

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651216

研究課題名（和文）

カルシウムイオンにより開始される新規プロテインスプライシング系の開発とその応用

研究課題名（英文）

Development and application of novel calcium-sensitive protein splicing systems

研究代表者

二木 史朗（FUTAKI SHIROH）

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：50199402

研究成果の概要（和文）：カルモジュリン中の C 端カルシウム結合領域由来ペプチドがカルシウムイオン存在下にヘテロダイマーを形成することを確認した。プロテインスプライシングへの応用の前段階として融合タンパク質間での蛍光エネルギー移動が観察されるかを調べたが明確な結果は得られず、その相互作用様式についての検討を継続中である。一方、この領域を膜外配列とする人工イオンチャネルの合成により、カルシウムの存在下にチャネルが開く人工カルシウム感受性チャネルを得た。

研究成果の概要（英文）：Calmodulin C-terminal domain peptides formed a heterodimer in the presence of calcium. Aiming at its application to protein splicing, detailed modes of heterodimer formation of these peptides are under study. On the other hand, an ion-channel protein was constructed using the calmodulin C-terminal segment. The channel opened in the presence of calcium, and thus artificial calcium-sensitive ion channel was successfully established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：カルシウムイオン；カルモジュリン；イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

カルモジュリン(CaM)は、約 150 残基のアミノ酸からなる比較的小さな酸性タンパク質である。4 つのヘリックスループ-ヘリックス構造(HLH I-IV)を持ち、それぞれに 1

つずつカルシウムイオンが結合し、構造変化を引き起こして、細胞内の特定のタンパク質と結合できるようになる。このカルモジュリンの C 末端部分(CaMc)の N 末端断片 HLH III と C 末端断片 HLH IV がカルシウムイオンの

存在下において、ヘテロダイマーを形成し、一続きの CaMc と類似した構造をとることが示唆されていた。

一方、プロテインスプライシングとは、タンパク質分子が合成された後、介在する一部分（インテイン）が自己触媒的に切除され、N 末端側と C 末端側の残った部分（エクステイン）がペプチド結合で連結される特異な化学反応であり、タンパク質工学の分野で、*in vivo* でも *in vitro* でも応用されている。プロテイントランススプライシング反応をコントロールする方法として、これまでに、光を用いた方法、あるいはラパマイシンなどの小分子を利用した方法が開発されている。しかしながら、カルシウムイオンなどの金属イオンを用いた方法はこれまでのところ報告されていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、CaM の C 端側セグメントを用いたカルシウムイオン依存的なタンパク質の機能スイッチへの応用の一環として、カルシウムイオンのアクセプターとして、カルモジュリン由来のカルシウムイオン依存性ヘテロダイマー形成モチーフである HLH-III および HLH-IV を使い、カルシウムイオン刺激によってスプライシング反応を制御する新しい方法の開発を目指した。更に、CaM の C 端側セグメントを膜外配列に利用することで、カルシウムイオン依存的に開口する人工イオンチャネルの構築を行った。

3. 研究の方法

HLH-III、HLH-IV、Rf50 ペプチドは Fmoc 固相合成法により化学合成し、高速液体クロマトグラフィーで精製後、高純度の目的ペプチドを得た。HLH-III と EGFP、ならびに赤色蛍光タンパク質である DsRed と HLH-IV の融合タンパク質、CaMc ペプチドは遺伝子工学的的手法により調製した。Rf50-CaMc は Rf50 と CaMc セグメントのネイティブライゲーションにより調製した。得られたペプチド・タンパク質の構造を質量分析により確認した。

4. 研究成果

まず、HLH-III および HLH-IV のヘテロダイマー形成能を確認するため、これらに対応するペプチドを合成した。双方のペプチド共存下では、カルシウム添加により 8-anilino-naphthalene-1-sulfonic acid (ANS) の蛍光強度の増強と蛍光波長の青色シフトが認められたが、片方のペプチドのみではこれが認められず、HLH-III および HLH-IV がカルシウム存在下にヘテロダイマーを形成することが確認できた。

これらのペプチドとインテイン、緑色蛍光タンパク質 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) との融合タンパク質のプラスミドの調製と融合タンパク質の細胞内発現に先立ち、これらの 2 つのペプチドを含むカルモジュリンの C 端側ペプチド (77-148 位: CaMc ペプチド) を遺伝子工学的に調製した。カルシウムイオン存在下では、同様の ANS の蛍光強度の増強と蛍光波長の青色シフトが認められたが、マグネシウム存在下ではこのような挙動は見られず、カルシウム特異的なライゲーションへの応用の可能性が示唆された。

さらに HLH-III と EGFP、ならびに赤色蛍光タンパク質である DsRed と HLH-IV の融合タンパク質をコードするプラスミドを調製し、これらを培養細胞に導入した。細胞内で個々のタンパク質の発現は確認されたが、ヒスタミン刺激により細胞内カルシウム濃度を上昇させても、EGFP と DsRed の間で明確な FRET は観察されず、これらの融合タンパク質がカルシウム存在下に会合しているのかどうか疑問が残った。カルモジュリン中の HLH-III と HLH-IV との立体配置から、これらが逆平行型のヘテロダイマーを形成すると予想し、上記の融合タンパク質を調製したが、ペプチド自体の認識に問題があるのか、融合タンパク質の設計に問題があるのかに関しての検討を継続中である。

一方、カルシウムイオンを用いてタンパク質機能をスイッチする例として、カルモジュリン C 端ペプチドを膜外配列とする人工イオ

ンチャンネル（カルモジュリン C 端ペプチドとチャンネル形成ペプチド、アラメチシンのハイブリッド体）を合成した。

チャンネル形成部位（膜内配列）として、pH 非依存性のアラメチシン(Rf50)に、Ca²⁺によって構造変化を起こすことが知られているカルモジュリン C 末端ドメインとして CaMc ペプチドを膜外配列として連結させた人工イオンチャンネル Rf50-CaMc を設計した（図 1A）。Rf50 は非タンパク質構成アミノ酸 Aib 残基を含むため、融合タンパク質 Rf50-CaMc は遺伝子組み換えタンパク質発現系では調製できない。そこで、Rf50 の thioester 体と、N 末端に Cys 残基を持つ Cys-CaM を各々調製した後、両者をネイティブケミカルライゲーションにより連結させるアプローチを採用し（図 1B）、高純度の Rf50-CaMc を得た（図 1C, D）。

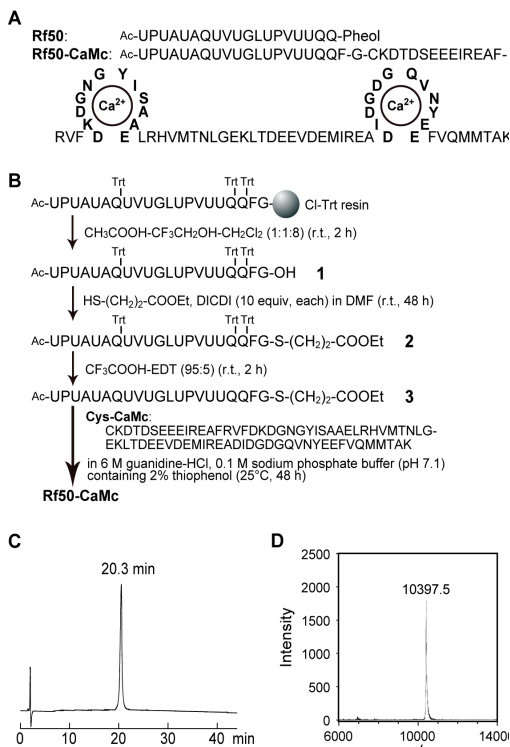


図 1. Rf50-CaMc の調製

酸性アミノ酸を多く含む CaMc 同士の静電反発によるチャンネル形成障害を防ぐため、チャンネル電流の測定は pH 5.4 の電解質溶液中で行った。初めに、CD 測定により、Rf50-CaMc

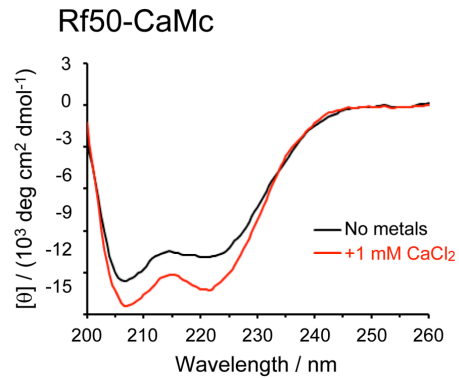


図 2. Rf50-CaMc のカルシウムイオンによる構造変化

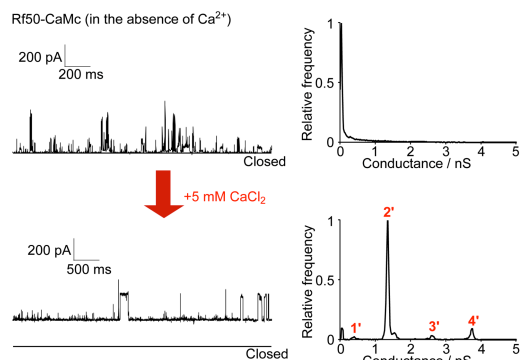


図 3. Rf50-CaMc のカルシウムイオン依存的チャンネル開口

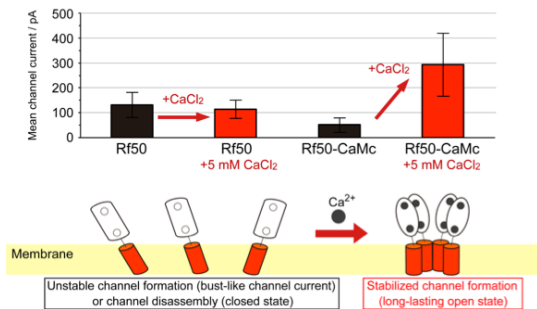


図 4. Rf50-CaMc のカルシウム依存的チャンネル電流の増加

の膜外領域が Ca²⁺によって構造変化を起こすことを確認した（図 2）。

また、8-anilino-naphthalene-1-sulfonic acid (ANS)の蛍光測定により、Ca²⁺の結合によって CaMc の構造変化が起こり、タンパク質内部に埋もれていた疎水性部分が表面に露出することを確認した。

Rf50-CaMc のチャンネル電流測定の結果、

Ca²⁺非存在下においては、開口時間の極めて短いバースト様の電流が観測されたが、Ca²⁺存在下においては、特定の会合体の開口時間が顕著に延長し、結果として平均チャンネル電流が 6 倍程度まで増加することが分かった (図 3, 4)。

本研究の結果は、外部刺激により、膜にチャンネルを形成するペプチドの会合を制御することによって、チャンネルポアを通るイオンの流れや物質の透過を制御できることを示すものであり、天然のチャンネルの構造と機能に関する理解や、機能的センサー素子の開発に有用な知見を与えるものである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- (1) Daisuke Noshiro, Kazuhiro Sonomura, Hao-Hsin Yu, Miki Imanishi, Koji Asami, Shiroh Futaki
Construction of a Ca²⁺-gated Artificial Channel by Fusing Alamethicin with a Calmodulin-derived Extramembrane Segment
Bioconjug. Chem. 24(2), 188-195 (2013)
DOI: 10.1021/bc300468x (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- (1) Shiroh Futaki
Peptide tools for controlling and analyzing cell functions
3rd International Symposium on Center for Creation of Functional Materials (招待講演)
2012.12.10
筑波大学、つくば市
- (2) 奥彰彦、游 皓欣、中瀬生彦、二木史朗
細胞内安定型ユビキチン多量体の構築のための新しいアプローチ
日本薬学会第 132 年会
2012.3.31
北海道大学、札幌市
- (3) 能代大輔、園村和弘、浅見耕司、二木史朗

カルモジュリンCドメインを用いたカルシウム感受性人工イオンチャンネルの創製
日本薬学会第 132 年会
2012.3.31
北海道大学、札幌市

[図書] (計 1 件)

- (1) Daisuke Noshiro, Kazuhiro Sonomura, Hao-Hsin Yu, Miki Imanishi, Koji Asami, Shiroh Futaki
Construction of a calcium-gated artificial channel by fusing alamethicin with a calmodulin sensor protein
Peptide Science 2012 (Ed by K. Sakaguchi), The Japanese Peptide Society, Mino, 2013, pp. 183-184

[その他]

ホームページ等

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~bfdc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二木 史朗 (FUTAKI SHIROH)
京都大学・化学研究所・教授
研究者番号：50199402