

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 27 年度博士課程進学

氏名 生島 智樹

指導教員 永田 宏次

論文題目 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

1. 研究背景と研究の目的

受精の過程では、卵が放出する誘引物質への精子の走化性が利用される。平常時の精子は鞭毛をほぼ対称的に動かし、らせん状の軌道で遊泳する。精子は卵が放出する種特異的な誘引物質の濃度勾配を感知しながら遊泳し、誘引物質の濃度の極小点を感知すると、カルシウムチャネルが活性化して精子内に Ca^{2+} が流入する(カルシウムスパイク)。カルシウムスパイクが起きると、精子の鞭毛運動が非対称になり、卵に向かって遊泳方向を大きく変える。こうした誘引物質の感受、カルシウムスパイク、遊泳方向の変化を何度も繰り返すことで、精子は卵まで効率良く到達することができる。

精子の鞭毛運動は鞭毛内のモータータンパク質ダイニンと微小管の間の滑り運動により制御される。ダイニンは ATP 依存的に微小管との間で滑り運動を起こし、この運動により 2 本の微小管が伸長方向にずれる。この局所的な部位で起こる微小管のずれが時間的・空間的に制御され、鞭毛全体の屈曲が運動に変換される。この滑り運動を制御する鞭毛内カルシウム結合タンパク質として、ホヤ精子からカラクシンが同定された。カラクシンはヒトやウニなど動物界に広く分布するタンパク質で、ダイニンと微小管の間の滑り運動を抑制することにより、カルシウムスパイク時の非対称的な鞭毛運動を生じさせる重要な因子と考えられている。

カラクシンは、 Ca^{2+} や Mg^{2+} の結合部位である EF-hand motif を 4 個含む(EF0, EF1, EF2, EF3)。平常時の細胞質内では、 Mg^{2+} 濃度(約 2 mM)が Ca^{2+} 濃度(約 10 nM)に比べて非常に高く、カラクシンなどの EF-hand タンパク質には Mg^{2+} が結合している。しかし、シグナル伝達により細胞質内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると(約 10 μM)、EF-hand に結合していた

Mg²⁺が Ca²⁺に置換され、EF-hand タンパク質の立体構造が変化して活性化状態に変化する。カラクシンの場合は、先行研究で Ca²⁺に依存してダイニンと相互作用することが明らかにされた。カルシウムスパイク後に、カラクシンの EF-hand に Ca²⁺が結合することによってダイニンと相互作用し、精子の鞭毛の非対称的な運動が誘起されると考えられている。

カラクシンの立体構造については、前任者によって Ca²⁺結合型の結晶構造が決定されている。しかし、この構造のみではカラクシンの立体構造変化を伴う活性制御機構を理解することはできない。そこで本研究では、初めに Mg²⁺結合型の結晶構造を決定し、さらにカラクシンの Mg²⁺および Ca²⁺との結合特性を等温滴定型熱量測定(isothermal titration calorimetry, ITC)により解析するとともに、Ca²⁺結合型と Mg²⁺結合型の X 線小角散乱、蛍光スペクトルのデータに基づいて、カラクシンの溶液中の立体構造変化および活性制御機構を解明することを目的とした。

2. Mg²⁺結合型のカラクシンの結晶構造

Mg²⁺結合型のカラクシンの立体構造を X 線結晶構造解析法により 2.6 Å 分解能で決定することに成功した。Mg²⁺結合型の構造は Ca²⁺結合型の構造によく似ており(RMSD 0.52 Å), Ca²⁺結合型の結晶構造と同様、非対称単位中に open state と closed state のカラクシン 2 分子が存在していた。両構造には相違点も見られ、Ca²⁺が open state と closed state の EF1, EF2, EF3 に結合していたのに対し、Mg²⁺は closed state の EF3 には結合していなかった。このことから、open state は closed state よりも EF3 に Mg²⁺が結合しやすい状態であることが示唆された。

また、ITC によりカラクシンの Ca²⁺と Mg²⁺への結合力を測定した。その結果、他の EF-hand タンパク質と同様に、カラクシンは Mg²⁺よりも Ca²⁺への結合力が強く、さらにアポ型よりも Mg²⁺結合型の方が Ca²⁺との結合力が強いことが明らかになった。イオン結合の熱力学パラメーターを算出した結果、Mg²⁺結合型のカラクシンに Ca²⁺が結合する際は、エンタルピー変化が負で、エントロピー変化が正であるため、エネルギー的に有利であることが示された。

さらに、カラクシンが属するファミリーのタンパク質構造を比較したところ、C 末端ヘリックスの位置と配向が様々であることが明らかになった。カラクシンの C 末端ヘリックス($\alpha 11$)は疎水性ポケットの一部を覆うように疎水性相互作用を形成していた。この $\alpha 11$ の立体構造の安定化への寄与を検証するため、 $\alpha 11$ を欠失させた変異体の熱安定性測定を行った。その結果、 $\alpha 11$ の欠失により変性温度が 56°C から 28°C まで低下し、 $\alpha 11$ の熱安定性への寄与が実証された。

3. 溶液中におけるカラクシンの構造変化の解析

結晶構造の比較では、Ca²⁺結合型と Mg²⁺結合型のカラクシンの間に顕著な構造変化が見られなかった。結晶化の際の分子のパッキングにより構造変化が妨げられているのではな

いかと考え、溶液中での立体構造を解析した。

初めに、結晶構造で見られた open state と closed state での 2 つの構造が Ca^{2+} 結合型と Mg^{2+} 結合型の構造と対応しているかどうか調べるため、X 線小角散乱による解析を行った。散乱データから慣性半径を計算した結果、 Mg^{2+} 結合型は 20.2 Å, Ca^{2+} 結合型は 19.3 Å と算出された。また、散乱曲線の解析結果から、 Mg^{2+} 結合型は open state 構造に対応するが、 Ca^{2+} 結合型は open state と closed state の中間構造をとることが明らかになった。結晶構造では、open state は closed state と比べて C-terminal domain の疎水性ポケットが大きいことから、 Ca^{2+} 結合によって分子の慣性半径が小さくなり closed state に近い状態に構造が遷移することでカラクシンの疎水性ポケットが狭くなることが示唆された。実際に分子表面の疎水性度が変化するか検証するために、タンパク質の疎水性表面に結合して蛍光を示す 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid (1,8-ANS) を用いた蛍光測定を行った。その結果、 Ca^{2+} 結合型では Mg^{2+} 結合型よりも蛍光強度が低かったことから、 Ca^{2+} 結合によりカラクシン表面の疎水性度が低下することが確認された。

4. トリプトファン蛍光測定を用いた各 EF-hand の構造変化の検証

カラクシンは 4 つの EF-hand によって構造のコアを形成している。各 EF-hand に Trp 残基を導入しトリプトファン蛍光測定を行うことで、各 EF-hand の Ca^{2+} や Mg^{2+} 結合時の局所的な構造変化を解析した。EF1 では Mg^{2+} 結合型と Ca^{2+} 結合型で蛍光スペクトルに変化はなかったが、EF2 と EF3 では Mg^{2+} 結合型に比べて Ca^{2+} 結合型では蛍光スペクトルのピークトップが長波長側にシフトし、疎水性ポケットの内部に導入した Trp 残基がより疎水的な環境に移動したことが明らかになった。このことから、 Ca^{2+} の結合によりカラクシンの EF2 と EF3 が構造変化を起こすことで疎水性ポケットの残基がより内部に埋まり、ポケットが狭くなることが示唆された。

5. 本研究のまとめ

本研究の X 線結晶構造解析および X 線小角散乱の結果から、 Mg^{2+} 結合型ではカラクシンが open state 構造をとっており、カルシウムスパイクにより Ca^{2+} 結合型に変わると closed state に近い構造になり、それに伴い、分子表面の疎水性ポケットも小さくなることが明らかになった。さらに、1,8-ANS の蛍光やトリプトファン蛍光の測定から、 Ca^{2+} 結合により EF2 と EF3 の構造変化が誘起され、疎水性ポケットが狭くなることが示された。カラクシンは Ca^{2+} 依存的にダイニンと結合することから、C-terminal domain の疎水性ポケットが狭くなることがダイニンとの結合に重要であると示唆される。他の NCS protein family タンパク質にもカラクシンで見られた疎水性ポケットは保存されており、 Ca^{2+} や Mg^{2+} の結合によって疎水性ポケットの大きさが変わり、相互作用相手の α -ヘリックス構造がそのポケットと疎水性相互作用を形成することが報告されている。同様に、カラクシンも Ca^{2+} と結合することで分子の疎水性ポケットを小さくし、ダイニンとの相互作用に適する構造になると予想される。

しかし、カラクシンは他とは異なり N-terminal domain の疎水性ポケットが $\alpha 11$ で塞がれており、C-terminal domain のみで構造変化とダイニンとの結合が示唆される点で新しい。

本研究の結果から、 Mg^{2+} 結合型と Ca^{2+} 結合型でカラクシンの構造が異なることが示され、 Ca^{2+} が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うことが示唆された。カルシウムスパイク時には、鞭毛の付け根の Ca^{2+} 濃度が上昇し、鞭毛の先端に向かって徐々に Ca^{2+} 濃度の上昇が伝播していくことが知られている。このため、 Ca^{2+} により促進されるカラクシンのダイニンへの結合および滑り運動の抑制が鞭毛全体に広がり、結果的に鞭毛全体の運動が制御されると考えられる。本研究の成果は、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だけでなく、鞭毛運動の異常が原因である疾患の軽減や治療に向けた薬剤開発の基盤になると期待される。