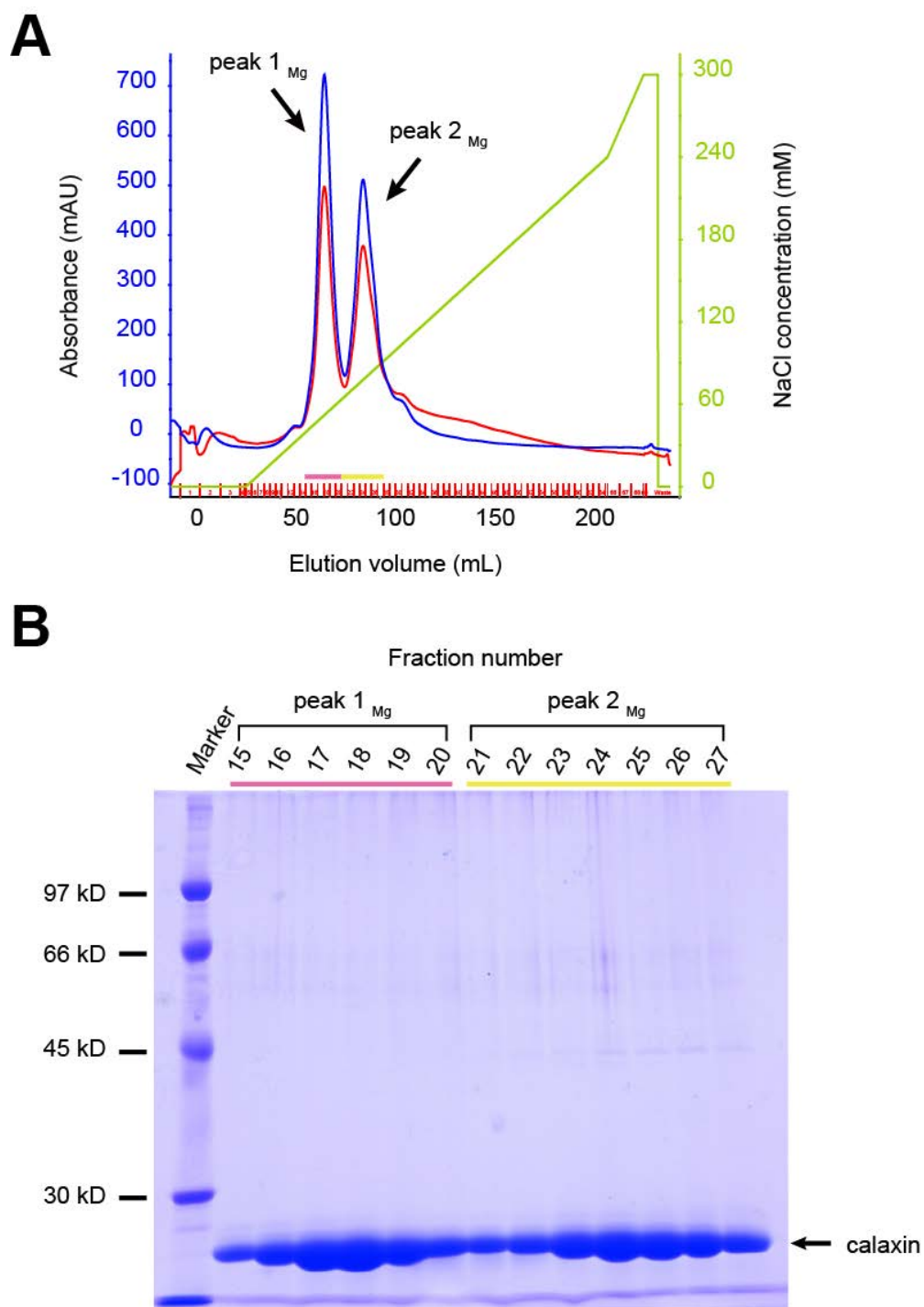


図 2-2 マグネシウムイオン結合型カラクシンの陰イオン交換精製
 (A)陰イオン交換樹脂 RESOURCE Q 6 mL を用いた精製のクロマトグラム. 280 nm の光の吸収と 260 nm の光の吸収をそれぞれ青線と赤線で示した(左縦軸). また, NaCl の濃度勾配を緑線で示した(右縦軸). (B) RESOURCE Q 6 mL による精製後の画分の SDS-PAGE.

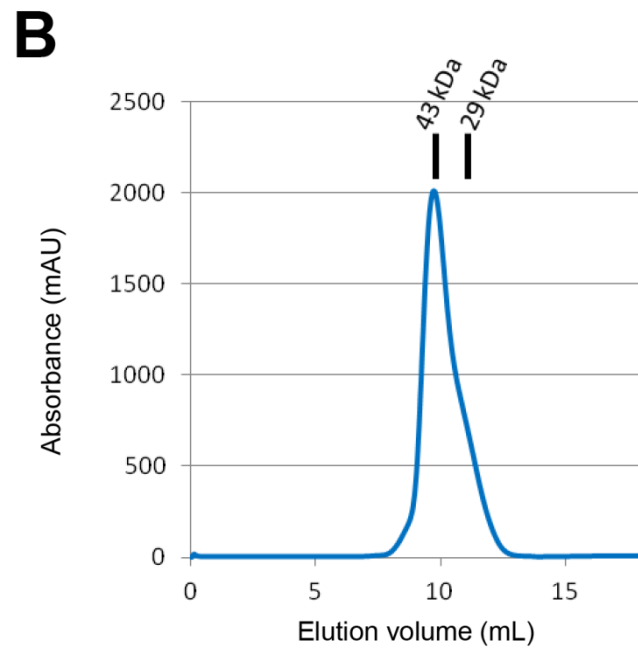
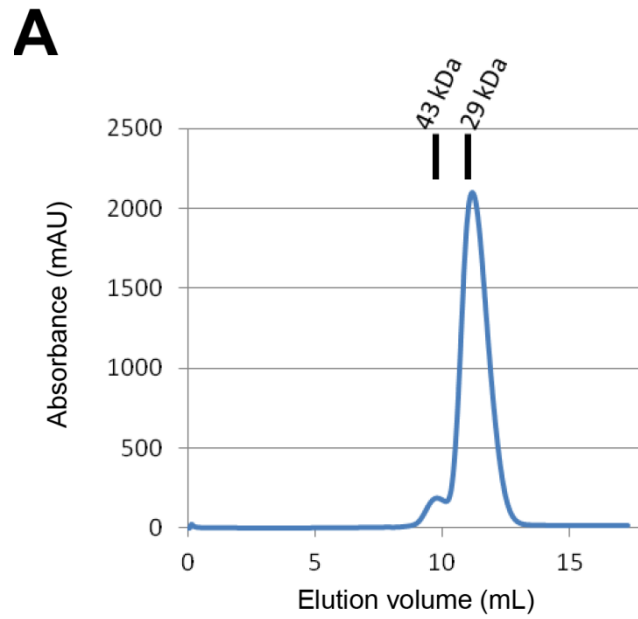


図 2-3 陰イオン交換精製後のピークのゲル濾過クロマトグラフィー
 peak 1_{Mg} (A)と peak 2_{Mg} (B)の 280 nm の吸収スペクトルを青の実線で示した。また、
 Ovalbumin (分子量 43,000)と Carbonic anhydrase (分子量 29,000)の溶出位置を上部に示した。

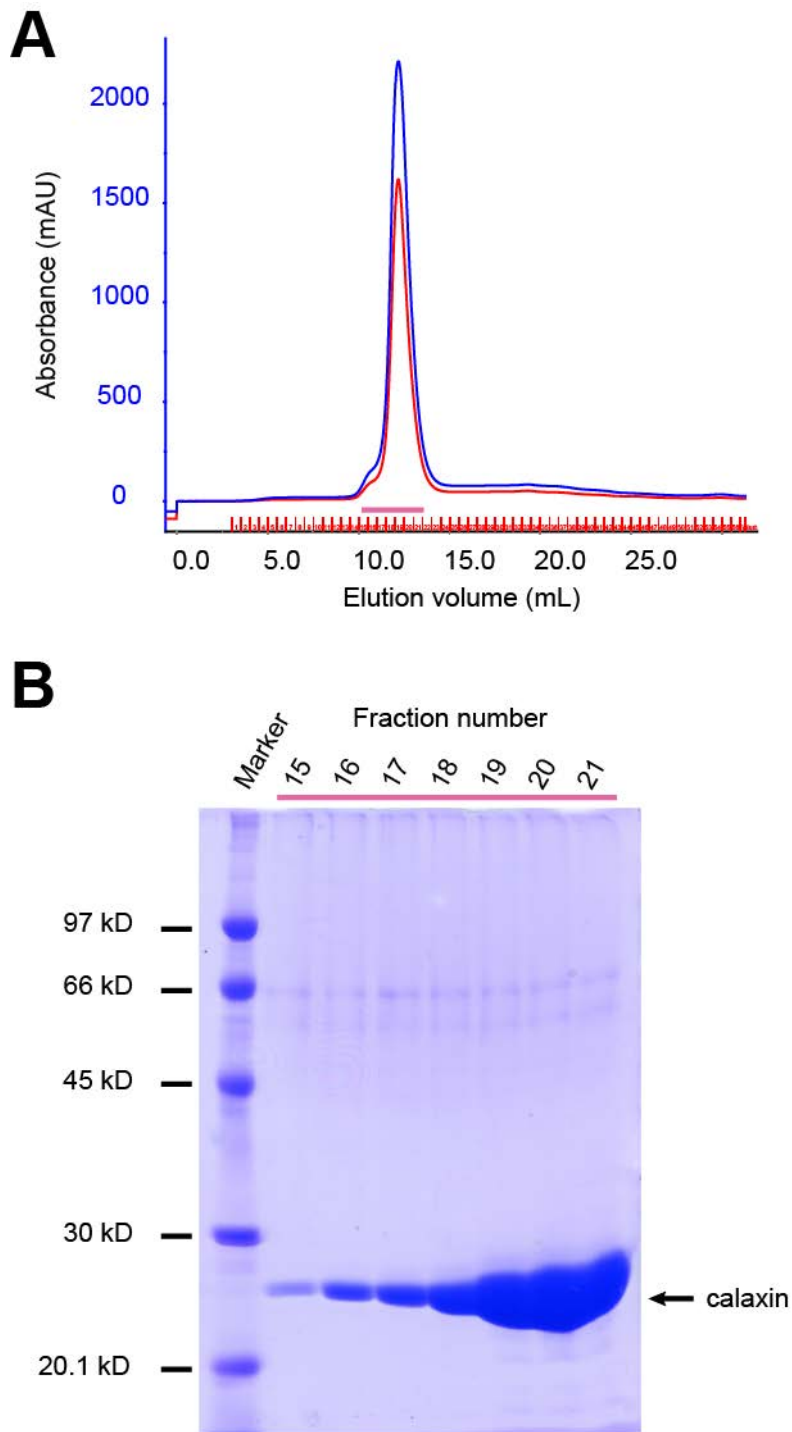


図 2-4 マグネシウムイオン結合型カラクシンのゲル濾過精製

(A)ゲル濾過クロマトグラフィーカラム Superdex 75 10/300 GL を用いた精製のクロマトグラム. 280 nm の光の吸収と 260 nm の光の吸収をそれぞれ青線と赤線で示した(左縦軸).

(B) Superdex 75 10/300 GL による精製後の画分の SDS-PAGE.

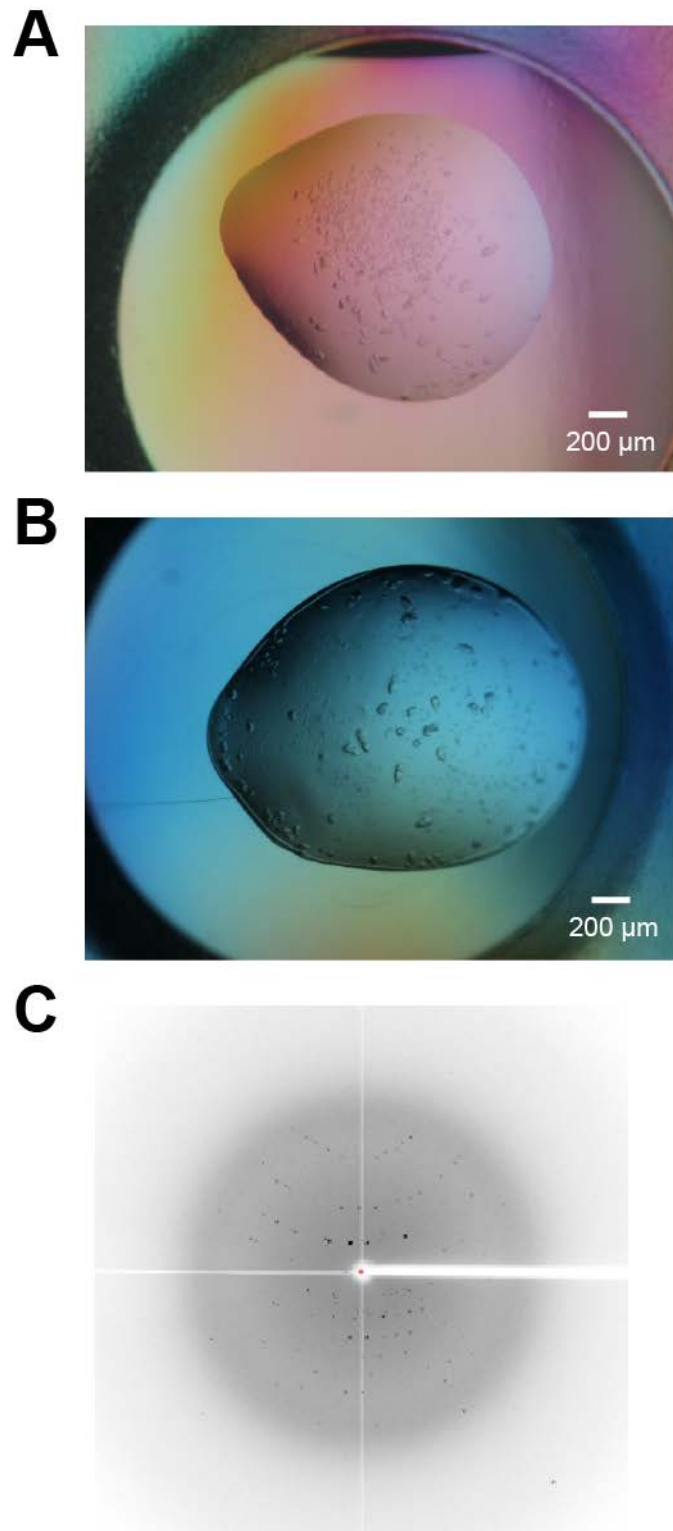


図 2-5 マグネシウムイオン結合型カラクシンの結晶

(A)一次スクリーニング後の結晶. (B)ゲル濾過精製後の結晶. (C)ゲル濾過精製後の結晶に X 線を照射した際の回折斑点.

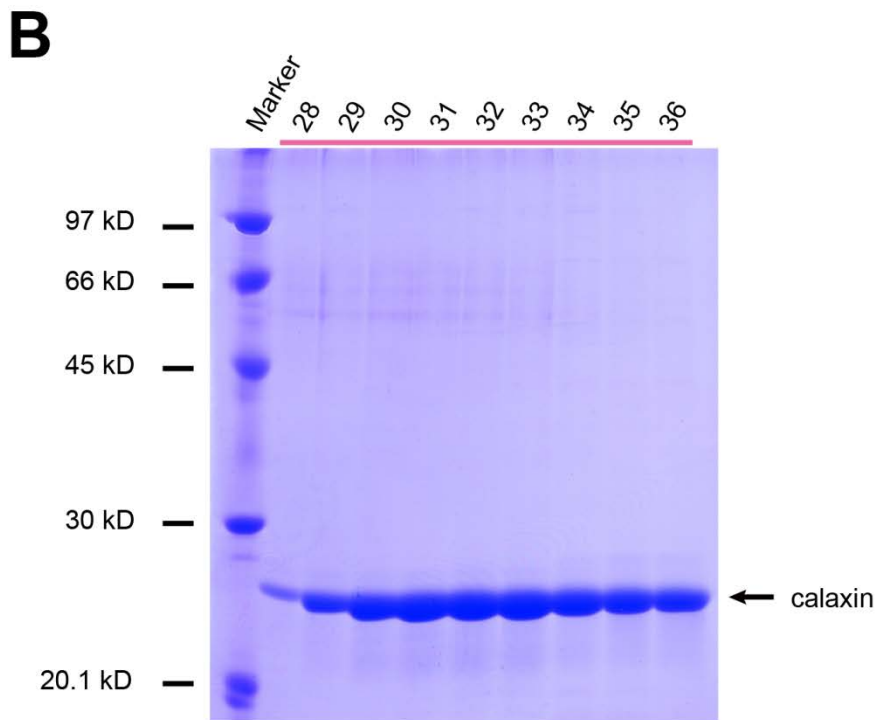
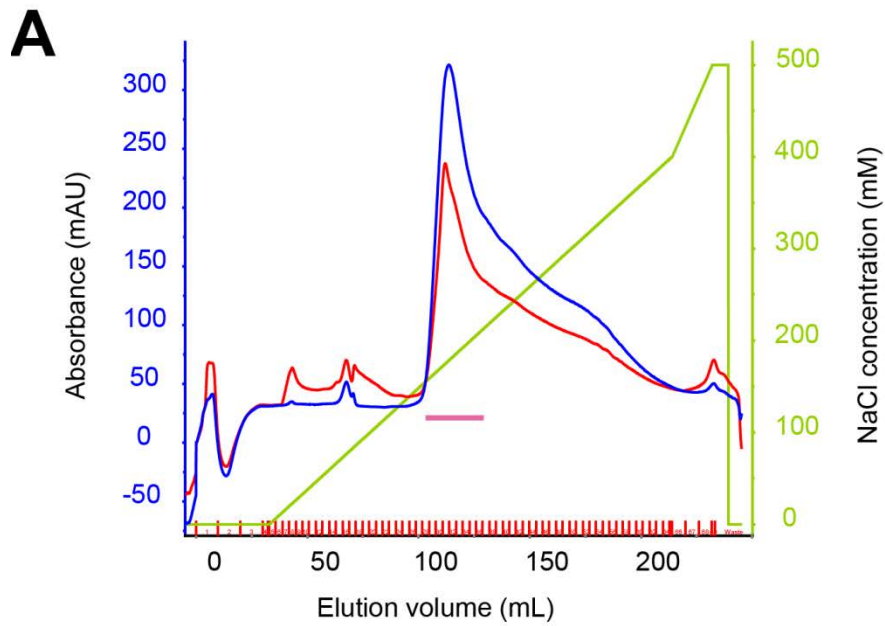


図 2-6 マグネシウムイオン結合型カラクシンの陰イオン交換精製
 (A)陰イオン交換樹脂 RESOURCE Q 6 mL を用いた精製のクロマトグラム. 280 nm の光の吸収と 260 nm の光の吸収をそれぞれ青線と赤線で示した(左縦軸). また, NaCl の濃度勾配を緑線で示した(右縦軸). (B) RESOURCE Q 6 mL による精製後の画分の SDS-PAGE.

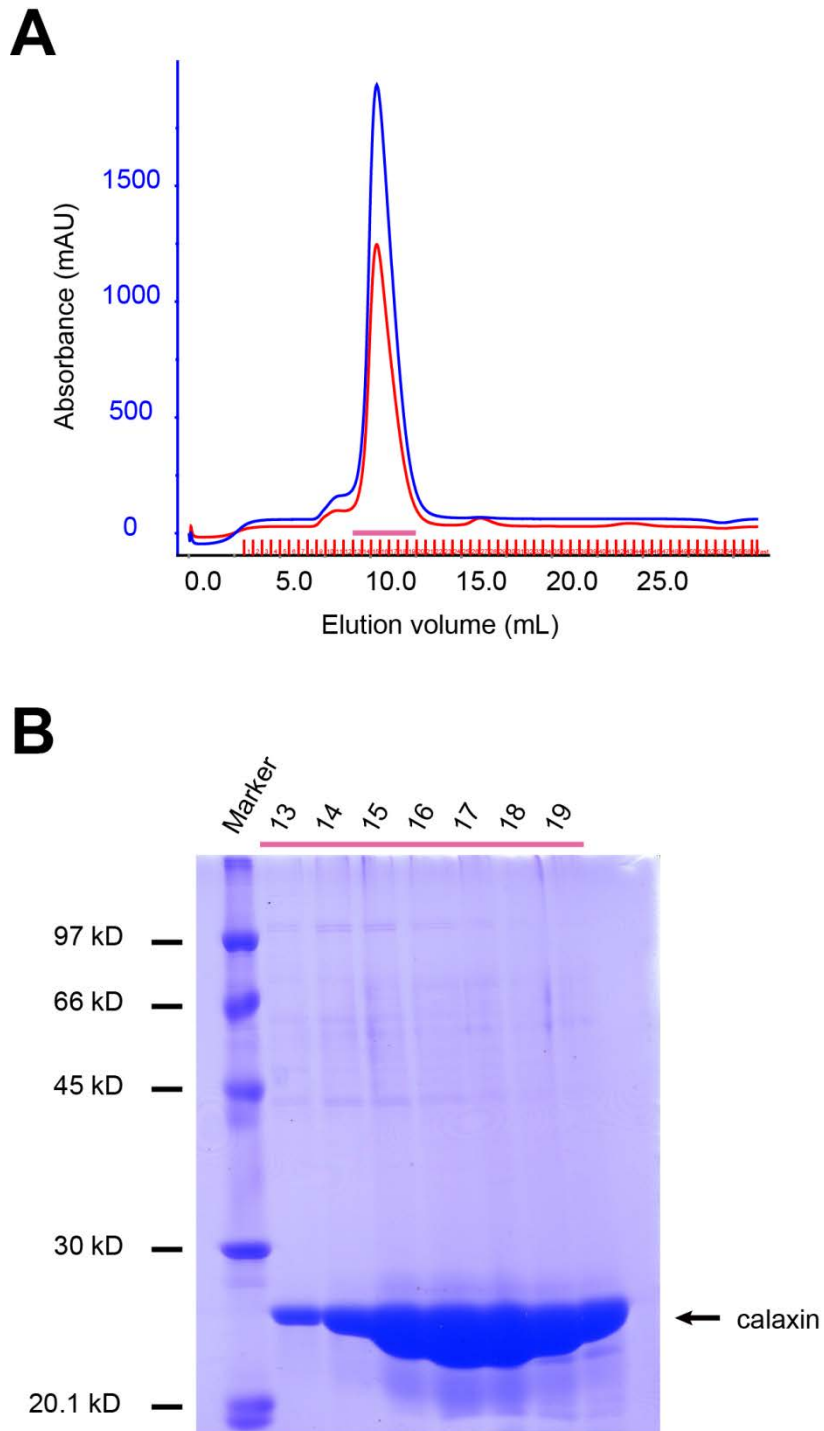


図 2-7 マグネシウムイオン結合型カラクシンのゲル濾過精製

(A)ゲル濾過クロマトグラフィーカラム Superdex 75 10/300 GL を用いた精製のクロマトグラム. 280 nm の光の吸収と 260 nm の光の吸収をそれぞれ青線と赤線で示した(左縦軸).

(B) Superdex 75 10/300 GL による精製後の画分の SDS-PAGE.

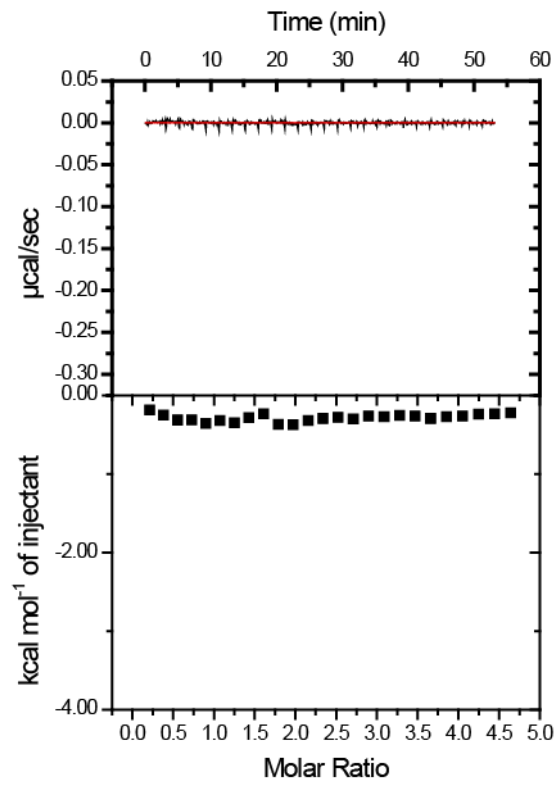


図 2-8 マグネシウムイオン結合型カラクシンに対するバリウムイオン滴定の ITC

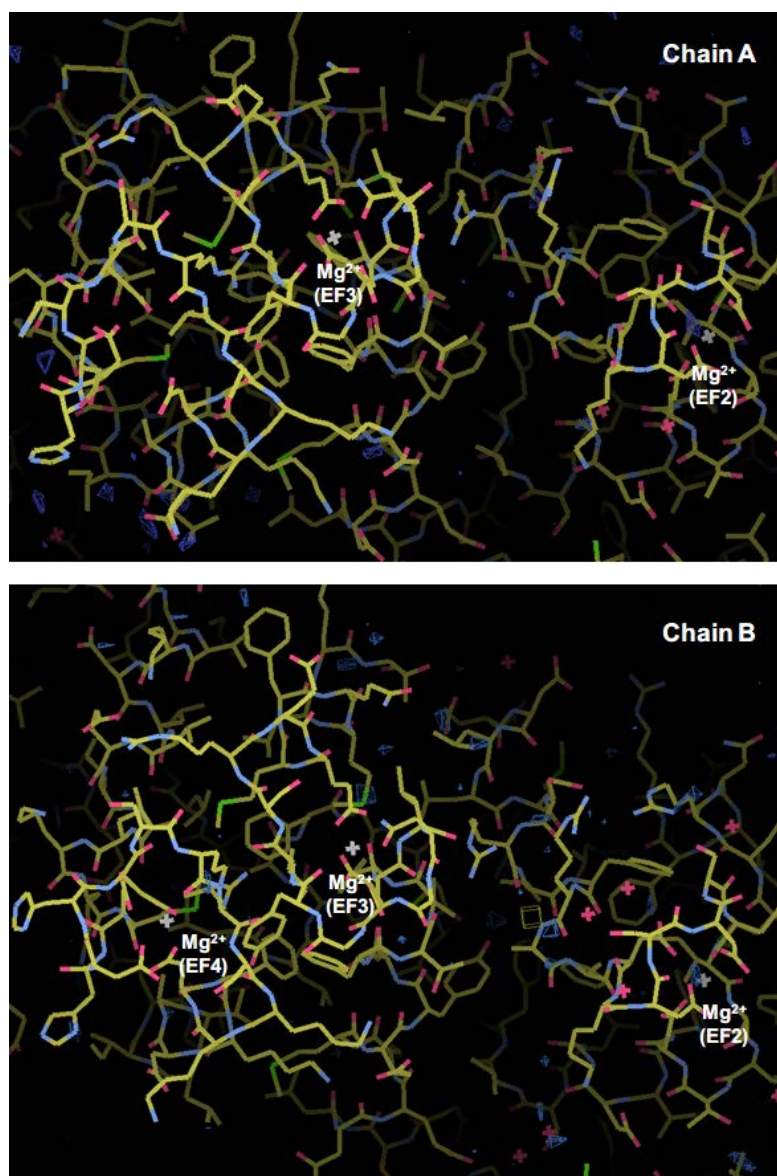


図 2-9 カラクシンの結晶中の異常分散シグナル

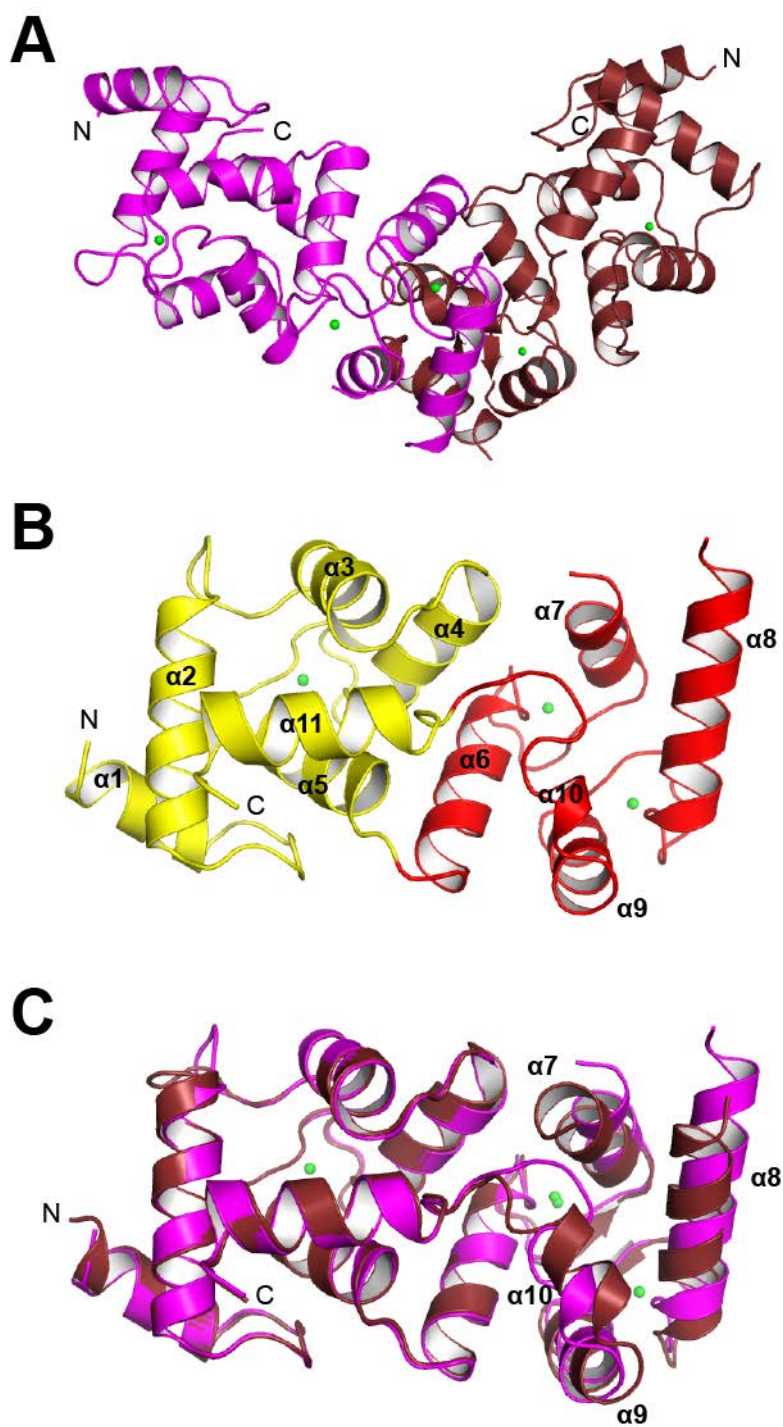


図 2-10 マグネシウムイオン結合型のカラクシンの結晶構造

(A)非対称単位中の結晶構造. open state と closed state の 2 状態の構造をそれぞれ magenta と ruby で示した. タンパク質の N 末端と C 末端はそれぞれ「N」と「C」で示した. マグネシウムイオンは green の sphere モデルで示した. (B) open state の構造の N-terminal domain (1-93, 182-199)と C-terminal domain (94-181)の構造. N-terminal domain と C-terminal domain をそれぞれ yellow と red で示した. マグネシウムイオンは green の sphere モデルで示した.

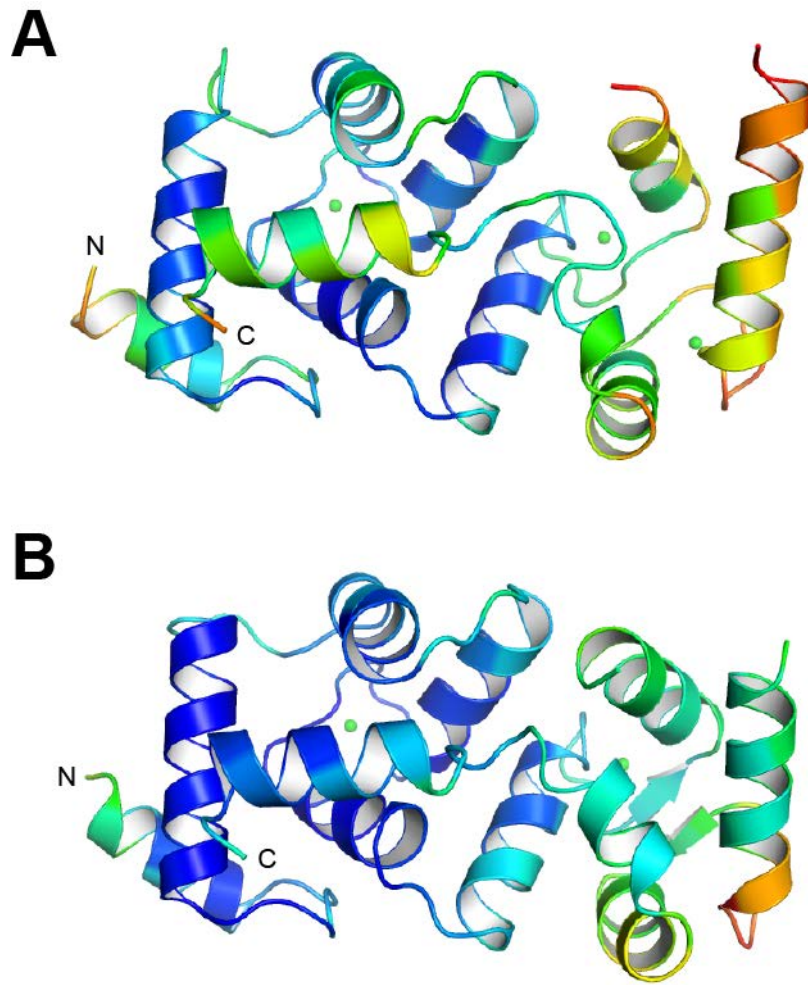
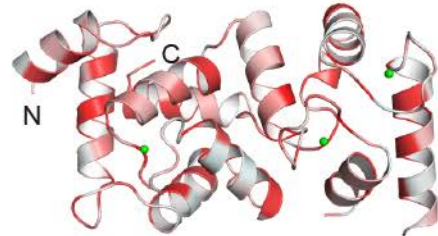
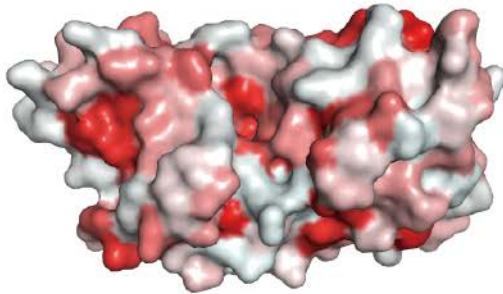


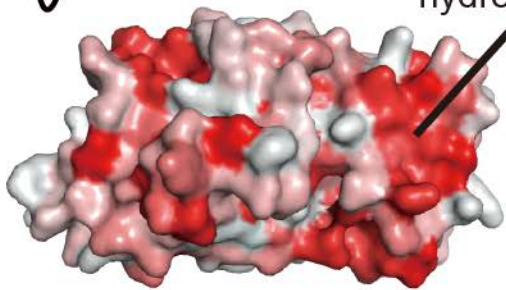
図 2-11 マグネシウムイオン結合型のカラクシンの B-factor マッピング
 closed state (A)と open state (B)の構造における α 炭素の B-factor を、低い値を青、高い値を赤で示した。

A

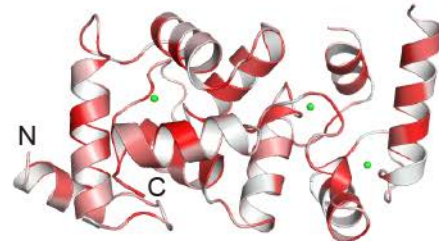
closed state



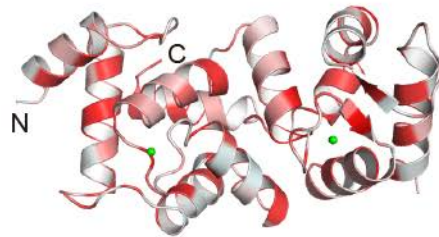
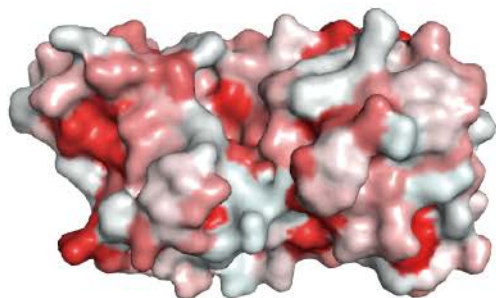
\curvearrowright 180°



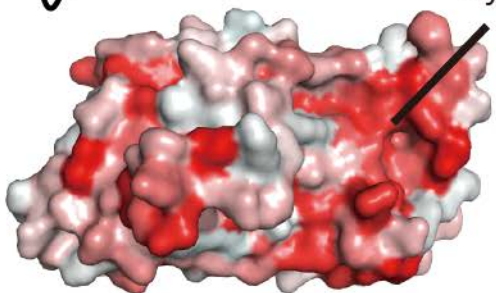
C-terminal domain
hydrophobic pocket



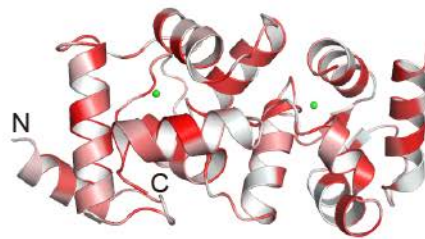
open state



\curvearrowright 180°



C-terminal domain
hydrophobic pocket



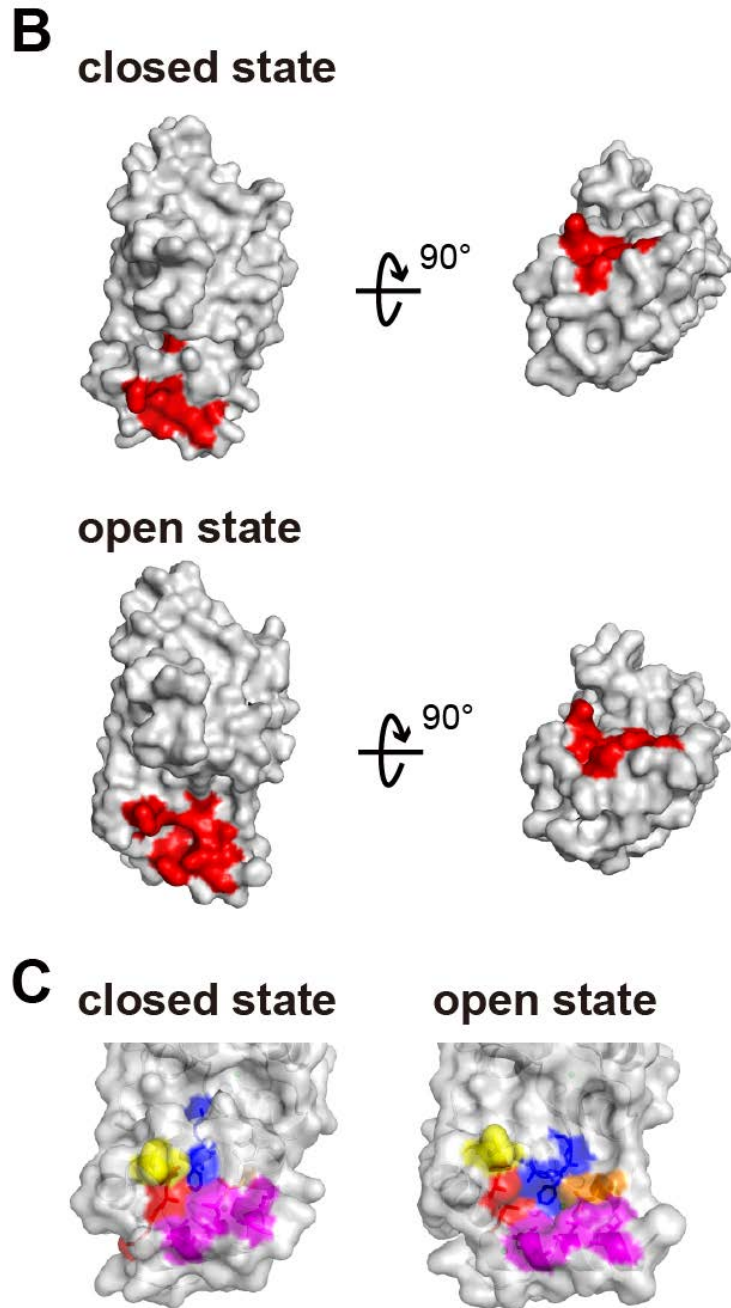


図 2-12 マグネシウムイオン結合型カラクシンの open state と closed state での疎水性表面
 (A)カラクシン表面の疎水性度. 左列には surface モデル, 右列には cartoon モデルの結晶構造を示した. 各結晶構造において, 疎水性度の高い領域を red で示した. (B) C-terminal domain の疎水性表面の形状変化. C-terminal domain に存在する疎水性残基(L123, G139, I140, L143, I146, A147, L173, L174, A177, F178, G179)を red で示した. (C) C-terminal domain の疎水性表面の各残基の位置の変化. $\alpha 7$ に存在する疎水性残基(L123)を orange, $\alpha 8$ に存在する疎水性残基(G139, I140, L143, I146, A147)を magenta, M151 と L174 を red, $\alpha 10$ に存在する疎水性残基(A177, F178, G179)を blue, L173 を yellow の stick モデルで示した.

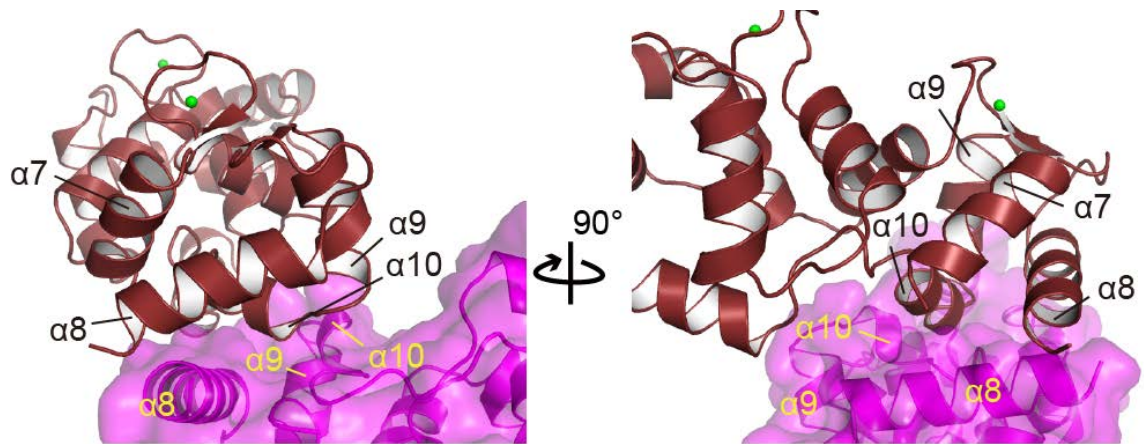


図 2-13 マグネシウムイオン結合型カラクシンの結晶構造中のパッキング様式
 open state の構造を magenta の cartoon モデルおよび surface モデルで， closed state の構造を
 ruby の cartoon モデルで示した。

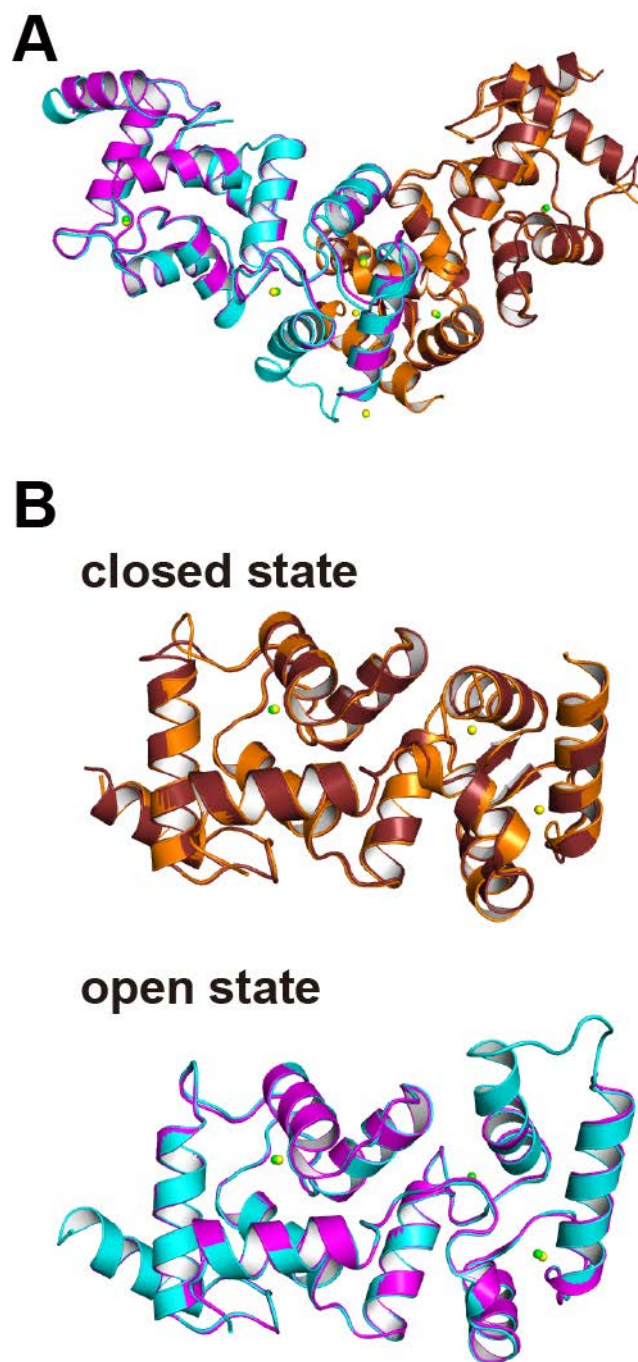


図 2-14 カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型のカラクシンの構造比較
 (A)カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型の間での非対称単位中の 2 分子の構造比較. (B)カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型の間での closed state と open state の構造比較. closed state でのカルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型の構造をそれぞれ orange と ruby の cartoon モデルで, open state でのカルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型の構造をそれぞれ cyan と magenta の cartoon モデルで示した.

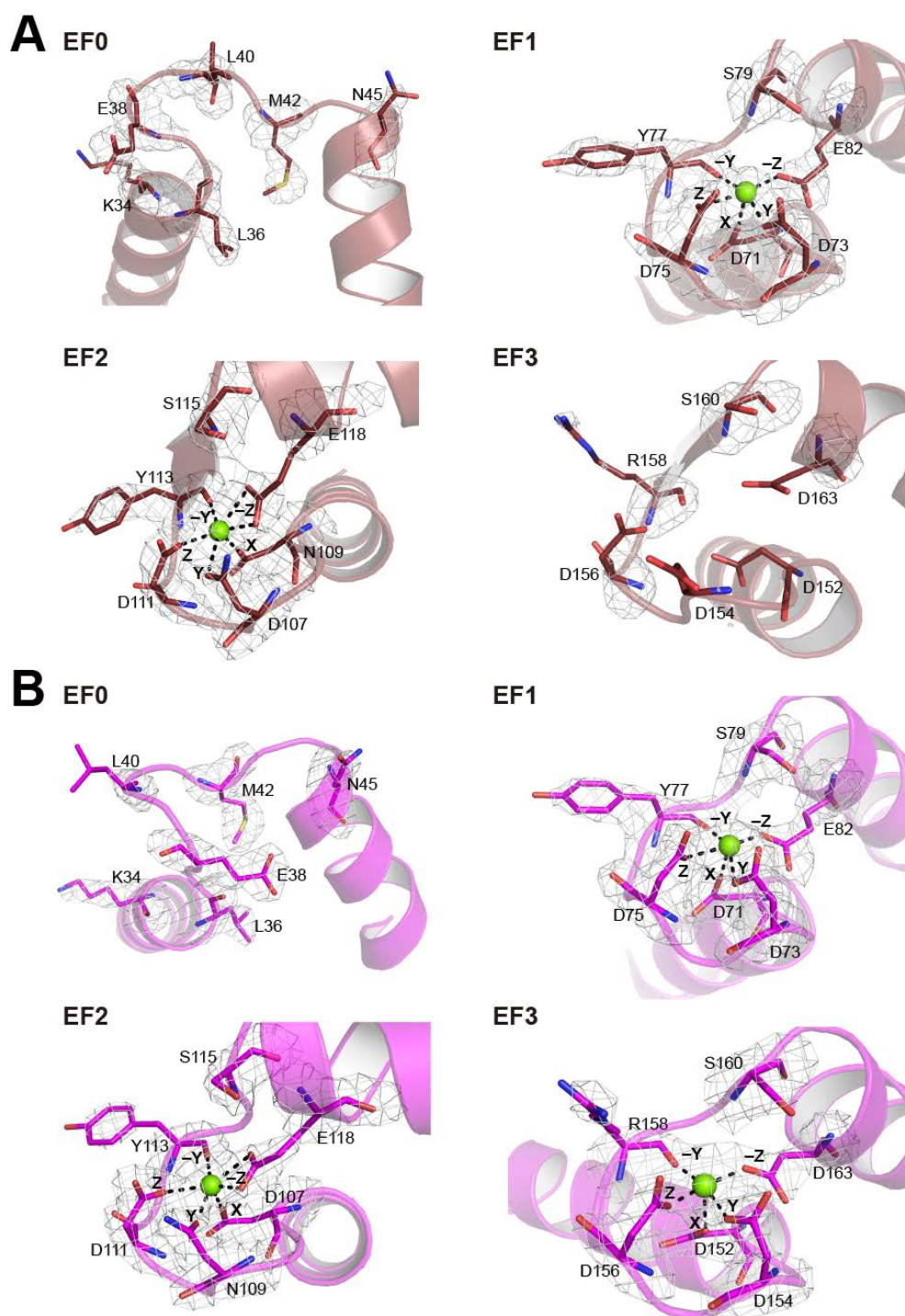


図 2-15 カラクシンの closed state (A)と open state (B)の 2 状態における各 EF-hand でのマグネシウムイオン配位様式

closed state と open state におけるカラクシンの結晶構造をそれぞれ ruby と magenta の cartoon モデルで示した. マグネシウムイオンは green の sphere モデルで示した. マグネシウムイオンの配位に関与するアミノ酸残基の側鎖(X, Y, -Y, Z, -Z)とマグネシウムイオンについて, gray の mesh により 3σ で電子密度を表示した.

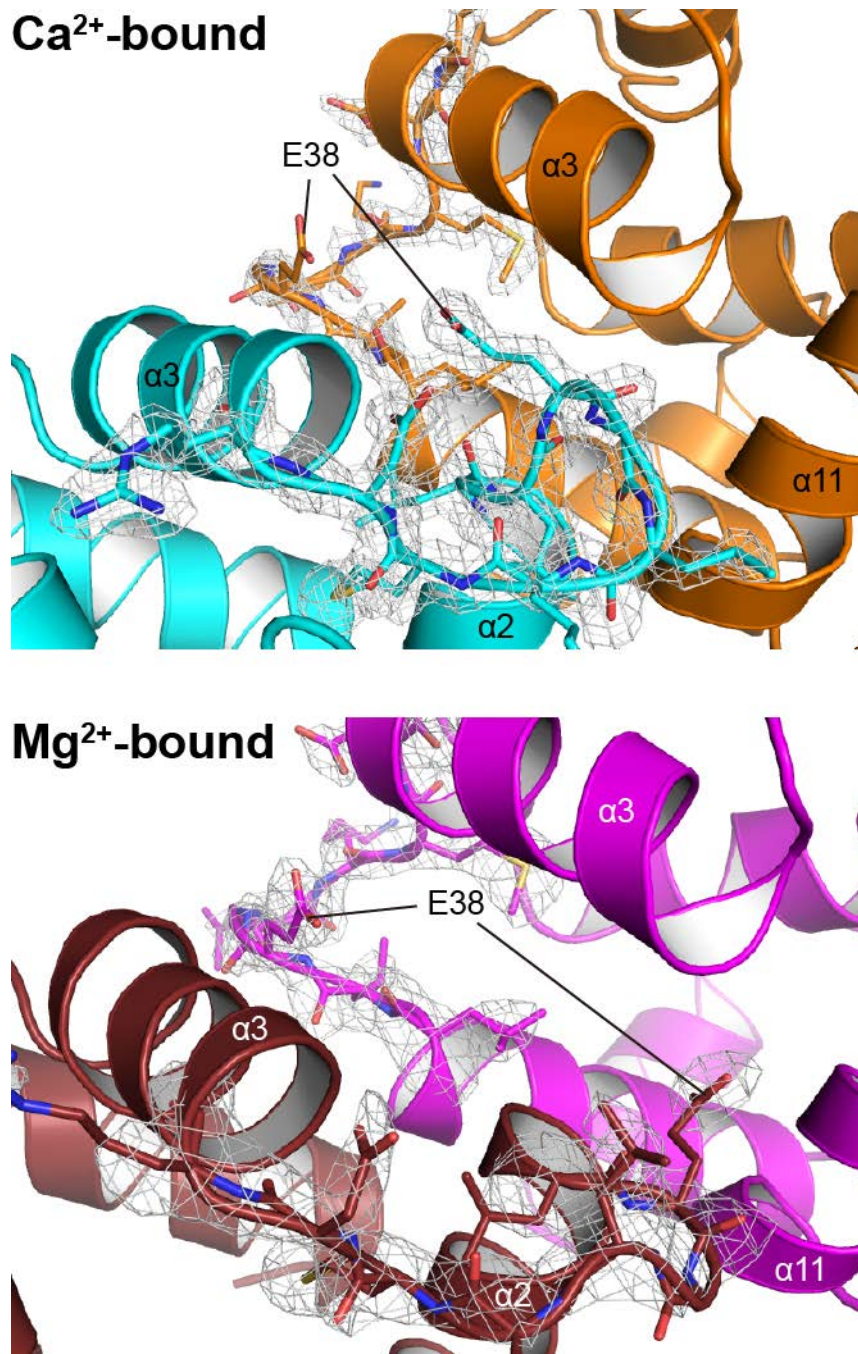


図 2-16 結晶構造中の EF0 のパッキング様式
 カルシウムイオン結合型(open state: cyan, closed state: orange)とマグネシウムイオン結合型
 (open state: magenta, closed state: ruby)の結晶構造を cartoon モデルで示した。また、E38 を
 stick モデルで示した。EF0 の電子密度は gray の mesh により 3σ で電子密度を表示した。

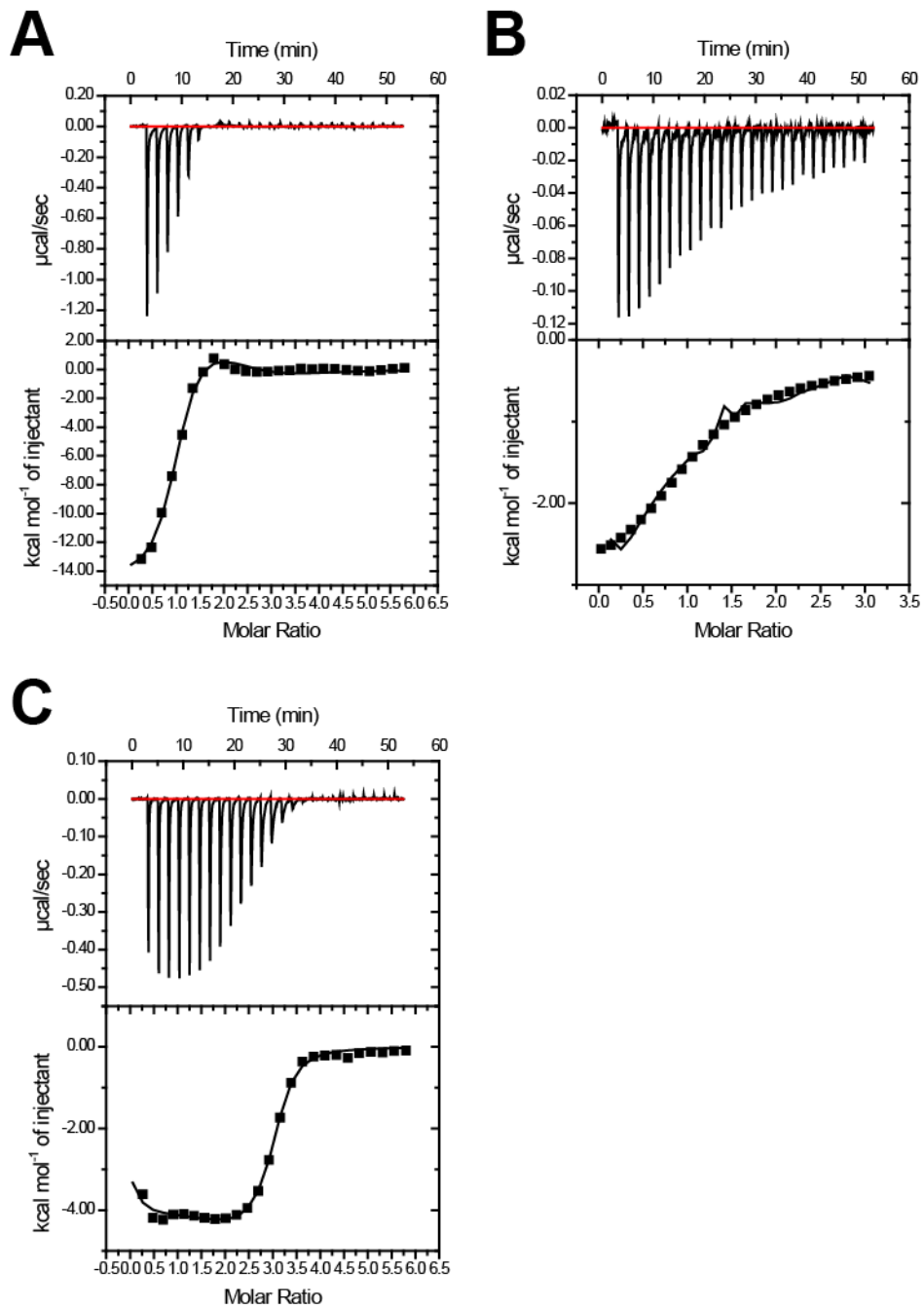


図 2-17 カラクシンの ITC 測定

(A)アポ型のカラクシンへのカルシウムイオンの滴下. (B)アポ型のカラクシンへのマグネシウムイオンの滴下. (C)マグネシウムイオン結合型のカラクシンへのカルシウムイオンの滴下.

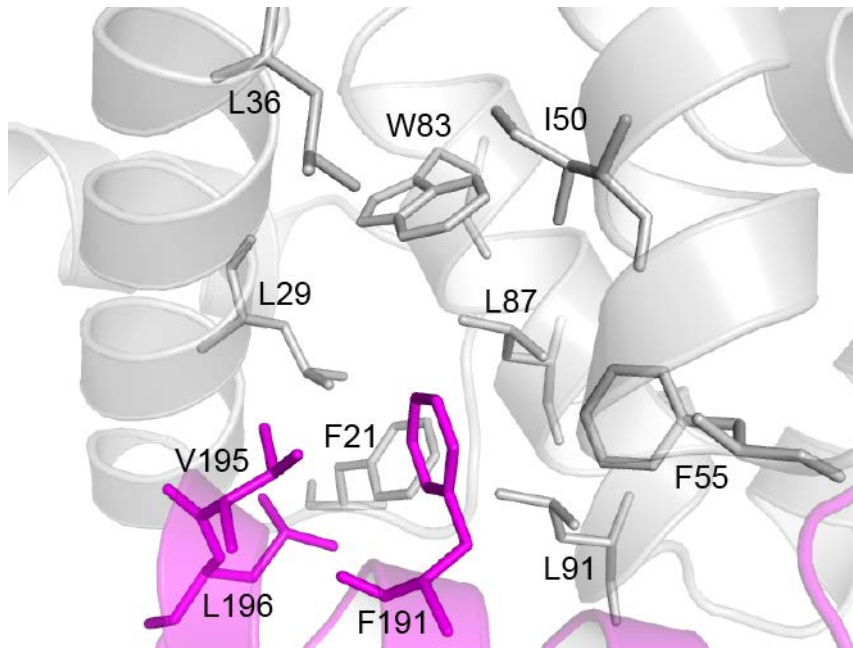


図 2-18 $\alpha 11$ と N-terminal domain 間の疎水性相互作用

マグネシウムシオン結合型の open state での構造を表示し、 $\alpha 11$ を magenta, それ以外の領域を gray の cartoon モデルで示した。疎水性相互作用を形成している $\alpha 11$ と N-terminal domain の疎水性残基の側鎖を stick モデルで示した。

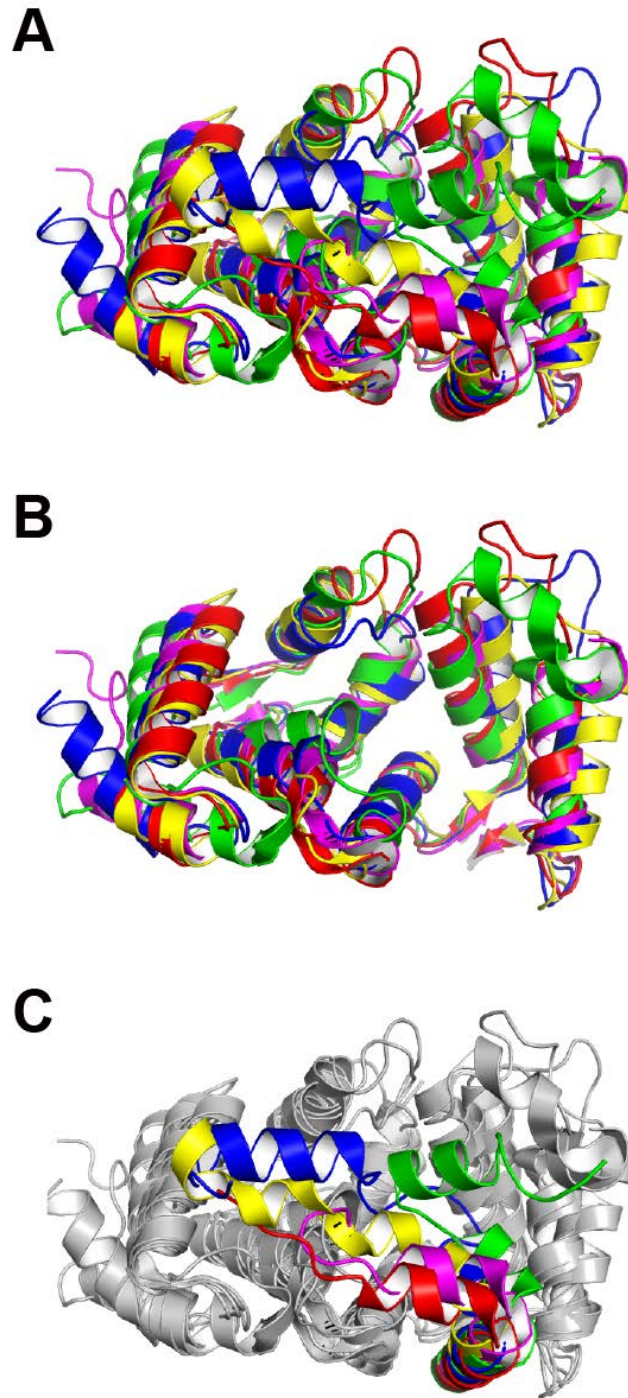


図 2-19 NCS protein family のタンパク質の結晶構造比較
 カラクシン(open state, blue), KChIP1 (PDB ID: 2I2R, red), AtCBL2 (PDB ID: 2ZFD, yellow),
 NCS-1 (PDB ID: 5AEQ, magenta), recoverin (PDB ID: 1OMR, green)の結晶構造を ribbon モデルで示した。(A)タンパク質の全長の構造。(B)各タンパク質の EF-hand motif を形成している部分と N 末端の α -ヘリックスのみの構造。(C)全長から(B)の部分を除いた領域のみを色で示した構造。

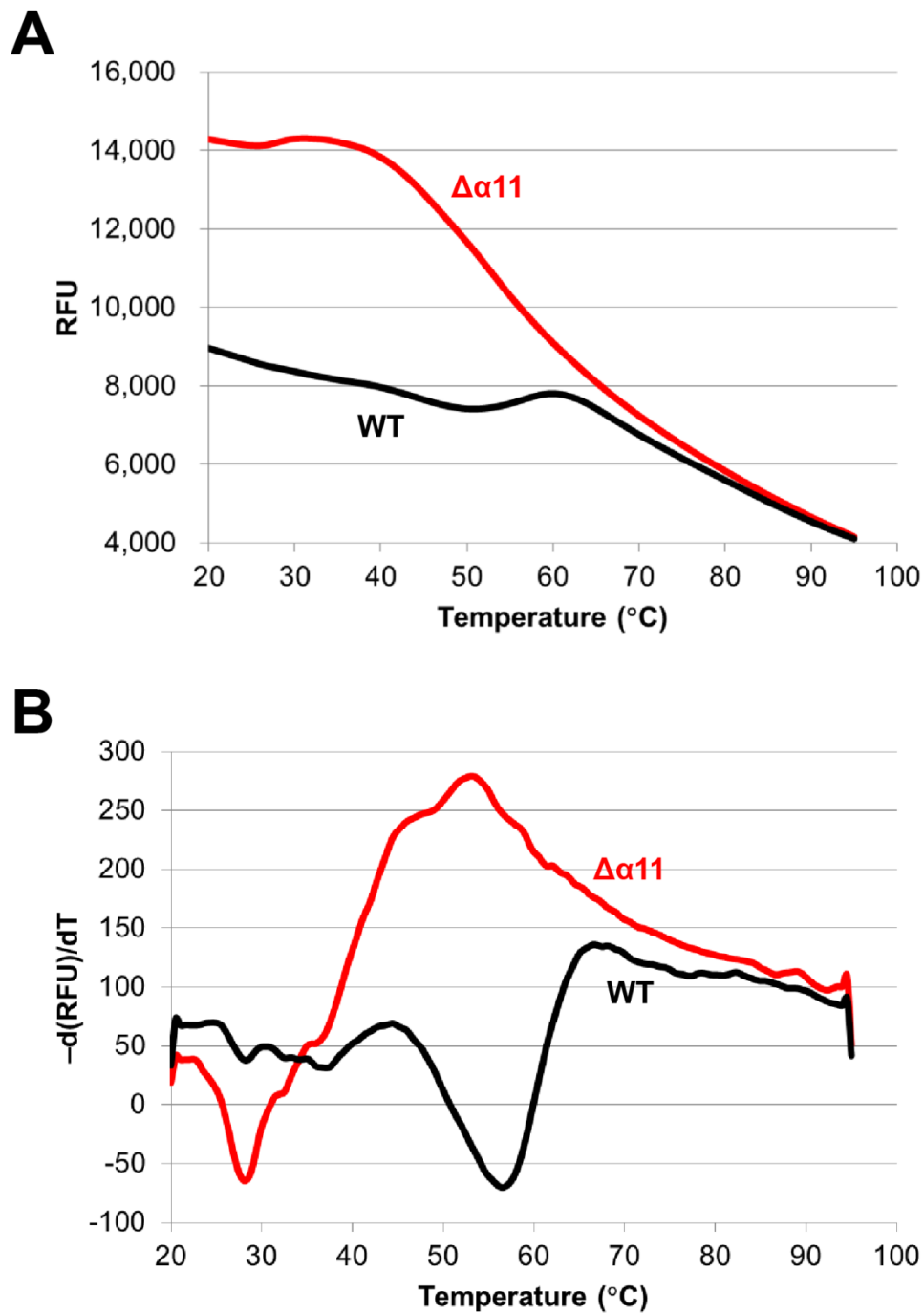


図 2-20 カラクシンの野生型と変異体($\Delta\alpha11$)の熱安定性測定
 野生型と $\Delta\alpha11$ の蛍光強度をそれぞれ黒と赤の曲線で示した. (A) SYPRO Orange の蛍光強度.
 (B) SYPRO Orange の蛍光強度の微分曲線.

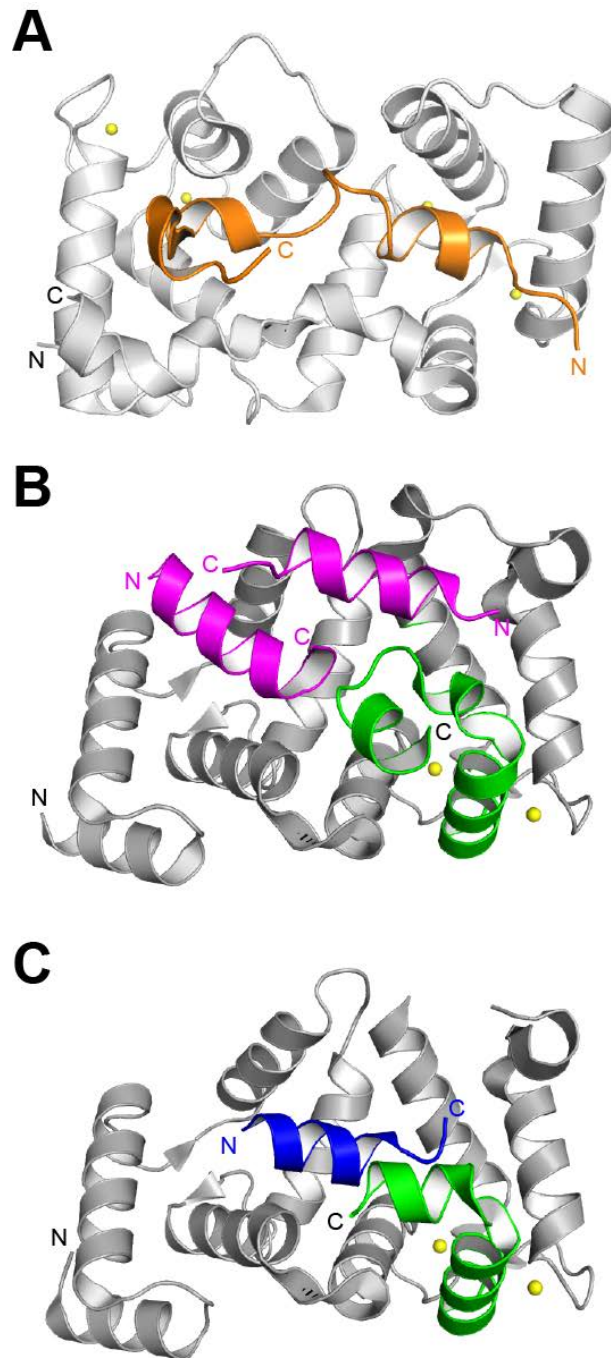


図 2-21 NCS protein family のタンパク質の複合体結晶構造

(A) AtCBL2 (gray90)と AtCIPK (orange)の複合体結晶構造. AtCIPK は AtCBL2 との結合に関与している 308–334 のアミノ酸残基のみを示した. (B) NCS-1 (gray70, green)と D2R (magenta)の複合体結晶構造. NCS-1 の C 末端のヘリックス(164–190)を green で示した. (C) NCS-1 (gray70, green)と GRK1 (blue)の複合体結晶構造. NCS-1 の C 末端のヘリックス(164–184)を green で示した. また, 各構造のカルシウムイオンを yellow の sphere モデルで示した.

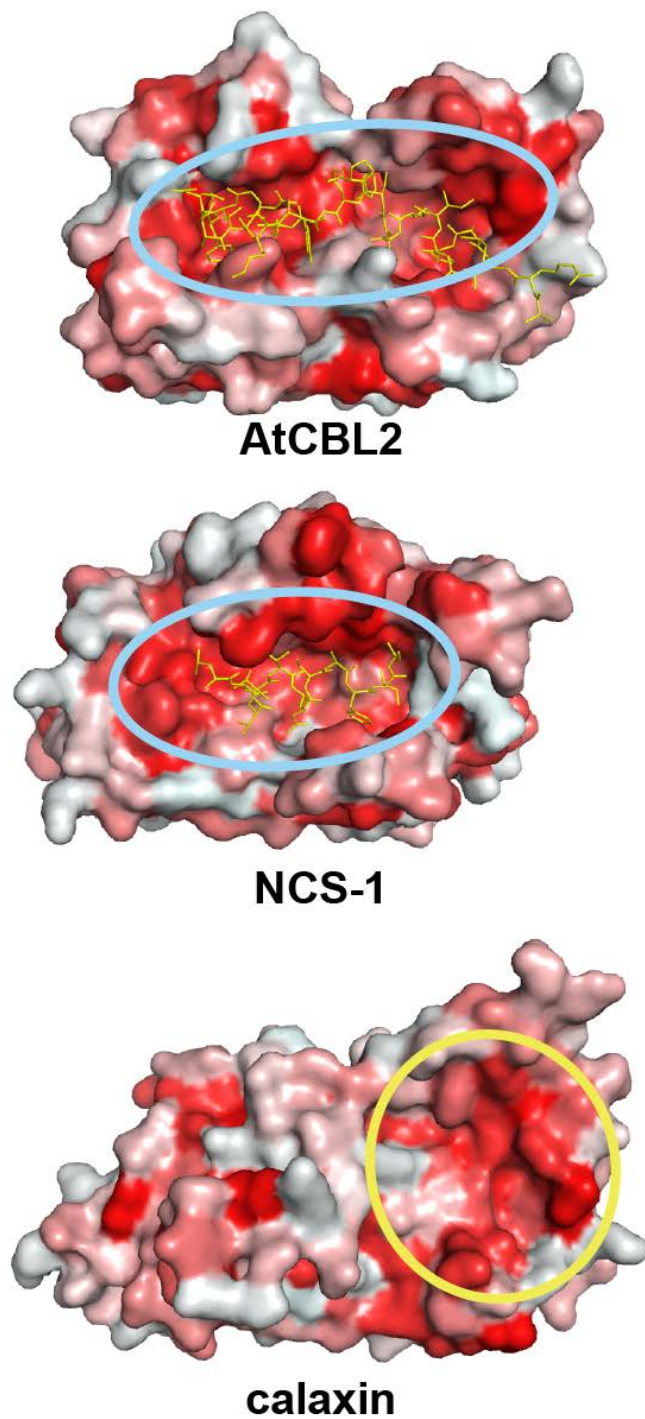


図 2-22 NCS protein family のタンパク質の疎水性ポケットの比較
 AtCBL2, NCS-1, カラクシンの構造を重ね合わせ、同じ方向から見た場合の結晶構造を示した。AtCBL2 および NCS-1 における相互作用パートナーとの結合に関わる疎水性ポケットをシアンで示した。また、カラクシンの疎水性ポケットを黄で示した。

第三章

溶液中におけるカラクシンの 構造変化の解析

3-1 X線小角散乱

3-1-1 X線小角散乱を用いたカラクシンの溶液中での構造変化の解析

X線結晶構造解析では、カラクシンのカルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型とで、大きな構造変化は確認できなかった。これは、カラクシンが結晶を形成した際の結晶のパッキングによって、カルシウムイオンあるいはマグネシウムイオンの結合による構造への影響が打ち消されてしまったことにある可能性がある。そこで、本当に生体内でもカルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型で同じ構造をとるのか、あるいは結晶形成におけるパッキングによる影響により構造変化が見えなかったただけなのかを判断するために、溶液中での構造変化を解析することにした。そのための手法として、X線小角散乱法を試みた。

X線小角散乱法は溶液の試料に対してX線を照射し、それによる散乱のうちの散乱角の小さいものについてデータを収集し、物質の構造情報を得る手法である。タンパク質の場合には溶液試料にX線を照射し、小さな散乱角の散乱を測定して、各散乱ベクトル(h)における散乱強度(I)のデータセットを取得する、それらのデータセットを処理することで、タンパク質の立体構造、会合状態、剛体半径の算出など、様々な構造情報を得ることができる(Blanchet & Svergun, 2013)。ただし、X線結晶構造解析法に比べると分解能が劣るため、原子レベルでの構造解析は困難である。

本研究では、アポ型、マグネシウムイオン結合型、カルシウムイオン結合型の各種カラクシン溶液に対してX線小角散乱測定を行い、分子の剛体半径を求めることで、金属イオンの結合によって分子の形状にどのような影響を与えるのかを解析した。

3-1-2 実験方法

3-1-2-1 X線小角散乱実験とデータ解析

X線小角散乱に用いるためのサンプルとして、アポ型のカラクシンの調製を熱安定性測定サンプルと同様の方法で精製した。その後、サンプルを2つに分けた後、終濃度 10 mM $MgCl_2$ を添加したもの、終濃度 10 mM の $CaCl_2$ を添加したものを、それぞれマグネシウムイオン結合型、カルシウムイオン結合型のサンプルとして調製した。また、各タンパク質の濃度は、マグネシウムイオン結合型は 2 mg/mL, 1.5 mg/mL, 0.5 mg/mL の 3 種類、カルシウムイオン結合型は 1.75 mg/mL, 1.5 mg/mL, 0.5 mg/mL の 3 種類を用意した。

X線小角散乱実験は Photon Factory のビームライン BL-10C を用いて行った。測定の際には、検出器として PILATUS3 2M (Dectris) を使い、X線の波長を 1.488 Å, カメラ長を 1.0 m の条件で行った。アポ型, Mg^{2+} 結合型, Ca^{2+} 結合型のそれぞれのサンプルにつき、1回の測

定で 10 回 X 線を照射してデータセットを取得し、それを 3 回繰り返すことで、計 30 個のデータセットを取得した。データ解析の際には、各回の測定(X 線照射 10 回分)の平均値をとり、3 回の測定ではほぼ同じ測定値であることを確認した後、計 30 回分の平均値をとることで、アポ型、マグネシウムイオン結合型、カルシウムイオン結合型のそれぞれのサンプルの測定値とした。得られたデータセットは、FIT2D (<http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D/>)を用いて Data reduction を行った。アポ型、マグネシウムイオン結合型、カルシウムイオン結合型のそれぞれの慣性半径(R_g)は、東京薬科大学生命科学部の小島正樹教授によって開発されたソフトウェアである anarg32n を用いた。散乱ベクトル h は以下の式により算出した(Svergun *et al.*, 1995)。

$$h = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$$

θ は X 線の散乱角、 λ は X 線の波長をそれぞれ表す。

また、慣性半径の算出のための guinier 領域における線形近似においては、横軸を h^2 、縦軸を $\ln I(h)$ に変換した上で、以下の近似式を用いた($I(h)$ は散乱強度)。

$$\ln(I(h)) = \ln(I(0)) - \frac{R_g^2}{3} h^2$$

散乱曲線のフィッティング曲線は以下の式を用いて描いた。

$$I(h) = (1 - \alpha) I_{\text{open}}(h) + \alpha I_{\text{closed}}(h)$$

$I_{\text{open}}(h)$ はカルシウムイオン結合型のカラクシンの open state の PDB ファイルから X 線小角散乱の解析プログラムである CRY SOL を用いて算出された理論的な散乱強度、 $I_{\text{closed}}(h)$ はカルシウムイオン結合型のカラクシンの closed state の PDB ファイルから CRY SOL を用いて算出された理論的な散乱強度を表す。データのフィッティングでは実測値とのずれを示す因子 R が一番小さくなるように α を選択して open state と closed state の割合を求めた。

$$R = \frac{\sum_h |I_{\text{obs}}(h) - k I_{\text{calc}}(h)| h^2}{\sum_h I_{\text{calc}}(h)^2 h^2}$$

I_{obs} は散乱強度の実測値、 I_{calc} は散乱強度の計算値を表す。

上の式の k は以下の式で算出されるスケール因子である。

$$k = \frac{\sum_h I_{\text{obs}}(h) I_{\text{calc}}(h) h^2}{\sum_h I_{\text{calc}}(h)^2 h^2}$$

3-1-2-2 ゲル濾過クロマトグラフィーを用いたカラクシンの分子量の算出

SAXS での実験に用いたカラクシンが多量体を形成しているかどうかを確認するために、ゲル濾過クロマトグラフィーと分子量マーカーを用いて、カラクシンの分子量の算出を行った。ゲル濾過クロマトグラフィーでは Superdex 75 10/300 GL カラムを用い、20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT の含まれるバッファーを用いて解析を行った。排除体積を求めるためには、1.0 mg/mL の Blue dextran を 200 μ L ロードした。分子量マーカーに用いるタンパク質としては Conalbumin (分子量 75,000), Ovalbumin (分子量 43,000), Chymotrypsinogen A (分子量 25,000), Ribonuclease A (分子量 13,700) の 4 種類を選択した。また、ロードした分子量マーカーの終濃度は ovalbumin が 4 mg/mL, Conalbumin, Chymotrypsinogen A, Ribonuclease A が 3 mg/mL であり、これらの混合物の溶液を用いた。カラクシン溶液は、精製の最終段階でのゲル濾過クロマトグラフィーのクロマトグラムから、溶出体積を求めた。各タンパク質の分配係数 K_{av} は以下の式により算出した。

$$K_{\text{av}} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o}$$

V_e は各タンパク質の溶出体積、 V_o はカラムの排除体積、 V_c はカラム容量(24 mL)を表す。

3-1-3 実験結果

3-1-3-1 溶液中でのカラクシンの多量体形成の解析

初めに、カラクシンが多量体を形成していると 1 分子の慣性半径を正確に見積もれないため、カラクシンが金属イオンの結合によって多量体を形成しているかどうかを確かめるためにゲル濾過クロマトグラフィーを用いて分子量の算出を行った(図 3-1 A-C, 図 3-2 A-C)。カラクシンの分子量は 23,772 であるが、SAXS で用いたアポ型、マグネシウムイオン結合同型、カルシウムイオン結合同型の分子量はそれぞれ 38,529, 23,744, 25,285 と計算された(表 3-1, 表 3-2, 図 3-1 C)。これらの値とカラクシンの分子量を比較すると、マグネシウムイオン結合同型とカルシウムイオン結合同型は単量体であると考えられる。アポ型に関しては、溶出体積が小さくなった原因が 2 量体化の形成によるものであるか、大きな構造変化により見た目の分子量が大きく算出されたのかをはっきりと断定することができなかった。しかし、少なくともマグネシウムイオン結合同型とカルシウムイオン結合同型に関しては、カラク

シン 1 分子の慣性半径の大きさを議論することができることが明らかになった。そのため、以降ではマグネシウムイオン結合型とカルシウムイオン結合型の慣性半径のみを議論することにした。

3-1-3-2 溶液中でのカラクシンの慣性半径の算出

X 線結晶構造解析では、カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型とで、カラクシンの構造に大きな違いが見られなかった。そこで、溶液中でのカラクシンの構造変化を観察するために、X 線小角散乱による解析を行った。初めにデータセットから得られた散乱曲線(X 軸が散乱ベクトル(h), Y 軸が散乱強度($I(h)$))を描いた(図 3-3 A, B)。続いて、散乱曲線を基に、横軸を h^2 に、縦軸を $\ln I(q)$ に変換を行って、guinier plot を描いた(図 3-4 A, B)。慣性半径(R_g)と guinier 領域における散乱曲線の傾き(slope)には以下の関係がある(Blanchet & Svergun, 2013)。

$$\text{slope} = -\frac{R_g^2}{3}$$

すなわち、guinier 領域の散乱曲線の負の傾きが大きいほど、慣性半径が大きいと言える。

続いて、ソフトウェア anarg32n を用いて、具体的な分子の慣性半径の大きさを算出した。各タンパク質濃度のカラクシン溶液に対する慣性半径をプロットし、カラクシンの濃度が 0 mg/mL の時の慣性半径(近似曲線と y 軸との交点)を真のカラクシンの慣性半径をして算出した結果、マグネシウムイオン結合型では 20.2 Å, カルシウムイオン結合型では 19.3 Å と算出された(図 3-5 A, B)。慣性半径の算出の結果から、マグネシウムイオンが結合した場合よりも、カルシウムイオンが結合した場合のほうが、慣性半径が小さくなることが示唆された。

カラクシンのカルシウムイオン結合型の結晶構造で見られた open state と closed state の 2 状態について、それぞれの PDB ファイルを用いて CRY SOL によって慣性半径を算出した。その結果、open state と closed state の各状態の分子の慣性半径はそれぞれ 18.82 Å, 17.84 Å となった。これらの値は、SAXS の結果から算出された値に比べると小さい値であった。このような結果となった原因としては、今回のカラクシンの結晶構造では N 末端の一部および C 末端の一部の構造が見えなかったため、その分だけ慣性半径が小さく見積もられたということも考えられる。

3-1-3-3 カルシウムイオン結合による溶液中での構造の遷移

今回の結晶構造で見られた open state や closed state の 2 状態の構造がカルシウムイオン結

合型およびマグネシウムイオン結合型の構造に対応しているかどうかを調べた。そこで、open state と closed state の 2 状態の分子に関して理論的な散乱曲線を描き、カルシウムイオン結合型やマグネシウムイオン結合型の散乱曲線が open state と closed state の 2 状態における散乱曲線の成分をどのような割合で含んでいるのかを解析した。その結果、マグネシウムイオン結合型の散乱曲線は、open state の状態における散乱曲線とフィッティングができたことから、マグネシウムイオン結合型における open state と closed state の 2 状態の存在比は 100:0 であることが明らかになった(図 3-4 A)。それに対して、カルシウムイオン結合型の散乱曲線は、82%の open state の状態と 18%の closed state の状態の存在比で描いた近似曲線とフィッティングさせることができた(図 3-4 B)。以上のことから、カラクシンにマグネシウムイオンが結合している時と比べて、カルシウムイオンが結合した際には closed state の状態に構造が遷移し、慣性半径がより小さくなるということが示唆された。

3-2 1,8-ANS 蛍光によるカラクシンの疎水性表面の解析

3-2-1 金属イオン結合によるカラクシンの疎水性表面の変化の解析

カラクシンが属する NCS protein family においては、溶液中におけるアポ型、マグネシウムイオン結合型、カルシウムイオン結合型でそれぞれの疎水性表面の広さが変わることが知られている(Aravind *et al.*, 2008 ; Gonzalez & Miksovska, 2014)。カラクシンでは、C-terminal domain の分子表面の片側に疎水性領域が集中して存在している部分がある(図 2-10 A)。しかし、カラクシンの結晶構造においては、カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型では構造が良く類似していた。しかし、SAXS によりカラクシンの慣性半径を算出した結果、カルシウムイオン結合型はマグネシウムイオン結合型と比べて慣性半径が小さくなることが明らかになった。また、カルシウムイオン結合によってカラクシンの構造は open state から closed state に状態が遷移することも明らかになった。closed state の状態では open state の状態と比べて C-terminal domain の疎水性ポケットの露出が小さくなる。そのため、溶液中ではカルシウムイオン結合時とマグネシウムイオン結合時でカラクシンの分子表面の疎水性度が変化するのではないかと考え、1,8-ANS 蛍光を用いた疎水性表面の解析を行った。

3-2-2 実験方法

8-(phenylamino)-1-naphthalenesulfonic acid (1,8-ANS)による蛍光測定のためのサンプルとして、アポ型のカラクシンの調製を熱安定性測定のためのサンプルと同様の方法で精製した。蛍光測定では、カラクシンと 1,8-ANS の終濃度がそれぞれ 20 μM と 100 μM になるようにサンプルを混合した。そして、アポ型には終濃度 1 mM の EDTA、マグネシウムイオン結合

型には終濃度 1 mM の MgCl_2 と終濃度 1 mM の EGTA, カルシウムイオン結合型には終濃度 1 mM の CaCl_2 , マグネシウムイオン/カルシウムイオン結合型には終濃度 1 mM の CaCl_2 と終濃度 1 mM の MgCl_2 を混合した. EDTA はカルシウムイオンやマグネシウムイオンなどの多くの種類の金属イオンとキレートする試薬で, カラクシンから金属イオンを除いたアポ型の調製のために添加した. また, EGTA はマグネシウムイオンに比べてカルシウムイオンと特異的にキレートできる試薬で, カルシウムイオンをタンパク質から除いて確実にマグネシウムイオン結合型を調製するために添加した.

蛍光測定の際は, 蛍光測定の機器として infinite M1000 を用い, プレートは 96-well の黒色平底プレートを用いた. また, 各サンプルは 100 μL ずつ使って測定をした. 励起光の波長は 350 nm の光を用い, 蛍光の波長が 400 nm から 600 nm までで 2 nm 間隔ずつの蛍光強度を検出した.

3-2-3 実験結果

カラクシンのアポ型, マグネシウムイオン結合型, カルシウムイオン結合型を用いて, 1,8-ANS による蛍光の測定を行った. 1,8-ANS は, タンパク質の疎水性表面に結合して蛍光を発する試薬なので, カラクシンの各状態の蛍光強度を比較することで, 疎水性表面の大小を比較することができる(Cardamone & Puri, 1992) (図 3-6).

測定の結果, 各サンプル(アポ型, マグネシウムイオン結合型, カルシウムイオン結合型, マグネシウムイオン/カルシウムイオン結合型)において, 445 nm と 495 nm 付近にピークが現れた(図 3-7). 全体の蛍光強度のスペクトルを比較すると, アポ型の蛍光強度が最も高く, 次いでマグネシウムイオン結合型, カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン/カルシウムイオン結合型がどちらも同程度の蛍光強度で, 蛍光強度が最も低かった. 以上の結果から, アポ型, マグネシウムイオン結合型, カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン/カルシウムイオン結合型の順で, 分子の表面の疎水性領域が広い, ということが示唆された. また, マグネシウムイオン/カルシウムイオン結合型は, カルシウムイオン結合型の蛍光強度と同程度であったが, マグネシウムイオン結合型の蛍光強度とは異なっていた. ITC の結果から, カラクシンのカルシウムイオンに対する結合力は, マグネシウムイオンに対する結合力よりも強いことが示された(表 2-5). このことから, マグネシウムイオンとカルシウムイオンが同じ濃度で含まれている場合は, カルシウムイオンの方がカラクシンへの結合力が強く, ほぼ全てのカラクシンにカルシウムイオンが結合しており, カルシウムイオン結合型の構造をとっていることが示唆される.

3-3 考察

本章では, 初めに SAXS により溶液中でのカラクシンのカルシウムイオン結合型とマグ

ネシウムイオン結合型でどのような構造の違いが見られるかを検証した。初めにカラクシンの慣性半径を算出した結果、カルシウムイオン結合型ではマグネシウムイオン結合型と比べて慣性半径が小さくなることが示された。さらに、マグネシウムイオン結合型からカルシウムイオン結合型になると、カラクシンの構造が open state から closed state に状態が遷移することも明らかになった。結晶構造の PDB を用いた計算から、open state よりも closed state の状態の方がタンパク質分子の慣性半径が小さいので、カルシウムイオン結合によりカラクシンが closed state に構造が遷移したことで、結果として慣性半径が小さくなったと考えられる。SAXS におけるカルシウムイオン結合型の散乱曲線は、82%の open state の状態と 18%の closed state の状態の存在比で描いた近似曲線で精度良くフィッティングが行えた。しかし、この実験でのカルシウムイオンの濃度は 10 mM と十分に高いので、カラクシンへのカルシウムイオン結合は飽和していると考えられる。つまり、カルシウムイオン結合時のカラクシンにおいては、82%の open state の状態の構造と 18%の closed state の状態の構造が混在しているわけではなく、open state と closed state の 2 状態の間の(より open state に近い)構造をとっていると考えられる。第二章において、カルシウムイオン結合型では open state と closed state の両方の状態で 3 つずつカルシウムイオンが EF-hand に結合しており、さらに SAXS の結果では、open state と closed state の間の状態に構造が遷移していることが明らかになった。これらの結果から、カルシウムイオン結合型は 3 か所の EF-hand にカルシウムイオンが結合しているままの状態でも、open state と closed state の 2 状態間で構造の遷移が起りやすく、ダイニンを受容させやすいのではないかと考えられる。

1,8-ANS の蛍光を用いたカラクシンの表面の疎水性度の解析では、カルシウムイオン結合型ではマグネシウムイオン結合型に比べて 1,8-ANS の蛍光強度が低く、疎水性表面の露出が小さくなっていることが示唆された。この結果と SAXS の結果を総合すると、マグネシウムイオン結合型のカラクシンに対して、マグネシウムイオンがカルシウムイオンに置換されると、立体構造が closed state の構造に遷移し分子の大きさ(慣性半径)が小さくなることで、カラクシンの疎水性表面の露出も小さくなる、というような構造変化が起こることが予想できる。また、カルシウムイオン結合型およびマグネシウムイオン結合型の小角散乱の散乱曲線に対して open state と closed state の 2 種類の状態成分のみでフィッティングを行えたことから、カラクシンの結晶構造中の open state と closed state の 2 状態の構造は溶液中においても形成されている構造であり、さらにこの 2 種の構造の間で構造の遷移が起こることが示された。SAXS の結果で最も興味深い点は、マグネシウムイオン結合型とカルシウムイオン結合型の散乱曲線が、いずれも open state と closed state の状態成分のみでフィッティングできたという点である。結晶構造から、open state と closed state の 2 状態の構造の差はほぼ C-terminal domain でしか見られず、疎水性ポケットの大きさに違いが生じていることが確認された。つまり、溶液中においてもカルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型の構造では、open state と closed state の 2 状態の構造の差と同様に、C-terminal domain の疎水性ポケットの大きさに違いが生じていることを示唆している。カルシ

ウムイオン結合型ではマグネシウムイオン結合型と比べて構造が **closed state** の状態での構造に遷移することから、カルシウムイオン結合によってカラクシンの **C-terminal domain** の疎水性ポケットの露出が小さくなるということが考えられる。

カラクシンと同じ **NCS protein family** に属するタンパク質で、カリウムチャンネルと相互作用することでチャンネルの制御やアポトーシスに関与すると知られる **DREAM (downstream regulatory element antagonist modulator)** というタンパク質が存在する。1,8-ANS を利用した金属イオン結合による **DREAM** の疎水性表面の変化を解析した結果では、アポ型では蛍光強度が一番低く、マグネシウムイオンの添加でわずかに蛍光強度が上昇し、カルシウムイオンの添加で蛍光強度が顕著に上昇する(Gonzalez & Miksovska, 2014)。この結果は、マグネシウムイオンやカルシウムイオンの結合によって蛍光強度が低下したカラクシンとは正反対の結果である。また、ミリストイル化された **NCS-1** においては、マグネシウムイオンの結合では疎水性領域の減少(1,8-ANS の蛍光強度の低下)が起き、カルシウムイオンの結合では疎水性領域の増加(1,8-ANS の蛍光強度の上昇)が起きることが示されている(Aravind *et al.*, 2008)。さらに、ミリストイル化されていない **NCS-1** では、逆に疎水性領域の減少(1,8-ANS の蛍光強度の低下)が起きた(Jeromin *et al.*, 2004)。カルシウムイオンの結合でこれらの結果から、**NCS protein family** に属するタンパク質の、カルシウムイオンやマグネシウムイオンが結合した際の疎水性領域の変化の様式は、タンパク質ごとに全く異なるということが示唆される。

カラクシンは、マグネシウムイオンが結合している時には β -チューブリンと相互作用できるが、カルシウムイオンが結合している時にはダイニンと結合できることが知られている。今回の **SAXS** と 1,8-ANS の蛍光を用いた実験により、カラクシンのカルシウムイオン結合型はマグネシウムイオン結合型の疎水性ポケットの大きさが小さくなることが明らかになった。このことから、疎水性表面が広い方がより β -チューブリンと相互作用が起りやすく、疎水性表面が狭い場合にはダイニンとの相互作用が起りやすい構造となっているということが示唆された。しかし、**SAXS** の結果では、カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型の構造では、**open state** と **closed state** の2状態間で見られた大きな差があるわけではなく、**open state** とそこからわずかに **closed state** の状態に近くなるように構造が遷移したものとのわずかな差しかないことを示唆している。本研究の結果は、このようなわずかな構造の違いによって、カラクシンの相互作用パートナーの選択が切り替わるという、**NCS protein family** の機能制御の精巧さを示したものである。

表 3-1 分子量マーカーの分子量とその溶出体積

	溶出体積(mL)	K_{av}	分子量
Blue dextran	8.16		
Conalbumin	9.29	0.0713	75,000
Ovalbumin	9.99	0.116	43,000
Chymotrypsinogen A	11.85	0.233	25,000
Ribonuclease A	12.84	0.295	13,700

表 3-2 カラクシンの溶出体積と算出された分子量

	溶出体積(mL)	K_{av}	分子量
アポ型	10.56 mL	0.152	38,529
マグネシウムイオン 結合型	11.64 mL	0.220	23,744
カルシウムイオン 結合型	11.50 mL	0.211	25,285

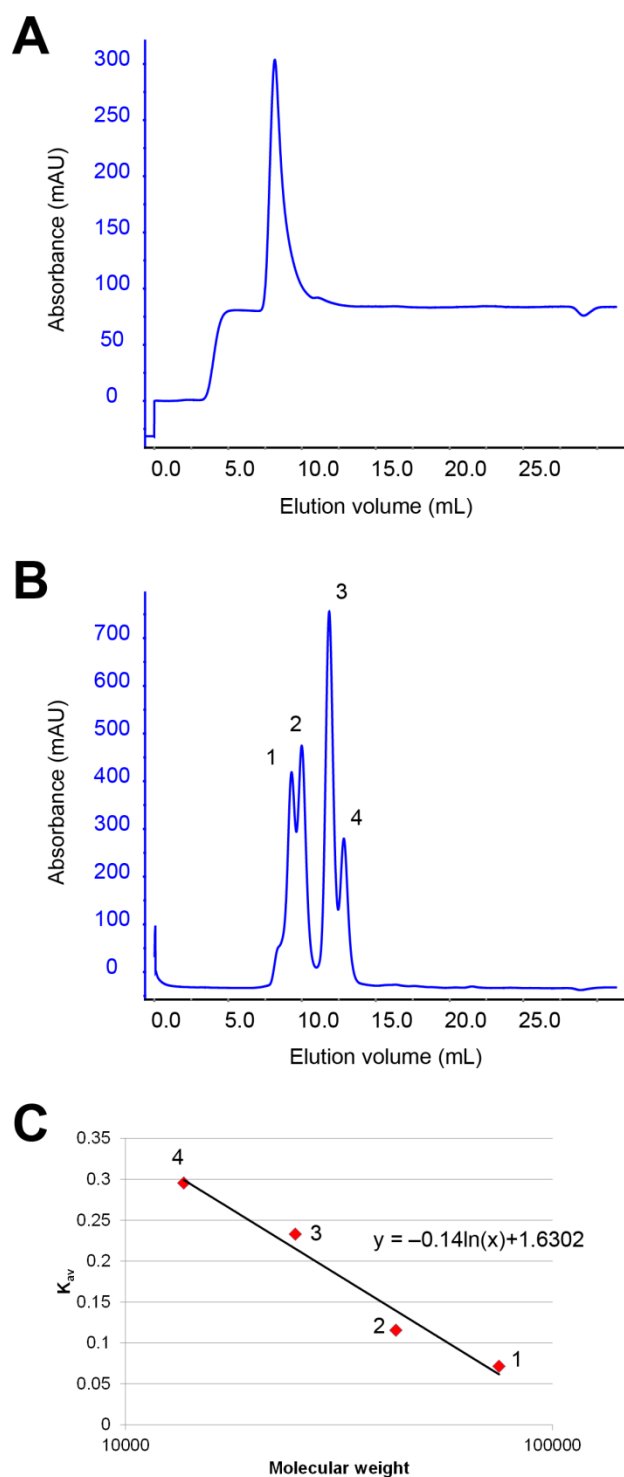


図 3-1 分子量マーカーを用いたゲル濾過クロマトグラフィーのキャリブレーション
 (A)280 nm の吸光度で作成した Blue dextran のクロマトグラム. (B)280 nm の吸光度で作成した分子量マーカーのクロマトグラム. 1, 2, 3, 4 のピークはそれぞれ Conalbumin, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A, Ribonuclease A のピークを表す. (C)分子量マーカーの検量線. 横軸は分子量の対数で表した.

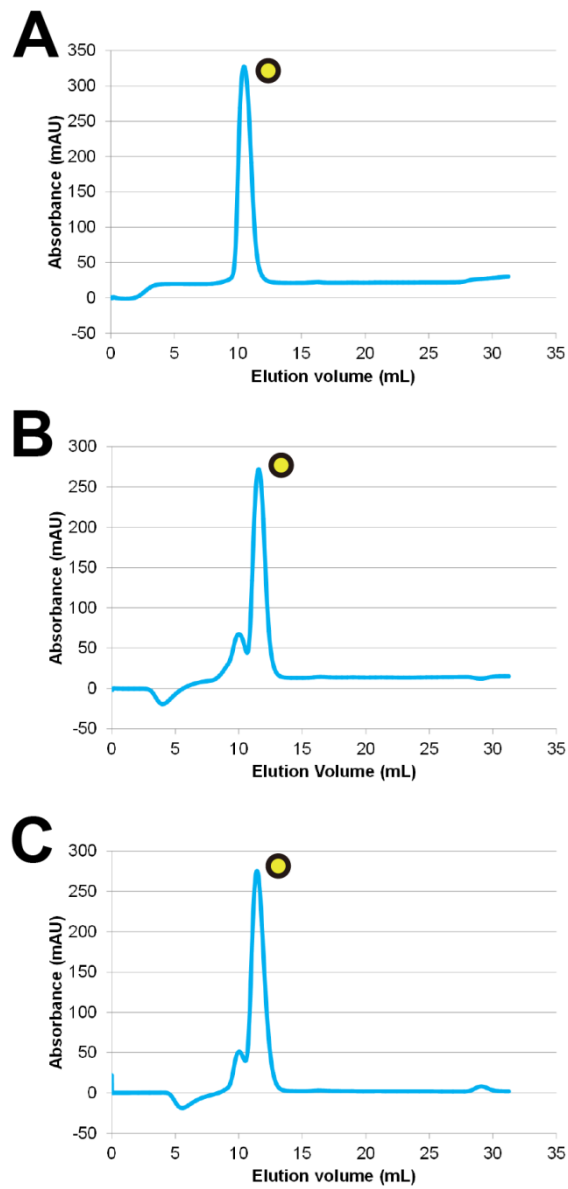


図 3-2 ゲル濾過クロマトグラフィーによるカラクシンの分子量算出
 カラクシンのアポ型(A), マグネシウムイオン結合型(B), カルシウムイオン結合型(C)のク
 ロマトグラムを示した. SAXS の実験では丸印のついたピークを分取した溶液を使用した.

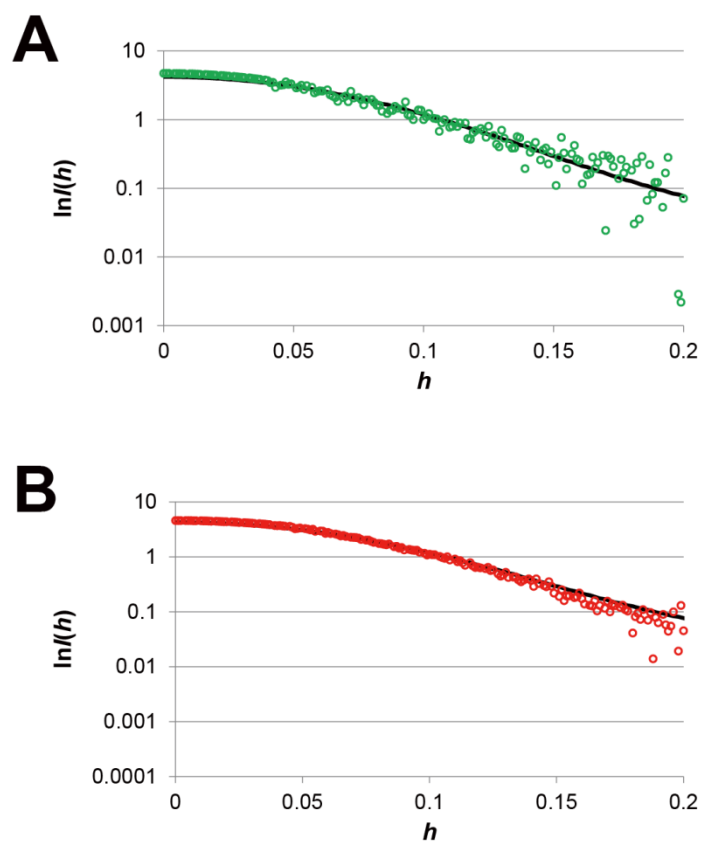


図 3-3 マグネシウムイオン結合型(A)とカルシウムイオン結合型(B)の X 線小角散乱曲線
 縦軸は散乱強度の対数で示した。散乱強度は green の円(A)と red の円(B)でプロットした。
 open state と closed state の各状態における結晶構造から計算された散乱曲線から作成したフ
 イッティングカーブを black の曲線で示した。

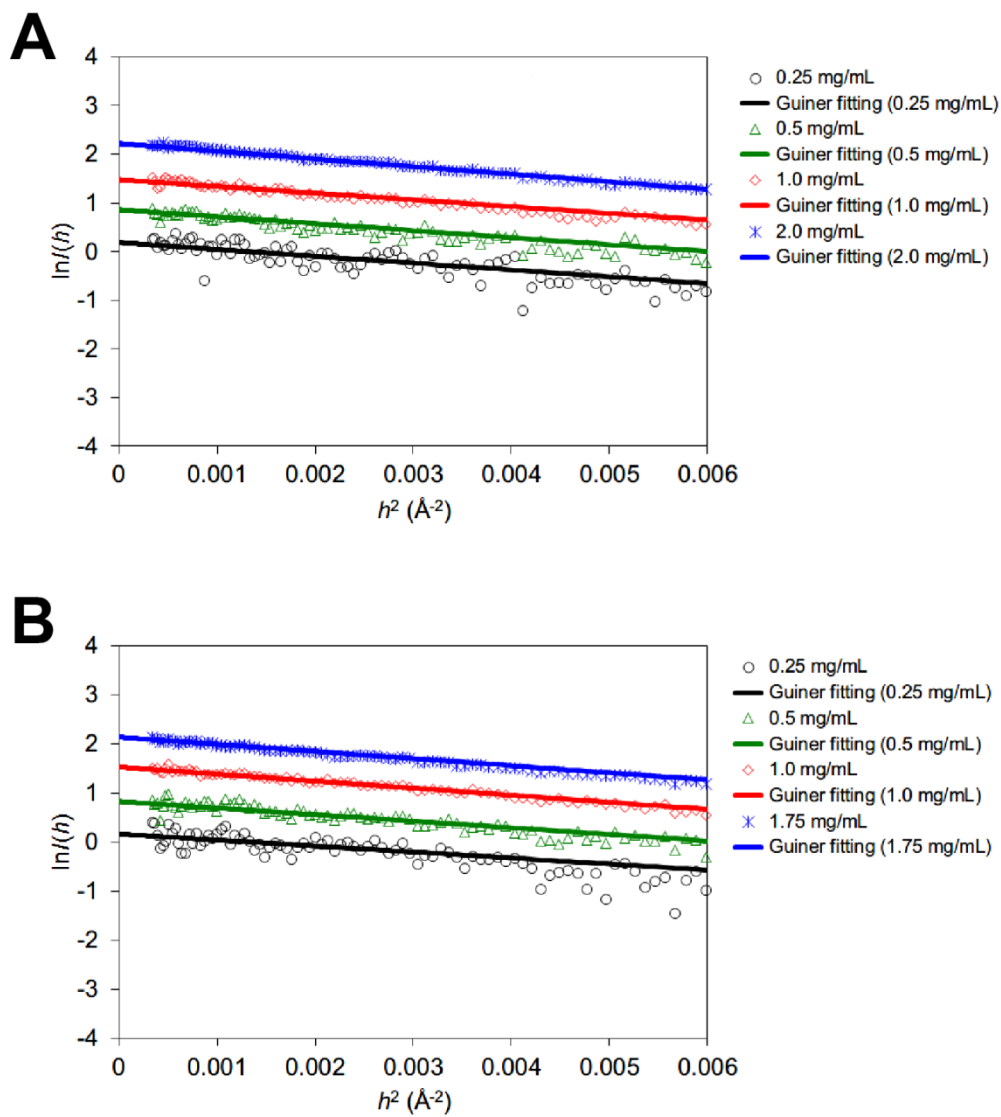


図 3-4 マグネシウムイオン結合型(A)とカルシウムイオン結合型(B)の guinier plot
 各 guinier plot に直線をフィッティングさせて示した。

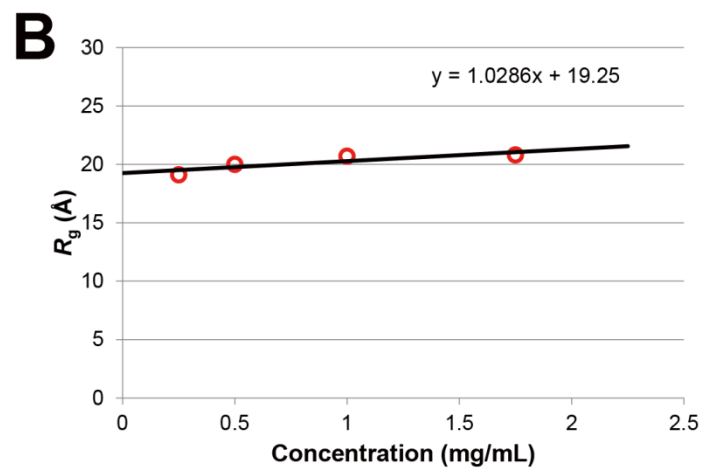
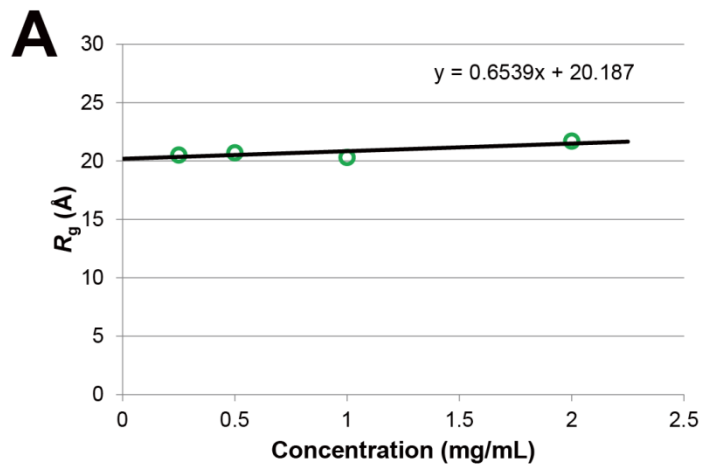


図 3-5 カラクシンの各濃度における慣性半径のプロット
 マグネシウムイオン結合型(A)とカルシウムイオン結合型(B)の慣性半径を円の印でプロットした。各プロットに対する近似曲線を黒の実線で示した。

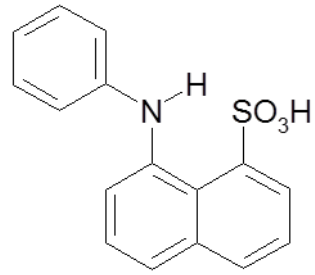


図 3-6 8-(phenylamino)-1-naphthalenesulfonic acid (1,8-ANS)の構造式

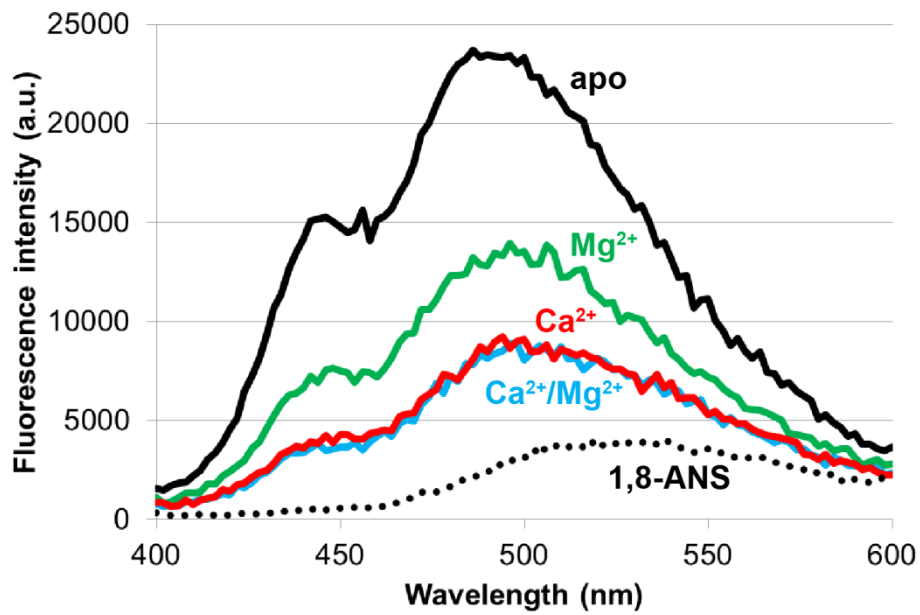


図 3-7 1,8-ANS の蛍光測定

カラクシンのアポ型，マグネシウムイオン結合型，カルシウムイオン結合型，マグネシウムイオン/カルシウムイオン結合型に結合させた 1,8-ANS の蛍光強度をそれぞれ黒，緑，赤，青の実線で示した．また，カラクシンと結合させていない 1,8-ANS の蛍光強度を黒の点線で示した．

第四章

カラクシンの EF-hand の
カルシウムイオン特異性

4-1 トリプトファン蛍光測定を用いた EF-hand の構造変化の解析

X 線小角散乱および 1,8-ANS による蛍光測定の結果から、溶液中ではカルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型でカラクシンの構造が異なっていることが明らかになった。カラクシンは 1 分子に 4 つの EF-hand motif を持つため、立体構造のコアはこれらの EF-hand motif によって形成されている。そのため、カルシウムイオンとマグネシウムイオンが結合した際の構造の差異の原因は、カラクシンに 3 つ含まれる各 EF-hand の、カルシウムイオンおよびマグネシウムイオンが結合した際の構造変化によると考えられる。そこで、各 EF-hand を構成するアミノ酸残基のひとつずつに Trp 残基を導入し、カルシウムイオンおよびマグネシウムイオンを加えた際の EF-hand の構造変化を Trp 蛍光によって観察することにした。Trp 蛍光は残基の周囲の環境変化に応じて蛍光強度や蛍光スペクトルのピークトップの位置が変化するため、各 EF-hand に導入した Trp 残基の蛍光スペクトルを解析することで、各 EF-hand の局所的な構造変化を検出することが期待できる。

カラクシンのアミノ酸配列には元々 Trp 残基が 1 つのみ含まれている(W83)。この W83 は、EF1 の E ヘリックス上に存在する(図 4-1)。そこで、同様に、EF2, EF3 のヘリックス上に Trp 残基を導入し、マグネシウムイオンおよびカルシウムイオンを結合させた際の蛍光スペクトルの変化を測定することで、EF-hand の構造変化を解析した(Davis *et al.*, 2002)。EF2, EF3 のヘリックス上で Trp 残基に置き換えるアミノ酸残基としては、C-terminal domain の疎水性ポケットに存在し、構造変化による周囲の環境変化により敏感であると考えられる C126 と L143 をそれぞれ選択した。なお、C126 は結晶構造中ではジスルフィド結合に関与していない。

4-2 実験方法

4-2-1 トリプトファン蛍光測定用の変異体

Trp 蛍光測定用の変異体として、W83F/C126W および W83F/L143W を作製した(図 4-1)。まず、野生型のカラクシンのプラスミドをテンプレートとして、W83F の変異を導入するための PCR を行った。初めに、カラクシンに含まれている唯一の Trp 残基(W83)を Phe に置換した変異体(W83F)を作製した。Trp (TGG)のコードンを Phe (TTC)のコードンに変えるようなプライマーを準備し、以下の組成で PCR 反応液を調製した(図 4-1)。

PrimeSTAR Max Premix(Takara)	25 μ L
10 μ M W83F primer forward	1 μ L
10 μ M W83F primer reverse	1 μ L
400 pg/ μ L 野生型プラスミド	1 μ L
MilliQ	22 μ L
計	50 μ L

PCR 反応液を調製した後は、以下の条件で PCR を行った。

98°C	2 min	
↓		
98°C	10 sec	35 cycles
55°C	15 sec	
72°C	35 min	
↓		
72°C	1 min	
4°C	∞	

PCR 反応後の溶液を、以下の組成で *DpnI* (メチル化された DNA を分解する酵素) 処理の反応液を調製し、37°C のウォーターバス中で 90 min インキュベートをすることで、形質転換の際に不必要であるメチル化されている大腸菌由来のテンプレートのプラスミドを除去した。

<i>DpnI</i> (Takara)	1 μ L
10 \times T buffer (Takara)	2 μ L
PCR 反応後溶液	17 μ L
計	20 μ L

DpnI 処理後の反応液から 5 μ L を使って、大腸菌株 XL1-blue を形質転換させた。その後、Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems を用いて XL1-blue からプラスミドを抽出し、株式会社ファスマックの DNA シーケンスの受託解析サービスを利用することで、正しく変異を導入できたことを確認した。

次に、EF2 および EF3 のヘリックスに存在する残基を Trp に置換した変異体を作製した。変異を導入する際は、カラクシンの open state と closed state の 2 状態の構造を比較して、構造の違いが大きい残基、すなわち大きい構造変化が起きると期待される残基を選択する

ようにした。結果として、EF2 に変異を導入する残基は C126, EF3 に変異を導入する残基は L143 を選択した。そして、W83F のプラスミドをテンプレートとし、C126 (TGT) のコドンを Trp のコドン(TGG)に変えるようなプライマーあるいは L143 (CTC)のコドンを Trp のコドン(TGG)に変えるようなプライマーを用いて、PCR で変異導入を行った(図 4-1)。PCR は W83F と同じ条件で行った。その後、W83F と同様に *DpnI* 処理をし、XL-1 blue を形質転換させ、プラスミド抽出とシーケンスの確認を行った。

4-2-2 トリプトファン蛍光測定

続いて、W83F/C126W および W83F/L143W の大量発現と精製を行った。2 種類のプラスミドを用いて KRX を形質転換させ、野生型のカラクシンと同様の誘導条件で各変異体タンパク質を発現させた。その後、野生型、W83F/C126W および W83F/L143W のアポ型の精製を、熱安定性測定サンプルと同様の方法で行った。

次に、野生型、W83F/C126W、W83F/L143W の 3 種類のサンプルを用いて、Trp 蛍光測定を行った。蛍光測定のために、7 種類のサンプルを以下の終濃度の試薬を添加することで調製した。カラクシンの終濃度は全て 10 μM で実験を行った。

アポ	1 mM EDTA
0.1 mM MgCl ₂	1 mM EGTA, 0.1 mM MgCl ₂
0.5 mM MgCl ₂	1 mM EGTA, 0.5 mM MgCl ₂
1 mM MgCl ₂	1 mM EGTA, 1 mM MgCl ₂
5 mM MgCl ₂	1 mM EGTA, 5 mM MgCl ₂
10 mM MgCl ₂	1 mM EGTA, 10 mM MgCl ₂
1 mM CaCl ₂	1 mM CaCl ₂

そして、蛍光測定の機器として infinite M1000 (Tecan)を用い、サンプルを分注するプレートとしては 96well の黒色平底プレート(Greiner)を使用した。各サンプルにつき 100 μL ずつプレートに分注し、蛍光測定を行った。励起には 280 nm の波長の光(バンド幅 5.0 nm)を用い、300 nm から 500 nm までの波長の蛍光を 2 nm ずつスキャンして検出した。

4-3 実験結果

野生型(EF1^{Trp}), W83F/C126W (EF2^{Trp}), W83F/L143W (EF3^{Trp})の 3 種類のサンプルに対して、300 nm から 500 nm における蛍光強度スキャンを行った。まず EF1^{Trp}では、アポ型と 0.1 mM MgCl₂ 添加時において、他のサンプルよりも蛍光強度が弱いことが確認された(図 4-2)。アポ型と 0.1 mM MgCl₂ 添加時でスペクトルがほぼ同じということは、0.1 mM の MgCl₂

濃度ではカラクシンにマグネシウムイオンが結合していないことを示唆している。それに対して、0.5 mM 以上の濃度の MgCl_2 が添加された場合と 1 mM の CaCl_2 が添加された場合では、いずれもアポ型よりも高い蛍光強度が観測され、さらにピークトップの位置が短波長側にシフトした。これは、EF1 にマグネシウムイオンおよびカルシウムイオンが結合したことで、EF1 の Trp 残基の蛍光スペクトルが変化したことを示唆している。また、マグネシウムイオン結合時とカルシウムイオン結合時で蛍光スペクトルに大きな違いが見られなかったことから、EF1 はマグネシウムイオンが結合した場合とカルシウムイオンが結合した場合で局所的な構造に大きな違いはないと考えられる。

次に EF2^{Trp} では、アポ型、 MgCl_2 添加、 CaCl_2 添加のいずれにおいても、蛍光強度に大きな違いが観測されなかった(図 4-2)。ただし、1 mM CaCl_2 添加時には、アポ型やマグネシウム添加時よりもわずかにピークトップが高波長側にシフトした。これは、EF2 がカルシウムイオンの結合によってアポ型やマグネシウムイオン添加時と比べて異なる構造をとるようになるということを示唆している。

EF3^{Trp} では、10 mM の MgCl_2 添加時には、アポ型や低濃度の MgCl_2 添加時と比べて蛍光強度がわずかに増加した(図 4-2)。それに対して、1 mM の CaCl_2 添加時には、アポ型やマグネシウムイオン添加時に比べて蛍光強度が著しく高くなり、さらにピークトップも高波長側にシフトした(図 4-2)。このことから、カルシウムイオン結合によって EF3 はアポ型やマグネシウムイオン存在下に比べて局所的な構造が大きく変化することが示唆される。

4-4 考察

本章では、EF0 以外の各 EF-hand motif に Trp 残基を導入し、その蛍光強度の変化を解析することでカルシウムイオンやマグネシウムイオンの添加による EF-hand の局所的な構造変化が起こるかどうかを検証した。その結果、アポ型と比較して、EF1 ではマグネシウムイオンおよびカルシウムイオンの添加によって蛍光強度増加とピークトップの短波長側へのシフト、EF2 ではカルシウムイオン添加でのみピークトップの長波長側へのシフト、EF3 では 10 mM のマグネシウムイオンおよびカルシウムイオンの添加でのみ蛍光強度の増大とピークトップの長波長側へのシフトが観測された。EF1 では 0.1 mM の MgCl_2 添加時にはアポ型と同程度の蛍光強度で、さらに 0.5 mM の MgCl_2 添加時に蛍光強度が増大してかつ最大になったことから、マグネシウムイオンの解離定数の値は 0.1 mM から 0.5 mM の間にあると推測できる。この値は、ITC の結果から算出されたマグネシウムイオンの解離定数の値 (1.32×10^{-6} M, 8.93×10^{-6} M, 1.46×10^{-5} M) と比べて 10 倍以上高い。EF-hand タンパク質のようにカルシウムイオン結合サイトが分子内に複数存在する場合には、複数個のカルシウムイオンの結合は独立ではなく、ある結合サイトへのイオンの結合が他のサイトへのイオンの結合力に影響を与えるというように協同的なものになることがある(Linse & Chazin, 1995)。本章の Trp 蛍光の測定では各 EF-hand について独立にイオンの結合を解析したので、

ITC で算出された結合力とは一致しなかったのではないかと考えられる。

カラクシンの結晶構造では、EF1 と EF2 にはカルシウムイオンとマグネシウムイオンの両方が結合していることから、EF1 と EF2 はどちらも構造的 EF-hand であると考えられる。しかし、EF3 では、カルシウムイオンは open state と closed state の両方の状態のカラクシン分子に結合していたが、マグネシウムイオンは open state の構造でのみ結合していた。本章でのトリプトファン蛍光測定の結果から、EF3 においてマグネシウムイオンとカルシウムイオンの添加によってピークトップの長波長側へのシフトが確認された。このことから、EF3 もマグネシウムイオンとカルシウムイオンの両方が結合できる構造的 EF-hand であることが示唆された。

EF1 ではカルシウムイオン結合時とマグネシウムイオン結合時でピークトップの位置が変化しなかったが、EF2 と EF3 ではカルシウムイオン結合時のピークトップよりもマグネシウムイオン結合時のピークトップの方がより長波長側に位置していた。トリプトファン蛍光のピークトップが長波長側にシフトすることは、そのトリプトファン残基がより疎水的な環境に移動したことを示唆している(Vivian & Callis, 2001)。このことから、マグネシウムイオン結合型からカルシウムイオン結合型に変わることによって、EF2 と EF3 のトリプトファン残基がより疎水的な環境に移ったことが示唆される。この結果は前章までの結果から得られた、カルシウムイオン結合型になることで構造が closed state 側の状態に遷移し、C-terminal domain の疎水性ポケットの露出が小さくなるという考察と一致している。さらに、EF1 ではマグネシウムイオン結合型とカルシウムイオン結合型でピークトップのシフトが起きなかったことから、本章の結果からもカラクシンの構造変化に寄与しているのは EF2 と EF3 であると考えられる。

前述したとおり、EF-hand は構造的 EF-hand (カルシウムイオンとマグネシウムイオンの両方が結合できる)と調節的 EF-hand (カルシウムイオンのみ結合できる)の 2 種類に分けることができる。分子内に 4 つの EF-hand motif を持ついくつかの EF-hand タンパク質において、各 EF-hand が構造的か調節的かの判別に関する先行研究を基に、EF-hand の配列と種類の比較を行った(Aravind *et al.*, 2008 ; Johnson *et al.*, 1980 ; Leavis *et al.*, 1978 ; Ohki *et al.*, 1997 ; Ohashi *et al.*, 2005) (表 4-2)。しかし、各配列を比較しても、調節的 EF-hand と構造的 EF-hand で共通の配列を見出すことは出来なかった。また、EF-hand の位置と種類についても、各タンパク質で多様性があった。カラクシンと NCS-1 は同じファミリーに属し立体構造は類似しているが、EF-hand の位置と種類、配列については特に相関は見いだせなかった。EF-hand の金属イオンの結合特異性は想像よりも複雑で、配位に関与しているアミノ酸残基だけではなく、E ヘリックスと F ヘリックスの間のループ全体の配列や構造、あるいはタンパク質分子全体の構造などの他の要因が絡むことで決められるのかも知れない。

表 4-1 W83F, C126W, L143W の変異導入に用いたプライマーの配列

	sequence
W83F_forward	ACTGAGTTCGTAGAAAGGATTGTCAGTT
W83F_reverse	TTCTACGAACTCAGTCAAACCTTATGTA
C126W_forward	AAGACATGGCTCGTTAAACAACCAACA
C126W_reverse	AACGAGCCATGTCTTCAACATTTGAAA
L143W_forward	AAAGACTGGGTTGAAATTGCACTGAAA
L143W_reverse	TTCAACCCAGTCTTTTATTCCTTCATC

表 4-2 EF-hand タンパク質の各 EF-hand の配列と種類

	1	2	3	4
NCS-1	Cryptic	Structural	Structural	Regulatory
	KDCPSGQLDAAG	DENKDGRIEFSE	DLDNDGYITRNE	DKNADGKLTQE
calmodulin	Structural	Regulatory	Structural	Structural
	DKDGDGTITTKE	DADGNGTIDFPE	DKDGNGYISAAE	DIDGDGQVNYEE
cardiac TnC	Cryptic	Regulatory	Structural	Structural
	DIFVLGAEDGCI	DEDGSGTVDFDE	DKNADGYIDLEE	DKNNDGRIDYDE
skeletal TnC	Regulatory	Regulatory	Structural	Structural
	DADGGDISVKE	DEDGSGTIDFEE	DRNADGYIDAE	DKNNDGRIDFDE
aequorin	Structural	Cryptic	Structural	Regulatory
	DVNHNGKISLDE	AGMKYGVETDWP	DKDQNGAITLDE	DIDESGQLDVDE
calaxin	Cryptic	Structural	Structural	Structural
	KNLLEGLKMDRN	DKSDSYISLTE	DLNGDGYISREE	DHDHDSRLSKKD

最上段の 1, 2, 3, 4 はそれぞれ N 末端から 1 番目, 2 番目, 3 番目, 4 番目の EF-hand motif を表す。「Cryptic」はカルシウムイオンもマグネシウムイオンも結合しない Cryptic EF-hand, 「Structural」はカルシウムイオンとマグネシウムイオンの両方が結合する Structural EF-hand(構造的 EF-hand), 「Regulatory」はカルシウムイオンのみが結合する Regulatory EF-hand(調節的 EF-hand)を表す。

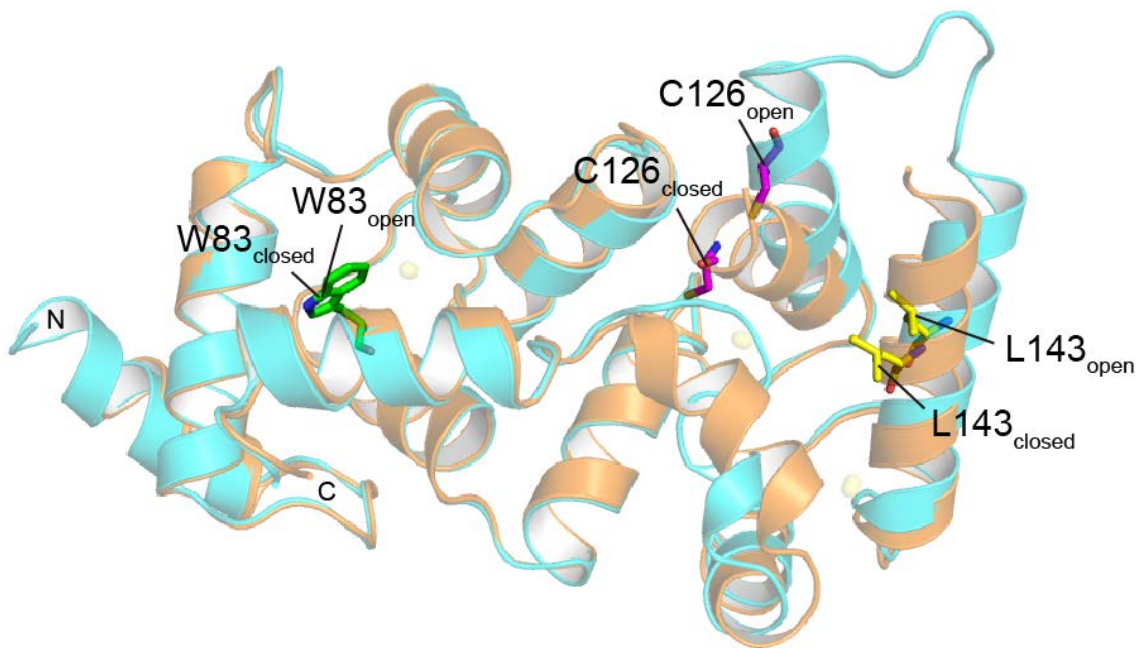


図 4-1 カラクシンに存在する W83 と Trp 残基を導入した C126 および L143 の位置
カルシウムイオン結合型のカラクシンの結晶構造を cyan (open state) と orange (closed state) の
cartoon モデルで示した。また, W83, C126, L143 をそれぞれ green, magenta, yellow の stick
モデルで示した。

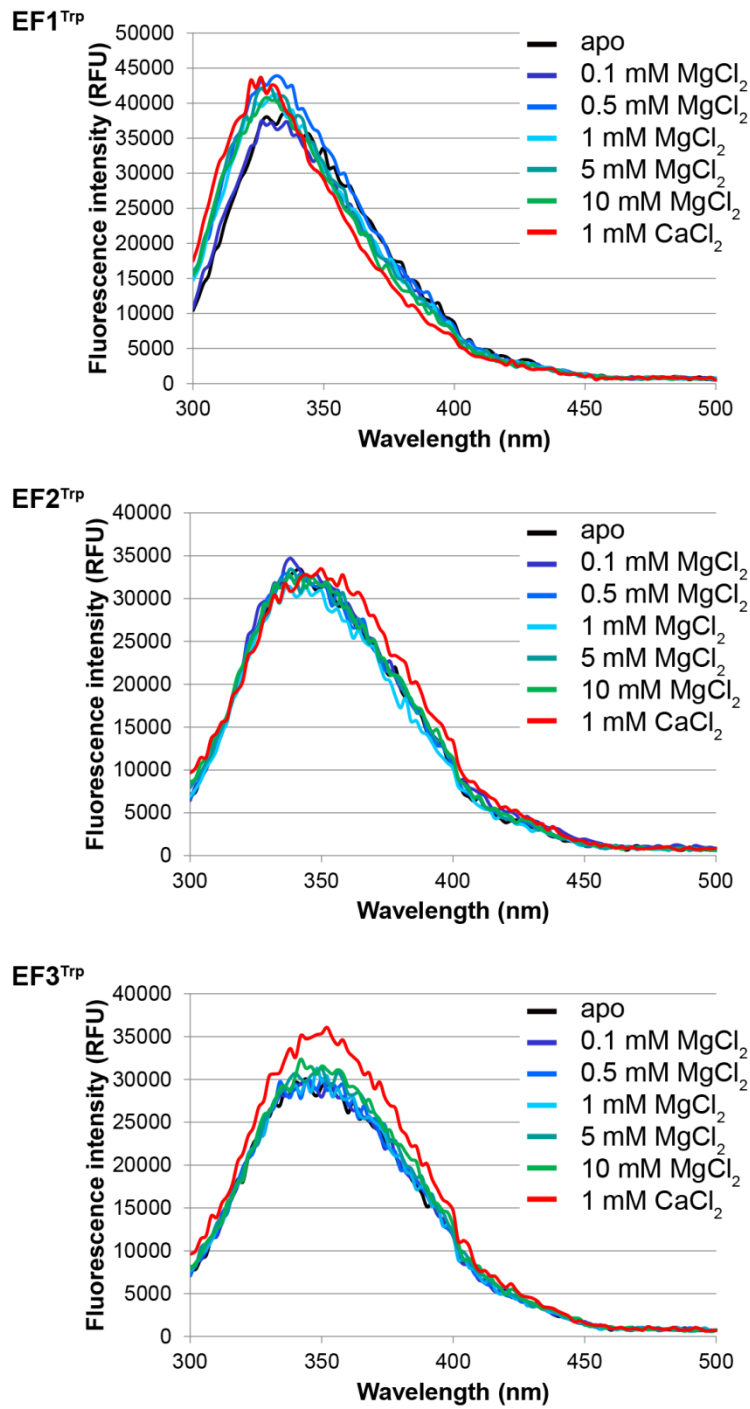


図 4-2 カラクシン変異体の Trp 蛍光スキャン

第五章

総合討論

5-1 本研究のまとめ

本研究では、カラクシンのカルシウムイオン依存的な鞭毛運動の制御機構に着目して実験を行ってきた。カラクシンは低濃度のカルシウムイオン存在下では微小管の β -チューブリンやダイニンとの中間鎖と相互作用し、高濃度のカルシウムイオン存在下ではダイニンの中間鎖や重鎖する。そのため、カルシウムイオン非結合状態(生体内ではマグネシウムイオン結合状態)と結合状態でカラクシンの構造に差があり、その構造の違いによって β -チューブリンやダイニンとの親和力が変わると仮定し、それらの 2 状態の構造の違いを実験的に見ることを目標とした。

まず初めに、カラクシンのマグネシウムイオン結合型の結晶構造を決定し、既に解かれているカルシウムイオン結合型の結晶構造と比較した。構造比較の結果、カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型で結晶構造の差はほとんどなかった。これは、結晶のパッキングの影響が大きく、カルシウムイオンあるいはマグネシウムイオンの結合による構造変化が見られなくなってしまうからだと考えられる。また、カラクシンの構造中には、他の NCS protein family のタンパク質と同様、相互作用パートナーとの結合に関わると思われる疎水性ポケットが N-terminal domain と C-terminal domain の両方に存在していた。しかし、N-terminal domain の疎水性ポケットは C 末端ヘリックス($\alpha 11$)と疎水性相互作用を形成して構造の安定化に寄与していたため、実際のダイニンとの相互作用には C-terminal domain の疎水性ポケットが重要なのではないかと推測された。closed state の EF3 にはマグネシウムイオンが結合しておらず、EF3 のマグネシウムイオンに対する結合力が低いことが示唆された。また、ITC の結果から、他の EF-hand タンパク質と同様、カラクシンのカルシウムイオンに対する結合力がマグネシウムイオンに対する結合力よりも 100 倍程度高いことが示された。

続いて、溶液中でのカルシウムイオン結合またはマグネシウムイオンが結合した際の構造変化を解析するための実験を行った。SAXS の解析によって、慣性半径を算出することでカルシウムイオン結合型はマグネシウムイオン結合型に比べて慣性半径が小さくなることが示された。また、マグネシウムイオン結合型では open state の状態の構造をとっているが、カルシウムイオン結合型では closed state の状態に近づくように構造が遷移することが明らかになった。1,8-ANS を用いた実験では、カルシウムイオン結合型がマグネシウムイオン結合型よりも弱い蛍光強度を示したことから、カルシウムイオン結合によって疎水性ポケットの露出が狭まるということが示唆された。また、X 線結晶構造解析と SAXS の結果も併せて、カラクシンはマグネシウムイオン結合型からカルシウムイオン結合型になることで、C-terminal domain の疎水性ポケットの大きさが小さくなるということが推定された。さらに、Trp 蛍光測定を用いて、カルシウムイオンおよびマグネシウムイオン結合による EF-hand の局所的な構造変化の解析を行った。その結果、EF1 ではカルシウムイオン結合時とマグネシウムイオン結合時で蛍光スペクトルのピークトップの位置がほぼ変化しなかったのに対し、

EF2 と EF3 ではカルシウムイオンの結合によってマグネシウムイオン添加時と比べてピークトップの位置が長波長側にシフトすることが明らかになった。これらのことから、結晶構造で示唆された通り、生体内では EF2 と EF3 がカルシウムイオン濃度上昇時のカラクシンの構造変化に寄与しているのではないかと推測された。

5-2 カラクシンの構造とダイニンとの結合に関する考察

カルシウムイオンやマグネシウムイオンの結合によって疎水性領域の広さが変わるということは、その領域に結合する相互作用パートナーとの結合のしやすさに影響すると考えられる。すなわち、金属イオンの結合によって疎水性領域の大きさが相互作用をするのに適した大きさになることで、他の分子との相互作用が起こるといことが考えられる。カラクシンではカルシウムイオンやマグネシウムイオンの結合によって疎水性領域が小さくなったが、NCS protein family に属する DREAM では逆に疎水性領域が大きくなった。このことは、カラクシンではカルシウムイオンの結合により疎水性領域が小さくなることでダイニンとの相互作用に適した構造になり、DREAM ではカルシウムイオンの結合で疎水性領域が大きくなることでカリウムチャンネルとの相互作用に適した構造をとることを示唆している。NCS-1 の場合では、通常は N 末端の Gly 残基がミリストイル化されており、アポ型ではミリストイル基が分子の疎水性ポケットに埋まっているが、カルシウムイオン結合型ではミリストイル基が外に露出し、膜アンカーの役割を担っている(Ames *et al.*, 2012)。そのため、カラクシンや DREAM に比べてカルシウムイオンやマグネシウムイオンに対する応答は複雑であると考えられる。

カラクシンはカルシウムイオン依存的にダイニンと結合するということが知られている。本研究では、溶液中においてカラクシンのカルシウムイオン結合型ではマグネシウムイオン結合型と比較して分子の慣性半径が小さくなり、分子表面の疎水性ポケットの面積が小さくなることが示された。これらのことから、カラクシンはカルシウムイオンと結合することで、C-terminal domain の疎水性ポケットを小さくし、ダイニンとの結合に適した構造になるのではないかと考えられる。NCS protein family で複合体構造が決定されている AtCBL2 と NCS-1 においては、いずれも相互作用パートナーの α -ヘリックス構造を疎水性ポケットに収めるようにして結合していた(図 2-22)。ダイニンは非常に分子量が大きいため全長の結晶構造が決定されていないものの、断片ごとの結晶構造は決定されており、それらを組み合わせたダイニン全体の構造のモデルが提唱されている。各断片の結晶構造によると、ダイニンも構造全体がほぼ α -ヘリックスでのみ構成されていた。そのことから、カラクシンとダイニンの相互作用においても、ダイニンを構成する α -ヘリックスがカラクシンの C-terminal domain の疎水性ポケットに収まるように結合するのではないかと予想される。また、チューブリンは α -ヘリックスと β -シートの両方で構造が形成されているが、微小管形成の際には α -ヘリックスが微小管の外側に向くような配向をとることが明らかにな

っている(Nicastro *et al.*, 2011). このことから、カラクシンは微小管の β -チューブリンと結合する際も、微小管の外側から近づいて露出している α -ヘリックスに結合するのではないかと考えられる. 実際にカラクシンがダイニンとどのような様式で結合しているのかを明らかにするためには、ダイニン(あるいはその断片)とカラクシンとの複合体の結晶構造を取得する必要があると考えられる. しかし、本研究によって、カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型で疎水性領域の露出度に差があることが明らかになった. この結果と、AtCBL2 や NCS-1 の複合体結晶構造において疎水性ポケットに相互作用パートナーが結合していた結果を統合して考えると、カルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型における疎水性領域の露出度の違いが、ダイニンとのカルシウムイオン依存的な結合に関与していると考えられる.

5-3 生体内におけるカラクシンによる鞭毛運動の制御の考察

精子の鞭毛運動の動力源は、鞭毛内の微小管とダイニンの間の滑り運動によるものであることは研究背景でも述べた通りである. そして、カラクシンは滑り運動を抑制することで、精子の鞭毛運動を非対称的な動きに変化させる. カラクシンが滑り運動を抑制するためにはダイニンか微小管の少なくともどちらかと相互作用をする必要があると考えられる. しかし、仮にカラクシンが微小管に相互作用をしたとしても、滑り運動を抑制するためにはダイニンが動く軌道上にカラクシンが存在していなければならず、また微小管を構成する分子の半分は β -チューブリンであるので、ダイニンとの滑り運動と関係のない部分の β -チューブリンにカラクシンが結合することも考えると、滑り運動の抑制の機構としては効率が悪い. しかし、カラクシンがダイニンと相互作用をすれば、滑り運動の力を生み出す分子と直接相互作用をすることになるので、効率よく滑り運動の抑制が行えるであろう. そう考えると、カラクシンがカルシウムイオン依存的にダイニンと結合するのは、滑り運動の抑制の機構としては理にかなった性質であると考えられる.

ITC の結果から、アポ型のカラクシンにカルシウムイオンが結合する場合よりも、マグネシウムイオン結合型のカラクシンにカルシウムイオンが結合する場合の方が結合力が強いことが示された. また、SAXS と 1,8-ANS の蛍光測定の結果から、マグネシウムイオン結合時とカルシウムイオン結合時で EF2 と EF3 の構造に変化がもたらされることが示された. 平常時の生体内ではカラクシンにマグネシウムイオンが結合しているとする、カルシウムイオン濃度が上昇してカラクシンの EF-hand に結合しているマグネシウムイオンがカルシウムイオンに置き換わると、主に EF2 と EF3 で大きな構造変化がもたらされると考えられる. もし生体内でもアポ型からカルシウムイオン結合型に構造が変化していると仮定すると、EF1 でも構造変化が起こり、カラクシン全体の構造が大きく変わってしまうと考えられる. 精子の鞭毛内でこのような大きな構造変化を繰り返すことは、エネルギー的にも無駄が多いはずである. 対して、マグネシウム型からカルシウムイオン結合型に構造が変化

するようなシステムであれば、ダイニンとの相互作用に関わるであろう **C-terminal domain** の疎水性ポケットの構造のみを特異的に変化させることができ、必要なエネルギーも節約されると考えられる。そのように考えると、マグネシウムイオンはカラクシンの疎水性ポケットの大きさを適切に変化させ、エネルギーを節約しながらダイニンとの相互作用することを可能にするために存在しているのかも知れない。

本研究ではカラクシンのカルシウムイオン結合型とマグネシウムイオン結合型で立体構造が異なることが示された。このことから、カルシウムイオンはカラクシンの構造と機能を変化させるスイッチの役割を担っていることが示唆された。図 5-1 にカルシウムイオンによるカラクシンとダイニン間の結合の制御モデルを示した。初めに、定常状態では、1分子のカラクシンに対して 3 個のマグネシウムイオンが結合している。そして、精子が誘引物質の濃度勾配を感知してカルシウムスパイクが起こると、カラクシンに結合していたマグネシウムイオンがカルシウムイオンに置換されて、カラクシンの疎水性ポケットが小さくなることでダイニンとの結合力が上昇する。カルシウムイオン結合型になったカラクシンはダイニンと相互作用し、微小管とダイニン間の滑り運動を抑制する。精子内への一過的なカルシウムイオン流入が収まりカルシウムイオン濃度が低下すると、再度カラクシンに結合していたカルシウムイオンがマグネシウムイオンに置換され、ダイニンとの結合力が低下する。その後、カラクシンとダイニンが解離し、再び定常状態に戻ると考えられる。先行研究から、カルシウムスパイクが発生すると、初めに鞭毛の局所的な部分でカルシウムイオン濃度の上昇が起き、そこから次第にカルシウムイオン濃度の上昇が鞭毛全体に広がっていくことが示された(Shiba *et al.*, 2008)。このようなカルシウムイオン流入の伝播に付随して、初めに鞭毛の一部でカラクシンのダイニンへの結合および滑り運動の抑制といった現象が起き、そこから鞭毛全体に滑り運動の抑制が広がり、結果的に鞭毛全体の運動が制御されるのではないかと考えられる。

ダイニンが滑り運動を起こす際、ダイニンの **Linker domain** が ATP の結合に伴って大きな構造変化を起こすことでダイニンのストロークを生じさせることが、電子顕微鏡による解析によって示唆された(Roberts *et al.*, 2009)。その結果から考えると、カラクシンが滑り運動を抑制するためには、**Linker domain** にカラクシンが作用してダイニンのストロークを抑えるか、カラクシンがダイニンの **Tail domain** に作用し、ダイニンと微小管の間の相互作用を阻害するといったことが考えられる。今後は、カラクシンがダイニンのどのドメインに結合するかを実験的に示し、カラクシンによる滑り運動の阻害がどのようなメカニズムで起こされるのかを明らかにしていくことが課題である。

5-4 本研究の今後と応用

本研究では鞭毛運動の制御に関わるカラクシンが、カルシウムイオン結合時とマグネシウムイオン結合時でどのような構造変化を起こすかについて着目し、様々な解析を行った。

その結果、カルシウムイオン結合時ではカラクシンの疎水性領域の露出が小さくなり、この疎水性領域の変化が、ダイニンとの結合のカルシウムイオン依存性につながっているのではないかと推察された。今後のカラクシンの研究の展開としては、まずカラクシンのダイニンのどのドメインに結合するかを同定することがあると考えられる。カラクシンとダイニンの相互作用部位を特定することができれば、そのドメインの機能から、カラクシンがどのような作用によってダイニンの滑り運動を抑制することができるかを推察することができると考えられる。また、ダイニン中のカラクシンの相互作用部位を特定できた後は、カラクシンとその相互作用断片を用いることで、複合体の結晶構造の取得を目指すことが可能となる。複合体の結晶構造の取得によって、カラクシンとダイニンの相互作用様式を原子レベルの分解能で解明することができる。カラクシンとダイニンの相互作用様式の解明は、細胞の繊毛運動や精子の鞭毛運動制御のメカニズム解明のための基盤的な情報を与えることができる。例えばウニの例では、カラクシンのロックダウンによって繊毛の動作に異常が生じることが研究で報告されたことを研究背景で述べた。カラクシンとダイニンの相互作用様式の解明によって、このカラクシンの機能不全による繊毛の異常が起こるメカニズムの解明につながることを期待される。また、鞭毛あるいは繊毛の運動の異常が疾患の原因となることが知られている。例えば、繊毛病として有名な疾患として、カルタゲナー症候群と呼ばれるものが知られている。この疾患は、男性の精子の鞭毛運動の異常によって不妊となってしまうものである。カルタゲナー症候群で見られる鞭毛運動の異常の原因の根本は、ダイニンの機能の低下にあるということが知られており、ダイニン重鎖をコードする遺伝子である *DNAH5* やダイニン中間鎖をコードする遺伝子である *DNAI1* に異常によってカルタゲナー症候群が引き起こされることが研究によって明らかにされている (Montjean *et al.*, 2015 ; Sha *et al.*, 2014)。カラクシン自身の変異による疾患の例はまだ確認されていないが、将来的にはカラクシンによる鞭毛や繊毛の運動制御のメカニズムの解明によって、他の遺伝子異常が原因である疾患のメカニズムの究明にも役立つかも知れない。本研究で得られた成果が繊毛および鞭毛のカルシウムイオン依存的な運動の制御機構の解明につながり、医療や創薬の世界で貢献できることを期待する。

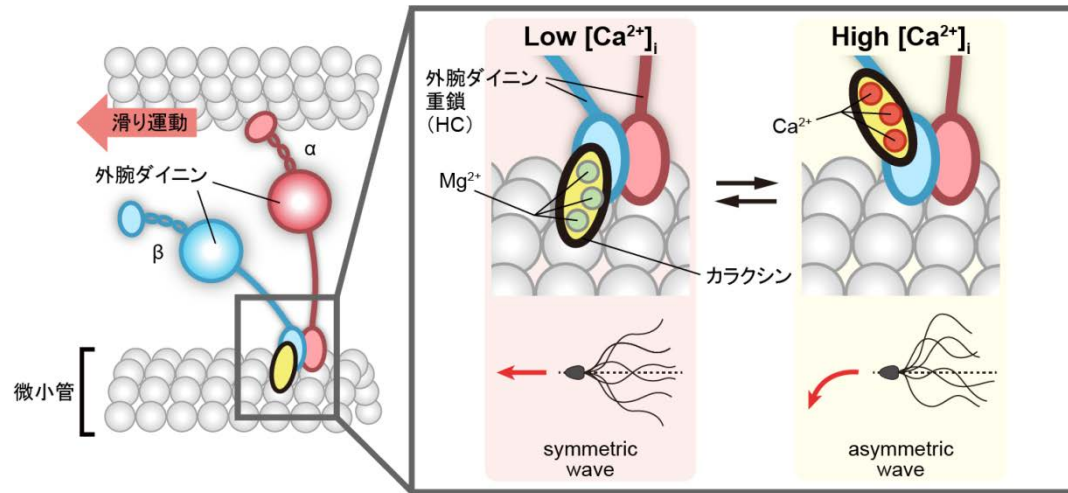


図 5-1 カルシウムイオンによるカラクシンとダイニンの結合予想モデル

参考文献

1. Akaboshi M, Hashimoto H, Ishida H, Saijo S, Koizumi N, Sato M, Shimizu T. (2008). The crystal structure of plant-specific calcium-binding protein AtCBL2 in complex with the regulatory domain of AtCIPK14. *J Mol Biol.* 377(1):246-57.
2. Ames JB, Lim S, Ikura M. (2012). Molecular structure and target recognition of neuronal calcium sensor proteins. *Front Mol Neurosci.* 5:10.
3. Aravind P, Chandra K, Reddy PP, Jeromin A, Chary KV, Sharma Y. (2008). Regulatory and structural EF-hand motifs of neuronal calcium sensor-1: Mg²⁺ modulates Ca²⁺ binding, Ca²⁺-induced conformational changes, and equilibrium unfolding transitions. *J Mol Biol.* 376(4):1100-15.
4. Biggar KK, Dawson NJ, Storey KB. (2012). Real-time protein unfolding: a method for determining the kinetics of native protein denaturation using a quantitative real-time thermocycler. *Biotechniques.* 53(4):231-8.
5. Blanchet CE, Svergun DI. (2013). Small-angle X-ray scattering on biological macromolecules and nanocomposites in solution. *Annu Rev Phys Chem.* 64:37-54.
6. Burgoyne RD. (2007). Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca²⁺ signalling. *Nat Rev Neurosci.* 8(3):182-93.
7. Cardamone M, Puri NK. (1992). Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *Biochem J.* 282 (Pt 2):589-93.
8. Chen CP, Lee L, Chang LS. (2006). Effects of metal-binding properties of human Kv channel-interacting proteins on their molecular structure and binding with Kv4.2 channel. *Protein J.* 25(5):345-51.
9. Cianfrocco MA, DeSantis ME, Leschziner AE, Reck-Peterson SL. (2015). Mechanism and regulation of cytoplasmic dynein. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 31:83-108.
10. Coll JC, Bowden BF, Meehan GV, Konig GM, Carroll AR, Tapiolas DM, Aliño PM, Heaton A, De Nys R, Leone PA, Maida M, Aceret TL, Willis RH, Babcock RC, Willis BL, Florian Z, Clayton MN, Miller RL. (1994). Chemical aspects of mass spawning in corals. I. Sperm-attractant molecules in the eggs of the scleractinian coral *Montipora digitata*. *Mar Biol.* 118:177-82.
11. Cox JA, Durussel I, Comte M, Nef S, Nef P, Lenz SE, Gundelfinger ED. (1994). Cation binding and conformational changes in VILIP and NCS-1, two neuron-specific calcium-binding proteins. *J Biol Chem.* 269(52):32807-13.
12. Davis JP, Rall JA, Reiser PJ, Smillie LB, Tikunova SB. (2002). Engineering competitive magnesium binding into the first EF-hand of skeletal troponin C. *J Biol Chem.* 277(51):49716-26.
13. Einspahr H, Bugg CE. (1981). The geometry of calcium carboxylate interactions in crystalline complexes. *Acta Crystallogr B Struct Sci Cryst Eng Mater.* B37, 1044-1052.

14. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 66(Pt 4):486-501.
15. Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ. (2007). Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J*. 405(2):199-221.
16. Gonzalez WG, Miksovska J. (2014). Application of ANS fluorescent probes to identify hydrophobic sites on the surface of DREAM. *Biochim Biophys Acta*. 1844(9):1472-80.
17. Heidarsson PO, Bjerrum-Bohr IJ, Jensen GA, Pongs O, Finn BE, Poulsen FM, Kragelund BB. (2012). The C-terminal tail of human neuronal calcium sensor 1 regulates the conformational stability of the Ca²⁺-activated state. *J Mol Biol*. 417(1-2):51-64.
18. Heuser T, Raytchev M, Krell J, Porter ME, Nicastro D. (2009). The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *J Cell Biol*. 187(6):921-33.
19. Hirano M, Adachi Y, Ito Y, Totani K. (2015). Calreticulin discriminates the proximal region at the N-glycosylation site of Glc1Man9GlcNAc2 ligand. *Biochem Biophys Res Commun*. 466(3):350-5.
20. Ikura M. (1996). Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci*. 21(1):14-7.
21. Jeromin A, Muralidhar D, Parameswaran MN, Roder J, Fairwell T, Scarlata S, Dowal L, Mustafi SM, Chary KV, Sharma Y. (2004). N-terminal myristoylation regulates calcium-induced conformational changes in neuronal calcium sensor-1. *J Biol Chem*. 279(26):27158-67.
22. Johnson JD, Collins JH, Robertson SP, Potter JD. (1980). A fluorescent probe study of Ca²⁺ binding to the Ca²⁺-specific sites of cardiac troponin and troponin C. *J Biol Chem*. 255(20):9635-40.
23. Kabsch W. (2010). XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 66(Pt 2):125-32.
24. Kadavath H, Hofele RV, Biernat J, Kumar S, Tepper K, Urlaub H, Mandelkow E, Zweckstetter M. (2015). Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(24):7501-6.
25. Kretsinger RH, Nockolds CE. (1973). Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem*. 248(9):3313-26.
26. Kumar S, Ahmad E, Kumar S, Khan RH, Gourinath S. (2012). Flexibility of EF-hand motifs: structural and thermodynamic studies of Calcium Binding Protein-1 from *Entamoeba histolytica* with Pb²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺. *BMC Biophys*. 5:15.
27. Leavis PC, Rosenfeld SS, Gergely J, Grabarek Z, Drabikowski W. (1978). Proteolytic fragments of troponin C. Localization of high and low affinity Ca²⁺ binding sites and interactions with troponin I and troponin T. *J Biol Chem*. 253(15):5452-9.
28. Lewit-Bentley A, Réty S. (2000). EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol*.

- 10(6):637-43.
29. Lim S, Dizhoor AM, Ames JB. (2014). Structural diversity of neuronal calcium sensor proteins and insights for activation of retinal guanylyl cyclase by GCAP1. *Front Mol Neurosci.* 7:19.
 30. Linse S, Chazin WJ. (1995). Quantitative measurements of the cooperativity in an EF-hand protein with sequential calcium binding. *Protein Sci.* 4(6):1038-44.
 31. Maccioni RB, Cambiazo V. (1995). Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev.* 75(4):835-64.
 32. Malmendal A, Linse S, Evenäs J, Forsén S, Drakenberg T. (1999). Battle for the EF-hands: magnesium-calcium interference in calmodulin. *Biochemistry.* 38(36):11844-50.
 33. Marino V, Sulmann S, Koch KW, Dell'Orco D. (2015). Structural effects of Mg^{2+} on the regulatory states of three neuronal calcium sensors operating in vertebrate phototransduction. *Biochim Biophys Acta.* 1853(9):2055-65.
 34. Mizuno K, Padma P, Konno A, Satouh Y, Ogawa K, Inaba K. (2009). A novel neuronal calcium sensor family protein, calaxin, is a potential Ca^{2+} -dependent regulator for the outer arm dynein of metazoan cilia and flagella. *Biol Cell.* 101(2):91-103.
 35. Mizuno K, Shiba K, Okai M, Takahashi Y, Shitaka Y, Oiwa K, Tanokura M, Inaba K. (2012). Calaxin drives sperm chemotaxis by Ca^{2+} -mediated direct modulation of a dynein motor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(50):20497-502.
 36. Mizuno K, Shiba K, Yaguchi J, Shibata D, Yaguchi S, Prulière G, Chenevert J, Inaba K. (2017). Calaxin establishes basal body orientation and coordinates movement of monocilia in sea urchin embryos. *Sci Rep.* 7(1):10751.
 37. Mogami T, Kon T, Ito K, Sutoh K. (2007). Kinetic characterization of tail swing steps in the ATPase cycle of Dictyostelium cytoplasmic dynein. *J Biol Chem.* 282(30):21639-44.
 38. Mons N, Guillou JL, Jaffard R. (1999). The role of Ca^{2+} /calmodulin-stimulable adenylyl cyclases as molecular coincidence detectors in memory formation. *Cell Mol Life Sci.* 55(4):525-33.
 39. Montjean D, Courageot J, Altié A, Amar-Hoffet A, Rossin B, Geoffroy-Siraudin C, Tourame P, Boyer P. (2015). Normal live birth after vitrified/warmed oocytes intracytoplasmic sperm injection with immotile spermatozoa in a patient with Kartagener's syndrome. *Andrologia.* 47(7):839-45.
 40. Mukherjee S, Mohan PM, Chary KV. (2007). Magnesium promotes structural integrity and conformational switching action of a calcium sensor protein. *Biochemistry.* 46(12):3835-45.
 41. Murshudov GN, Skubák P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, Winn MD, Long F, Vagin AA. (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 67(Pt 4):355-67.
 42. Nicastro D, Fu X, Heuser T, Tso A, Porter ME, Linck RW. (2011). Cryo-electron tomography

- reveals conserved features of doublet microtubules in flagella. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(42):E845-53.
43. Ohashi W, Inouye S, Yamazaki T, Hirota H. (2005). NMR analysis of the Mg^{2+} -binding properties of aequorin, a Ca^{2+} -binding photoprotein. *J Biochem*. 138(5):613-20.
 44. Ohki S, Ikura M, Zhang M. (1997). Identification of Mg^{2+} -binding sites and the role of Mg^{2+} on target recognition by calmodulin. *Biochemistry*. 36(14):4309-16.
 45. Okada M, Takezawa D, Tachibanaki S, Kawamura S, Tokumitsu H, Kobayashi R. (2003). Neuronal calcium sensor proteins are direct targets of the insulinotropic agent repaglinide. *Biochem J*. 375(Pt 1):87-97.
 46. Olson JH, Xiang X, Ziegert T, Kittelson A, Rawls A, Bieber AL, Chandler DE. (2001). Allurin, a 21-kDa sperm chemoattractant from *Xenopus* egg jelly, is related to mammalian sperm-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(20):11205-10.
 47. Pandalaneni S, Karuppiyah V, Saleem M, Haynes LP, Burgoyne RD, Mayans O, Derrick JP, Lian LY. (2015). Neuronal Calcium Sensor-1 Binds the D2 Dopamine Receptor and G-protein-coupled Receptor Kinase 1 (GRK1) Peptides Using Different Modes of Interactions. *J Biol Chem*. 290(30):18744-56.
 48. Peshenko IV, Dizhoor AM. (2006). Ca^{2+} and Mg^{2+} binding properties of GCAP-1. Evidence that Mg^{2+} -bound form is the physiological activator of photoreceptor guanylyl cyclase. *J Biol Chem*. 281(33):23830-41.
 49. Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*. 413(6856):603-9.
 50. Riffell JA, Krug PJ, Zimmer RK. (2002). Fertilization in the sea: the chemical identity of an abalone sperm attractant. *J Exp Biol*. 205(Pt 10):1439-50.
 51. Roberts AJ, Kon T, Knight PJ, Sutoh K, Burgess SA. (2013). Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14(11):713-26.
 52. Roberts AJ, Numata N, Walker ML, Kato YS, Malkova B, Kon T, Ohkura R, Arisaka F, Knight PJ, Sutoh K, Burgess SA. (2009). AAA+ Ring and linker swing mechanism in the dynein motor. *Cell*. 136(3):485-95.
 53. Schiavo G, Greensmith L, Hafezparast M, Fisher EM. (2013). Cytoplasmic dynein heavy chain: the servant of many masters. *Trends Neurosci*. 36(11):641-51.
 54. Schwaller B. (2010). Cytosolic Ca^{2+} buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(11):a004051.
 55. Sha YW, Ding L, Li P. (2014). Management of primary ciliary dyskinesia/Kartagener's syndrome in infertile male patients and current progress in defining the underlying genetic mechanism. *Asian J Androl*. 16(1):101-6.
 56. Shannon RD. (1976). Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallogr A*. 32:751-67.

57. Shiba K, Baba SA, Inoue T, Yoshida M. (2008). Ca^{2+} bursts occur around a local minimal concentration of attractant and trigger sperm chemotactic response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(49):19312-7.
58. Smith EF. (2002). Regulation of flagellar dynein by calcium and a role for an axonemal calmodulin and calmodulin-dependent kinase. *Mol Biol Cell*. 13(9):3303-13.
59. Sonnenburg WK, Seger D, Beavo JA. (1993). Molecular cloning of a cDNA encoding the "61-kDa" calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. Tissue-specific expression of structurally related isoforms. *J Biol Chem*. 268(1):645-52.
60. Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm. *Nature*. 471(7338):382-6.
61. Svergun D, Barberato C, Koch MHJ. (1995). CRYSOLE – a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Crystal*. 28:768-73.
62. Szebenyi DM, Moffat K. (1986). The refined structure of vitamin D-dependent calcium-binding protein from bovine intestine. Molecular details, ion binding, and implications for the structure of other calcium-binding proteins. *J Biol Chem*. 261(19):8761-77.
63. Towler DA, Adams SP, Eubanks SR, Towery DS, Jackson-Machelski E, Glaser L, Gordon JI. (1988). Myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase activities from rat liver and yeast possess overlapping yet distinct peptide substrate specificities. *J Biol Chem*. 263(4):1784-90.
64. Vagin A, Teplyakov A. (2010). Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 66(Pt 1):22-5.
65. Vivian JT, Callis PR. (2001). Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys J*. 80(5):2093-109.
66. Ward GE, Brokaw CJ, Garbers DL, Vacquier VD. (1985). Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. *J Cell Biol*. 101(6):2324-9.
67. Wingard JN, Chan J, Bosanac I, Haeseleer F, Palczewski K, Ikura M, Ames JB. (2005). Structural analysis of Mg^{2+} and Ca^{2+} binding to CaBP1, a neuron-specific regulator of calcium channels. *J Biol Chem*. 280(45):37461-70.
68. Yoshida M, Murata M, Inaba K, Morisawa M. (2002). A chemoattractant for ascidian spermatozoa is a sulfated steroid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(23):14831-36.
69. da Silva AC, Kendrick-Jones J, Reinach FC. (1995). Determinants of ion specificity on EF-hands sites. Conversion of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ site of smooth muscle myosin regulatory light chain into a Ca^{2+} -specific site. *J Biol Chem*. 270(12):6773-8.

謝辞

本研究を進めるにあたって、自身の研究のための環境を提供してくださり、また多くのご指導とご助言を賜りました永田宏次准教授に心より感謝申し上げます。

本研究で使用したプラスミドを提供してくださり、また研究のディスカッションを行ってくださった筑波大学下田臨海実験センターの稲葉一男教授に心より感謝申し上げます。

本研究における実験を行える環境を提供してくださり、また研究のディスカッションとご指導を行ってくださった東京大学農学生命科学研究科養生訓を科学する医食農連携研究室の田之倉優特任教授と宮川拓也特任准教授に心より感謝申し上げます

本研究の X 線回折実験と構造解析に関してご指導を賜りました学習院大学理学部生命科学科の中村顕助教に心より感謝申し上げます。

本研究の X 線小角散乱実験と解析においてご指導を賜りました東京薬科大学生命科学部の小島正樹教授と松村義隆博士に心より感謝申し上げます。

食品生物構造学研究室の皆様には日頃から数多くのご助言を賜り、大変お世話になりました。自身の充実した研究生活を支えてくださり、この場にて皆様に深く感謝をいたします。

最後に、私の大学院進学と博士号取得を応援してくださり、また大学院生活を多くの面で支えてくださった家族に深く感謝をいたします。