

シグナル伝達系の構成蛋白質の  
構造ダイナミズムと  
機能制御ドメインの解析

課題番号：12680702

平成12年～14年度  
科学研究費補助金  
基盤研究(C)

研究報告書



作成提出：平成16年3月

研究代表者：布村 渉  
(東京女子医科大学医学部生化学)

# シグナル伝達系の構成蛋白質の 構造ダイナミズムと 機能制御ドメインの解析

課題番号：12680702

平成 12 年～14 年度  
科学研究費補助金  
基盤研究 (C)

研究報告書

作成提出：平成 16 年 3 月

研究代表者：布 村 渉  
(東京女子医科大学医学部生化学)

# 構 成

## 第 1 章 研究の概要

1. 序論
2. 本申請で明らかにしたこと (総括)
  - A. 4.1R の膜結合 domain。
  - B. 135kDa 型 protein 4.1R (4.1R<sup>135</sup>) NH<sub>2</sub> 末端部 209 アミノ酸残基 (head-piece, HP) の細胞膜結合制御機構。
  - C. 4.1G の膜結合解析。
  - D. 4.1B<sup>AUG2</sup> と NHE-RF の結合解析。
3. 研究組織
4. 研究発表

## 第 2 章 研究の成果

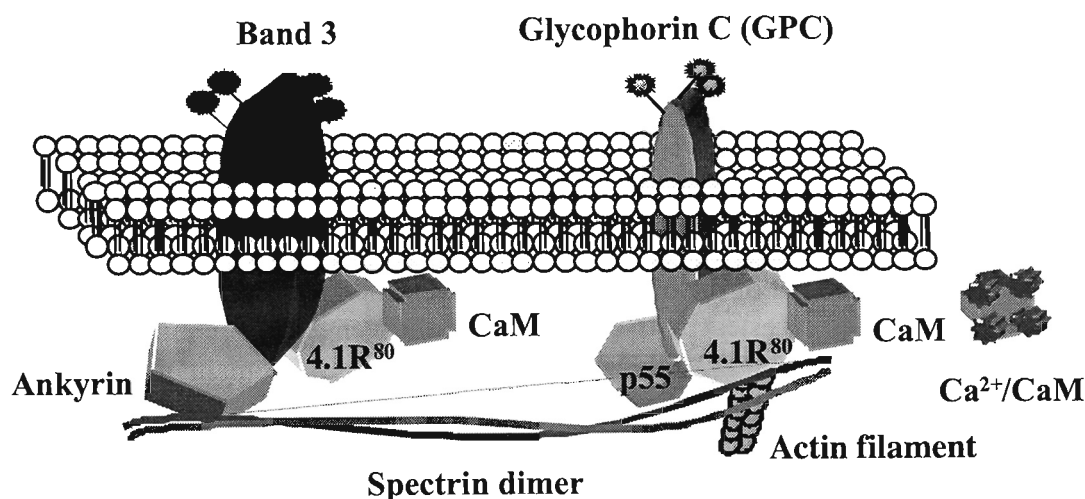
- 第 1 項 4.1R 30kDa domain の calmodulin 結合部位。
- 第 2 項 4.1R<sup>80</sup> による PDZ 蛋白質の膜結合制御。
- 第 3 項 4.1R 30kDa domain の X 線結晶構造解析。
- 第 4 項 135kDa 型 protein 4.1R (4.1R<sup>135</sup>) NH<sub>2</sub> 末端部 209 アミノ酸残基 (head-piece, HP) の細胞膜結合制御機構。
- 第 5 項 160kDa 型 protein 4.1G の細胞膜との結合解析。
- 第 6 項 腎型 protein 4.1B (4.1B<sup>AUG2</sup>) と PDZ 蛋白質の結合解析。
- 第 7 項 その他の研究成果。
- 第 8 項 統括討論

## 印刷発表の別刷り

# 第 1 章 本研究の概要

## 1. 序論：

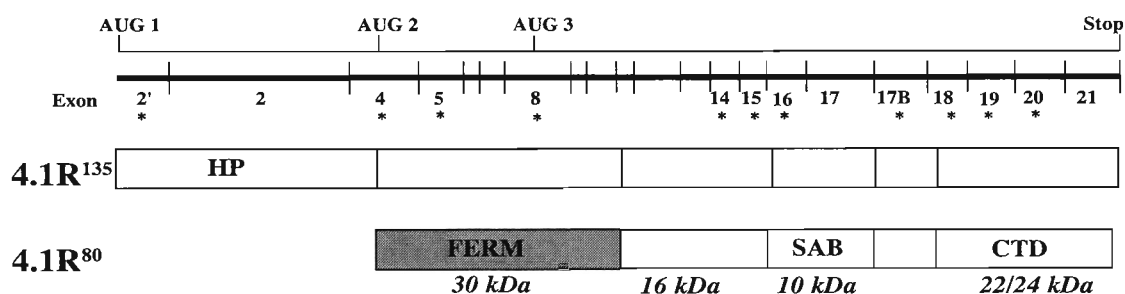
細胞膜を介するシグナル伝達系は、「膜貫通蛋白質－膜裏打ち蛋白質－細胞骨格系」の構造ダイナミズムの連鎖である。つまり、シグナル伝達系には、受容体等の膜貫通蛋白質に直接結合する膜骨格（裏打ち）蛋白質を介して細胞骨格に伝達されると考えた。現在行われている研究の多くはシグナル伝達に関わる蛋白質モジュール（個々の蛋白質分子）の同定に主力が注がれ、蛋白質の構造変化や分子間相互作用（平衡解離定数などの定量的解析）を解析した報告は少ない。



**Fig.1. Organization of the erythrocyte plasma membrane.** A protein network forming a “cytoskeleton” underlies the cytoplasmic surface of the red blood cell lipid bilayer. Spectrin ( $\alpha$  and  $\beta$ ), actin, adducin, 4.1R<sup>80</sup> and p55 are the main constituents of the skeleton. Interactions between these proteins are defined as lateral interactions. This protein network is anchored to the lipid bilayer through two vertical interactions, one involving ankyrin, and Band 3, the other one involving 4.1R<sup>80</sup>, p55, and glycophorin C (GPC).

本研究では、細胞膜裏打ち蛋白質群（Fig. 1 参照）に焦点をあて、膜骨格蛋白質の分子レベルでシグナル伝達を理解するために、膜裏打ち構造の要であり、細胞内シグナル伝達にも重要な役割を果たしていると予想される protein 4.1（赤血球型 80kDa を 4.1R<sup>80</sup>、赤芽球型 135kDa を 4.1R<sup>135</sup> 及び

全組織に発現する general type を 4.1G 及び腎に異所発現する脳型を 4.1B<sup>AUG2</sup> と略記) の膜結合 domain である N 末端 30kDa (所謂 FERM domain) 及び 4.1R<sup>135</sup> の 30kDa (FERM domain) の N 末端 209 アミノ酸ポリペプチド (head-piece、HP と略記、Fig.2) に焦点を当て、膜貫通蛋白質 (glycophorin C、以下 GPC、Band 3 或いは p55 (赤血球 PDZ 蛋白質、分子量 55kDa) ) との結合解析を行い、シグナル伝達における膜骨格蛋白質の機能を考察した。



**Fig.2. Primary structure of 4.1R isoforms.** Translation of the prototypical red blood cell 80kDa 4.1R isoform (4.1R<sup>80</sup>) is initiated at AUG-2, which is located in Exon 4. Translation of the 135 kDa 4.1R isoform (4.1R<sup>135</sup>), an isoform expressed in early erythroblasts and other nucleated cells, is initiated at AUG-1, which is located in Exon 2'. An updated list of the binding partners identified for each domain of 4.1R is displayed. 4.1R<sup>80</sup> is digested by  $\alpha$ -chymotrypsin and generated 4 main domains, 30 kDa, 16kDa, 10 kDa and 22/24kDa domains. The 30kDa domain named FERM domain after Four point one, Ezrin, Radixin and Moesin, which have conserved amino acid sequence (Chishti, A. H. *et al.* (1998) *Trends Biochem. Sci.* **23**, 281-282). \* Indicates alternative slicing Exon.

また、4.1 ファミリー蛋白質の 4.1G、4.1B と 4.1R の結合特性を比較することにより、4.1 ファミリー蛋白質の構造的多様性と機能分化について考察を試みた。

## 2. 本申請で明らかにしたこと（総括）

### A. 4.1R<sup>80</sup> の膜結合 domain

(1) 各種の Exon を欠失させた 4.1R の膜結合 domain (N 末端 30kDa) の組換え蛋白質について、Resonant Mirror Detection (RMD) 法を用いた IAsys™ 装置による反応速度論的結合解析により、4.1R<sup>80</sup> の p55、GPC 及び CaM の結合部位を同定した。つまり、p55 は Exon 10、GPC は Exon 8 のそれぞれ親水性アミノ酸残基を多く含む部分に結合し、CaM は Exon 9 (Ca<sup>2+</sup> 感受性の結合) 及び Exon 11 (Ca<sup>2+</sup> 非感受性の結合) の 2 箇所 (各 11 残基) に結合することを明らかにした。また、CaM が 4.1R<sup>80</sup> に作用するためにはこの 2 箇所に同時に結合することが重要であることを明らかにした。更に 4.1R<sup>80</sup> と CaM の結合に於いて、Ca<sup>2+</sup> 感受性の結合部位では 185 番目のセリン残基(S<sup>185</sup>)、Ca<sup>2+</sup> 非感受性の結合部位では、芳香族アミノ酸が重要な役割をしていることを明らかにした。

(2) p55 の GPC への結合は、4.1R<sup>80</sup> が p55 の結合することにより約 10 倍強められた。p55 の結合部位 (Exon 10 領域) は 30kDa domain の結晶構造上の C-lobe 領域にあり、また、GPC と Band 3 の結合部位は結晶構造上の  $\alpha$ -lobe 領域及び N-lobe 領域に局在した。

(3) 4.1R<sup>80</sup> の p55、GPC、および Band 3 への結合は、Ca<sup>2+</sup> により CaM を介して親和性が約 10~20 分の 1 に弱められた。

(4) マラリア由来の赤血球膜蛋白質の一つ MESA は、4.1R<sup>80</sup> の Exon 10 領域であり、MESA は、p55 と 4.1R<sup>80</sup> の結合を競合した。

(5) 小麦胚芽レクチン (WGA) を凝集が起こらない程度で赤血球膜 (ゴースト) に作用させると赤血球膜の変形能が低下した。WGA 存在下で、赤血球膜の反転膜小胞を作ることはできなかった。

## B. 135kDa 型 protein 4.1R (4.1R<sup>135</sup>) NH<sub>2</sub> 末端部 209 アミノ酸残基 (head-piece, HP) の細胞膜結合制御機構。

4.1R<sup>135</sup> の 30kDa (FERM domain) の N 末端 209 アミノ酸ポリペプチド (HP) は、30kDa (FERM domain) と膜蛋白質 (GPC と Band 3) との結合を制御 (抑制と促進) した。GPC、Band 3 の細胞内 domain 及び p55 とは各々、平衡解離定数 $\sim 10^{-6}$  M、 $\sim 10^{-8}$  M、 $\sim 10^{-7}$  M、で結合した。HP には、30kDa (FERM domain) よりも優位に CaM が結合した。CaM が Ca<sup>2+</sup> 存在下で HP に結合すると 4.1R<sup>135</sup> と p55 及び GPC とは全く結合できなくなった。また、Band 3 との平衡解離定数は $\sim 10^{-6}$  M に大きくなり結合の親和性が低下した。

## C. 4.1G の膜結合解析。

4.1G は、赤芽球培養 7 日目に一過性に発現していた。4.1G の NH<sub>2</sub> 末端部 209 アミノ酸残基 (head-piece, HP) には Ca<sup>2+</sup> 依存性の CaM 結合部位があり、CaM と平衡解離定数 $\sim 10^{-8}$  M で結合した。GPC、Band 3 の細胞内 domain 及び p55 とは各々、平衡解離定数 $\sim 10^{-7}$  M で結合した。CaM が Ca<sup>2+</sup> 存在下で HP に結合すると 4.1G と p55 及び Band 3 とは全く結合できなくなった。また、GPC との平衡解離定数は $\sim 10^{-6}$  M になり結合の親和性が低下した。

## D. 4.1B<sup>AUG2</sup> と NHE-RF の結合解析。

腎細胞に発現する Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 (NHE 3) の調節蛋白質 NHE-RF (2 個の PDZ domain を有する) と 4.1B<sup>AUG2</sup> が結合しうることを *in vitro* binding assay (IASys<sup>TM</sup>) により明らかにした。また、NHE-RF 分子上では 4.1R<sup>80</sup> の結合部位は Ezrin の結合部位及び PDZ domain とは異なる部位にあることが示された。



### 3. 研究組織：

研究代表者：布村 渉 （東京女子医科大学医学部生化学・助手）

研究分担者：高桑雄一 （東京女子医科大学医学部生化学・教授）

研究分担者：金城政孝 （北海道大学電子研究所・助教授）

研究協力者：Mohandas Narla (New York Blood Center, USA)

研究協力者：Bong Gyoon Han (Lawrence Berkeley Natl. Lab., UCB, USA)

研究協力者：Philippe Gascard (Lawrence Berkeley Natl. Lab., UCB, USA)\*

研究協力者：Marilyn Parra (Lawrence Berkeley Natl. Lab., UCB, USA)\*

研究協力者：Xiu-Li An (New York Blood Center, USA)\*

研究協力者：澤田賢一 （秋田大学医学部内科学・教授）\*

研究協力者：廣畑裕治 （日本シイベルヘグナー）\*

研究協力者：川越徹也 （イニシウム）\*

（\*の研究協力者は、本研究費補助金申請時に研究協力者として申請しなかったが、研究開始後に当事者に承諾を得て、研究の協力を頂いた方々である。敬称略）

### 交付決定額：

平成12年度 直接経費 1、000千円

平成13年度 直接経費 1、800千円

平成14年度 直接経費 800千円

#### 4. 研究発表：

##### (1) 誌上発表<sup>註</sup>

(<sup>註</sup>研究代表者の全ての業績及び研究分担者の関連発表を掲載)

Regulation of protein 4.1R, p55 and glycophorin C ternary complex in human erythrocyte membrane.

Nunomura, W., Takakuwa, Y., Parra, M., Conboy, J. G., and Mohandas, N.

*J. Biol. Chem.* **275 (32)**: 24540-24546 (2000)

Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent calmodulin binding sites in erythrocyte protein 4.1: implications for regulation of protein 4.1 interactions with transmembrane proteins.

Nunomura, W., Takakuwa, Y., Parra, M., Conboy, J. G., and Mohandas, N.

*J. Biol. Chem.* **275 (9)**: 6360-6367 (2000)

Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a 30kD membrane binding domain of protein 4.1 from human erythrocytes.

Han, B. G., Nunomura, W., Wu, H., Mohandas, N., and Jap, B. K.

*Acta Crystallographica* **D56**: 187-188 (2000)

Protein 4.1 core domain structure and insight into regulation of cytoskeletal organization.

Han, B. G., Nunomura, W., Takakuwa, Y., Mohandas, N., and Jap, B. K.

*Nature Struc. Biol.* **7(10)**: 871-875 (2000)

*Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 1 associates with the Band 3 binding domain of ankyrin in the infected red cell membrane.

Magowan, C., Nunomura, W., Waller, K.L., Yeung, J., Liang, J., Dort, H. V., Low, P. S., Coppel, R. L., and Mohandas, N.

*Biochim. Biophys. Acta* **1502**:461-470 (2000)

Two distinct domains of protein 4.1 critical for assembly of functional nuclei *in vitro*.

Krauss, S. W., Heald, R., Lee, G., Nunomura, W., Gimm, J. A.,

Mohandas, N., and Chasis, J. A.

*J. Biol. Chem.* **277(46)**: 443399-44346 (2002)

Functional characterization of spectrin-actin-binding domains in 4.1 family of proteins.

Gimm, J. A, An, X. L., Nunomura, W., Mohandas, N.  
*Biochemistry* **41(23)**: 7275-7282 (2002)

Mapping the domains of the cytoadherence ligand *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) that bind to the knob-associated histidine-rich protein (KHRP).

Waller, K.L., Nunomura, W., Cooke, B.M., Mohandas, N., Coppel, R. L.  
*Mol. Biochem. Parasitol.* **119(1)**: 125-129 (2002)

Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA) of *Plasmodium falciparum* binds to the 30-kDa domain of protein 4.1 in malaria-infected red blood cells.

Waller, K.L., Nunomura, W., An, X.L., Mohandas, N., Coppel, R. L.  
*Blood* **102**, 1911-1914 (2003)

(2)学会発表

平成12年度 (2000年)

Protein 4.1 (135 kDa) と膜蛋白質との結合解析

布村 渉、水野章子、高桑雄一

第73回日本生化学会大会、生化学：72、806 (2000)

Jap, B.K., Han, B.-G., Nunomuwa, W., Takakuwa, Y., and Narla M.  
Atomic model of protein 4.1R core domain; insights into calmodulin regulated activities of protein 4.1R on cytoskeletal structure.  
50th. American Crystallographic Association, Program: **93** (2000)

Krauss, S.W., Heald, R.W., Lee, G.M., Gimm, J.A., Nunomura, W., Narla, M., and Chasis, J.A. Dissecting protein 4.1 function in assembly of vertebrate nuclei, mitotic spindles and centrosomes. 40th. American Society for Cell Biology Annual Meeting, *Mol. Biol. Cell* **11** (suppl.), 567a (2000)

平成13年度 (2001年)

135 kDa の protein 4.1 (4.1R<sup>135</sup>) と膜蛋白質との結合について。

布村 渉、水野章子、高桑雄一

日本膜学会第23年会 (2001)

赤血球型 protein 4.1 (4.1R)の膜結合 domain の結晶構造解析。

布村 渉、Han, B.-G.、Mohandas, N.、Jap, B.K.、高桑雄一  
日本膜学会第 23 年会 (2001)

Protein 4.1 (4.1R) の 30-kDa domain の X 線結晶構造解。  
布村 渉、Han, B.-G.、Mohandas, N.、Jap, B.K.、高桑雄一  
第 74 回日本生化学会大会、要旨：806 (2001)

#### 平成 14 年度 (2002 年)

細胞接着分子 CD44 を介する分子間相互作用の解析について。  
服部美奈子、布村 渉、太田博明、高桑雄一  
日本膜学会第 24 年会、要旨集、p76 (2002)

CD44 と細胞膜骨格蛋白質群の結合について。  
服部美奈子、布村 渉、太田博明、高桑雄一  
第 55 回日本細胞生物学会大会、要旨集、p34 (2002)

非赤血球型 Protein 4.1 族の膜蛋白質結合性の反応速度論的解析。  
布村 渉、Parra, M.、An, X.-L.、Narla, M.、高桑雄一  
第 75 回日本生化学会大会、生化学 75 巻、p798 (2002)

FERM 蛋白質群の膜結合性に関する分子間相互作用の反応速度論的  
解析。  
服部美奈子、布村 渉、太田博明、高桑雄一  
第 75 回日本生化学会大会、生化学 75 巻、p798 (2002)

Mapping of the regions responsible for in vitro interactions between  
Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers, NHERF and protein 4.1R.  
Nunomura, W., Orłowski, J., Denker, S.P., Mohandas, N., and Gascard,  
P.D. 42nd American Society for Cell Biology Annual Meeting. *Mol. Biol.*  
*Cell* **13**, 55a (suppl.) (2002)

Interactions of protein 4.1G with membrane proteins and calmodulin.  
Nunomura, W., Gascard, P., Parra, M., An, X., Narla, M., and Takakuwa,  
Y. 42nd American Society for Cell Biology Annual Meeting. *Mol. Biol.*  
*Cell* **13**, 500a (suppl.) (2002)

Regulation of 135 kDa protein 4.1R interactions with membrane proteins  
by its headpiece region.

Nunomura, W., An, X., Gascard, P., Parra, M., Narla, M., and Takakuwa, Y. 42nd American Society for Cell Biology Annual Meeting. *Mol. Biol. Cell* **13**, 500a (suppl.) (2002)

Identification of protein 4.1 and actin binding sites in erythrocyte beta-spectrin.

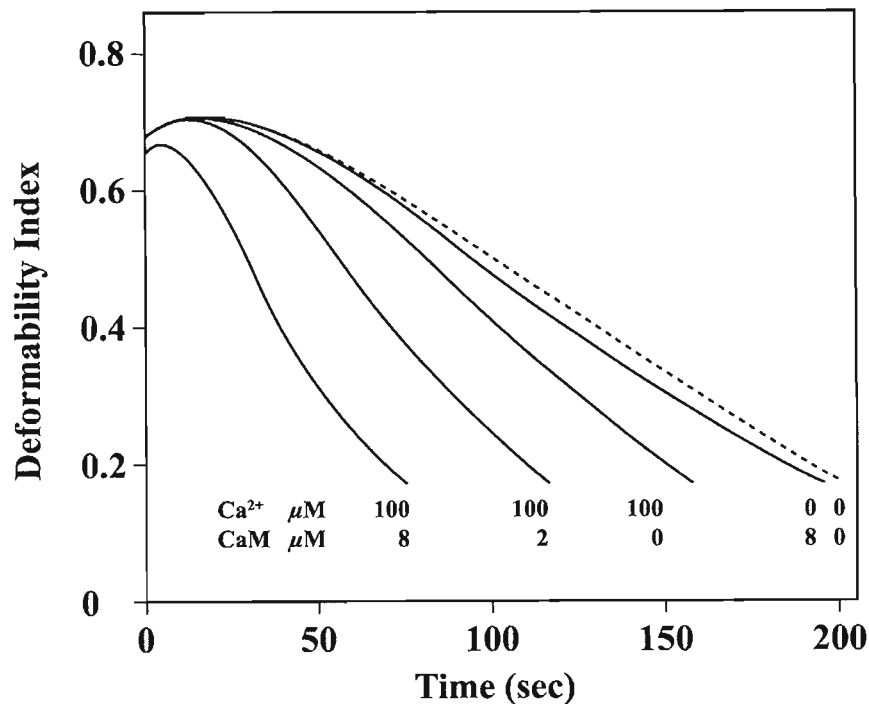
Debnath, G., Nunomura, W., Guo, C., Baines, A., Mohandas, N., and An, X. 42nd American Society for Cell Biology Annual Meeting. *Mol. Biol. Cell* **13**, L137 (Late Abstracts) (2002)

## 第 2 章 研究の成果

## 第1項 4.1R 30kDa domain の calmodulin 結合部位。

### [目的]

4.1R<sup>80</sup>は、膜結合部位である 30kDa domain を介して calmodulin (CaM) と Ca<sup>2+</sup>非依存性に結合することが知られている (Fig. 1 参照)。一方、ヒト赤血球膜では、Ca<sup>2+</sup>と CaM の複合体 (Ca<sup>2+</sup> 4分子で飽和された CaM、以下では Ca<sup>2+</sup>/CaM と表記する) が 4.1R<sup>80</sup>に結合すると 4.1R<sup>80</sup>と spectrin / actin の結合が弱まり、結果として膜の安定性が低下することが知られている (Fig.3)。4.1R<sup>80</sup>が CaM と Ca<sup>2+</sup>非依存性に結合するにも関わらず、Ca<sup>2+</sup>が CaM を介した 4.1R<sup>80</sup>の膜結合を制御する機構を解明する為に、4.1R<sup>80</sup>の CaM 結合部位を決定した。



**Fig.3 Ca<sup>2+</sup>/CaM -induced decrease in membrane stability.** Resealed ghosts were prepared in the presence and absence of Ca<sup>2+</sup> (0 or 100 μM). Various concentrations of CaM (0, 2, 4, and 8 μM) and membrane stability were measured by Ektacytoeter. Membrane stability decreased with increase in Ca<sup>2+</sup> only when CaM was present. (Referred from Takakuwa, Y. *et al.* (1986) *J. Clin. Invest.* **78**, 80-85)

## [ 材料と方法 ]

### 1. 組換え蛋白質の作製

ヒト 4.1R の cDNA から、30kDa domain (アミノ酸番号 1~298、Exon 4~12 コード領域)を *EcoRI* 及び *SalI* 制限酵素切断部位を付加した特異プライマーによる PCR で増幅し、pGEX-KG ベクター (Amersham Bioscience) に組換えた。また、Band 3 細胞質内 domain は、赤芽球由来 cDNA から、特異的プライマーにより増幅し、塩基配列を確認後、大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3)を形質転換した。LB 培地にて大腸菌を 37℃一定条件下で震盪培養し、波長 600nm での吸光度 (以下では OD600 若しくは A600 等で表示) の値が 0.4~0.8 に達した時に、IPTG を最終濃度 (1mM) 添加し、さらに 37℃一定条件下で 3 時間震盪培養した。大腸菌は、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4℃、8 分間)沈澱後、1mM EDTA、1mM DFP、1mM 2ME を添加した B-PER™ (PIERCE、USA) に懸濁し溶菌した。溶菌液は氷上 10 分間の超音波処理後、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間) の上清を得た。上清は、Glutathione-Sepharose (Amersham Bioscience) と懸濁し、GST 融合蛋白質を分離した。GST 融合蛋白質は PreScission proteinase™ 処理により標的蛋白質 (30kDa domain) と GST を切断した後、GST を Glutathione-Sepharose にて吸収し、30kDa domain を Q-Sepharose (Amersham Bioscience) で更に精製した。精製した蛋白質の純度は SDS-PAGE にて検定した。蛋白質量は UV 法を用いた (280nm と 260nm を測定し、蛋白質濃度 (mg/ml) =  $1.45 A_{280} - 0.74 A_{260}$ ) 。

各種の Exon を欠失させた 4.1 の膜結合 domain (N 末端 30kDa) の組換え体を作製した(Fig. 2)。遺伝子の点変異導入によるアミノ酸配列の置換 (S185 ⇨ W185, F277F ⇨ A277A, W268, F277F ⇨ A268, A277A) には、



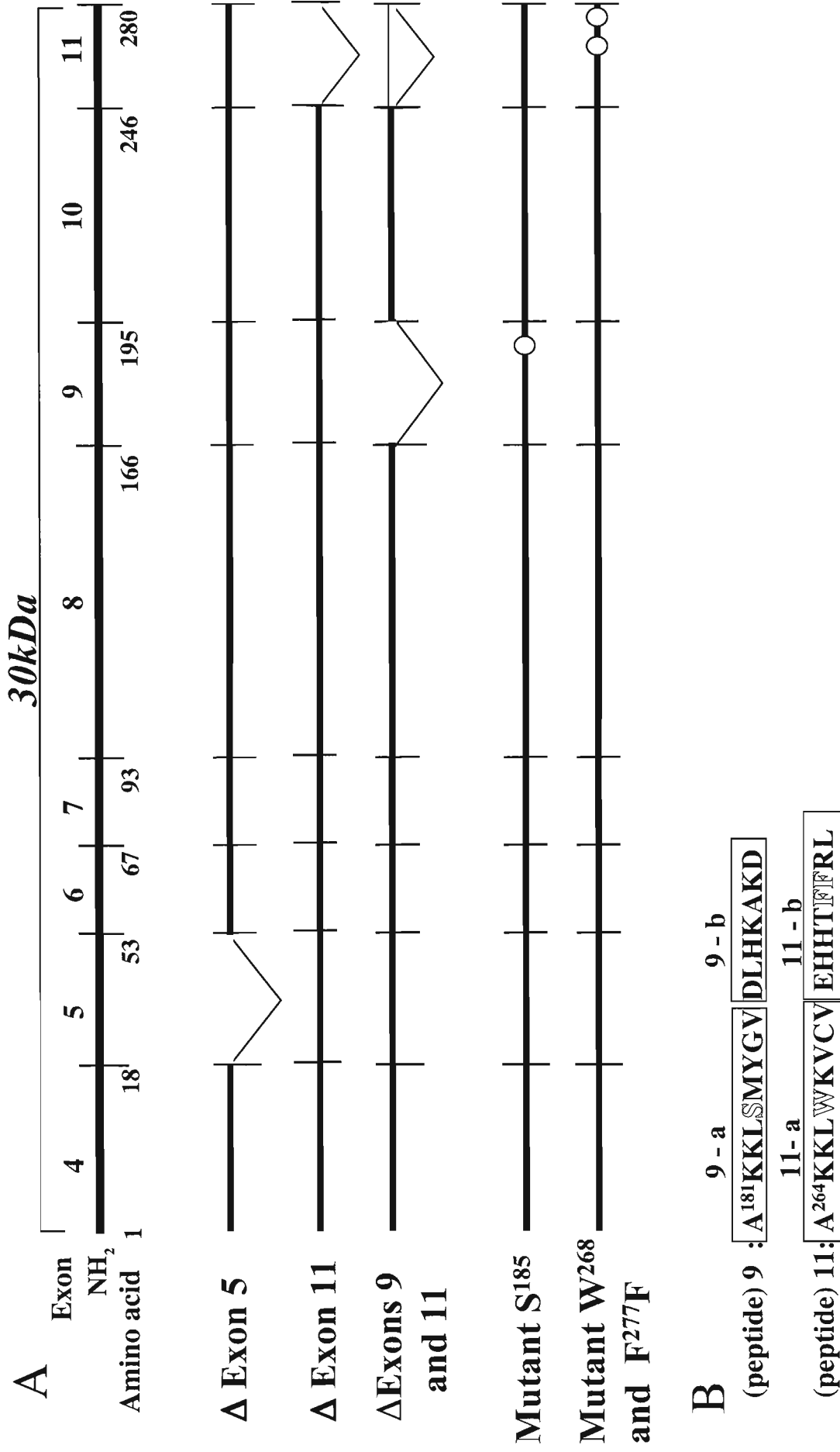


Fig. 4 *A*, structure of the 30-kDa domain of 4.1R encoded by exons 4-11 and the various mutant constructs. In some of the mutant constructs, sequences encoded by specific exons are deleted ( $\Delta$ Ex.5,  $\Delta$ Ex.11, and  $\Delta$ Ex.9/11), while in others specific amino acid residues indicated by *open circles* are mutated (Ser<sup>185</sup> replaced with tryptophan and Trp<sup>268</sup> or Phe<sup>277</sup>-Phe<sup>278</sup> replaced by alanine). The locations of two CaM binding peptides encoded by exon 9 (peptide 9) and exon 11 (peptide 11) are shown as *solid bars*. *B*, amino acid sequences of peptides 9 and 11. The mutated amino acids are represented as *outlined letters*.

特異プライマーを合成し、QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて作成した。変異導入は、塩基配列を確認した。

## 1. CaM の精製。

CaMは、正常牛脳からトリクロロ酢酸沈澱、等電点沈澱、Phenyl Sepharose CL6B (Amersham Bioscience) を用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した (Gopalakrishna, R., and Anderson, W. B. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 830–836) 。

## 1. ペプチド合成。

ペプチドは、Fmoc 法により Perseptive 社のペプチド合成機 9500 により合成した (Fig.4 参照)。ペプチドは、逆相カラムクロマトグラフィー (C18) で精製した。アミノ酸シークエンサーで配列を確認し、純度は (MALDI-TOF-MS, REFLEX II™, Bruker Instruments, Switzerland) で検定した。

## 1. Resonant Mirror Detection (RMD)法による反応速度論的解析。

蛋白質-蛋白質間および蛋白質-ペプチド間の反応速度論的解析には、Affinity Sensor 社 (ケンブリッジ、UK) の Resonant Mirror Detection (RMD)法による IAsys™ 装置を用いた (原理は Fig.5A 参照)。蛋白質或いはペプチドは、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4 緩衝液 (0.1M NaCl を含む、以下 PBS と略記) に 100 μg/ml の濃度に溶解しアミノシランキュベット上に、BS<sup>3</sup> (PIERCE 社、USA) を介して固相化した。ペプチドの固相化には、一旦アミノシランキュベット上にウシ血清アルブミン (BSA) を BS<sup>3</sup> で固相化したのち、NHS/EDC にて BSA のアミノ基を活性化する方法

(Nunomura, W., et al. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30322–30328) も併用した。反応には、10mM Tris HCl 緩衝液 pH7.5、0.1M NaCl (Buffer A)

に対して 1mM EGTA 或いは 1mM EGTA と 2mM CaCl<sub>2</sub> を加えて用いた。キュベット内の反応温度は 25℃ 一定に保ち、一定速度で攪拌した。反応に関わるパラメーター（結合速度定数、解離速度定数、最大結合量）は専用解析ソフトを用いて計算した（Fig.5B 参照）。平衡解離定数 ( $K_{(D)kin}$ ) は、結合速度定数 ( $k_a$ ) と解離速度定数 ( $k_d$ ) の比から以下の式で求めた。

$$K_{(D)kin} = k_d / k_a$$

( $K_{(D)kin}$ ) の値は、同じ測定で得られた結果から最大結合量の値を用いて Scatchard plot 解析を行い、両者を比較し合致性を検討した。本文での結果は、( $K_{(D)kin}$ ) の結果のみを  $K_{(D)}$  として表示した。

結合比は、以下の式に従って求めた。

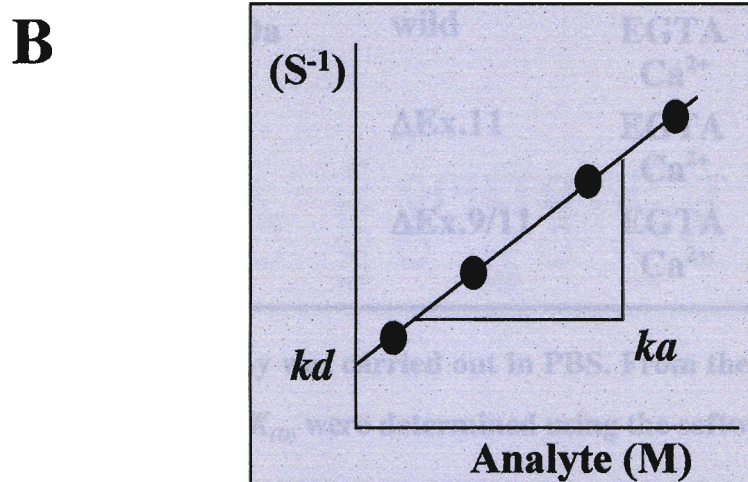
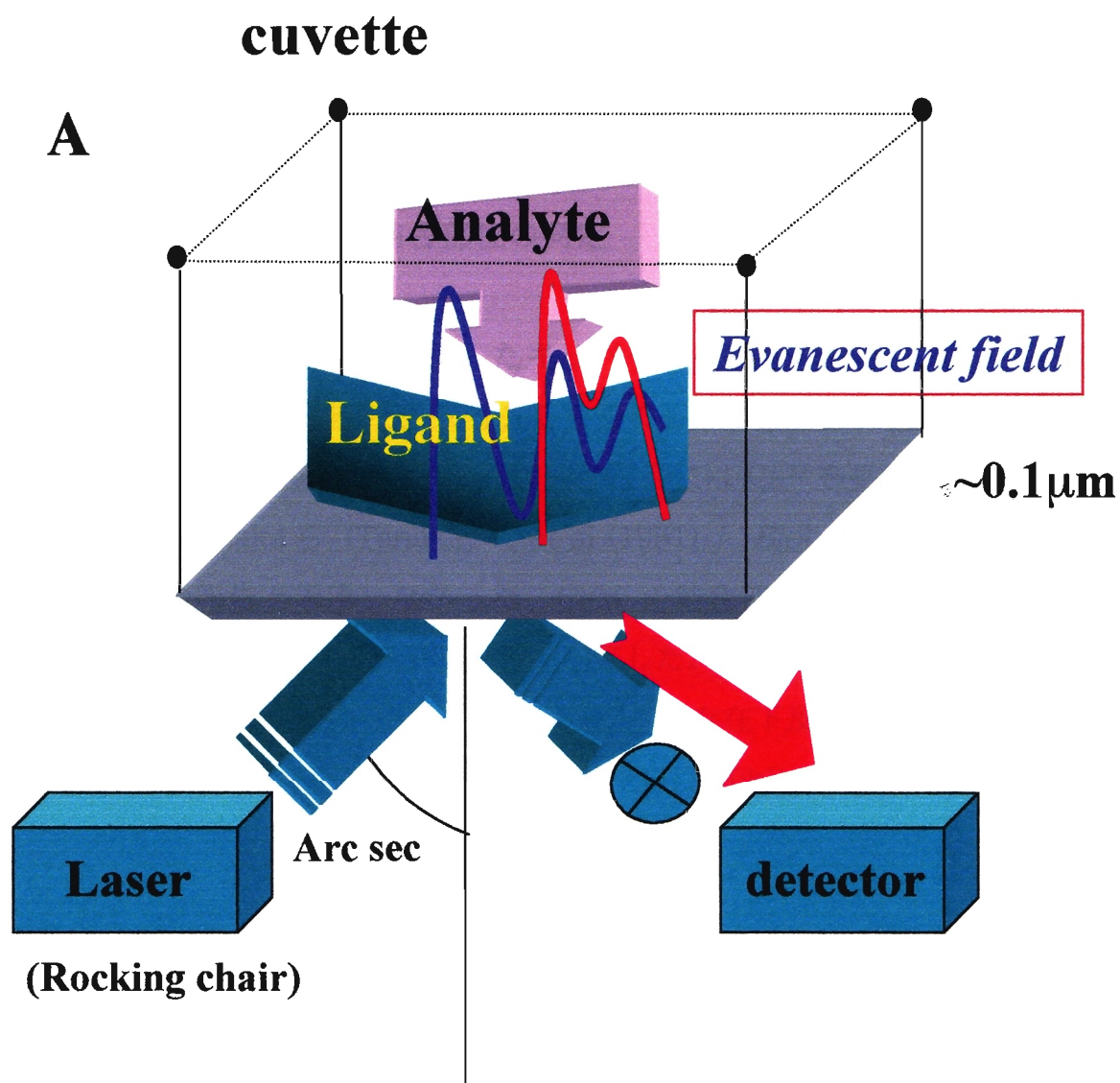
結合比 4.1R : CaM =

$B_{max} (4.1R^{80}) / 80,000 : \text{CaM 固相化量} / 18,000$

(4.1R と CaM の分子量は 80,000 と 18,000 とした。 $B_{max}$  は、解析ソフトを用いた計算から得られる最大結合量)。

## 1. CaM と 4.1 由来ペプチドの熱量測定

ペプチド 9 及び 11 と CaM の結合で発生する熱量変化を、MicroCal 社の滴定型熱量測定器 (VP-ITC) で測定した。反応には、10mM Tris HCl 緩衝液 pH7.5、0.1M NaCl (Buffer A) に対して 1mM EGTA 或いは 1mM EGTA と 2mM CaCl<sub>2</sub> を加えて用いた。CaM 濃度 23 $\mu$ M に対してペプチド濃度 (471  $\mu$ M) を滴定した。熱力学的パラメーター、 $\Delta H$  : エンタルピー変化量 ;  $\Delta S$  : エントロピー変化量 ;  $\Delta G$  : 自由エネルギー変化量 ; N ; 結合比は、付属のソフトウェアを用いて解析した。



**Fig.5 RMD (Resonant Mirror Detection) method.** The principle of RMD and IA<sub>sys</sub><sup>TM</sup> is described by Cush, R., et al. (1993) *Biosensors & Bioelectronics* **8**, 347-353. In B,  $k_a$  and  $k_d$  represent association rate constant and dissociation rate constant, respectively.

[ 結果と考察 ]

1. 4.1R<sup>80</sup> の CaM の結合部位の同定

Fig.6 に、CaM を固相化したキュベットに種々の濃度 4.1R<sup>80</sup>、30kDa domain を Ca<sup>2+</sup> 非存在下で添加した時の結合曲線を一つの図に合成して示した。この結果は、4.1R<sup>80</sup> が CaM との結合には Ca<sup>2+</sup> を要求しない事を示しており、Tanaka ら (Tanaka, T. et al (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 1134-1140) の報告と矛盾しなかった。CaM の結合部位は、N 末端部 30kDa domain であることを RMD 法にて検証した。つまり、他の 16kDa 10kDa 22/24kDa の各 domain と CaM は Ca<sup>2+</sup> 非存在下及び存在下で全く結合しなかった (data not shown) 。4.1R<sup>80</sup> 或いは 30kDa domain と CaM の結合比は、Ca<sup>2+</sup> 非存在下及び存在下の両方で 1 : 1 であった (Fig.7) 。

**Table I** *CaM binding to wild and mutant 30kDa domain*

Analyte	Mutation	Condition	$K_{(D)}$ ( $\mu$ M)
4.1R <sup>80</sup>	wild	EGTA	<b>0.33</b>
		Ca <sup>2+</sup>	<b>0.10</b>
30kDa	wild	EGTA	<b>0.35</b>
		Ca <sup>2+</sup>	<b>0.13</b>
	$\Delta$ Ex.11	EGTA	<b>30.0</b>
		Ca <sup>2+</sup>	<b>5.10</b>
$\Delta$ Ex.9/11	EGTA	<b>No binding</b>	
	Ca <sup>2+</sup>	<b>No binding</b>	

The binding assay was carried out in PBS. From the binding curves obtained by RMD,  $k_d$ ,  $k_a$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.

4.1R<sup>80</sup> と CaM の平衡解離定数は、Ca<sup>2+</sup> 非存在下及び存在下で 1.0~3.3 x10<sup>-7</sup>M であり、30kDa domain と CaM の平衡解離定数は、Ca<sup>2+</sup> 非存在下及び存在下で 1.0~3.5 x10<sup>-7</sup>M であった。30kDa domain をコードする Exon 4 から 11 のそれぞれを欠失させた変異組換え蛋白質を作製した。CaM との結合を IAsys™ で解析した結果、Exon 11 を欠失させた変異組換え蛋白質と CaM の平衡解離定数は、Ca<sup>2+</sup> 非存在下で 3.0 x10<sup>-5</sup> M (30μM) であったのに対して、Ca<sup>2+</sup> 存在下では 5.1 x10<sup>-6</sup> M (5.1μM) であった (Table I)。Exon 9 と 11 の両方を欠失させた変異組換え蛋白質は CaM と結合しなかった。この結果から、

- 1) Exon 9 と 11 に CaM の結合部位がある、
- 1) Exon 9 には Ca<sup>2+</sup> 依存性の結合部位がある

ことが示唆された。この仮説を検証する為に、二つの Exon 9 と 11 がコードする領域で相同性がある配列を検索した。その結果、Fig. 4 に示した配列について、CaM の結合を解析した。Table 1 に示したように、pep 9 は、Ca<sup>2+</sup> 依存性の CaM 結合部位であり、pep 11 は、Ca<sup>2+</sup> 非依存性の CaM 結合部位であることが明らかとなった。さらに各々の部分ペプチドについて同様に結合解析を行った。pep 9-a の 9 アミノ酸残基が、Ca<sup>2+</sup> 依存性の CaM 結合部位であった。

pep 11 に続く配列：

**T<sup>281</sup>STDTIPK**

及び、

pep 9 に続く配列：

**E<sup>198</sup>GVDIIL**

**Table II. CaM binding to peptides of 30kDa domain of 4.1R**

peptide	Condition	$k_a$ ( $M^{-1}\cdot s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_{(D)}$ ( $\mu M$ )
<b>9</b>	<b>EGTA</b>	$6.5 \pm 0.65 \times 10^2$	$2.6 \pm 0.03 \times 10^{-2}$	<b>40.0</b>
	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$2.1 \pm 0.02 \times 10^3$	$7.0 \pm 0.03 \times 10^{-3}$	<b>1.7</b>
<b>9-a</b>	<b>EGTA</b>	No binding	No binding	No binding
	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$9.2 \pm 0.30 \times 10^2$	$1.5 \pm 0.01 \times 10^{-2}$	<b>16.3</b>
<b>9-b</b>	<b>EGTA</b>	$1.1 \pm 0.03 \times 10^3$	$2.6 \pm 0.03 \times 10^{-2}$	<b>23.6</b>
	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$1.2 \pm 0.02 \times 10^3$	$1.3 \pm 0.01 \times 10^{-2}$	<b>10.8</b>
<b>11</b>	<b>EGTA</b>	$5.4 \pm 0.30 \times 10^4$	$2.9 \pm 0.14 \times 10^{-2}$	<b>0.5</b>
	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$4.3 \pm 0.31 \times 10^4$	$2.6 \pm 0.26 \times 10^{-2}$	<b>0.6</b>
<b>11-a</b>	<b>EGTA</b>	$2.7 \pm 0.03 \times 10^3$	$1.9 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	<b>7.0</b>
	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$1.8 \pm 0.05 \times 10^3$	$1.0 \pm 0.03 \times 10^{-2}$	<b>5.6</b>
<b>11-b</b>	<b>EGTA</b>	$4.4 \pm 0.46 \times 10^2$	$1.8 \pm 0.05 \times 10^{-2}$	<b>40.9</b>
	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$1.8 \pm 0.09 \times 10^3$	$2.7 \pm 0.07 \times 10^{-2}$	<b>15.0</b>

$K_{(D)}$  for CaM binding to normal (*wild*) and mutant peptide 11 sequences. Mutation of aromatic residues in this Ca<sup>2+</sup> independent site residues or eliminates CaM affinity. The binding assay was carried out in buffer A and either 0.1mM EGTA (*EGTA*) or 1.1 mM CaCl<sub>2</sub> and 1.0mM EGTA (*Ca<sup>2+</sup>*) as described in Methods section. From the binding curves obtained by resonant mirror detection method,  $k_a$ ,  $k_d$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software pack FAST-Fit™.

**Table III. Importance of aromatic amino acids in peptide 11 for  $Ca^{2+}$  - independent CaM binding**

<b>Mutation</b>	<b>Condition</b>	$k_a$ ( $M^{-1}\cdot s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_{(D)}$ ( $\mu M$ )
<b>11 (wild)</b>	<b>EGTA</b>	$5.4 \pm 0.30 \times 10^4$	$2.9 \pm 0.14 \times 10^{-2}$	<b>0.5</b>
	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$4.3 \pm 0.31 \times 10^4$	$2.6 \pm 0.26 \times 10^{-2}$	<b>0.6</b>
<b>W<sup>268</sup> / A<sup>268</sup></b>	<b>EGTA</b>	$4.2 \pm 0.04 \times 10^2$	$1.6 \pm 0.01 \times 10^{-2}$	<b>38.1</b>
	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$1.4 \pm 0.22 \times 10^3$	$5.8 \pm 0.01 \times 10^{-2}$	<b>41.4</b>
<b>F<sup>277</sup> F / A<sup>277</sup> A</b>	<b>EGTA</b>	$7.2 \pm 0.08 \times 10^2$	$1.5 \pm 0.03 \times 10^{-2}$	<b>20.8</b>
	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$7.2 \pm 0.29 \times 10^2$	$1.4 \pm 0.01 \times 10^{-2}$	<b>19.4</b>
<b>W<sup>268</sup>, F<sup>277</sup> F/ A<sup>268</sup>, A<sup>277</sup> A</b>	<b>EGTA</b>	<b>No binding</b>	<b>No binding</b>	<b>No binding</b>
	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>No binding</b>	<b>No binding</b>	<b>No binding</b>

$K_{(D)}$  for CaM binding to normal (*wild*) and mutant peptide 11 sequences. Mutation of aromatic residues in this  $Ca^{2+}$  independent site residues or eliminates CaM affinity. The binding assay was carried out in buffer A and either 0.1mM EGTA (*EGTA*) or 1.1 mM  $CaCl_2$  and 1.0mM EGTA ( $Ca^{2+}$ ) as described in Methods section. From the binding curves obtained by resonant mirror detection method,  $k_a$ ,  $k_d$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software pack FAST-Fit™.



**Table IV.  $Ca^{2+}$  - dependent binding to CaM requires a critical serine residues**

Mutation	Condition	$k_a$ ( $M^{-1}\cdot s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_{(D)}$ ( $\mu M$ )
9 ( <i>wild</i> )	EGTA	$6.5 \pm 0.65 \times 10^2$	$2.6 \pm 0.03 \times 10^{-2}$	40.0
	$Ca^{2+}$	$4.1 \pm 0.02 \times 10^3$	$7.0 \pm 0.03 \times 10^{-3}$	1.7
S <sup>185</sup> / W <sup>185</sup>	EGTA	$2.7 \pm 0.04 \times 10^3$	$2.3 \pm 0.01 \times 10^{-2}$	8.5
	$Ca^{2+}$	$4.3 \pm 0.07 \times 10^3$	$2.4 \pm 0.01 \times 10^{-2}$	5.6
11 ( <i>wild</i> )	EGTA	$5.4 \pm 0.30 \times 10^4$	$2.9 \pm 0.14 \times 10^{-2}$	0.5
	$Ca^{2+}$	$4.3 \pm 0.31 \times 10^4$	$2.6 \pm 0.26 \times 10^{-2}$	0.6
W <sup>268</sup> K/A <sup>268</sup> L	EGTA	$5.6 \pm 0.04 \times 10^2$	$1.2 \pm 0.03 \times 10^{-2}$	21.4
	$Ca^{2+}$	$1.3 \pm 0.14 \times 10^4$	$1.4 \pm 0.03 \times 10^{-2}$	1.1
W <sup>268</sup> /S <sup>268</sup>	EGTA	$8.2 \pm 0.04 \times 10^3$	$5.5 \pm 0.03 \times 10^{-2}$	20.8
	$Ca^{2+}$	$2.9 \pm 0.07 \times 10^3$	$8.2 \pm 0.04 \times 10^{-3}$	19.4
K <sup>269</sup> / L <sup>269</sup>	EGTA	$1.1 \pm 0.03 \times 10^3$	$3.3 \pm 0.03 \times 10^{-2}$	33.0
	$Ca^{2+}$	$3.0 \pm 0.05 \times 10^2$	$1.0 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	33.3

$K_{(D)}$  for CaM binding to normal (*wild*) and mutant peptide 11 sequences. Mutation of aromatic residues in this  $Ca^{2+}$  independent site residues or eliminates CaM affinity. The binding assay was carried out in buffer A and either 0.1mM EGTA (*EGTA*) or 1.1 mM  $CaCl_2$  and 1.0mM EGTA ( $Ca^{2+}$ ) as described in Methods section. From the binding curves obtained by resonant mirror detection method,  $k_a$ ,  $k_d$ , and  $K_{(D)}$  were determined using the software pack FAST-Fit™.

Table V. Affinity of peptide 11 / CaM complex for peptide 9

peptide	Condition	$k_a$ ( $M^{-1}\cdot s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_{(D)}$ ( $\mu M$ )
9	EGTA	$8.4 \pm 0.33 \times 10^3$	$4.7 \pm 0.04 \times 10^{-2}$	5.6
	$Ca^{2+}$	$5.1 \pm 0.31 \times 10^3$	$1.7 \pm 0.16 \times 10^{-3}$	0.3
9-a	EGTA	$3.2 \pm 0.46 \times 10^3$	$7.7 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	24.1
	$Ca^{2+}$	$5.9 \pm 0.10 \times 10^3$	$3.5 \pm 0.16 \times 10^{-2}$	5.9
9-b	EGTA	$3.8 \pm 0.35 \times 10^4$	$6.0 \pm 0.10 \times 10^{-2}$	1.6
	$Ca^{2+}$	$9.0 \pm 0.17 \times 10^3$	$1.3 \pm 0.03 \times 10^{-2}$	1.4

CaM and peptide 11 at a molar ratio of 1:10 were mixed in buffer A and incubated at room temperature for 1hr. Unbound peptide 11 was separated by Sephadex G-25 column chromatography. The binding assay was carried out in buffer A and either 0.1mM EGTA (EGTA) or 1.1 mM  $CaCl_2$  and 1.0mM EGTA ( $Ca^{2+}$ ) as described in Methods section. From the binding curves obtained by resonant mirror detection method,  $k_a$ ,  $k_d$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software pack FAST-Fit™.

には、CaMはCa<sup>2+</sup>の存在に関わらず結合しなかった。

また、カルシウムポンプ由来のCa<sup>2+</sup>依存性CaM結合ペプチド：

**LRRQPSIASQHHDVTNISTPTHI**

或いは、

**KKAVKVPKKEKSVLQKLTRLAVQI**

をキュベットに固相化してCaMとの結合を測定した結果、Ca<sup>2+</sup>依存性の結合をし、平衡解離定数は10<sup>-8</sup>Mであった。この結果は、既報の結果と矛盾しなかった。

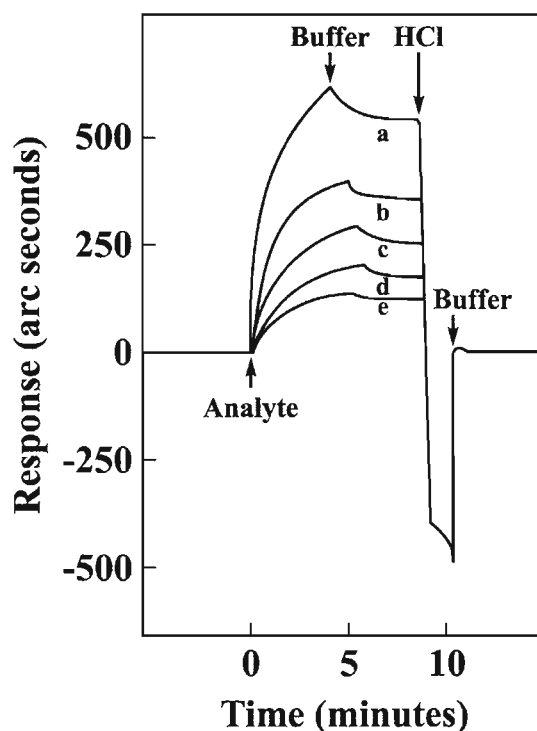
pep 11とpep 9アミノ酸残基と配列を比較すると、N側から4残基、AKKL配列は両方のペプチドで共通しており、次のセリン残基とトリプトファン残基が異なっていることから、pep 9におけるセリン(S<sup>185</sup>)をトリプトファン(W<sup>185</sup>)に置換した変異ペプチド：

**A<sup>181</sup>KKLW MYGVDLHKAKD**

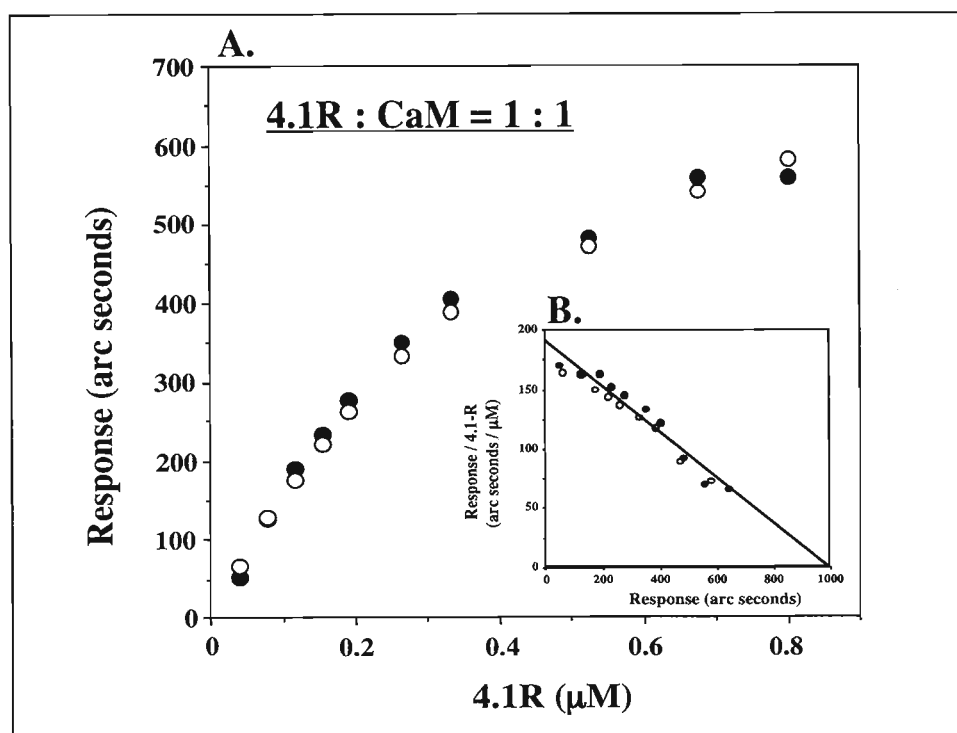
とCaMの結合を解析した(Table III)。その結果、トリプトファン(W<sup>185</sup>)に置換ペプチド9は、CaMとCa<sup>2+</sup>非依存性の結合をした。一方、pep 11の置換した変異ペプチド：

**A<sup>264</sup>KKLSLVCVEHHTFFRL**

は、CaMとCa<sup>2+</sup>依存性の結合をした(Table III)。しかし、Table 4に示したように、W<sup>268</sup>/S<sup>268</sup>の単独置換ではCaMとCa<sup>2+</sup>非依存性の結合をし、

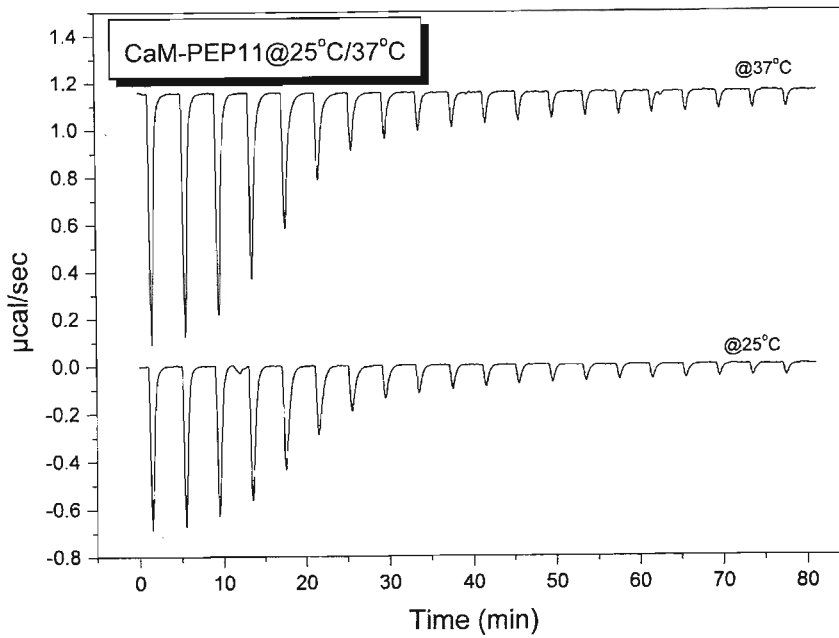


**Fig. 6. Tracing from the IAsys™ system to quantitate interaction between 4.1R and CaM.** 4.1R interaction with CaM was examined with the IAsys™ system (Thermo Labsystems Affinity Sensors, Cambridge, UK), resonant mirror detection (RMD). RMD relies on kinetic analysis of molecular interactions in a cuvette in which binding of a protein in solution (*analyte*) to a protein immobilized on the cuvette surface (*ligand*) is monitored by differential resonant mirror diffraction of a laser beam. Various concentrations of 4.1R (*a*, 1.6  $\mu\text{M}$ ; *b*, 1.2  $\mu\text{M}$ ; *c*, 0.8  $\mu\text{M}$ ; *d*, 0.6  $\mu\text{M}$ ; *e*, 0.4  $\mu\text{M}$ ) as *analytes* were added to the CaM immobilized cuvette. Signal response to binding was expressed as *arc seconds*. Dissociation rate constants may be derived based on signal loss as a function of time immediately following replacement of the binding buffer containing analyte-free solution (*Buffer*). The bound *analyte* was completely dissociated from the cuvette by 20mM HCl (*HCl*). The analyte-free binding buffer regenerated the cuvette. This method makes possible measurement of the association rate constant ( $k_a$ ), and dissociation rate constant ( $k_d$ ), from which the equilibrium dissociation constant  $K_{(D)}$  is determined from  $K_{(D)} = k_d / k_a$ . Changes in  $k_a$  and  $k_d$  provide indirect evidence for changes in conformation and/or distribution of surface charge within a molecule and a complex, respectively. Parameters for binding analysis by RMD were estimated with the software package, FASTfit™. The principle, mathematical analysis method and immobilization of ligand to the cuvette are described in previous paper [Nunomura, W. (2001) *Res. Adv. Biol. Chem.* **1**, 25-49, Nunomura, W. et al. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 6360-6367.].

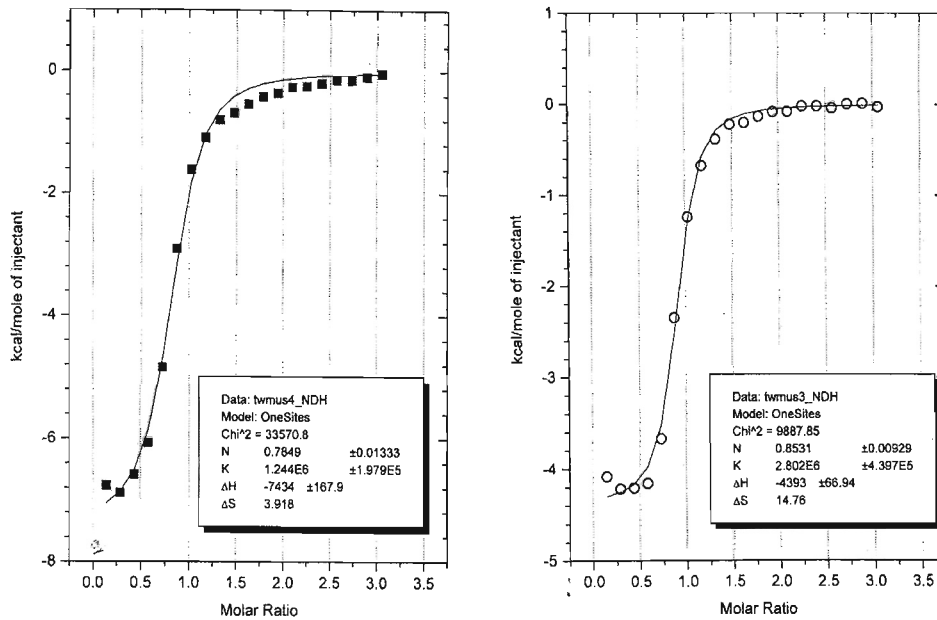


**Fig.7. Scatchard plot analysis of 4.1R binding to CaM using the IAsys system.**  
 A. Concentration dependence of 4.1R binding to CaM. Increasing concentrations of purified 4.1R (up to 0.8  $\mu\text{M}$ ) were incubated with an aminosilane cuvette on which CaM has been immobilized, either in the presence ( $\bullet$ ) or absence ( $\circ$ ) of  $\text{Ca}^{2+}$ . The amounts of 4.1R/CaM complex formed under equilibrium conditions are represented by the "Response" expressed in arc seconds. B. Scatchard plot analysis of the data shown in panel A. Maximal binding ( $B_{\text{max}}$ ) of 4.1R to CaM immobilized cuvette was 970 arc seconds, both in the presence and absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . The amount of immobilized CaM on the aminosilane cuvette accounted for 200 arc seconds by it. The apparent molar ratio of 4.1R (M.W. = 80 kDa) binding to CaM (M.W. = 18.5 kDa) was 1:1, both in the presence and absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . In this figure, 4.1R<sup>80</sup> is presented as "4.1R".

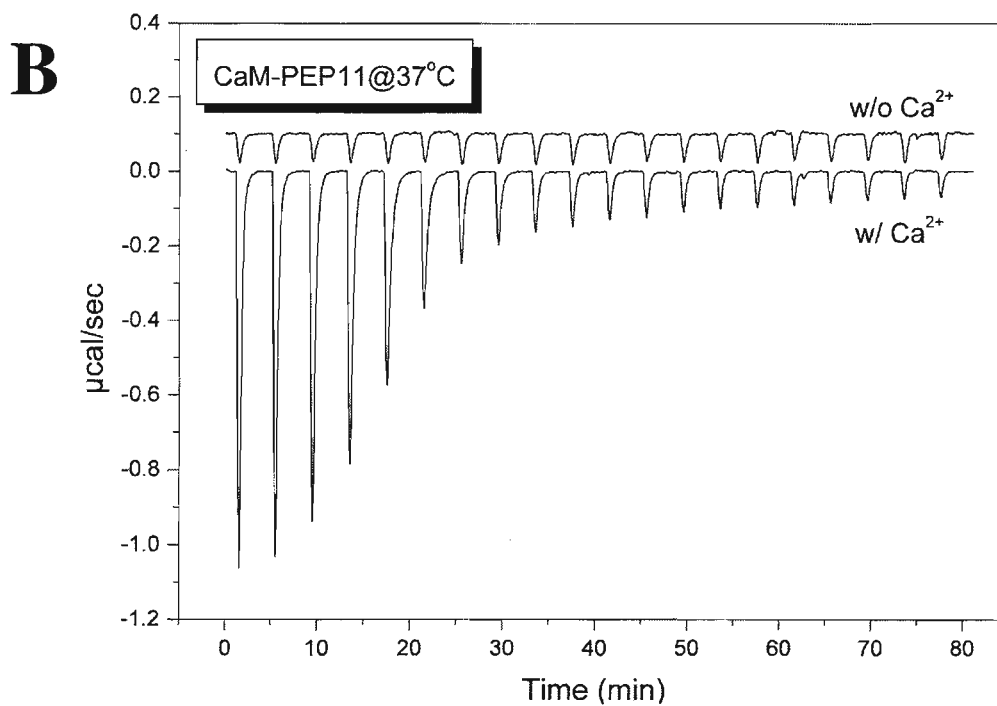
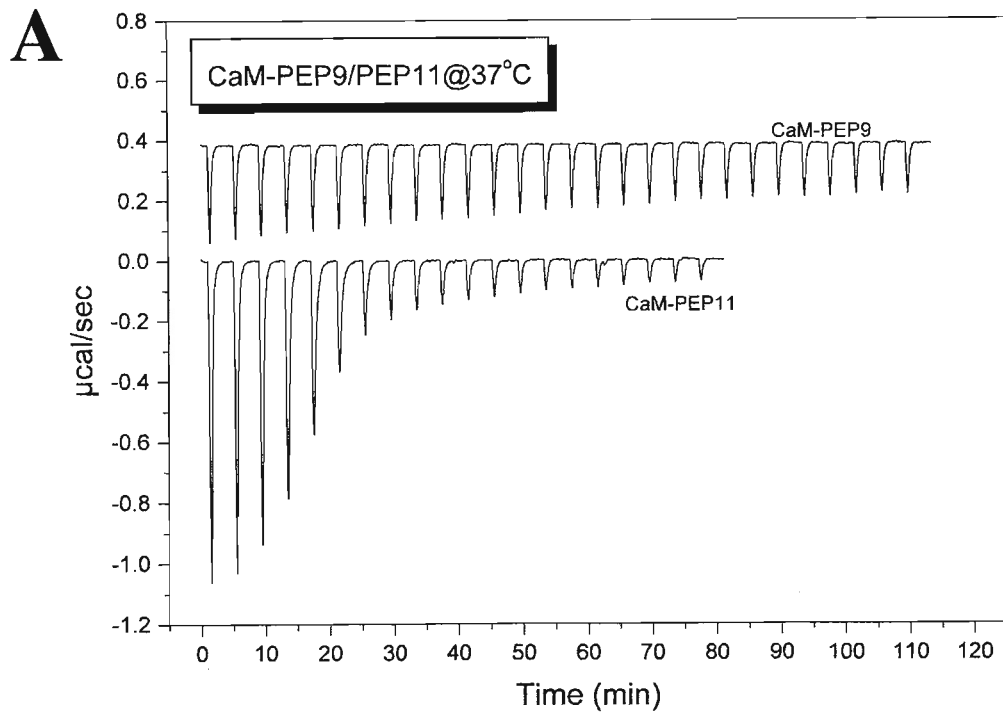
**A.**



**B.**



**Fig.8 Temperature dependent CaM binding to pep11 in the presence of Ca<sup>2+</sup>.** *A.* shows raw data and *B* shows binding fit by using software. The parameters are calculated as following; *37C*(left panel):  $N = 0.7849$ ;  $\Delta H = -31.07$  KJ/mol;  $\Delta S = 0.0164$  KJ/mol·K;  $\Delta G = -36.16$  KJ/mol;  $K_{(D)} = 8.0 \times 10^{-8}$ M; *25C*(right panel)  $N = 0.8531$ ;  $\Delta H = -18.36$  KJ/mol;  $\Delta S = 0.0617$  KJ/mol·K;  $\Delta G = -36.74$  KJ/mol;  $K_{(D)} = 3.6 \times 10^{-7}$ M



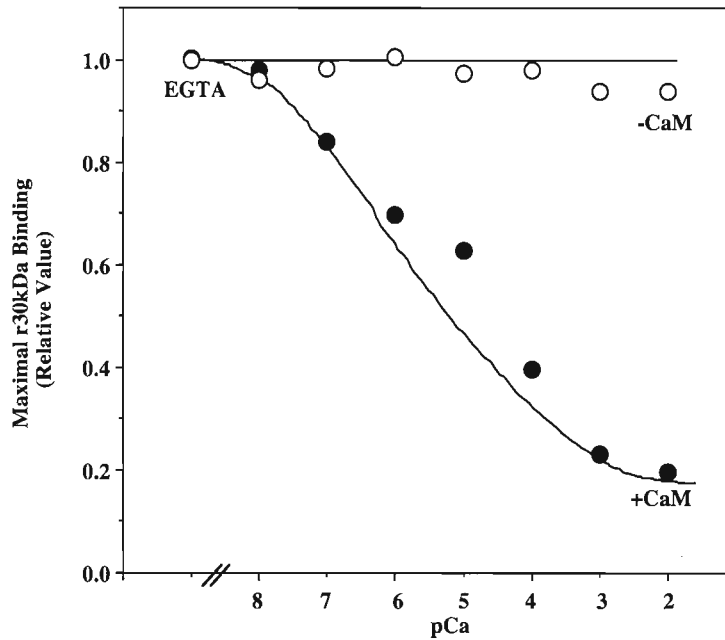
**Fig.9 Calorimetric binding analysis of CaM binding peptides to CaM.** A, pep 9 and pep11 titration into CaM in the presence of Ca<sup>2+</sup>; B, pep 11 titration into CaM in the presence (w/Ca<sup>2+</sup>) and absence of Ca<sup>2+</sup> (w/o Ca<sup>2+</sup>). Concentration of CaM and peptides were 23 μM and 471 μM, respectively.

隣のリジン残基 (K<sup>269</sup>) をロイシンに同時に置換する (S<sup>268</sup>L) ことによって Ca<sup>2+</sup> 依存性の CaM 結合をしたことから、pep 11 における K 残基のクラスター (KKLWK) 配列は CaM の結合に関与していることが示唆された。合成ペプチドで得られた結果を検証するために、セリン (S<sup>185</sup>) をアラニン (A<sup>185</sup>) に置換した変異組換え 30kDa domain を作製し、CaM との結合を解析した結果、Ca<sup>2+</sup> 非依存性の結合をした。また、Table IV に示した pep 11 における芳香族アミノ酸の置換実験 (W<sup>268</sup>/A<sup>268</sup>, F<sup>277</sup>F/A<sup>277</sup>A) は、それぞれで結合速度定数が低下したが、解離速度定数は殆ど変化しないことにより平衡解離定数の増加が観察された。また、W<sup>268</sup>, F<sup>277</sup>F/A<sup>268</sup>, A<sup>277</sup>A で示したように 3 つの芳香族アミノ酸をアラニンに置換すると CaM は結合しなかった。この事実は、W<sup>268</sup>, F<sup>277</sup>F/A<sup>268</sup>, A<sup>277</sup>A に置換した組換え 30kDa domain は、CaM との結合しなかつたことと矛盾しなかつた。

pep11 と CaM の複合体 (量比は 5 : 1 ~ 10 : 1) は、pep 9 に対して、Ca<sup>2+</sup> 依存性を維持しながら、結合速度定数の増加と解離速度定数の低下により平衡解離定数の低下 (親和性の増加) が観察された (Table V)。

次に、pep 9 及び pep 11 の Ca<sup>2+</sup> 存在下での CaM 結合における熱力学的変化を測定した (Fig.8)。37℃ 及び 25℃ における熱力学的パラメーターを、IAsys™ での結果をもとに *one site model* で fit した。結合に伴う熱力学的変化の結果は、IAsys™ で求めた平衡解離定数とよく合致していた。しかし、Ca<sup>2+</sup> 非存在下では、pep11 と CaM の反応熱は観察されなかつた。この結果は、CaM の構造変化が pep 11 との結合に関与していること、つまり、Ca<sup>2+</sup> 非存在下ではエントロピックな結合反応であることに対して、Ca<sup>2+</sup> 存在下ではエンタルピックな結合反応であることが示された。一方、pep 9 と CaM の反応系では、熱量の変化が観察されなかつたことから、エントロピックな結合反応であることが示唆された (Fig.9)。





**Fig. 10.  $\text{Ca}^{2+}$  concentration dependence of protein 4.1 binding to cytoplasmic domain of Band 3.** 30kDa domain of  $4.1\text{R}^{80}$  binding to cytoplasmic domain of Band 3 was measured at various concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  either in the presence of  $5\ \mu\text{M}$  CaM (represented as +CaM) or in the absence of CaM (represented as -CaM).  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations were maintained by  $\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA}$  buffer system. The maximal extent of binding under different experimental conditions was quantitated as described under "Experimental Procedures". Maximal binding in the presence of EGTA was used to normalize the extent of binding under different experimental conditions.  $p\text{Ca}$  represents ionized  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. The extent of r30kDa binding to cytoplasmic domain of Band 3 is plotted as a function of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. r30kDa represents recombinant 30kDa domain of  $4.1\text{R}^{80}$ .

**Table VI.  $Ca^{2+}/CaM$  down regulation of 30kDa-Band 3 interaction**

<b>Mutation</b>	<b>CaM</b>	<b>Condition</b>	$k_a$ ( $M^{-1}\cdot s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_{(D)}$ ( $\mu M$ )
<b>wild</b>	-	<b>EGTA</b>	$2.0 \pm 0.27 \times 10^4$	$4.1 \pm 0.13 \times 10^{-3}$	<b>0.2</b>
		<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$8.5 \pm 0.07 \times 10^3$	$8.6 \pm 0.06 \times 10^{-4}$	<b>0.1</b>
<b>+</b>	<b>+</b>	<b>EGTA</b>	$4.4 \pm 0.17 \times 10^4$	$8.1 \pm 0.13 \times 10^{-3}$	<b>0.2</b>
		<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$3.4 \pm 0.01 \times 10^3$	$6.7 \pm 0.50 \times 10^{-3}$	<b>2.0</b>
<b><math>\Delta</math> Exon 11</b>	-	<b>EGTA</b>	$6.3 \pm 0.01 \times 10^3$	$6.2 \pm 0.01 \times 10^{-4}$	<b>0.1</b>
		<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$1.7 \pm 0.9 \times 10^4$	$3.6 \pm 0.08 \times 10^{-3}$	<b>0.2</b>
<b>+</b>	<b>+</b>	<b>EGTA</b>	$6.2 \pm 0.46 \times 10^3$	$7.5 \pm 0.18 \times 10^{-4}$	<b>0.1</b>
		<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$3.0 \pm 0.30 \times 10^4$	$8.5 \pm 0.29 \times 10^{-3}$	<b>0.3</b>
<b><math>\Delta</math>Exons 9 and 11</b>	-	<b>EGTA</b>	$9.7 \pm 0.21 \times 10^4$	$1.1 \pm 0.06 \times 10^{-2}$	<b>0.1</b>
		<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$1.1 \pm 0.02 \times 10^5$	$3.5 \pm 0.06 \times 10^{-2}$	<b>0.3</b>
<b>+</b>	<b>+</b>	<b>EGTA</b>	$1.0 \pm 0.09 \times 10^5$	$1.4 \pm 0.02 \times 10^{-2}$	<b>0.1</b>
		<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$7.0 \pm 0.17 \times 10^4$	$7.4 \pm 0.32 \times 10^{-3}$	<b>0.1</b>

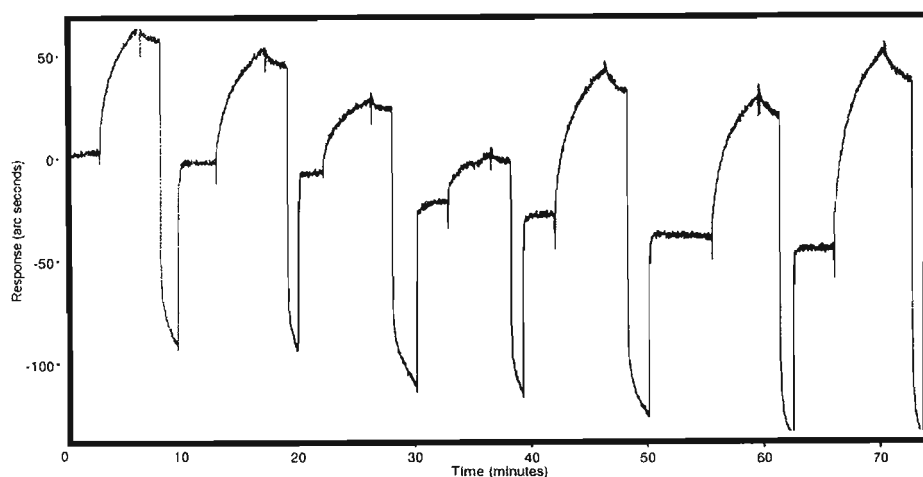
$K_{(D)}$  for interaction between cytoplasmic domain of Band 3 and full length 30kDa (*wild*), Exon 11 deleted 30kDa domain Exons 9 and 11 deleted 30kDa, in the presence and absence of  $Ca^{2+}$  and CaM are shown. Increasing concentration of 30kDa (50nM~100nM) were preincubated with CaM (5 $\mu$ M) and either 0.1mM EGTA (*EGTA*) or 1.1 mM  $CaCl_2$  and 1.0mM EGTA ( $Ca^{2+}$ ) as described in Methods section. From the binding curves obtained by resonant mirror detection method,  $k_a$ ,  $k_d$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software pack FAST-Fit™.

## 2. CaM による 4.1R<sup>80</sup> の Band 3 結合抑制効果

組換え 30kDa domain は、Band 3 の細胞内 domain と平衡解離定数  $0.18\mu\text{M}$  ( $1.8 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) で結合した。CaM と組換え 30kDa domain の複合体（モル比 5 : 1 以上）は  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下では、Band 3 の細胞内 domain と平衡解離定数  $0.18\mu\text{M}$  ( $1.8 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) で結合したが、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下では、Band 3 の細胞内 domain と平衡解離定数  $2.0\mu\text{M}$  ( $2.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) で結合した。この変化は、結合速度定数の低下により平衡解離定数の増加（親和性の低下）が起きたことから、組換え 30kDa domain は、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  結合することにより、立体構造或いは表面荷電の変化にともなって、Band 3 の細胞内 domain と結合し難くなったと考察される。一方、セリン ( $\text{S}^{185}$ ) をアラニン ( $\text{A}^{185}$ ) に置換した組換え 30kDa domain は、Band 3 の細胞内 domain と平衡解離定数  $2\mu\text{M}$  ( $2.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) で結合したが、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  による Band 3 の細胞内 domain と結合は変化しなかった。さらに、Exon 9 及び Exon11 を欠失させた組換え 30kDa domain も、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  による Band 3 の細胞内 domain と結合は変化しなかった (Table VI)。最大結合量が  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下 (100% の結合量とする) での半分の結合量になる  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は大凡  $10^{-7} \text{ M}$  であり、細胞内での  $\text{Ca}^{2+}$  濃度と一致していた (Fig.10)。

### 3. 4.1R<sup>80</sup> 内部結合の CaM による抑制作用

FERM ファミリー蛋白質では、その FERM domain は内部相互作用（同じ分子内で結合）ことが報告されている。4.1R<sup>80</sup> の各 domain が相互に結合することについて IAsys™ を用いて検討した。



**Fig. 11 Binding profile of 4.1R<sup>80</sup> to 4.1R<sup>80</sup> immobilized cuvette.** Various concentration of 4.1R<sup>80</sup> put into the 4.1R<sup>80</sup> immobilized cuvette. The binding curves are traced. The binding parameters were  $k_a=1.6 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_d=2.1 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ , and  $K_{(D)}=1.31 \times 10^{-7} \text{M}$ .

Fig.11 に示したように、4.1R<sup>80</sup> を固相化したキューベットに 4.1R<sup>80</sup> を添加すると、明らかに濃度依存的に結合した。Table VII に示したように 4.1R<sup>80</sup> の 4.1R<sup>80</sup> にたいする平衡解離定数は 131nM ( $1.31 \times 10^{-7} \text{M}$ ) で結合した。また、4.1R<sup>80</sup> の各 domain を固相化したキューベットに 4.1R<sup>80</sup> を添加すると、30kDa domain と CTD (C-terminal domain, 22/24kDa domain) にそれぞれ  $\sim 10^{-7} \text{M}$  で結合した。Table VIII に示したように、30kDa domain と CTD が直接結合すると考えられ、その平衡解離定数は  $\sim 200 \text{nM}$  ( $2.91 \times 10^{-7} \text{M}$ ) であった。

CTD の 30kDa domain における結合部位を探索するために、Exon20, 21 がコードするポリペプチドを固相化したキューベットに 4.1R<sup>80</sup> を添加すると Fig.12 に示したように濃度依存的に結合し、その平衡解離定数は  $\sim 200 \text{nM}$

*Table VII. 4.1R<sup>80</sup> binding to 4.1R<sup>80</sup>*

Analyte	Ligand	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{(D)}$ (nM)
4.1R <sup>80</sup>	4.1R <sup>80</sup>	1.6 ± 0.17 x10 <sup>5</sup>	2.1 ± 0.40 x10 <sup>-2</sup>	131
	30kDa	1.0 ± 0.10 x10 <sup>4</sup>	3.2 ± 0.40 x10 <sup>-3</sup>	320
	16kDa*	No binding	No binding	No binding
	10kDa	No binding	No binding	No binding
	CTD	2.6 ± 0.20 x10 <sup>4</sup>	4.4 ± 0.07 x10 <sup>-3</sup>	169
	GST	No binding	No binding	No binding

The binding assay was carried out in PBS. From the binding curves obtained by RMD,  $k_d$ ,  $k_a$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.

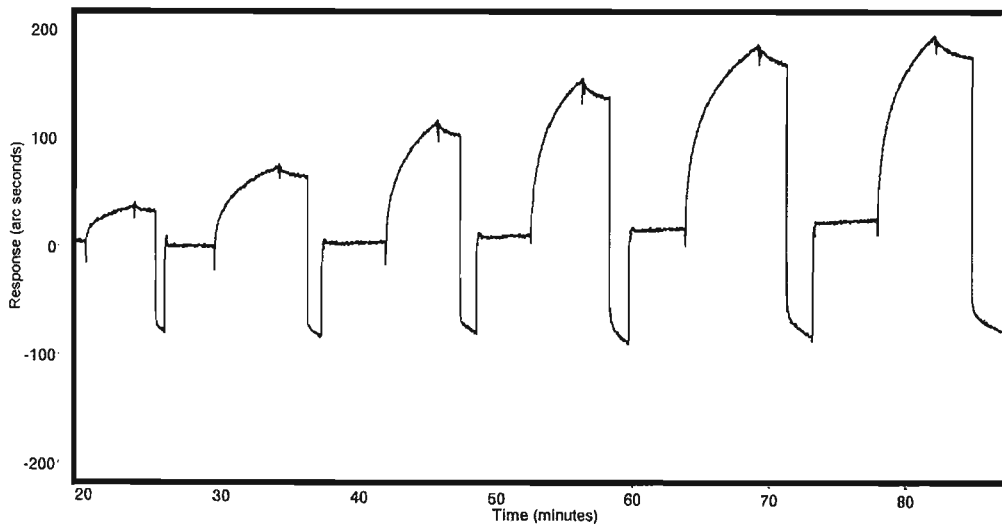
(2.8 x10<sup>-7</sup>M) であった。この値は、30kDa domain と CTD および 4.1R<sup>80</sup> と CTD の結合における平衡解離定数とよく一致していた。その結果、4.1R<sup>80</sup> の 30kDa domain は、Exon 20,21 がコードする領域と結合すること示された。

30kDa domain をコードする各 Exon を欠失させた組換え蛋白質を用い

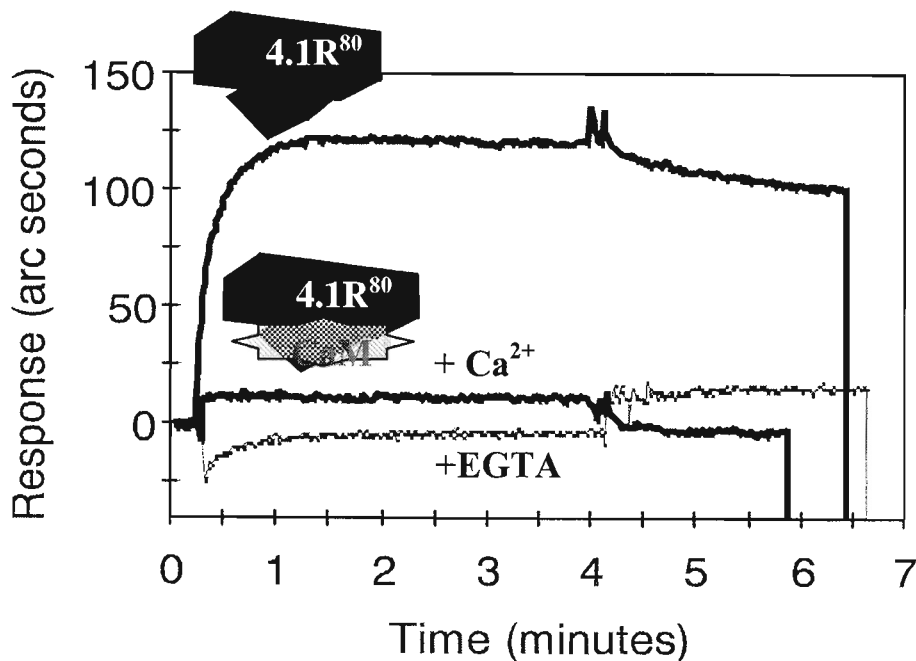
*TableVIII. 30kDa domain binding to CTD*

Analyte	Ligand	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{(D)}$ (nM)
30kDa	4.1R <sup>80</sup>	5.6 ± 0.50 x10 <sup>4</sup>	1.5 ± 0.05 x10 <sup>-2</sup>	280
	30kDa	No binding	No binding	No binding
	16kDa*	No binding	No binding	No binding
	10kDa	No binding	No binding	No binding
	CTD	8.2 ± 0.20 x10 <sup>4</sup>	1.8 ± 0.01 x10 <sup>-2</sup>	219
	GST	No binding	No binding	No binding

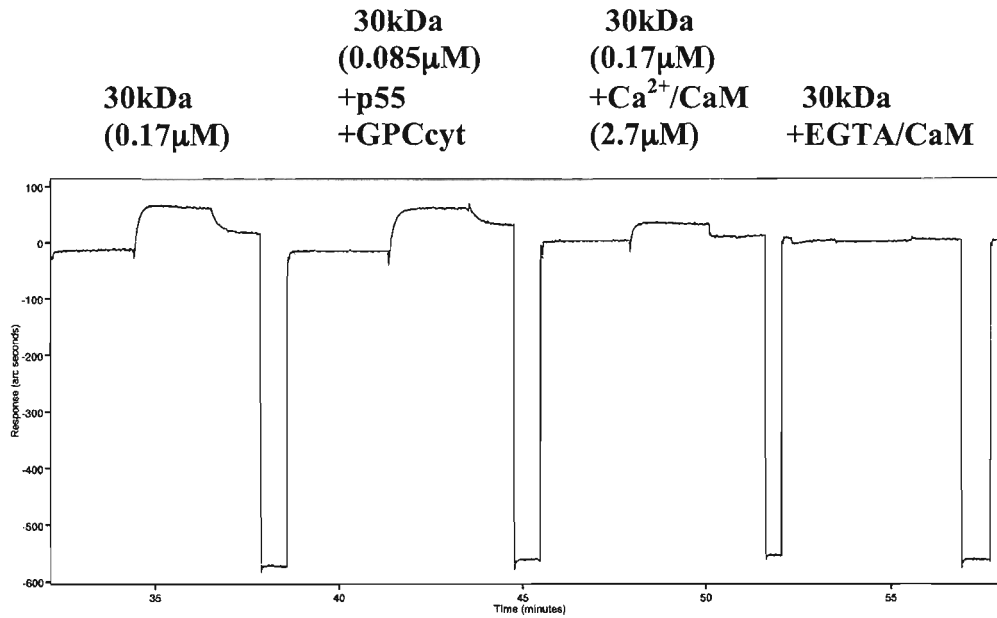
The binding assay was carried out in PBS. From the binding curves obtained by RMD,  $k_d$ ,  $k_a$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.



**Fig.12 Binding profile of 4.1R<sup>80</sup> to Exon 20 and 21 encoded polypeptide of 4.1R<sup>80</sup> immobilized cuvette.** Various concentration of 4.1R<sup>80</sup> put into the Exon 20 and 21 encoded polypeptide of 4.1R<sup>80</sup> immobilized cuvette. The binding parameters were  $k_a=2.4 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ,  $k_d=7.0 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ , and  $K_{(D)}=2.91 \times 10^{-7} \text{M}$ .



**Fig. 13 CaM inhibited 4.1R<sup>80</sup> binding to 4.1R<sup>80</sup> in Ca<sup>2+</sup>-independent manner.** CaM completely inhibited 4.1R<sup>80</sup> binding to 4.1R<sup>80</sup> with CaM in the presence and absence of Ca<sup>2+</sup>.



**Fig. 14 CaM inhibited 30kDa domain of 4.1R<sup>80</sup> binding to CTD of 4.1R<sup>80</sup> in Ca<sup>2+</sup>-independent manner.** 30kDa domain of 4.1R<sup>80</sup> with or without CaM in the presence and absence of Ca<sup>2+</sup>-. CaM completely inhibited 30kDa binding to CTD with CaM in the absence of Ca<sup>2+</sup>. The complex of 30kDa and cytoplasmic domain of GPC and p55 did not inhibit 30kDa - CTD interaction.

た結合解析により、Exon11 がコードする領域が Exon 20,21 がコードする領域と結合することが示された(data not shown)。30kDa domain に過剰の CaM を Ca<sup>2+</sup> 存在下及び非存在下で結合させ、Exon 20,21 がコードする領域と結合反応を解析した結果、Ca<sup>2+</sup> 非存在下および存在下で CaM と 30kDa domain の複合体は結合しなかった (Fig.13) 。また、GPC、p55 と 30kDa domain の複合体は、CTD との結合を阻害しなかった (Fig.14) 。GPC、p55 及び CaM は、CTD との結合しなかった (data not shown) 。これらの結果は、4.1R<sup>80</sup> が、CaM と Ca<sup>2+</sup> 非存在下で結合する生理学的な意義として、4.1R<sup>80</sup> の内部結合或いは多量体結合による巨大分子化を抑制するためと考えられる。多量体結合には、互に逆方向で結合する (*anti parallel*) 2 量体型か、多量体結合するのかは不明である (Fig.15) 。現在、解析超遠心機を用いた分子量解析及び Yeast Two Hybrid System により、更に検討中である。

[まとめ]

1) 4.1R<sup>80</sup>とCaMの結合は、Ca<sup>2+</sup>依存性の



とCa<sup>2+</sup>非依存性の



の2箇所では結合し、185番目のセリン残基(S<sup>185</sup>)がCa<sup>2+</sup>依存性の結合に、pep 11配列の芳香族アミノ酸が結合に重要な役割をしている事が明らかになった。

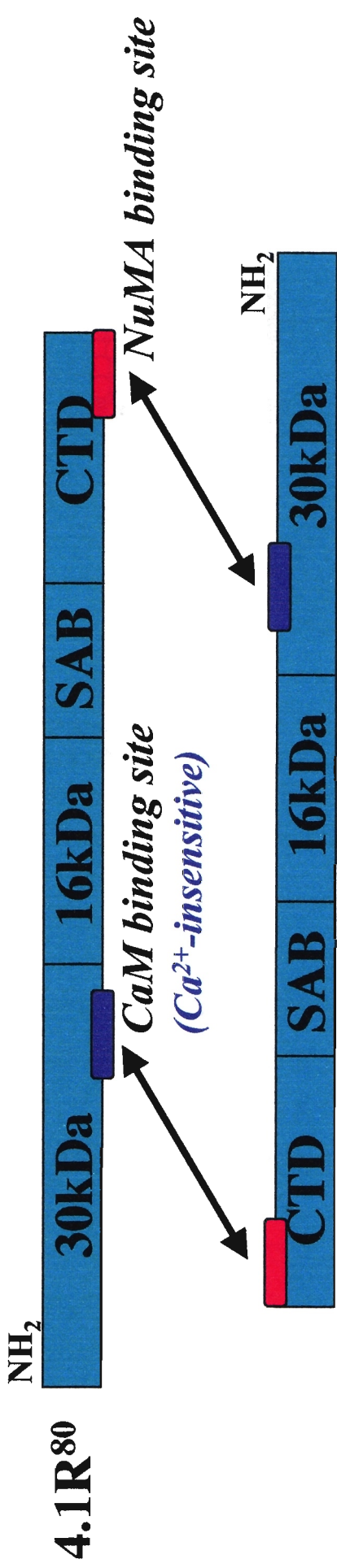
2) Ca<sup>2+</sup>存在下でCaMとpep 9はエントロピック、pep 11はエンタルピックな結合をした。

3) 4.1R<sup>80</sup>とCaMの複合体はCa<sup>2+</sup>依存性に膜貫通蛋白質の一つ、Band 3の細胞内domainとの結合が弱められた。

4) 4.1R<sup>80</sup>がCaMと複合体はCa<sup>2+</sup>非依存性に結合する理由として、内部結合あるいは4.1R<sup>80</sup>同士の結合による巨大複合体化を抑止する意義があると推察された。



**A. Anti parallel model (Dimer form)**



**B. Chain model (Polymer form)**

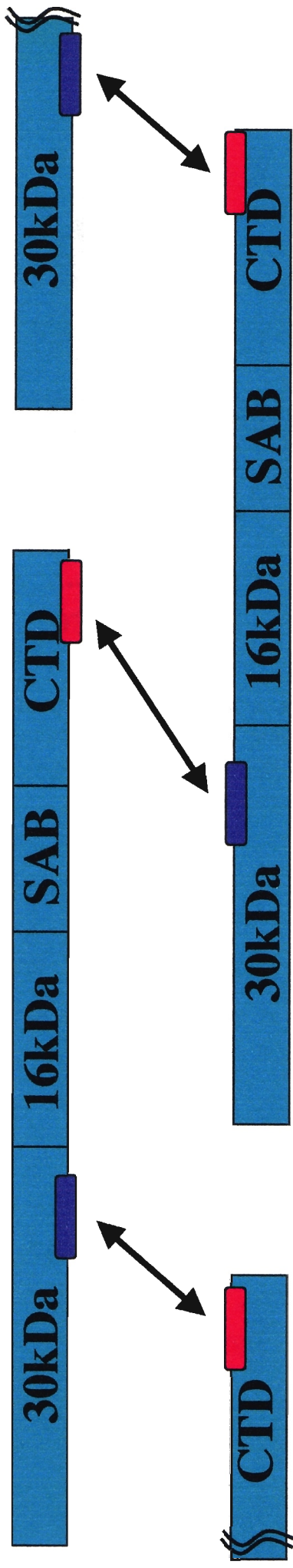
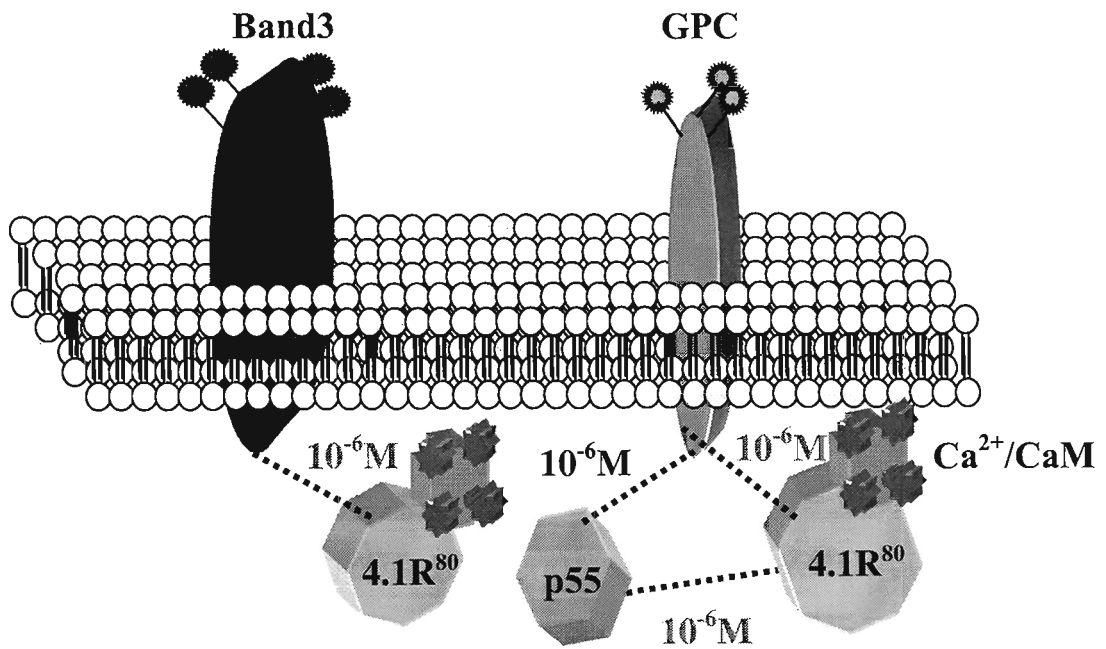


Fig.15 Proposed model of 4.1R<sup>80</sup>-4.1R<sup>80</sup> internal interaction. NuMA binding site was described in *J. Biol. Chem.* 277(46): 443399-44346 (2002).



**Fig.16 Proposed model of Ca<sup>2+</sup> regulation 4.1R<sup>80</sup> binding to membrane proteins through CaM interaction.** Dissociation constants of p55 binding to GPC was described in this chapter § 2 “PDZ proteins binding to membrane regulated by 4.1R<sup>80</sup>”.

[ 今後 ]

4.1R<sup>80</sup>に S<sup>268</sup>M の変異を導入した場合、4.1R<sup>80</sup>は、完全に CaM と Ca<sup>2+</sup> 依存性の結合に変化するかを確認する。この変異導入 4.1R<sup>80</sup>を 4.1R<sup>80</sup> 欠損赤血球に封入し、その膜安定性を Ca<sup>2+</sup> 存在下と非存在下で測定すると、野生型 4.1R<sup>80</sup>に比べてより強く変化すると期待される。

## 第2項 4.1R<sup>80</sup> による PDZ 蛋白質の膜結合制御。

### [ 目的 ]

赤血球 PDZ (PSD95、ZO 1、Dlg の略号であり、共通したアミノ酸配列及び構造の PDZ domain を 1~3 個有する。PDZ domain は、膜貫通蛋白質の C 末端の特異的配列 T/S-X-X-V 或いは他の PDZ domain と結合する。また、分子内に SH3 及び膜結合性グアニレートカイネース (MAGUK) 相同領域を C 末端に有する) である p55 および GPC (膜一回貫通型糖蛋白質) は、41R<sup>80</sup> と結合することが知られている。本研究では、

1) 41R<sup>80</sup>/p55/GPC 三者複合体形成にかかわる p55 と 41R<sup>80</sup> の役割

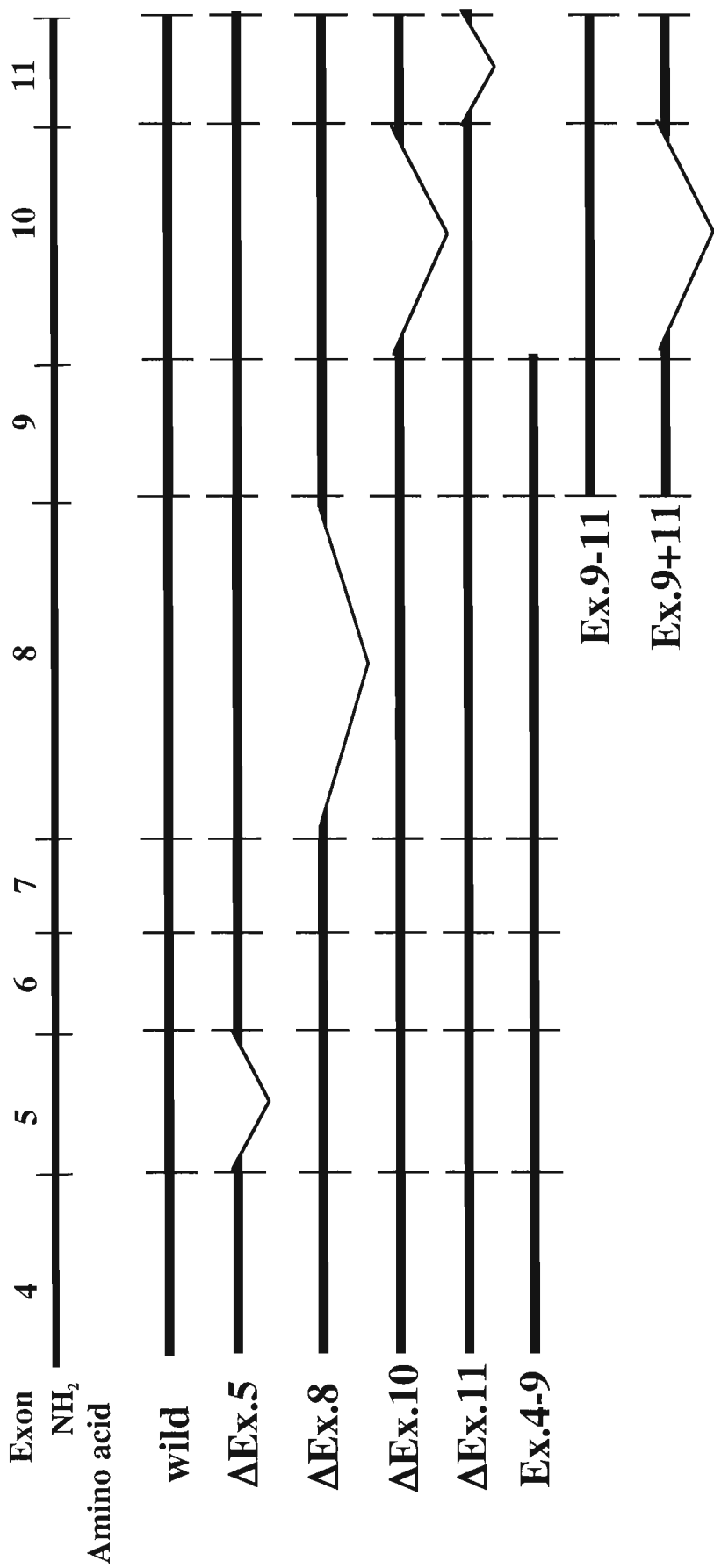
1) p55 の機能的結合様式

を解明することを目的とした。

### [ 材料と方法 ]

#### 1. 組換え蛋白質の作製

cDNA (4.1R) から、30kDa domain (アミノ酸番号 1~298、Exon 4~12 コード領域)を *EcoRI* 及び *Sall* 制限酵素切断部位を付加した特異的プライマーによる PCR で増幅し、pGEX-4T2 ベクター (Amersham Bioscience) に組換えた。各 Exon の欠失及び Exon 単位でのポリペプチド(Fig.17)は、特異的プライマーによる PCR で増幅して pGEX-4T2 ベクターに組換えた。また、赤芽球由来 cDNA から特異的プライマーにより増幅した GPC 細胞質内 domain (GPCcyt) は pGEX-4T2 ベクターに、p55 は pET31 (Novagen)に組換えた。PCR 産物は塩基配列を確認後、大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3)を形質転換した。LB 培地にて大腸菌を 37℃一定条件下で震盪培養し、波長 600nm での吸光度 (以下では OD600 若しくは A600 等で表示) の値が 0.4~0.8 に達した時に、IPTG を最終濃度 (1mM) 添加し、さら



**Fig.17 Structure of the 30kDa domain of 4.1R encoded by exons 4-11 and the various mutant constructs.**  
 In some mutant constructs, sequences encoded by specific exons were deleted, while in others, sequences encoded by a single exon or a combination of were included.

に 37°C 一定条件下で 3 時間震盪培養した。pGEX-4T2 ベクターで形質転換した大腸菌は、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4°C、8 分間)沈澱後、1mM EDTA、1mM DFP、1mM 2ME を添加した B-PER™ (PIERCE、USA) に懸濁し溶菌した。溶菌液は氷上 10 分間の超音波処理後、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間) の上清を得た。上清は、Glutathione-Sepharose (Amersham Bioscience) と懸濁し、GST 融合蛋白質或いは His tag 蛋白質 (p55) を分離した。GST 融合蛋白質はトロンビン処理により標的蛋白質 (30kDa domain) と GST を切断した後、GST を Glutathione-Sepharose にて吸収し、30kDa domain を Q-Sepharose (Amersham Bioscience) で更に精製した。pET31b ベクターで形質転換した大腸菌は、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4°C、8 分間)沈澱後、1mM DFP、を添加した 6M 尿素に懸濁し溶菌した。溶菌液は氷上 10 分間の超音波処理後、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間) の上清を得た。上清は、Ni<sup>+</sup>カップリングゲルと懸濁し、Histagp55 を分離した。精製した蛋白質の純度は SDS-PAGE にて検定した。蛋白質量は UV 法を用いた (280nm と 260nm を測定し、蛋白質濃度 (mg/ml) = 1.45 A<sub>280</sub> - 0.74 A<sub>260</sub>) 。

核移行蛋白質 Importin  $\alpha$  の精製は、Gascard, P., Nunomura W., et al. *Mol. Biol. Cell* **10** (6): 1783-1798 (1999) 及びマラリア由来赤血球蛋白質 Mature parasite-infected Erythrocyte Surface Antigen (MESA) の精製及び p55 との競合解析の方法は、Waller, K.L., Nunomura, W. et al. *Blood* **102**, 1911-1914 (2003) に詳述した。

## 2. CaM の精製

CaM は、正常牛脳からトリクロロ酢酸沈澱、等電点沈澱、Phenyl Sepharose CL6B (Amersham Bioscience) を用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した (Gopalakrishna, R., and Anderson, W. B. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 830-836) 。

## 2. ペプチド合成

ペプチドは、Fmoc 法により Perseptive 社のペプチド合成機 9500 により合成した。ペプチドは、逆相カラムクロマトグラフィー (C18) で精製し、アミノ酸シーケンサーで配列を確認し、純度は(MALDI-TOF-MS, REFLEX II<sup>TM</sup>, Bruker Instruments, Switzerland)で検定した。以下に GPC の部分ペプチドの配列を示す。

**GPC-1: D<sup>112</sup>PALQDAGDSSRKEYFI**

**GPC-2: T<sup>99</sup>EFAE-SADAALQG**

**GPC-3: R<sup>82</sup>YMYRHKGTYHTNDAKG**

(Fig.27 を参照)

## 2. Resonant Mirror Detection (RMD)法による反応速度論的解析。

蛋白質-蛋白質間および蛋白質-ペプチド間の反応速度論的解析には、Affinity Sensor 社 (ケンブリッジ、UK) の Resonant Mirror Detection (RMD)法による IAsys 装置を用いた (Fig.5A 参照)。蛋白質或いはペプチドは、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4 緩衝液 (0.1M NaCl を含む、以下 PBS と略記) に 100 μg/ml の濃度に溶解しアミノシランキュベット上に、BS<sup>3</sup> (PIERCE 社、USA) を介して固相化した。ペプチドの固相化には、一旦アミノシランキュベット上に BSA を BS<sup>3</sup> で固相化したのち、NHS/EDC にて BSA のアミノ基を活性化する方法 (Nunomura, W., et al. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30322-30328) も併用した。反応には、10mM Tris HCl 緩衝液 pH7.5、0.1M NaCl (Buffer A) に対して 1mM EGTA 或いは 1mM EGTA と 2mM CaCl<sub>2</sub> を加えて用いた。キュベット内の反応温度は 25℃ 一定に保ち、一定速度で攪拌した。P55 との結合解析には、PBS に 0.05% Tween-20 を加えること

で、His tagの非特異的結合を回避した。反応に関わるパラメーター（結合速度定数、解離速度定数、最大結合量）は専用解析ソフトを用いて計算した（Fig.5B参照）。平衡解離定数（ $K_{(D)kin}$ ）は、結合速度定数（ $k_a$ ）と解離速度定数（ $k_d$ ）の比から以下の式で求めた。

$$K_{(D)kin} = k_d / k_a$$

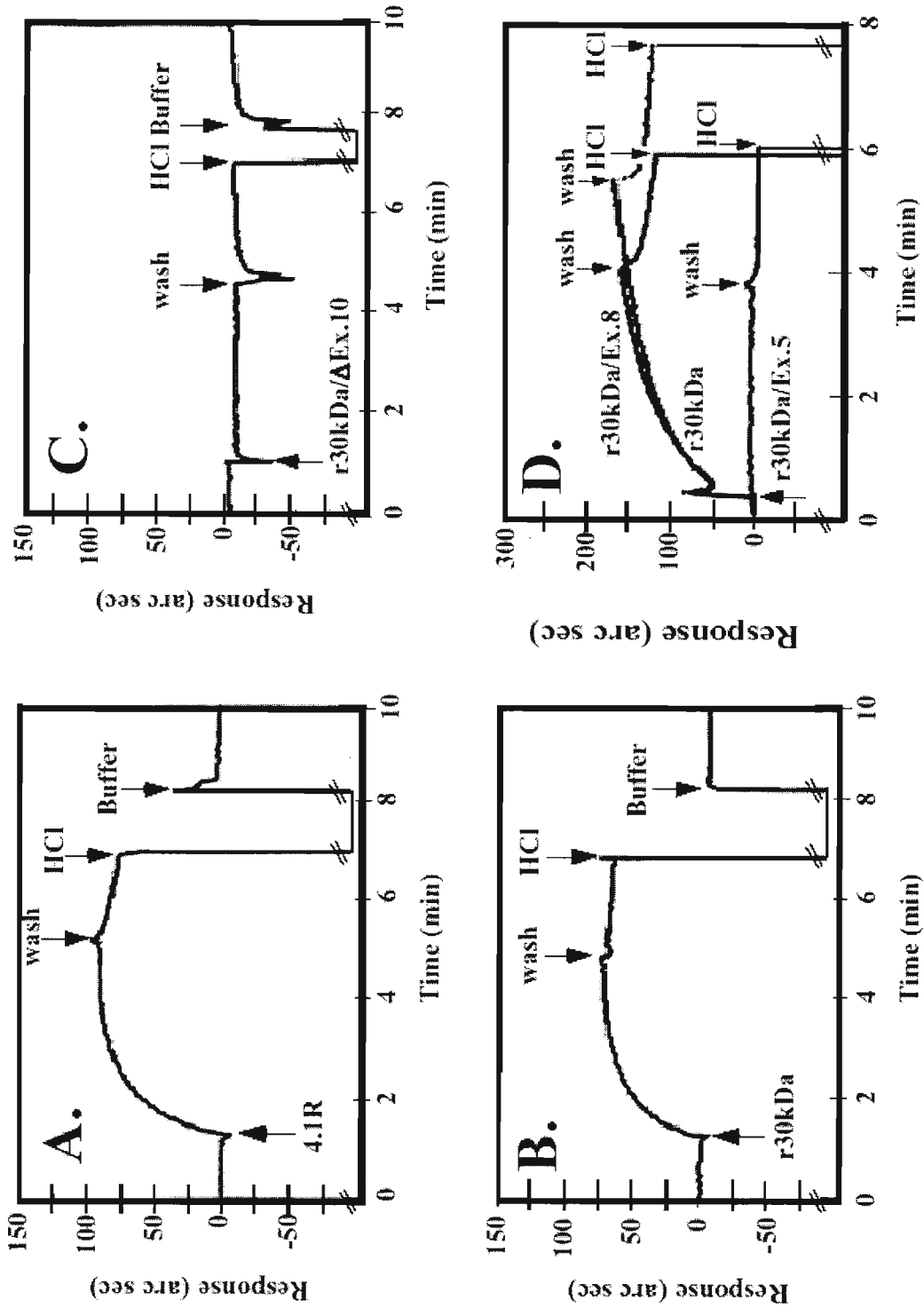
（ $K_{(D)kin}$ ）の値は、同じ測定で得られた結果から最大結合量の値を用いて Scatchard plot 解析を行い、両者を比較し合致性を検討した。本文での結果は、（ $K_{(D)kin}$ ）の結果のみを  $K_{(D)}$ として表示した。

## 2. 2次元電気泳動法（2D）による解析。

成熟マウス脳を切り出し、湿重量の 5 倍量の 9.6M 尿素（高純度品、Gibco より購入）に懸濁した。超音波破碎後、遠心（RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4℃、10 分間）沈澱後上清を得た。この上清を 2 次元電気泳動法装置（PROTEAN IEF Cell, BioRad、本科学研究費補助金で購入）の使用書に従って分析を行った。同時に 2 枚のゲルを用意し、1 枚は銀染色（和光純薬）に供した。1 枚は PVDF 膜に電気転写し免疫染色した。抗体は家兎に、組換え p53 あるいは 4.1R<sup>80</sup> の 30kDa domain を免疫して得た抗血清を IgG に精製して用いた。各抗原のヒトとマウスの種間交差性は、それぞれの赤血球膜を用いたウェスタンブロット法で確認した。予備実験として、ヒト赤血球膜を 2 次元電気泳動して、同様に銀染色と PVDF 膜に電気転写した後、家兎抗 4.1R<sup>80</sup> の 30kDa domain 抗体による免疫染色に供した。





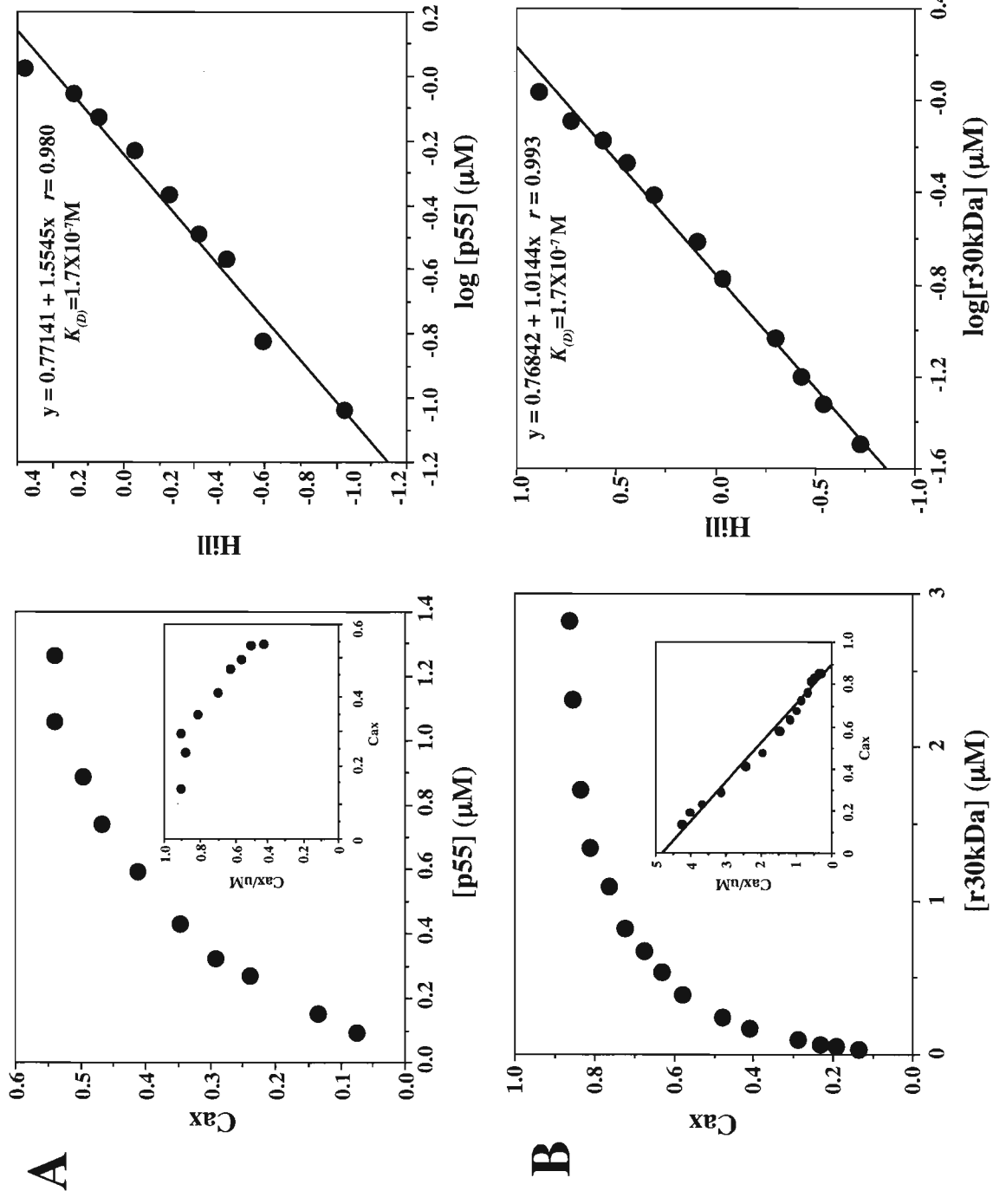


**Fig. 18. Typical tracings from the IAsys™ system to quantitate the interactions between p55 and 4.1R (A); p55 and r30kDa (B); p55 and r30kDa/ΔEx.10 (C); and GPC and r30kDa, r30kDa/Ex.5, or r30kDa/Ex.8 (D).** The specific binding response monitored as an increase in arc seconds reached a plateau value at 3.5; 5 min. After the equilibrium state was reached, the cuvette was washed with protein-free binding buffer (*wash*). Following this washing step, the response signal decreased and reached a new lower plateau value. The cuvette is subsequently washed with 20 mM HCl to remove all bound proteins (*HCl*) and regenerated with phosphate-buffered saline buffer (*Buffer*). While a specific association was noted between p55 and both 4.1R and r30kDa protein, no specific association was noted between p55 and r30kDa/ΔEx.10. A specific association was also documented between r30kDa and r30kDa/Ex.8 with GPC but not between r30kDa/Ex.5 and GPC. In this figure, recombinant 30kDa represented as r30kDa.

**Table IX. *p55* binding to 30kDa domain of 4.1R<sup>80</sup>**

Peptides	mutation	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{(D)}$ (M)
<b>4.1R<sup>80</sup></b>	wild	<b>3.8 ±0.2x10<sup>4</sup></b>	<b>3.6 ±0.2x10<sup>-3</sup></b>	<b>0.9 x10<sup>-7</sup></b>
<b>30kDa</b>	wild	<b>4.0 ±0.2x10<sup>4</sup></b>	<b>8.0 ±0.5x10<sup>-3</sup></b>	<b>2.0 x10<sup>-7</sup></b>
	<b>ΔEx.5</b>	<b>1.5 ±0.1x10<sup>4</sup></b>	<b>6.0 ±0.5x10<sup>-3</sup></b>	<b>4.0 x10<sup>-7</sup></b>
	<b>ΔEx.8</b>	<b>4.1 ±0.4x10<sup>4</sup></b>	<b>7.0 ±0.2x10<sup>-3</sup></b>	<b>1.7 x10<sup>-7</sup></b>
	<b>ΔEx.10</b>	<b>No binding</b>	<b>No binding</b>	<b>No binding</b>
	<b>ΔEx.11</b>	<b>3.7 ±0.1x10<sup>5</sup></b>	<b>1.5 ±0.4x10<sup>-2</sup></b>	<b>4.1 x10<sup>-8</sup></b>
	<b>Ex.4-9</b>	<b>No binding</b>	<b>No binding</b>	<b>No binding</b>
	<b>Ex.9-11</b>	<b>3.3 ±0.8x10<sup>4</sup></b>	<b>4.5 ±0.1x10<sup>-3</sup></b>	<b>1.4 x10<sup>-7</sup></b>
	<b>Ex.9+11</b>	<b>No binding</b>	<b>No binding</b>	<b>No binding</b>

The binding assay was carried out in PBS containing 0.05% Tween-20. From the binding curves obtained by RMD,  $k_d$ ,  $k_a$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.



**Fig.19 Hill plot analysis of complexes.** A, complex of GPC and r30kDa (recombinant 30kDa domain of 4.1R) binding to p55 (Hill constant was calculated as 1.6); B, complex of GPC and p55 binding to r30kDa (Hill constant was calculated as 1.0).  $C_{ax}$  represent Miaximal binding.

**Table X. p55 binding site on Exon 10 encoded region of 4.1R**

peptide	$k_a$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_{(D)}$ (M)
Ex10-1	$5.8 \pm 0.1 \times 10^3$	$9.8 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	$1.7 \times 10^{-6}$
Ex10-2	$9.0 \pm 0.9 \times 10^4$	$9.4 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-7}$
Ex10-3	$9.7 \pm 0.3 \times 10^4$	$8.2 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	$8.4 \times 10^{-8}$

The binding assay was carried out in PBS containing 0.05% Tween20. From the binding curves obtained by resonant mirror detection method,  $k_a$ ,  $k_d$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.

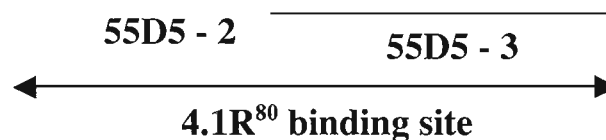
Fig.20 に 4.1R<sup>80</sup> の Exon 10 コード領域のアミノ酸配列を示した。それぞれのペプチドと p55 との結合は、Ex10-2 と Ex10-3 は  $\sim 10^{-7}$ M で結合したが、Ex10-1 の結合は他に比較して約 1/10 の親和性であった (Table X)。

一方、p55 の 4.1R<sup>80</sup> の結合部位は、PDZ domain と MAGUK domain の中間にある 39 アミノ酸残基からなる HOOK domain であることが知られている (Fig.21)。本研究に於いて、この HOOK domain (D5 と同義) の GST 融合蛋白質及び部分の合成ペプチドを作製し、4.1R<sup>80</sup> ・及び 4.1R<sup>80</sup> ・30kDa domain の結合解析を行った結果は、p55 全長との結果とよく一致した (data not shown)。合成ペプチドでは、55D5-2 と 55D5-2 が 4.1R<sup>80</sup> ・及び 4.1R<sup>80</sup> ・30kDa domain と結合した。

### 39 amino acids

**RVSMAQSAPSEAPSCSSPFGKKKKYKDKYLAKHSSIFDQ**

**55D5 - 1**



**Fig. 21 Amino acid sequence of 4.1R<sup>80</sup> binding site of p55.** Exon 10 encodes the sequence. 55D5-1~3 were indicate sequence of synthetic peptide. This sequence is named as “HOOK domain” at present.

## 1. GPC ペプチドと p55 及び 4.1R<sup>80</sup>・30kDa domain の結合解析

Table XI に示したように、4.1R<sup>80</sup>・30kDa domain は GPC-3 に平衡解離定数  $2.2 \times 10^{-7}$  M で結合し、p55 は GPC-1 と平衡解離定数  $1.6 \times 10^{-6}$  M で結合することが示された。p55 は GPC-1 との結合は既報の結果とよく一致した (Marfatia, S. M., et al. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 715-719)。p55 に 4.1R<sup>80</sup>・30kDa domain を過剰に反応させた後に GPC-1 との結合を解析すると、p55 は結合速度定数  $1.6 \times 10^5$  M<sup>-1</sup>・s<sup>-1</sup>、解離速度定数  $4.4 \times 10^5$  s<sup>-1</sup>、平衡解離定数  $2.8 \times 10^{-7}$  M で結合することが示され、p55 と GPC-1 の結合に 30kDa domain が p55 に結合することにより、約 10 倍親和性が上昇することが示された (Table XI)。30kDa domain の代わりに 4.1R<sup>80</sup> (data not shown) あるいは Ex10-2 と Ex10-3 (ペプチド) を用いても同様の効果が得られた (Table XII) ことから、4.1R<sup>80</sup> には p55 の GPC への結合を促進する機能があることが示された。

Table XIII に示したように、4.1R<sup>80</sup>・30kDa domain と p55 或いは p55 と GPC-1 の複合体の平衡解離定数はそれぞれ  $1 \sim 2 \times 10^{-7}$  M で結合し変化は無かったがこれは、結合速度定数と解離速度定数が同じ比で変化した結果であった。p55 と 4.1R<sup>80</sup>・30kDa domain 或いは 4.1R<sup>80</sup>・30kDa domain と GPC-3 複合体との結合を解析した結果、4.1R<sup>80</sup>・30kDa domain の p55 への結合に GPC-3 は関与しないことが示された。

## 3. CaM による 4.1R<sup>80</sup> の GPC 及び p55 結合抑制効果

組換え 30kDa domain は、GPC の細胞内 domain と平衡解離定数  $1.8 \times 10^{-7}$  M で結合した。CaM と組換え 30kDa domain の複合体 (モル比 5:1 以上) は Ca<sup>2+</sup> 非存在下では、GPC の細胞内 domain と平衡解離定数  $4.1 \times 10^{-7}$  M で結合したが、Ca<sup>2+</sup> 存在下では、GPC の細胞内 domain と平衡解離定数  $1.6 \times 10^{-6}$  M で結合した。また、組換え 30kDa domain は、p55

**Table XII. Effect of exon 10 peptide interaction on p55 binding to GPC**

GPC	peptide	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_{(D)}$ (M)
cyt	None	$1.0 \pm 0.1 \times 10^4$	$1.6 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	$1.6 \times 10^{-6}$
	+pepEx10-2	$1.2 \pm 0.2 \times 10^5$	$3.5 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	$2.5 \times 10^{-7}$
	+pepEx10-3	$1.8 \pm 0.2 \times 10^5$	$1.7 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	$9.4 \times 10^{-8}$
-1	None	$1.0 \pm 0.1 \times 10^4$	$1.6 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	$1.6 \times 10^{-6}$
	+pepEx10-2	$2.0 \pm 0.2 \times 10^4$	$6.3 \pm 0.6 \times 10^{-3}$	$3.1 \times 10^{-7}$
	+pepEx10-3	$2.3 \pm 0.2 \times 10^4$	$3.3 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	$1.4 \times 10^{-7}$

The binding assay was carried out in PBS containing 0.05% Tween-20. From the binding curves obtained by RMD,  $k_d$ ,  $k_a$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.

**Table XIII. Effect of GPC peptide on binding between p55 and r30kDa**

<b>Ligand</b>	<b>Analyte</b>	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_{(D)}$ (M)
<b>r30kDa</b>	<b>p55</b>	$4.0 \pm 0.2 \times 10^4$	$8.0 \pm 0.5 \times 10^{-3}$	$2.0 \times 10^{-7}$
	<b>p55+GPC-1</b>	$1.2 \pm 0.1 \times 10^5$	$1.2 \pm 0.2 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^{-7}$
<b>p55</b>	<b>r30kDa</b>	$3.9 \pm 0.3 \times 10^4$	$8.5 \pm 0.3 \times 10^{-3}$	$2.2 \times 10^{-7}$
	<b>r30kDa+ GPC-3</b>	$1.3 \pm 0.1 \times 10^5$	$2.9 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	$2.2 \times 10^{-7}$

The binding assay was carried out in PBS containing 0.05% Tween-20. From the binding curves obtained by RMD,  $k_d$ ,  $k_a$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.

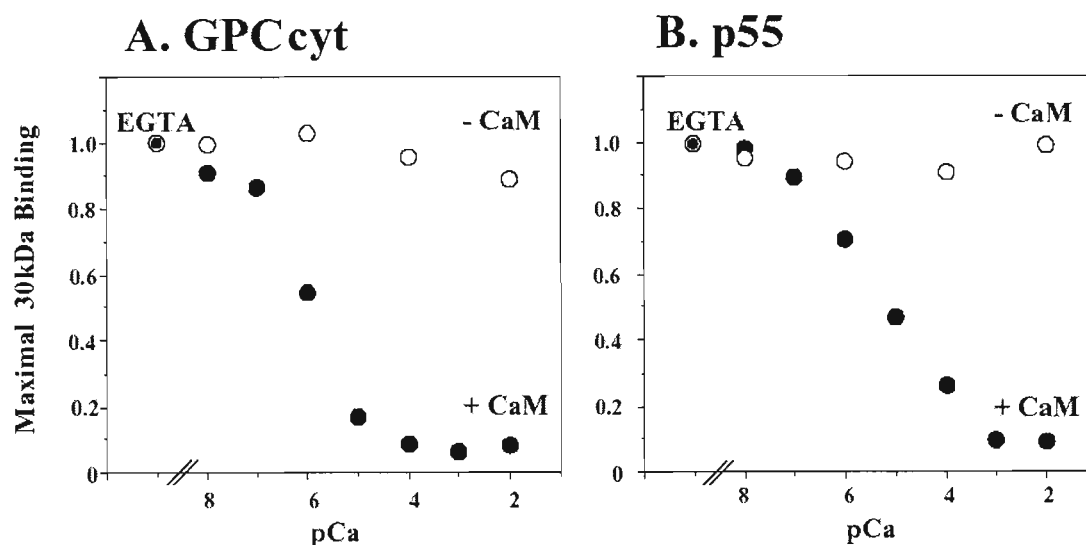
**Table XIV. Effect of CaM interaction on r30kDa binding to GPC and p55**

Peptides	CaM	Condition	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_{(D)}$ (M)
GPC	-	EGTA	$2.4 \pm 0.3 \times 10^4$	$4.4 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	$1.8 \times 10^{-7}$
		+Ca <sup>2+</sup>	$2.1 \pm 0.3 \times 10^4$	$2.6 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-7}$
	+	EGTA	$4.4 \pm 0.5 \times 10^4$	$1.8 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	$4.1 \times 10^{-7}$
		+Ca <sup>2+</sup>	$9.0 \pm 0.2 \times 10^3$	$1.4 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	$1.6 \times 10^{-6}$
p55	-	EGTA	$5.6 \pm 0.1 \times 10^4$	$2.5 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	$4.4 \times 10^{-7}$
		+Ca <sup>2+</sup>	$1.0 \pm 0.1 \times 10^5$	$3.7 \pm 0.3 \times 10^{-2}$	$3.7 \times 10^{-7}$
	+	EGTA	$4.9 \pm 0.1 \times 10^4$	$1.1 \pm 0.1 \times 10^{-2}$	$2.2 \times 10^{-7}$
		+Ca <sup>2+</sup>	$2.6 \pm 0.3 \times 10^3$	$8.9 \pm 0.8 \times 10^{-3}$	$3.4 \times 10^{-6}$

An increasing concentration of r30kDas (50nM-1 $\mu$ M) were preincubated with CaM (5 $\mu$ M) and either 0.1 mM EGTA (EGTA) or 1.1 mM CaCl<sub>2</sub> and 1.0 mM EGTA (+Ca<sup>2+</sup>) for 30 min at 25 °C in Buffer A as described for "Methods". From the binding curves obtained by resonant mirror detection method,  $k_a$ ,  $k_d$ ,  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.



と平衡解離定数  $4.4 \times 10^{-7}$  M で結合した。CaM と組換え 30kDa domain の複合体（モル比 5 : 1 以上）は  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下では、p55 と平衡解離定数  $4.1 \times 10^{-7}$  M で結合したが、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下では、p55 と平衡解離定数  $3.4 \times 10^{-6}$  M で結合した（Table XIV）。この変化は、結合速度定数の低下により平衡解離定数の増加（親和性の低下）が起きたことから、30kDa domain は、 $\text{Ca}^{2+}$  /CaM 結合することにより、立体構造あるいは表面荷電の変化にともなって、p55 の細胞内 domain と結合し難くなったと考察される。最大結合量が  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下（100%の結合量とする）での半分の結合量になる  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は大凡  $10^{-7}$ M であり、細胞内での  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度と一致していた（Fig.22）。



**Fig.22.  $\text{Ca}^{2+}$  concentration dependence of 30kDa binding to cytoplasmic domain of GPC (A) and p55 (B).** 30kDa binding to cytoplasmic domain of GPC (GPCcyt) and p55 was measured at various concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  in the presence (closed circle) and absence (open circle) of  $5\mu\text{M}$  CaM.  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations were maintained by a  $\text{Ca}^{2+}$ /EGTA buffer system. The maximal extent of binding under different experimental conditions was quantitated as described under “Experimental Procedures.” Maximal binding in the presence of EGTA was used to normalize the extent of binding in the presence of varying concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$ . pCa represents ionized  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. The extent of 30kDa binding to GPCcyt and p55 is plotted as a function of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration.

#### 4. p55 の核移行蛋白質 (importin $\alpha$ ) との結合

p55 は、核移行蛋白質 (importin  $\alpha$ ) とその p55D5 及び p55D5-2 と平衡解離定数  $10^{-8}$  M で結合した (Table XV)。PDZ 蛋白質の一つ CASK は核内へ移行し転写因子と結合することが知られている。p55 も同様に importin  $\alpha$  と結合することにより、核内へ移行する可能性がある。

Table XV. *Importin  $\alpha$  binding to p55*

peptide	$k_a$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_{(D)}$ (M)
p55	$3.4 \pm 0.3 \times 10^5$	$9.9 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	$2.9 \times 10^{-8}$
p55D5	$2.9 \pm 0.3 \times 10^5$	$4.9 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	$1.7 \times 10^{-8}$
p55D5 -1	No binding	No binding	No binding
p55D5 -2	$2.4 \pm 0.3 \times 10^5$	$7.9 \pm 0.1 \times 10^{-3}$	$3.3 \times 10^{-8}$
p55D5 -3	No binding	No binding	No binding

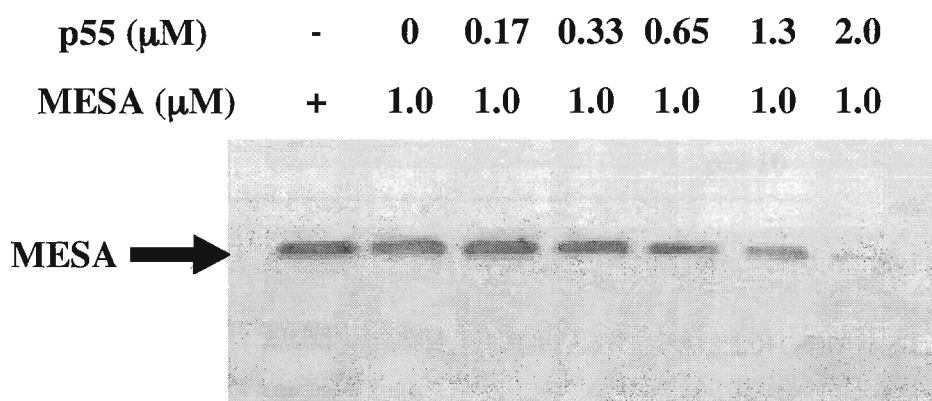
The binding assay was carried out in PBS containing 0.05% Tween20. From the binding curves obtained by resonant mirror detection method,  $k_a$ ,  $k_d$ , and  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.

#### 5. p55 とマラリア由来 Mature parasite-infected Erythrocyte Surface Antigen (MESA) の 4.1R80 に対する競合的結合。

マラリア (*Plasmodium falciparum*) は、赤血球内で Mature parasite-infected Erythrocyte Surface Antigen (MESA) を産生し、N末端の19アミノ酸配：

**DHLYSIRNYIECLRNPYI**

で4.1R<sup>80</sup>に結合することが知られている (Bennett, B.J. et al. *J Biol.Chem.* (1997) **272**,15299-15306)。しかし、4.1R<sup>80</sup>の結合部位は不明であった。本研究において、MESAの結合部位は、Exon10コード領域であり、p55と競合することが明らかになった (Fig.23)。マラリア原虫は赤血球内ではp55を4.1R<sup>80</sup>から解離させてMESAを結合させると考えられる。マラリア原虫の生存戦略としてMESAと4.1R<sup>80</sup>を介して赤血球膜に繫留していると予想されるが、生物学的意義は尚不明である。また、MESAの結合ペプチド：DHLYSIRNYIECLRNPYIを赤血球内に封入して、p55と4.1R<sup>80</sup>を特異的に解離させることで、膜機能を解析することでp55の機能を推察できると考えられた。



**Fig.23. Three-dimensional structure of 30-kDa 4.1R and competition of MESA binding to 4.1 by p55.** Competition of binding was demonstrated using GST-pull down assays, in which GST-4.1R<sup>80</sup> (coupled to glutathione Sepharose beads; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) pre-incubated (30 minutes at room temperature) with increasing concentrations of p55 (ranging from 0.0μM to 2.0μM), before the addition of 1.0μM His-tagged MESA (S)+19 (30 minutes at room temperature, Bennett, B.J. et al. *J Biol.Chem.* (1997) **272**,15299-15306). Subsequently, beads were washed and collected, and the proteins resolved by SDS-PAGE (10%[wt/vol]). The binding of MESA to 4.1R<sup>80</sup> was detected by Western blot using monoclonal anti-His antibody (Roche, Indianapolis, IN). The first lane contains 0.45μg His-tagged MESA that was included as an immuno-blot MESA-positive control. Competition of MESA for 4.1R80 by p55 was indicated by the decreasing levels of MESA detected in samples with increasing concentrations of p55 used in the preincubations.

## 1. マウス脳の4.1Rとp55相同抗原の2次元電気泳動法による解析。

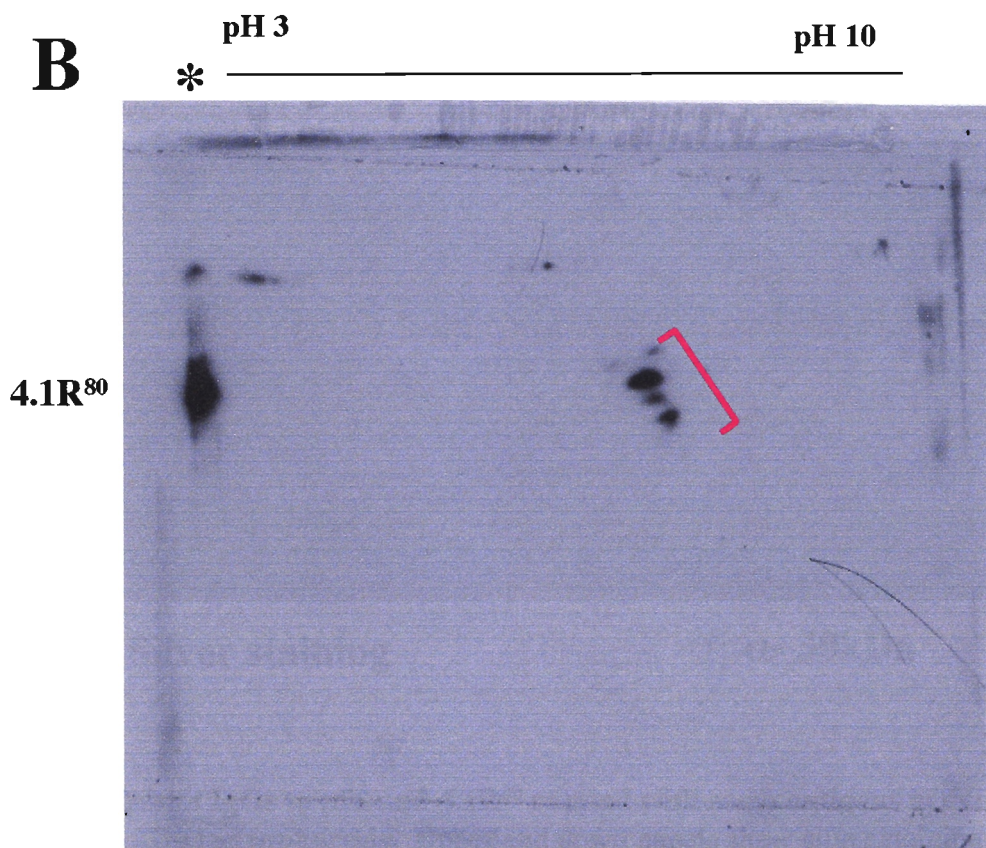
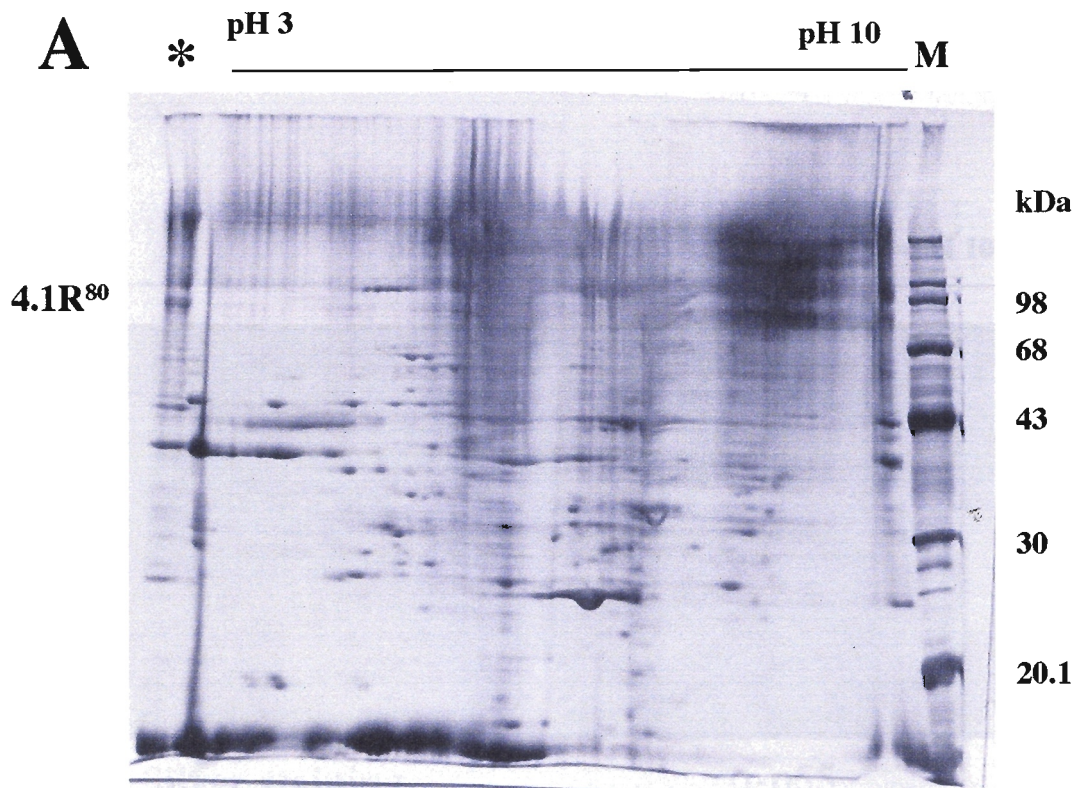
ヒト赤血球膜を2次元電気泳動法で解析すると、4.1R<sup>80</sup>はpH7.4付近に3つのスポットとして泳動された (Fig.24)。マウス脳の2次元電気泳動法による解析では、抗4.1R<sup>80</sup>30kDa抗体はpH6.5、分子量約150kDa付近に、また、抗p55抗体pH6.4、分子量約100kDa付近のスポットを検出した。これらの分子のアミノ酸配列等については解析中である (Fig.25)。

## 7. HOOK domain の相同性

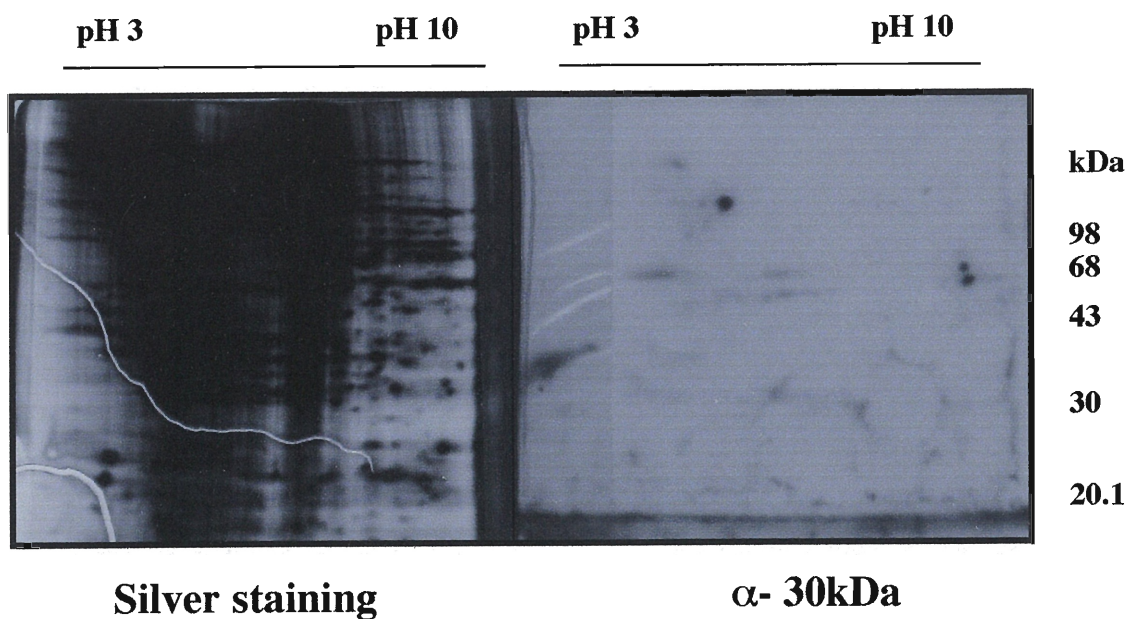
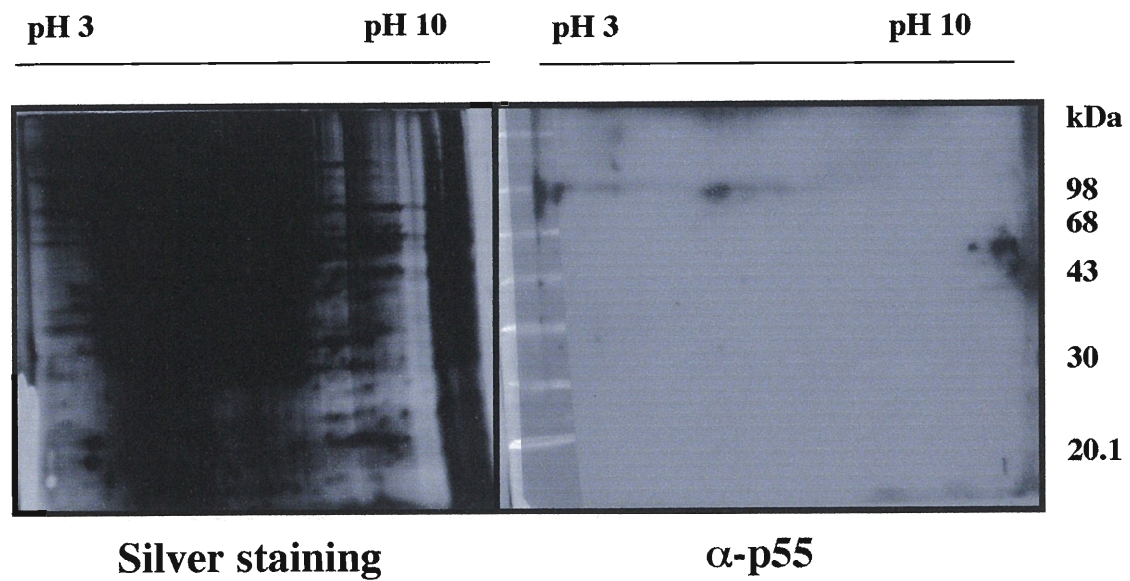
4.1 family 蛋白質 (4.1G、4.1N、4.1B) には、4.1R とよく保存されたアミノ酸配列があることから、p55に限らず、HOOK domain を有するPDZ蛋白質と結合する可能性があることが示唆された (Fig.26)。

4.1-R:	YKDKLRINRFPWPKVLKISYKRS	S	FFIKIRPGE
4.1-G:	YKDRLRINRFAWPKILKISYKRS	NY	FIKVRPΔE
4.1-N:	YRDRLRINRFAWPKILKISYKRS	N	FFIKIRPGE
4.1-B:	YRDRLRINRFAWPKVLKISYKR	NNY	FIKIRPGE

**Fig.26 Sequence conservation of p55 binding site among members of the protein 4.1 family.** A stretch of 33 hydrophilic amino acids in the C-terminal part of Exon 10-encoded sequence in 4.1R is highly conserved in the homologues, 4.1G, 4.1N, and 4.1B. Shaded regions indicate identical amino acids.



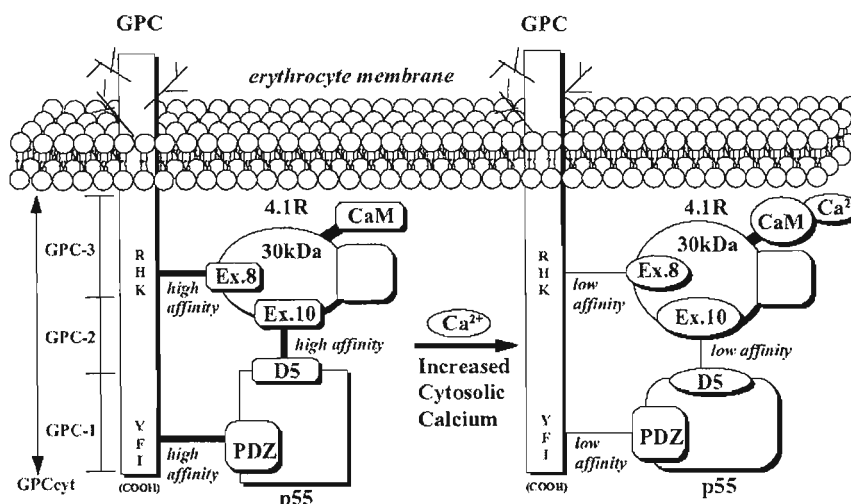
**Fig.24** 4.1R<sup>80</sup> in human red blood cell membrane detected by 2D-electrophoresis. Panels A and B shows silver staining and immuno-blot staining by rabbit IgG to 30kDa domain of 4.1R<sup>80</sup>. Note that 4.1R<sup>80</sup> migrated at the position of pH7.4 and 80kDa. \* indicates whole red blood cell.



**Fig.25 Rabbit IgGs to p55 and 4.1R<sup>80</sup> reacted with some antigens in extract of mouse brain on 2D-electrophoresis.** Upper and down panels show silver staining and immunoblot staining by rabbit IgG to human p55 and 30kDa domain of 4.1R<sup>80</sup>, respectively. Note that p55-like antigen was detected at the position of pH6.4 and ~100kDa. A 30kDa-like antigen was detected at the position of pH6.5 and ~150kDa. The cross reactivity of those antibodies were checked by immuno-blot of mouse red blood cell membrane.

[まとめ]

- (1) p55 は、4.1R<sup>80</sup> の Exon 10 コード領域、GPC は、4.1R<sup>80</sup> の Exon 8 コード領域に結合した。
- (2) 4.1R<sup>80</sup> は、p55 の GPC 結合を促進した。
- (3) Ca<sup>2+</sup>/CaM は、4.1R<sup>80</sup> と p55 及び GPC との結合が弱めた。
- (4) p55 は、核移行蛋白質 (importin  $\alpha$ ) と結合し、核移行の可能性をした。
- (5) p55 とマラリア (*Plasmodium falciparum*) 蛋白質 Mature parasite-infected Erythrocyte Surface Antigen (MESA) は、4.1R<sup>80</sup> 結合に際して競合すると考えられた。
- (6) マウス小脳には、抗 p55 抗体に反応する蛋白質が存在した。



**Fig.27 Model proposed for Ca<sup>2+</sup>/CaM modulation of 4.1R<sup>80</sup> interactions with GPC and p55 in the erythrocyte membrane.** The proposed model is based on the binary protein-protein interaction data obtained in the present study. When Ca<sup>2+</sup> concentration inside the erythrocyte is less than 1.0  $\mu$ M, CaM is constitutively bound to the Ca<sup>2+</sup>-independent CaM binding site of the 30kDa domain of 4.1R<sup>80</sup>. In this state, CaM-bound 4.1R binds simultaneously to the D5 domain (at present, D5 domain is renamed as “*HOOK domain*”) of p55 and to the GPC-3, while p55 binds to GPC-1 through its PDZ domain. All three of these interactions exhibit binding affinities on the order of 0.1  $\mu$ M. Following increased intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, CaM binds with high affinity to the Ca<sup>2+</sup>-dependent CaM binding site in the 30-kDa domain, causing conformational change in binding sites for GPC and p55, resulting in marked decreases in the affinity of 4.1R<sup>80</sup> for both GPC and p55 (binding affinities on the order of 1.0  $\mu$ M). We suggest that this large decrease in the binding affinities of all three binary interactions that constitute the GPC-4.1R<sup>80</sup>-p55 ternary complex will markedly destabilize this complex. In this figure, 4.1R<sup>80</sup> is represented as ‘4.1R’.

### 第3項 4.1R 30kDa domain の X 線結晶構造解析

#### [ 目的 ]

膜骨格の主要蛋白質である 4.1R<sup>80</sup> は、N 末端 30kDa domain (膜結合 domain) を介して膜貫通蛋白質 (Band 3、GPC、p55) や CaM と結合することを述べた。一方、4.1R<sup>80</sup> と膜結合 domain の膜蛋白質に対する親和性は、Ca<sup>2+</sup>/CaM により約 10 分の 1 以下に低下することを明らかにし、第 1、2 項で述べた。本研究では、膜結合 domain の三次元構造を解析することにより、一次元配列で明らかになった各結合蛋白質の結合部位の空間的位置関係を明らかにした。

#### [ 方法 ]

##### 1. 組換え蛋白質の作製

4.1R の cDNA から、30kDa domain (アミノ酸番号 1~298、Exon 4~12 コード領域) を *EcoRI* 及び *Sall* 制限酵素切断部位を付加した特異プライーによる PCR で増幅し、pGEX-6P2 ベクター (Amersham Bioscience) に組換えた。塩基配列を確認後、大腸菌 (*E. coli*) BL21(DE3) を形質転換した。LB 培地にて大腸菌を 37°C 一定条件下で震盪培養し、OD600 の値が 0.4~0.8 に達した時に、IPTG を最終濃度 (1mM) 添加し、さらに 37°C 一定条件下で 3 時間震盪培養した。大腸菌は、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、8,000rpm、8 分間) 沈澱後、1mM EDTA、1mM DFP、1mM 2ME を添加した B-PER™ (PIERCE、USA) に懸濁し溶菌した。溶菌液は氷上 10 分間の超音波処理後、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間) の上清を得た。上清は、Glutathione-Sepharose (Amersham Bioscience) と懸濁し、GST 融合蛋白質を分離した。GST 融合蛋白質は PreScission Protease™ 処理により標的蛋白質 (30kDa domain) と GST を切断した後、Q-



Sepharose (Amersham Biosciences)で更に精製した。精製した蛋白質の純度は SDS-PAGE にて検定した。膜結合 domain は塩入法により結晶化し、Advanced Light Source (Lawrence Berkeley National Lab., UCB) にて X 線結晶解析を行った [*Acta Crystallogr.*, **D56**, 187 (2000)]。

## [ 結果と結論 ]

Fig.28A に平衡四辺形型をした結晶を示した。Fig.28B に示したように、結晶化した 4.1R の 30kDa は、三量体を形成していた。Fig.29 に示したように、それぞれは、三つ葉様の構造をしていた。B には、2 次構造を平面で示した。Band 3-の結合モチーフ (L<sup>37</sup>EEDY 配列) は、N 末端部の第 1 葉 (N-lobe) のループ部位であった。GPC の結合部位である Exon 8 コード領域は、4 個の  $\alpha$ -helix からなる第 2 葉 ( $\alpha$ -lobe) の 3 番目の helix を含む領域であった。p55 は 7 個の  $\beta$ -sheet と 1 個の  $\alpha$ -helix からなる第 3 葉 (C-lobe) のループ部位に結合することが明らかになった。CaM は、中心溝部の第 2 葉 ( $\alpha$ -lobe) と第 3 葉 (C-lobe) に跨って結合することが明らかとなった。Fig.30 に、表面荷電分布を示した。Band 3 の結合モチーフ (L<sup>37</sup>EEDY 配列) は、青色で示したように、陰性荷電のスポットとであった。GPC の結合部位は、赤色で示したように陽性荷電領域であった。CaM の Ca<sup>2+</sup>依存性結合部位である pep9 の領域は、青色で示した陰性荷電表面であり、ポケット構造が観察された。CaM の Ca<sup>2+</sup>非依存性結合部位である pep11 の領域は、白色で示した疎水表面であった。Fig.31 に、CaM の Ca<sup>2+</sup>依存性結合部位である pep9 の領域のスペースフィリングモデルを示した。CaM の Ca<sup>2+</sup>非依存性結合部位である pep11 の領域には、赤丸で囲ったようにフェニルアラニンとプロリンが集まって疎水面を形成していた (Fig.30 と比較)。

Fig.32 に、Radixin の FERM domain (1J19) の結晶構造を示した。4.1R と Radixin の FERM domain の結晶構造は、ともに三つ葉様構造をしている点で良く似ているが、円で示した a, b, c 等のループ構造では互いに異なっており、結合特異性を規定していることが推定される。

N-lobe と C-lobe は、それぞれ既知のユビキチン (1UB1) とβ-スペクトリンの PH domain (1MPH) と類似していたことは興味深い。アミノ酸組成は異なる蛋白質にあって、構造の類似性があることは、生物学的機能よりも蛋白質の物性として安定な構造に収斂してきたと予想された。CaM と 4.1R の FERM domain の共結晶構造解析は、その特異な結合を理解する上で極めて有効な手段である。現在、UC Berkeley と共同研究で、科研費補助金 15570123 (研究代表者; 布村渉) に継続中である。FERM 蛋白質の一つであり、細胞のがん化に関わる Merlin (1ISN) には BB (Blue Box) と呼ばれる特異な配列:

**Y<sup>177</sup>QMTPEM**

と似た配列:

**R<sup>166</sup>SMTPAQ**

がある。*Drosophila* では、MTP 配列の変異がドミナントネガティブで、変異形質を生ずることが知られている。BB は、4.1R の 30kDa domain にも相同配列があり、構造上、蛋白質表面に露出していることが明らかになった。現在、このモチーフの結合蛋白質を検索中である。

#### [まとめ]

X線結晶構造解析により、4.1R の膜結合 domain は三葉様構造をしていること、CaM はその中心部の溝部に結合し、p55、GPC、Band 3 はそれぞれ別葉に結合することから、CaM による 4.1R の機能制御の分子構造を明らかにした。

---

<図の説明>

**Fig.29. Overall structure of 4.1R 30kDa domain.** A. Visualization of 4.1R 30kDa domain structure by ribbon representation with secondary structure elements. Letters in the N-lobe and in the C-lobe represent  $\beta$ -strands while numbers in the  $\alpha$ -lobe represent helices. The blue, green, and red colored ribbons represent the N-lobe, the  $\alpha$ -lobe and the C-lobe, respectively. The crystallographic data of 30kDa domain of 4.1R were treated with molecular visualization program RASMOL (<http://www.OpenRasMol.org/>, Sayle, R. and Milner-White, E. J. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 374.) B. Topological diagram of 4.1R 30kDa domain. Arrows and boxes represent  $\beta$ -strands and  $\alpha$ -helices, respectively.

**Fig.30 Ribbon diagram, surface and density maps.** A, Ribbon diagram of 30kDa domain viewed perpendicular to the faces of the cloverleaf like structure showing the three lobes (N-lobe,  $\alpha$ -lobe and C-lobe) and their overall internal structure. B; Electric potential surface map of the molecule in the same orientation as in A. B, Electric potential surface map of the molecule in the same orientation as in (A). The  $\text{Ca}^{2+}$  insensitive CaM binding domain (indicated by the green arrow) contains predominantly hydrophobic residues and is in an indentation located between the C-lobe and N-lobe.

**Fig.31. Space filling representations of CaM binding regions.** Amino acid residues on the surface are labeled. Hydrophobic residues of the CaM binding sequence are colored white, polar residues yellow, negatively charged residues red, and positively charged residues blue. Key amino acid residues for CaM binding are labeled red. Hydrophobic residues from distant regions of the primary sequence that have folded to participate in the formation of the hydrophobic patch of the CaM binding region are shown in translucent white. *pep11*,  $\text{Ca}^{2+}$  insensitive CaM binding region showing a hydrophobic patch flanked by predominantly positively charged residues. This patch has a high degree of complementarity to the target peptide-binding surface of the CaM globular domain, which has a hydrophobic patch flanked by negatively charged residues. Such complementarity is believed to be a critical factor in CaM target peptide interactions. Hydrophobic residues (Trp<sup>268</sup>, Phe<sup>277</sup> and Phe<sup>278</sup>, indicating Red circled) of 4.1R are known to be critical for CaM binding; replacement of these residues with Ala greatly affects CaM binding. The point mutation W<sup>268</sup>S results in CaM binding becoming  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive. *pep9*,  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive CaM binding region showing a hydrophobic patch and the distribution of charged residues. This region is formed by an extended structure. The polar residue Ser<sup>185</sup> is found to be important for  $\text{Ca}^{2+}$  dependent interactions with CaM; the mutation S<sup>185</sup>W increases the binding affinity between this site and CaM and abolishes the  $\text{Ca}^{2+}$  dependence.

**Fig.32 3D structures of FERM domain.** Comparison of the FERM domain of 4.1R with radixin (1J19). The differences are presented in 3-circled regions.

**Fig.33 Similar structure of subdomain presents in the different proteins.** Comparison of the N-lobe with ubiquitin (1UBI), and C-lobe with PH domain of  $\beta$ -spectrin (1MPH).

## 第4項 135kDa 型 protein 4.1R (4.1R<sup>135</sup>) NH<sub>2</sub> 末端部 209 アミノ酸残基 (head-piece, HP) の細胞膜結合制御機構.

### [ 目的 ]

赤芽球及び上皮細胞に発現する 135kDa のアイソフォーム (4.1R<sup>135</sup>) は、4.1R<sup>80</sup> の N 末端部に約 50kDa (head-piece, HP) のポリペプチドが付加されているが、その膜蛋白質との相互作用は不明である (Fig.1 参照)。本研究では、4.1R<sup>135</sup> の分子間相互作用を解析し 4.1R<sup>80</sup> と比較した。

### [ 材料と方法 ]

#### 1. 赤芽球の培養

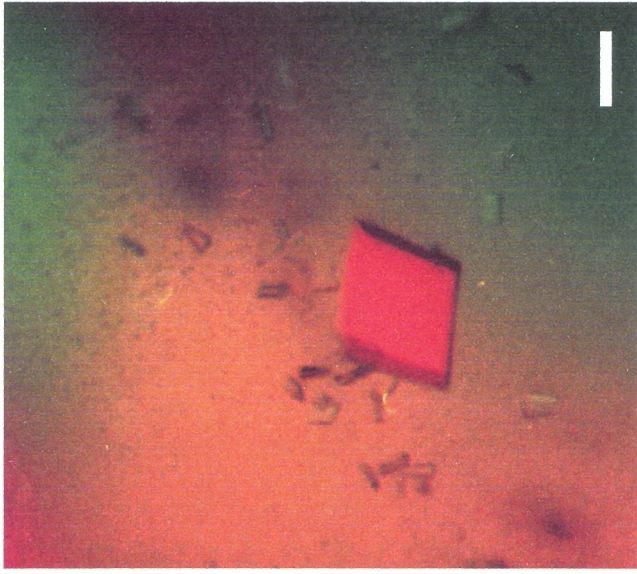
赤芽球の培養及び免疫染色は、秋田大学医学部内科学澤田賢一教授との共同研究で行われた。

ヒト抹消血から分離した血液幹細胞を培養して CD34 陽性細胞を得た。さらにエリスロポエチンの添加により赤芽球に分化誘導した。CD34 陽性細胞を得た時を Day 0 として脱核するまで経時的に細胞を採取した。細胞は固定後、内因性のペルオキシダーゼを 3% 過酸化水素水 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 処理により不活性化し、一次抗体として、家兎抗 4.1RHP 領域抗体、家兎抗 4.1R<sup>80</sup> 領域抗体、マウス抗 GPC 領域抗体を反応させた。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体を反応させ、diaminobenzidine (DAB) で発色可視化した。

#### 2. 組換え蛋白質の作製

組換え 4.1R<sup>80</sup> とその 30kDa domain、Band 3、GPC 及び p55 の細胞内 domain の作製と CaM の精製は第 1 項に記載した。HP 及び HP+30kDa domain (以下 HP30) は GST fusion protein として大腸菌に発現させた。cDNA (4.1R) から、HP 及び HP30 領域を *EcoRI* 及び *SaII* 制限酵素切断部位を付加した特異プライマーによる PCR で増幅し、pGEX-4T2 ベクター

**A**



**B**



**Fig.28 A; Crystal of 30kDa doamin of protein 4.1R. Scale bar indicates 0.1 mm.  
B; The 30kDa domain crystalized as trimer.**

**A.** C-lobe



**B.**

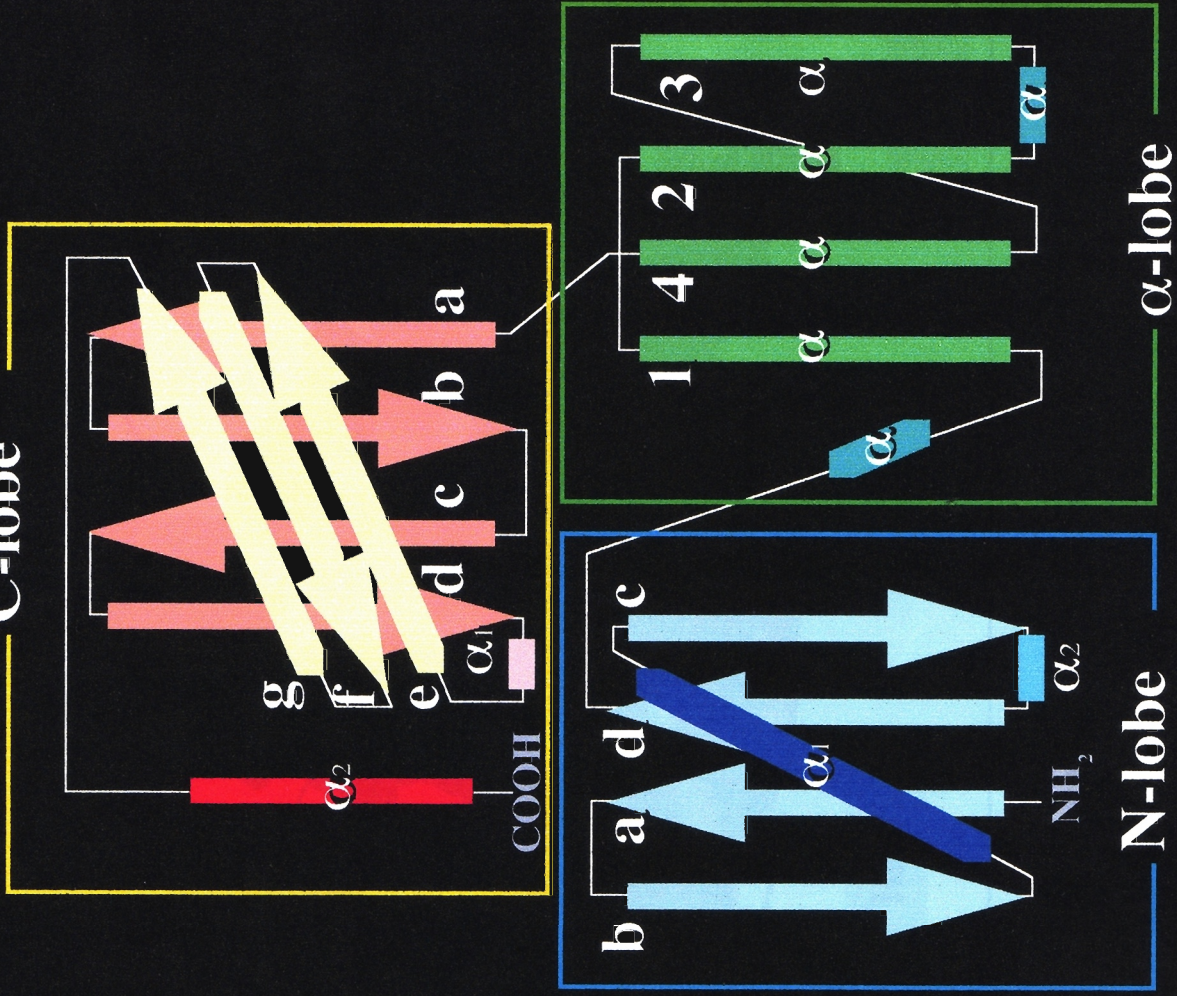
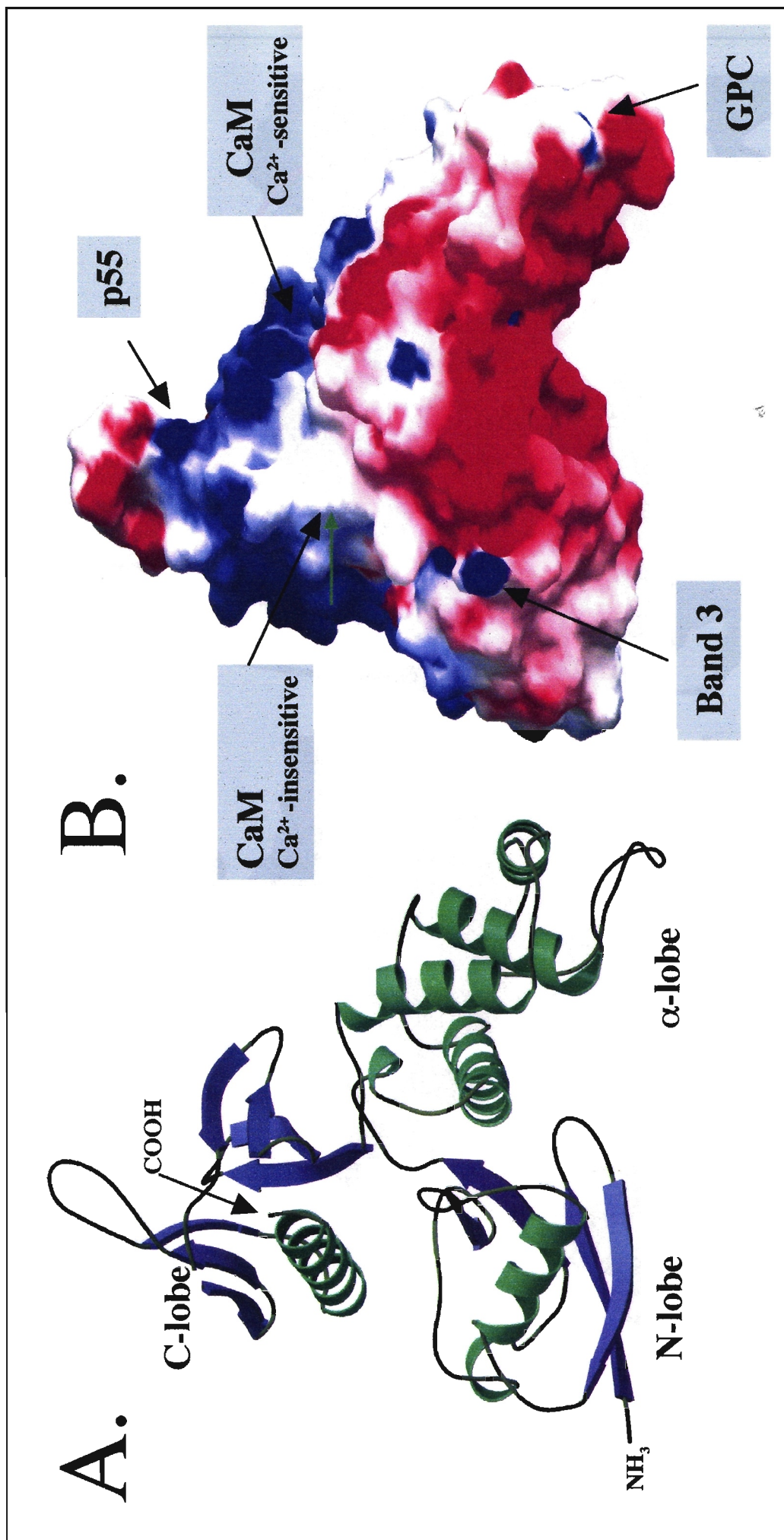
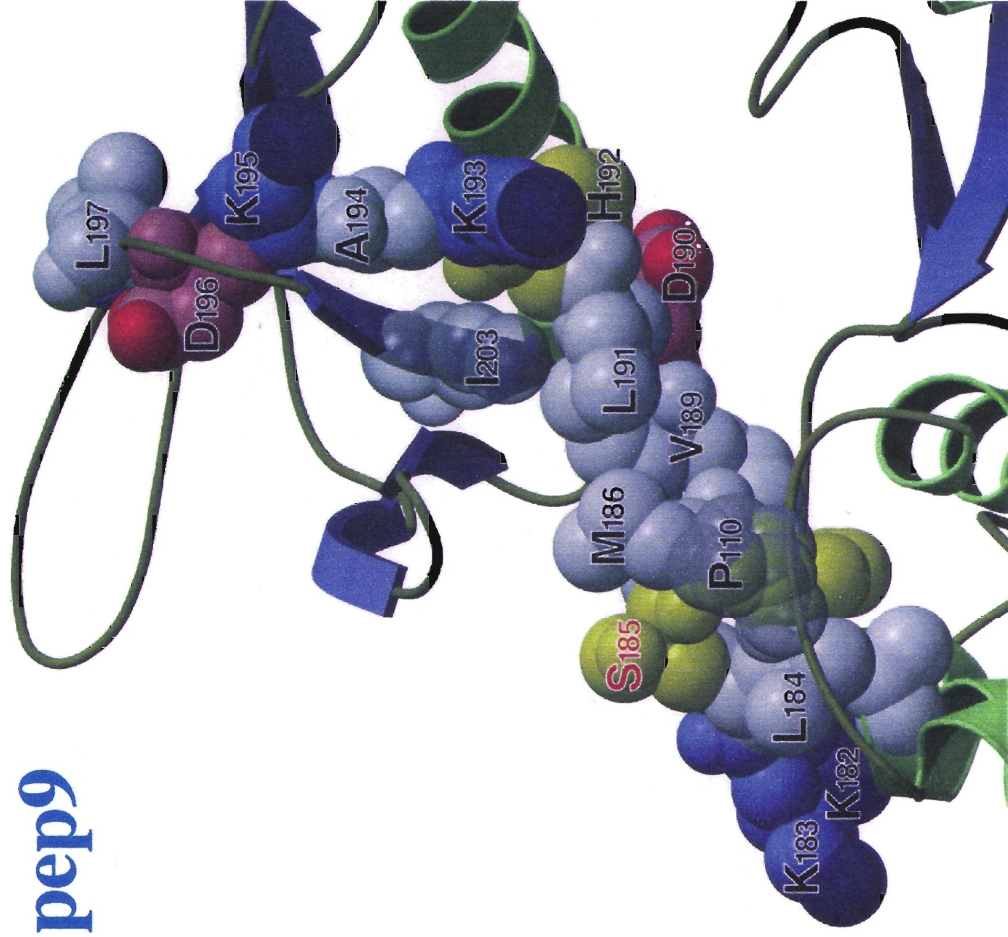


Fig.29



**Fig.30 Ribbon diagram, surface and density maps.** A, Ribbon diagram of 30kDa domain viewed perpendicular to the faces of the cloverleaf like structure showing the three lobes (N-lobe,  $\alpha$ -lobe and C-lobe) and their overall internal structure. B; Electric potential surface map of the molecule in the same orientation as in A.. B, Electric potential surface map of the molecule in the same orientation as in (A). The Ca<sup>2+</sup> insensitive CaM binding domain (indicated by the green arrow) contains predominantly hydrophobic residues and is an indentation located between the C-lobe and N-lobe.

pep9



pep11

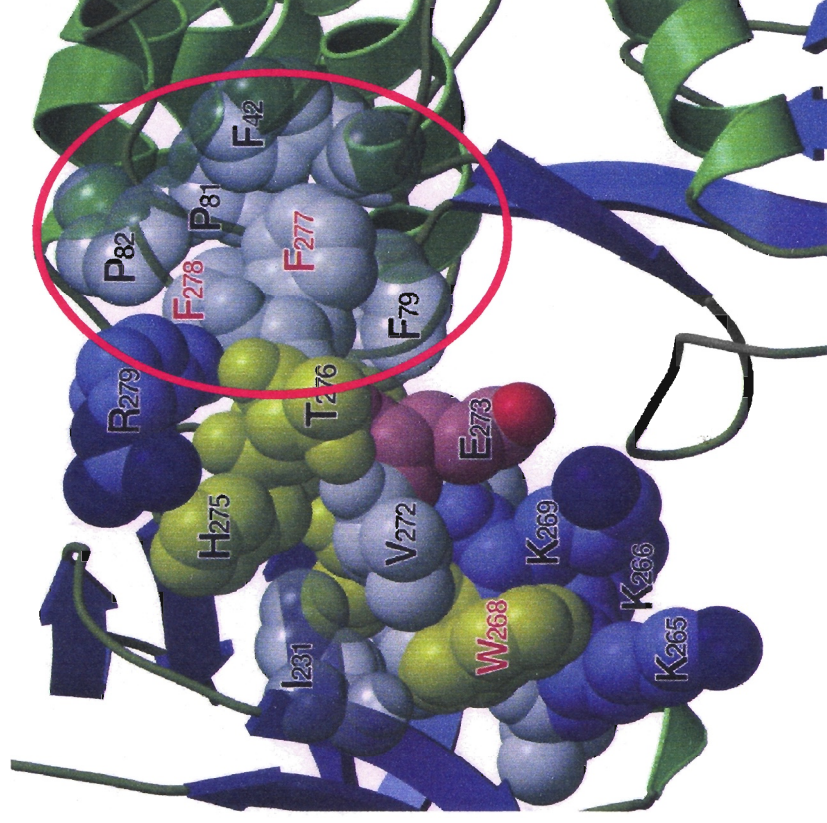


Fig.31 Space filling representations of CaM binding regions.



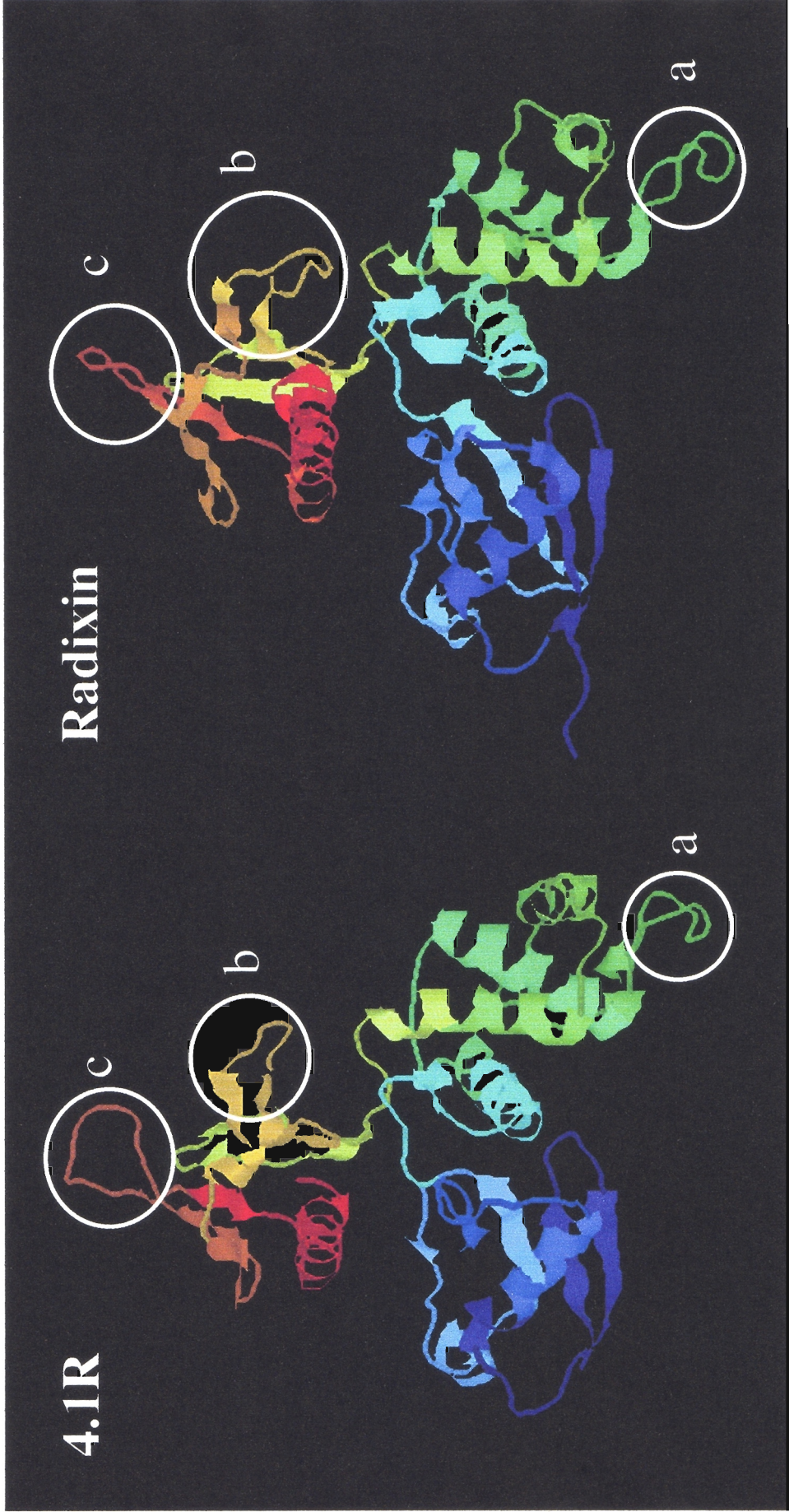


Fig.32 3D structures of 30kDa domain of 4.1R and FERM domain of radixin.

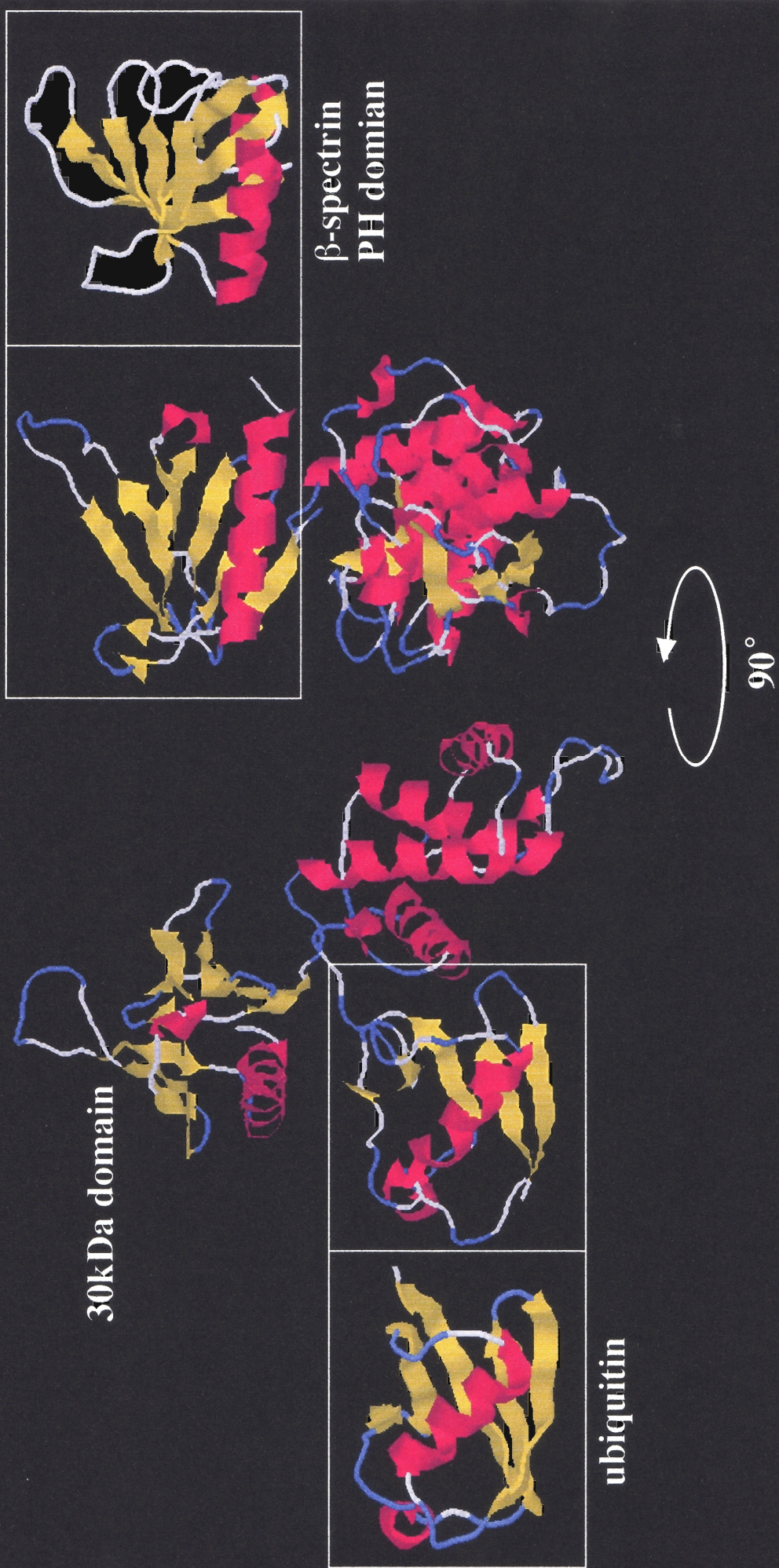


Fig.33 Similar structure presents in the different proteins.

(Amersham Bioscience) に組換えた。4.1R<sup>135</sup> は、tag 領域を欠失させた pET31 (Novagen) に組換えた塩基配列を確認後、大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) を形質転換した (4.1R<sup>135</sup> には tag は付加されていない)。LB 培地にて大腸菌を 37℃ 一定条件下で震盪培養し、OD600 の値が 0.4~0.8 に達した時に、IPTG を最終濃度 (1mM) 添加し、さらに 37℃ 一定条件下で 3 時間震盪培養した。pGEX-4T2 ベクターで形質転換した大腸菌は、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4℃、8 分間) 沈澱後、1mM EDTA、1mM DFP、1mM 2ME を添加した B-PER™ (PIERCE、USA) に懸濁し溶菌した。溶菌液は氷上 10 分間の超音波処理後、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間) の上清を得た。上清は、Glutathione-Sepharose (Amersham Biosciences) と懸濁し、GST 融合蛋白質を分離した。GST 融合蛋白質はトロンビン処理により標的蛋白質 (30kDa domain) と GST を切断した後、GST を Glutathione-Sepharose にて吸収し、30kDa domain を Q-Sepharose (Amersham Biosciences) で更に精製した。pET31b ベクターで形質転換した大腸菌は、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4℃、8 分間) 沈澱後、1mM DFP、を添加した PBS (第 1 項参照) に懸濁し、氷上 10 分間の超音波処理後、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間) の上清を得た。上清は、35% 硫酸沈澱後、Q-Sepharose、CaM-Sepharose により精製した。蛋白質の純度は SDS-PAGE にて検定した。蛋白質量は UV 法を用いた (280nm と 260nm を測定し、蛋白質濃度 (mg/ml) = 1.45 A<sub>280</sub> - 0.74 A<sub>260</sub>) 。

### 3. 反転膜小胞 (inside-out-vesicle: IOV) との結合解析

健康成人男性に対して、十分な実験趣旨の説明をした上で本人了承を得た上で、血液をヘパリン存在下で腕静脈から採取し、赤血球を分離した。赤血球は、5mM リン酸緩衝液による低張条件下で溶血し、ヘモグロビン等細胞内成分を除去し、所謂、赤血球膜ゴースト分画を得た。赤血球膜ゴーストは、1mM EDTA 溶液 (pH8.5) に懸濁し、遠心沈澱分画 (反転膜分画) を得た。

反転膜分画は、さらに、10mM NaOH、pH11 で処理し膜結合の蛋白質を変性除去し、PBS で十分に洗浄の後、結合解析に供した。本文では、この pH11 で処理した反転膜を IOV とした。総蛋白質量は、便宜上、牛血清アルブミンを標準としたブラッドフォード法（試薬は PIERCE 社、USA より購入）により測定した（目安の蛋白質量として用い、絶対量ではないことを認識の上で使用した）。種々の濃度の組換え 4.1R<sup>135</sup>（作製法は先に詳述）IOV と 37℃で 30 分間反応後、20%シュクロース溶液に懸濁液を重層し、ローター（RPR20-2）を用いて 18000rpm、30min、4℃で行い沈澱分画（IOV-蛋白質結合分画）を SDS-PAGE 用処理液に懸濁した。一定量のサンプルを SDS-PAGE に掛け、蛋白質染色（Coomasie Brilliant Blue G250）後、デンストメーター（KODAK EDAS290）で 4.1R<sup>135</sup> 及び Band 3（内部標準）の吸光度をコンピューター解析した。結果は、4.1R<sup>135</sup> の Band 3 に対する相対吸光度で評価した。Scatchard plot 解析は常法に従った。

#### 4. 細胞内強制発現

cDNA（4.1R<sup>135</sup> 及び HP30）を pEGFP ベクターに組み込み、塩基配列を確認後、大腸菌（*Escherichia coli*）DH5 $\alpha$ を形質転換した。大腸菌から無菌的にベクターを分離精製し、サブコンフルエントの COS7 細胞に導入試薬を用いて形質転換した。顕微鏡は、Zeiss LSM 510 confocal microscope を用いた。

#### 5. 蛋白質間の結合解析には IAsys™ を用いた。

蛋白質-蛋白質間および蛋白質ペプチド間の反応速度論的解析には、Affinity Sensor 社（ケンブリッジ、UK）の Resonant Mirror Detection (RMD)法による IAsys 装置を用いた（Fig.5 参照）。蛋白質或いはペプチドは、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4 緩衝液（0.1M NaCl を含む、以下 PBS と略記）に 100  $\mu$ g/ml の濃度に溶解しアミノシランキュベット上に、BS<sup>3</sup>（PIERCE 社、USA）を介して固相化した。ペプチドの固相化には、一旦アミノシランキュベット上に BSA を BS<sup>3</sup> で固相化したのち、NHS/EDC

にて BSA のアミノ基を活性化する方法(Nunomura, W., et al. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30322-30328)も併用した。反応には、10mM Tris HCl 緩衝液 pH7.5、0.1M NaCl (Buffer A) に対して 1mM EGTA 或いは 1mM EGTA と 2mM CaCl<sub>2</sub> を加えて用いた (Fig.2 参照)。キュベット内の反応温度は 25℃一定に保ち、一定速度で攪拌した。反応に関わるパラメーター (結合速度定数、解離速度定数、最大結合量) は専用解析ソフトを用いて計算した (Fig.5 参照)。平衡解離定数 ( $K_{(D)kin}$ ) は、結合速度定数 ( $k_a$ ) と解離速度定数 ( $k_d$ ) の比から以下の式で求めた。

$$K_{(D)kin} = k_d / k_a$$

( $K_{(D)kin}$ ) の値は、同じ測定で得られた結果から最大結合量の値を用いて Scatchard plot 解析を行い、両者を比較し合致性を検討した。本文での結果は、( $K_{(D)kin}$ ) の結果のみを  $K_{(D)}$  として表示した。

## 2. CaM-Sepharose への 4.1R 結合性の解析

CaM-Sepharose (Amersham Biosciences) のカラムを 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.1M NaCl と 1mM CaCl<sub>2</sub> 含有で十分に平衡化し、同緩衝液で透析平衡化した蛋白質溶液を添加した。カラムに結合した蛋白質は 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.1M NaCl と 5mM EGTA および 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.6M NaCl と 5mM EGTA で順次溶出した。

## 6. 水晶マイクロ発振子による結合測定

CaM と 4.1R<sup>135</sup> の結合比の解析には、直接分子の質量変化を測定できる水晶マイクロ発振子 (QCM™、イニシウム、日本。石井泉社長の御協力により機器を貸与して頂いた) を用いた。水晶マイクロ発振子への CaM の固相化は、使用説明書に従った。この時、CaM を段階的に水晶マイクロ発振子に加えながら、固相化状態をモニターし、結合量を決定した。

結合量は、以下の式から求めた。

$$\Delta F = C \cdot \Delta m$$

Cは定数、振動数の変化量はチップ上の全質量変化と比例する。1Hzの変化は30pgの変化に相当する。なお、4.1R<sup>135</sup>の分子量は理論計算により、93305.77、4.1R<sup>80</sup>の分子量は69940.65、CaMの分子量は16706を用いた。

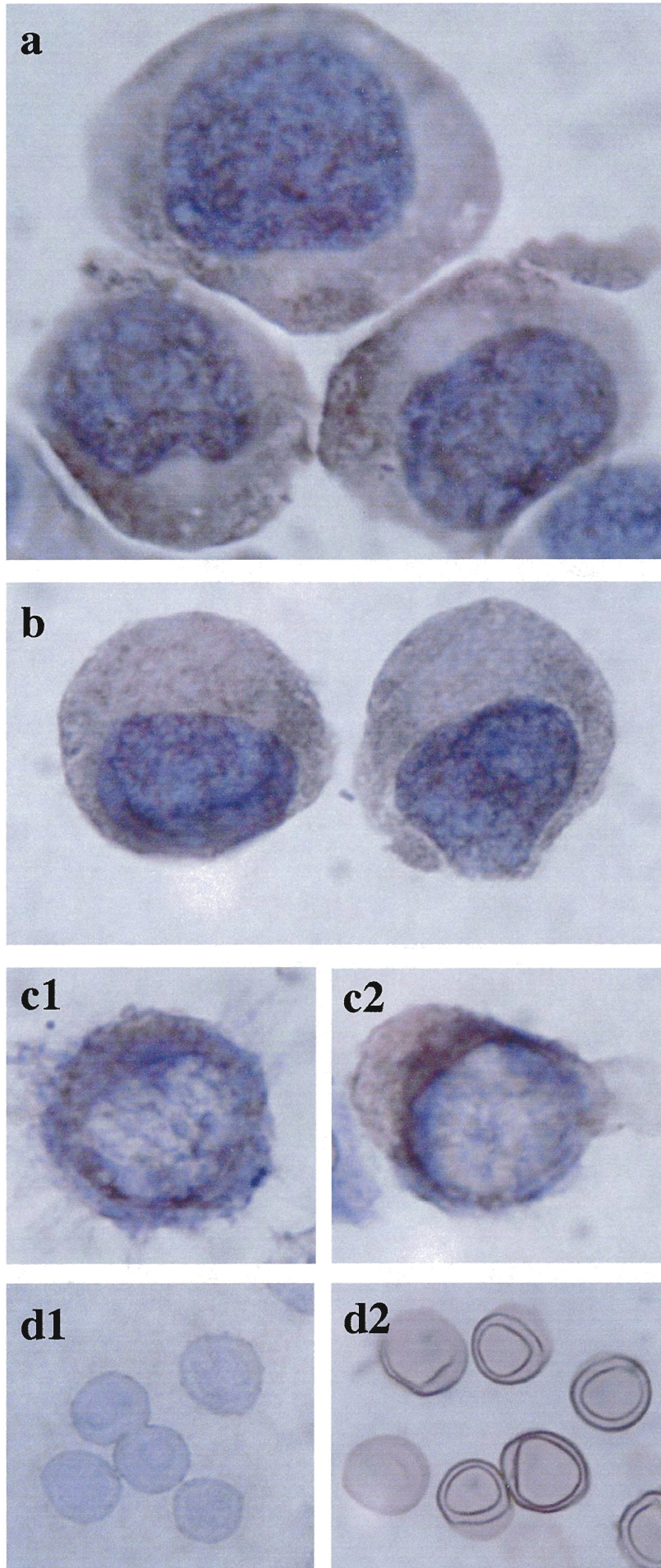
## [ 結果 ]

### 1) 赤芽球に於ける 4.1R<sup>135</sup> の膜局在

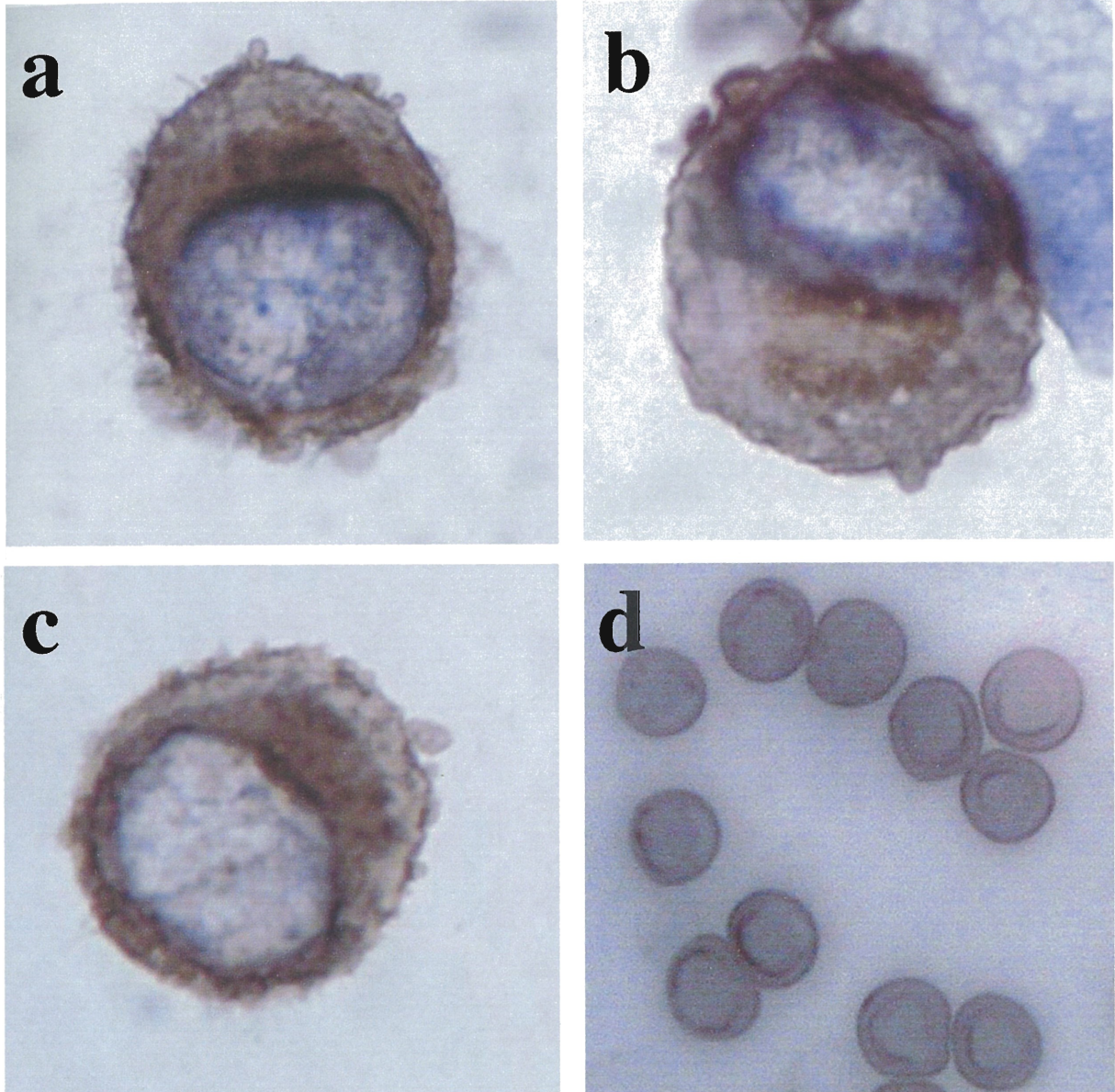
赤芽球は、培養後 14 日目で脱核し成熟赤血球に分化した。赤芽球培養 (Day0) で 4.1R<sup>135</sup> の細胞膜での局在が観察され (data not shown) 、Day3、Day5 では細胞膜近傍に観察された。この時、GPC の細胞膜局在が観察された (Fig.34) 。Day10 では、4.1R<sup>135</sup> は細胞膜での染色が薄くなり、代わりに 4.1R<sup>80</sup> が細胞膜に局在が観察された。成熟赤血球において、4.1R<sup>135</sup> は全く観察されなかったが、4.1R<sup>80</sup> は細胞膜に強く染色された (Fig.34) 。GPC は、Day0 から成熟赤血球に至まで細胞膜局在が観察された (Fig.35) 。Fig.には示さないが、Band 3 抗原も同様に Day5 以降に発現を認めた。4.1R<sup>135</sup> の細胞膜結合性が示唆されたので、4.1R<sup>135</sup> 及び 4.1R・HP30 を上皮細胞の COS7 で強制発現した時に、実際に細胞膜に集積することを確認した。Fig.36 に示したように、GFP との 4.1R<sup>135</sup> は、細胞膜に集積局在することから、確かに細胞膜に局在することが確認された。

### 2) IOV と 4.1R<sup>135</sup> の結合解析

赤芽球において、4.1R<sup>135</sup> は細胞膜での局在が観察され、また、同時に膜貫通蛋白質であり、4.1R<sup>80</sup>の結合蛋白質である GPC 及び Band 3 も細胞膜局在が観察されたことから、4.1R<sup>135</sup> は GPC 及び Band 3 と 4.1R<sup>80</sup>同様に結合すると予想された。この仮説を確認する為に、4.1R<sup>135</sup> と IOV の結合解析を行った。その



**Fig.34** 4.1R<sup>135</sup> expressed in erythroblasts. *a*, Day3; *b*, Day5; *c1* and *c2*, Day10; *d1* and *d2*, matured red blood cells. 4.1R<sup>135</sup> was showed in *a*, *b*, *c1* and *d1*, and 4.1R<sup>80</sup> in *c2* and *d2*.



**Fig.35 GPC expressed in erythroblasts.** Note that GPC strongly stained at the plasma membrane at Day5 (*a*), Day7 (*b*), Day10 (*c*) and matured red blood cells (*d*). x1000





**Fig.36 4.1R<sup>135</sup>-GFP transfected COS7 cells.** The recombinant fusion protein 4.1R<sup>135</sup>-GFP localized at the plasma membrane (arrow indicates 4.1R<sup>135</sup>-GFP).

結果、4.1R<sup>135</sup> は IOV と結合し、単相性あるいは2相性の結合を示した。強い結合は、平衡解離定数が約  $10^{-8}$  M (83nM) であり、弱い結合は平衡解離定数が約  $10^{-7}$  M (358nM) であった (Fig.37)。同様に 4.1R<sup>80</sup> と IOV の結合解析を行った処、1相性で平衡解離定数が約  $10^{-7}$  M の結合を示した (data not shown)。実験によって、単相性あるいは2相性の結合を示したのは、IOV を pH11 で処理したために、膜貫通蛋白質に変性が起きたと考えられた。より自然な条件で 4.1R<sup>135</sup> と膜蛋白質 (GPC、Band 3 及び p55) との結合解析を行う為に、IASys<sup>TM</sup>による反応速度論的解析を行い、4.1R<sup>80</sup> との比較を試みた。

## 2) 4.1R<sup>135</sup> と 膜蛋白質の結合

4.1R<sup>135</sup> と 4.1R<sup>80</sup> と膜蛋白質との IASys<sup>TM</sup>による反応速度論的解析結果を Table XVI に総括した。4.1R<sup>135</sup> と Band 3 との結合の平衡解離定数 ( $K_{(D)} = \sim 10^{-8}$  M) は 4.1R<sup>80</sup> よりも約 10 倍小さかった (親和性は高い)。4.1R<sup>135</sup> と GPC との平衡解離定数 ( $K_{(D)} = \sim 10^{-6}$  M) は、4.1R<sup>80</sup> と GPC との平衡解離定数 ( $K_{(D)} = \sim 10^{-7}$  M) よりも大きく親和性は低いことが明かとなった。一方、p55

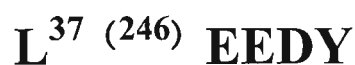
と 4.1R<sup>135</sup> あるいは 4.1R<sup>80</sup> との平衡解離定数はともに ( $K_{(D)} \approx 10^{-7}$  M) で違いを認めなかった。HP は、Band 3、GPC、p55 とは結合しなかったことから、HP は、30kDa domain の膜結合を制御 (Band 3 との結合を促進し、GPC との結合を抑制) することが示唆された。また、4.1R<sup>80</sup> とも結合しないことから、HP は、4.1R の内部結合に関与しないことが示された。一方、合成ペプチドを用いた実験報告 (Leclerc E. & Vetter S. (1998) *Eur. J. Biochem.* **258**, 567-571) から、HP は CaM と Ca<sup>2+</sup>依存性の結合をすることが知られていたが、本件研究の結果は、HP は CaM と Ca<sup>2+</sup>依存性の結合を示し、その平衡解離定数は  $\sim 10^{-8}$  M と 30kDa との結合よりも強いことが明らかになった。

**Table XVI. 4.1R<sup>135</sup> and 4.1R<sup>80</sup> binding to membrane proteins**

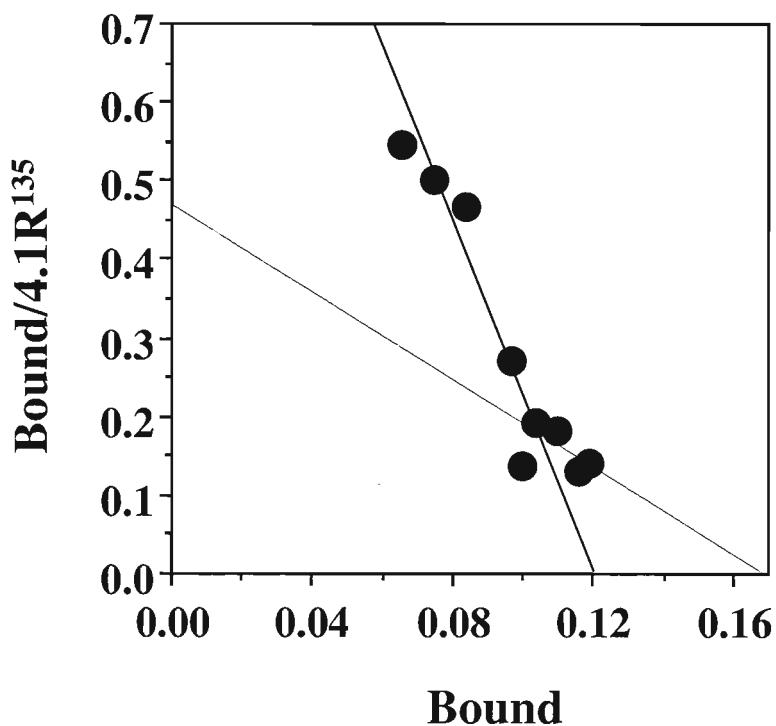
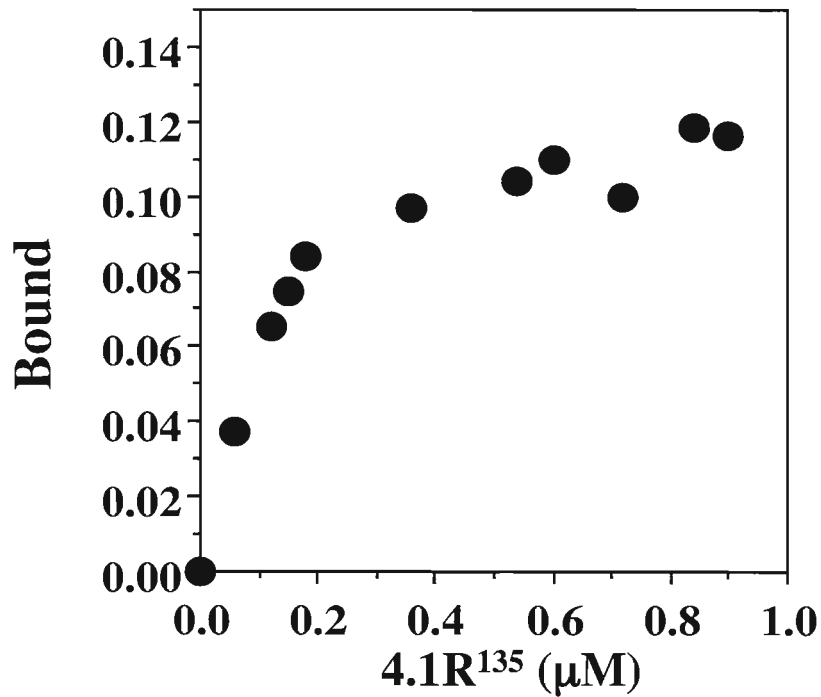
peptide	Ligand	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{(D)}$ (nM)
4.1R <sup>135</sup>	GPCcyt	9.1 x10 <sup>3</sup>	1.2 x10 <sup>-2</sup>	1319
4.1R <sup>80</sup>	GPC cyt	2.9 x10 <sup>5</sup>	2.7 x10 <sup>-2</sup>	93
4.1R <sup>135</sup>	Band 3 cyt	4.0 x10 <sup>5</sup>	6.1 x10 <sup>-3</sup>	15
4.1R <sup>80</sup>	Band 3 cyt	9.4 x10 <sup>4</sup>	1.4 x10 <sup>-2</sup>	205
4.1R <sup>135</sup>	p55	1.4 x10 <sup>5</sup>	1.7 x10 <sup>-2</sup>	121
4.1R <sup>80</sup>	p55	3.8 x10 <sup>4</sup>	3.6 x10 <sup>-2</sup>	95

The binding assay was carried out in TBS. From the binding curves obtained by RMD,  $k_a$ ,  $k_d$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.

HP 領域には、Band 3 結合モチーフである



とよく似たアミノ酸配列、



**Fig.37  $4.1R^{135}$  binding to inside-out-vesicle of human red blood cells.** Upper and Lower panels show the binding profile and Scatchard plot analysis, respectively. In Scatchard plot analysis, dot line shows possible 2nd phase. “Bound” is represented as the ratio of optical densities of  $4.1R^{135}$  to Band 3 on the SDS-PAGE measured by EDAS290 (KODAK, USA).

# $S^{95}$ EEEG · $L^{122}$ DEEI

**Table XVII. HP binding to membrane proteins and CaM**

Analyte	Ligand	$K_{(D)}$ (nM)
<b>HP</b>	<b>Band 3</b>	<b>No Binding</b>
	<b>GPC</b>	<b>No Binding</b>
	<b>p55</b>	<b>No Binding</b>
	<b>CaM (+EGTA)</b>	<b>No Binding</b>
	<b>CaM (+Ca<sup>2+</sup>)</b>	<b>73</b>
	<b>4.1R<sup>80</sup></b>	<b>No Binding</b>

The binding assay was carried out in Buffer A. From the binding curves obtained by RMD,  $k_d$ ,  $k_a$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.

が存在する。HP 自身は Band 3 とは結合しなかった (Table XVII)。これらのアミノ酸配列が直接、Band 3 結合モチーフとならないことは明らかであるが、立体構造上、L<sup>37 (246)</sup> EEDY モチーフとともに陽性荷電表面を形成し、Band 3 が 4.1R<sup>135</sup> が 4.1R<sup>80</sup> よりも強く結合したと推測される。現在、HP30 の結晶を作製中であり、X 線結晶構造解析によりこの疑問が解決されると期待される。

### 3) 4.1R<sup>135</sup> と CaM との結合

上記の結果を踏まえ、4.1R<sup>135</sup>、HP 及び IIP30 の CaM 結合性を CaM-Sepharose を用いたカラム法で検証した結果を Fig.38 に示した。HP は、GST 融合蛋白質として精製した後、トロンピンで両者を切断した混合液を CaM-Sepharose に添加した。GST はカラムを素通りしたが、HP はカラムに結合していた。HP は、5mM EGTA で溶出された (Fig.38A)。HP は、OD280 では殆ど検出されなかったが、SDS-PAGE では強く蛋白質染色された。この理由は、

HP ポリペプチド内に芳香族アミノ酸の含量が少ないことに起因していると考えられた。4.1R<sup>135</sup> 及び HP30 (data not shown) も同様に、Ca<sup>2+</sup> 存在下で CaM-Sepharose に結合し、5mM EGTA で溶出された (Fig.38B)。4.1R<sup>135</sup> を 5mM EGTA で CaM-Sepharose から溶出後、さらに 0.6M NaCl を添加したところ OD280 のピークの出現を認めたが、SDS-PAGE では蛋白質染色されなかった (Fig.38)。

CaM と 4.1R<sup>135</sup> の IAsys™ による結合解析の結果を Table VXIII に示した。4.1R<sup>135</sup> は CaM と Ca<sup>2+</sup> 存在下では平衡解離定数  $K_{(D)}=6.9 \times 10^{-8}M$  で結合したが、EGTA 存在下では、その親和性は  $K_{(D)}=6x \sim 10^{-6}M$  であった。以上の結果は、4.1R<sup>135</sup> 及び HP は、Ca<sup>2+</sup> 存在下で CaM-Sepharose と結合し、EGTA で溶出された結果と矛盾しないと判断した。

**Table VXIII 4.1R<sup>135</sup> binding to CaM**

Analyte	Condition	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{(D)}$ (nM)
4.1R <sup>135</sup>	EGTA	2.6 x10 <sup>3</sup>	1.5 x10 <sup>-2</sup>	5769
	Ca <sup>2+</sup>	2.1 x10 <sup>5</sup>	1.1 x10 <sup>-2</sup>	69
4.1R <sup>80</sup>	EGTA	7.8 x10 <sup>4</sup>	1.6 x10 <sup>-2</sup>	205
	Ca <sup>2+</sup>	2.3 x10 <sup>5</sup>	2.3 x10 <sup>-2</sup>	100

The binding assay was carried out in Buffer A. From the binding curves obtained by RMD,  $k_d$ ,  $k_a$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.

QCM™ による測定結果から、CaM と 4.1R<sup>135</sup> は 1 : 1 で Ca<sup>2+</sup> 依存性の結合をすることが確認された。4.1R<sup>80</sup> は、CaM と 1 : 1 で Ca<sup>2+</sup> 非依存性の結合をすることが確認された (Fig.39)。CaM は優位に HP に結合すると結論した。

HP 領域における CaM 結合配列は、合成ペプチドを用いた実験結果から、



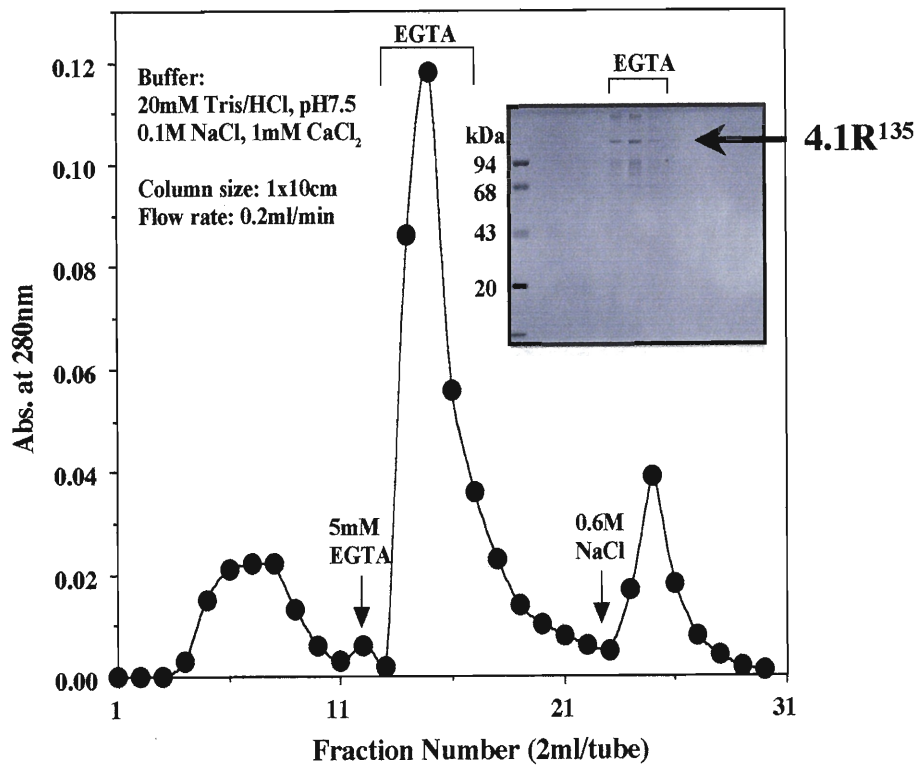
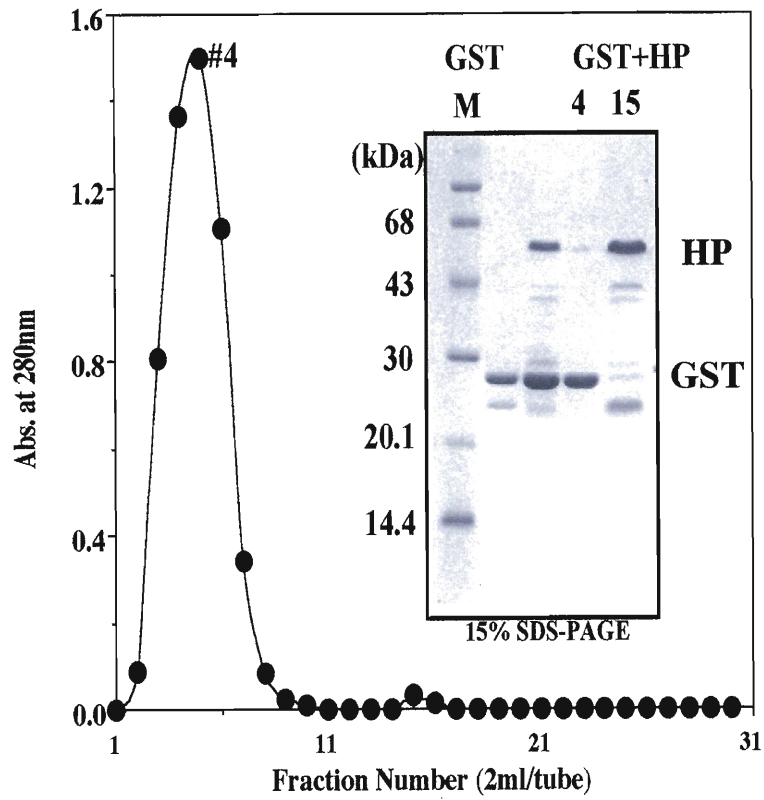
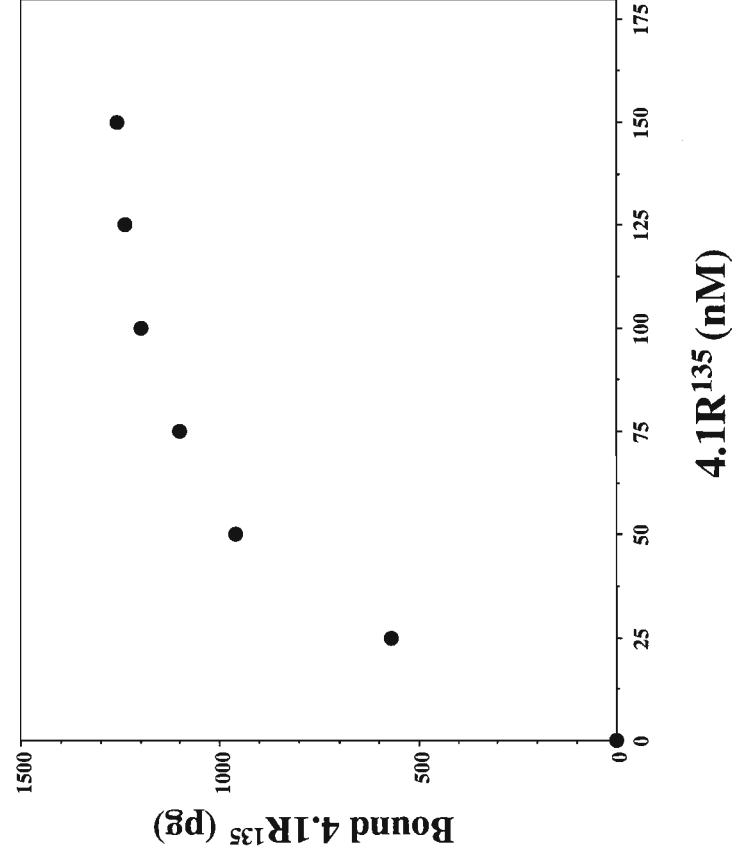
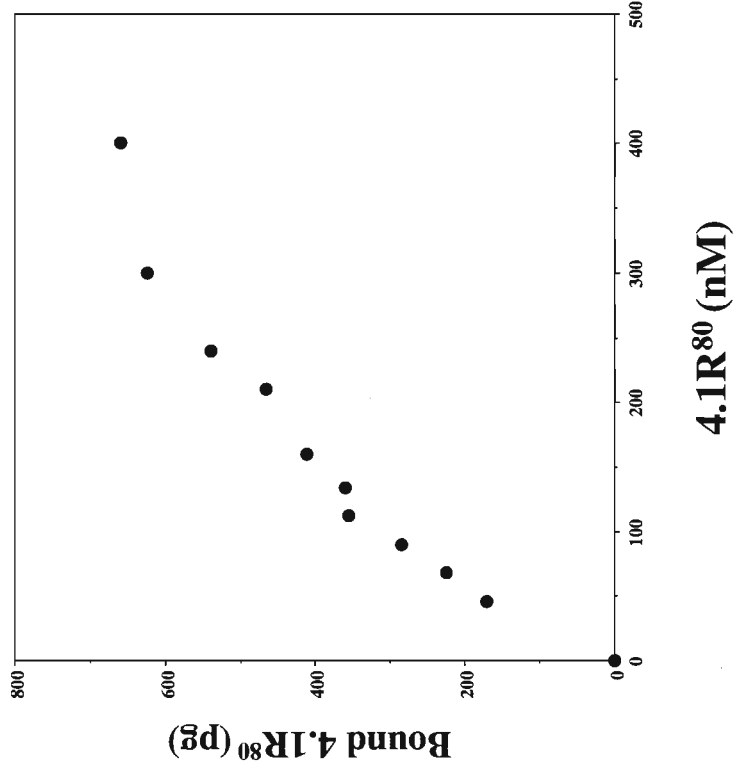
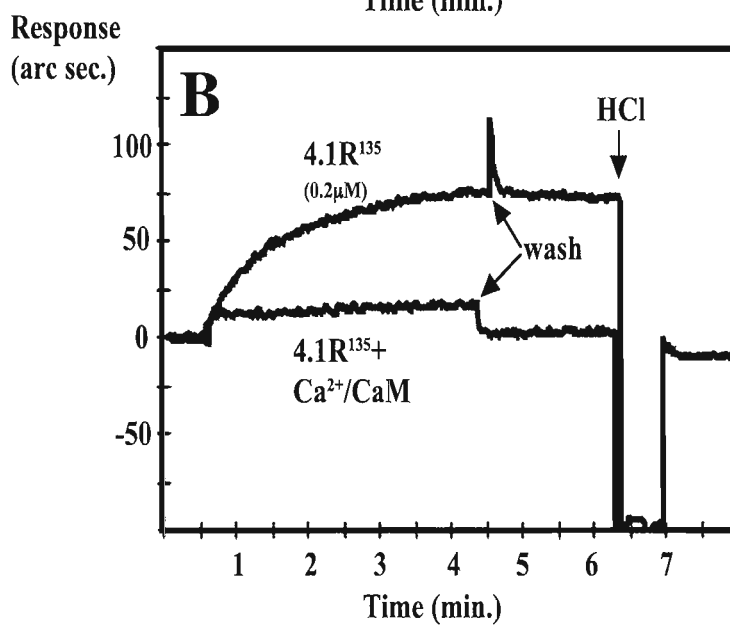
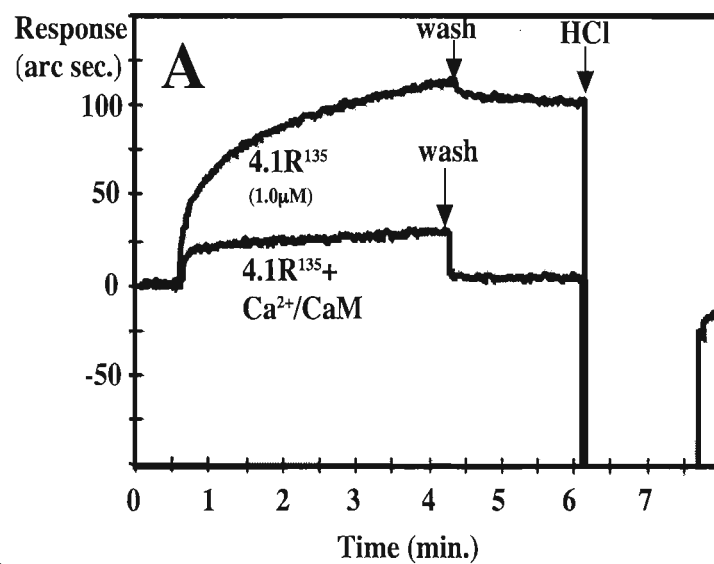


Fig.38 HP and 4.1R<sup>135</sup> binding to CaM-Sepharose in the presence of Ca<sup>2+</sup>.



**Fig.39 QCM™ analysis of 4.1R<sup>80</sup> and 4.1R<sup>135</sup> binding to CaM.** CaM immobilized on the sensor tip according to the instruction book. 1.23 x10<sup>-14</sup> mol of 4.1R<sup>80</sup> (A) and 1.33 x10<sup>-14</sup> mol of 4.1R<sup>135</sup> (B) bound to 1.57 x10<sup>-14</sup> mol of CaM immobilized on the sensor tip. The binding ratio was of CaM : 4.1R<sup>80</sup> was calculated 1 : 1.23 and that of CaM : 4.1R<sup>135</sup> was 1 : 1.20.



**Fig.40** Ca<sup>2+</sup>/CaM inhibits 4.1R<sup>135</sup> binding to cytoplasmic domain of GPC (GPCcyt, *A*) and p55 (*B*).



であることが報告されている (Leclerc E. & Vetter S. (1998) *Eur. J. Biochem.* 258:567-571)。下線は、リン酸化されるセリン残基を示している。合成ペプチドを用いた実験結果から、このセリン残基がリン酸化されると CaM の親和性が低下することが報告されている。抗リン酸化セリン抗体を用いて、生体内でのリン酸化を証明することが期待される。本研究でセリン残基が  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の CaM 結合に重要であることを明らかにしたが、IIP の CaM 結合においても同様にセリン残基が重要であることが予想される。

## **A<sup>181</sup>KKLSMYGVDLHKAKD**

(4.1R<sup>80</sup> の 30kDa domain における  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の CaM 結合配列)

### 4) $\text{Ca}^{2+}$ /CaM による 4.1R<sup>135</sup> の膜蛋白質結合の制御

以上までに、4.1R<sup>135</sup> は  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で CaM に結合することを明らかにした。組換え 30kDa domain は、GPC の細胞内 domain と平衡解離定数  $1.8 \times 10^{-7}$  M で結合した。CaM と 4.1R<sup>135</sup> 複合体 (モル比 5 : 1 以上) は  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下では、GPC の細胞内 domain と平衡解離定数  $2 \times 10^{-6}$  M で結合したが、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下では、GPC の細胞内 domain とは全く結合しなかった (Fig.40A)。また、組換え 30kDa domain は、p55 と平衡解離定数  $4.4 \times 10^{-7}$  M で結合した。CaM と 4.1R<sup>135</sup> の複合体 (モル比 5 : 1 以上) は  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下では、p55 と平衡解離定数  $4.1 \times 10^{-7}$  M で結合したが、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下では、p55 とは全く結合しなかった (Fig.40B)。CaM と 4.1R<sup>135</sup> の複合体 (モル比 5 : 1 以上) は  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下では、Band 3 の細胞内 domain と平衡解離定数  $1.5 \times 10^{-7}$  M で結合したが、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下では、Band 3 の細胞内 domain と平衡解離定数  $3.9 \times 10^{-6}$  M で結合した。この変化は、結合速度定数の低下により平衡解離定数の増加 (親和性の低下) が起きたことから、4.1R<sup>135</sup> は、 $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 結合することにより、立体構造或いは表面荷電の変化にともなって、Band 3 の細胞内 domain と結合し難くなったと考察される。最大結合量が

Ca<sup>2+</sup> 非存在下（100%の結合量とする）での半分の結合量になる Ca<sup>2+</sup> 濃度は大凡 10<sup>-7</sup> M であり、細胞内での Ca<sup>2+</sup> 濃度と一致していた (Fig.41)。

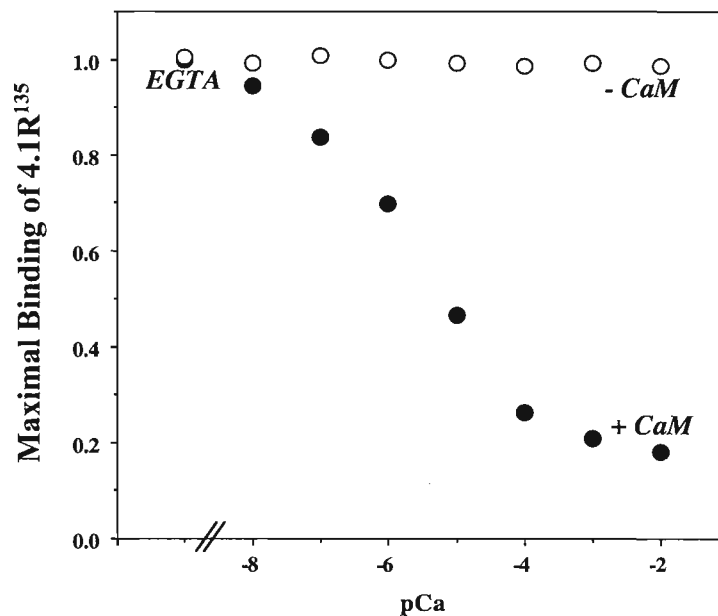
この CaM の Ca<sup>2+</sup>存在下での完全な結合抑制は、4.1R<sup>135</sup> は細胞内 Ca<sup>2+</sup>の上昇により、細胞膜蛋白質と完全に解離すると推察される。4.1R<sup>135</sup> が細胞内で、4.1R<sup>80</sup>同様に spectrin/actin filament と結合している実験的証拠はない

**Table XIX. Effect of Ca/CaM on 4.1R<sup>135</sup> binding to Band 3**

Analyte	Condition	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{(D)}$ (nM)
4.1R <sup>135</sup>	EGTA	4.0 x10 <sup>5</sup>	6.1 x10 <sup>-3</sup>	15
	Ca <sup>2+</sup>	2.1 x10 <sup>5</sup>	8.1 x10 <sup>-3</sup>	39
4.1R <sup>135</sup> +CaM	EGTA	5.1 x10 <sup>5</sup>	6.4 x10 <sup>-3</sup>	13
	Ca <sup>2+</sup>	1.1 x10 <sup>4</sup>	1.2 x10 <sup>-2</sup>	1100

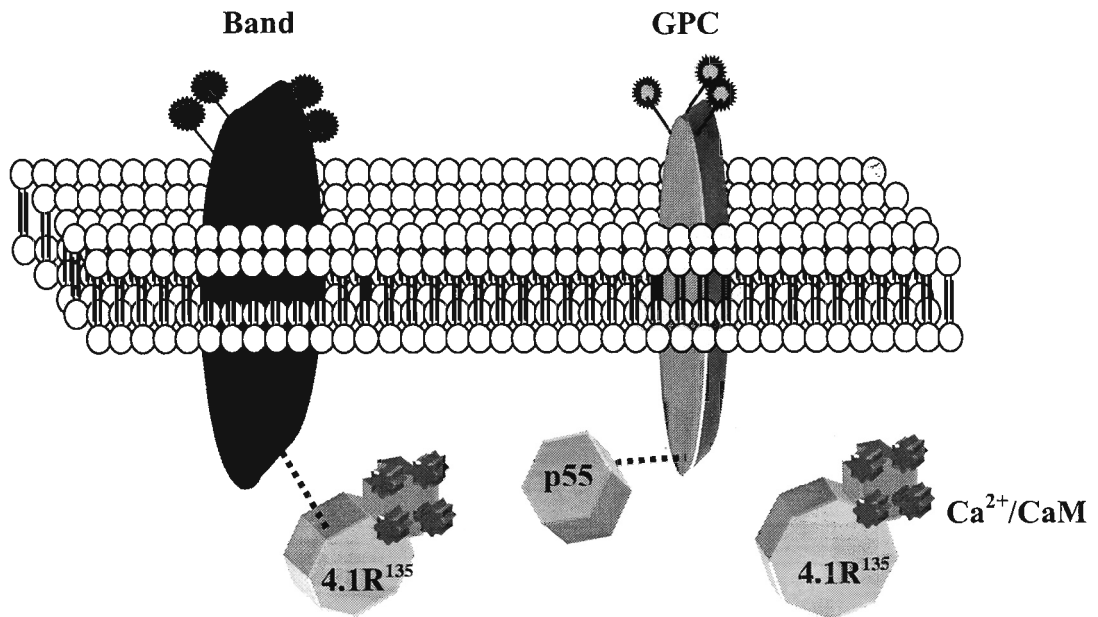
The binding assay was carried out in Buffer A. From the binding curves obtained by RMD,  $k_b$ ,  $k_a$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.

が、アミノ酸配列から結合する可能性は充分にあると言って良い。4.1R<sup>135</sup> が spectrin/actin filament と結合しているとすれば、細胞膜裏打ち構造が、Ca<sup>2+</sup> の上昇により 4.1R<sup>135</sup> を中心に解体されると推察される。4.1R<sup>80</sup> は、本研究で明らかにしたように強固に GPC-p55 と三者複合体を形成しており、仮に、細胞内 Ca<sup>2+</sup>が上昇したしても三者複合体のそれぞれの結合が 1/10 に変化するだけで、三者複合体は尚、維持されると想定される、成熟赤血球において、毛細血管の通過等に伴い一過性に細胞内 Ca<sup>2+</sup>が上昇しても膜裏打ち構造の結合自体は変化せずに、膜構造を維持すると考えられる。一方、赤芽球が脱核をする時には核の放出にともなって細胞膜裏打ち構造の弛緩がおけると想定される。この時、Ca<sup>2+</sup> の上昇あれば 4.1R<sup>135</sup> は CaM を介して完全に細胞膜から解離し、細胞膜裏打ち構造が弛緩できると推察される。



**Fig. 41.  $\text{Ca}^{2+}$  concentration dependence of protein 4.1R<sup>135</sup> binding to cytoplasmic domain of Band 3.** 4.1R<sup>135</sup> binding to cytoplasmic domain of Band 3 was measured at various concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  either in the presence of 5  $\mu\text{M}$  CaM (represented as +CaM) or in the absence of CaM (represented as -CaM).  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations were maintained by  $\text{Ca}^{2+}$ /EGTA buffer system. The maximal extent of binding under different experimental conditions was quantitated as described under "Experimental Procedures". Maximal binding in the presence of EGTA was used to normalize the extent of binding under different experimental conditions. *pCa* represents ionized  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. The extent of 4.1R<sup>135</sup> binding to cytoplasmic domain of Band 3 is plotted as a function of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration.

[まとめ]



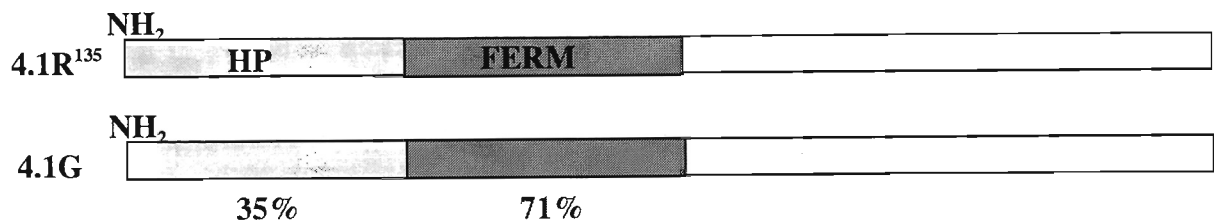
**Fig.42 Proposed model of  $\text{Ca}^{2+}$  regulation  $4.1\text{R}^{135}$  binding to membrane proteins through CaM interaction.**

非赤血球及び赤芽球に発現する  $4.1\text{R}^{135}$  は成熟赤血球型  $4.1\text{R}^{80}$  と同様に、赤血球 PDZ 蛋白質 p55 と平衡解離定数  $\sim 10^{-7}$  M で結合した。赤血球膜貫通蛋白質である GPC 及び Band 3 の細胞内 domain とは各々、平衡解離定数  $\sim 10^{-6}$  M 及び  $\sim 10^{-8}$  M で結合した。CaM は、 $4.1\text{R}^{135}$  の HP 領域に  $\text{Ca}^{2+}$  依存性に平衡解離定数  $\sim 10^{-8}$  M で結合し、p55 と GPC との結合を完全に抑制した。

## 第 5 項 160kDa 型 protein 4.1G の細胞膜との結合解析.

### [ 目的 ]

赤芽球では、4.1R のアイソフォーム 4.1G の発現は予測されていたが実際の観察報告はなく、また、その膜蛋白質との相互作用は不明である。一方、4.1R<sup>135</sup> と 4.1G は、共に膜結合をする 30kDa FERM domain の N 末端部に 209 アミノ酸残基 (head-piece、HP) のポリペプチドが付加されている。本研究では、4.1G の細胞内局在と細胞膜蛋白質との分子間相互作用を解析し 4.1R<sup>135</sup> と比較した。



**Fig.43 Primary structure of 4.1R<sup>135</sup> and 4.1G.** 4.1G is one of 4.1R Isoform that expresses in general. The amino acid sequences of HP and FERM in 4.1G are identical 35% and 71%, respectively. HP region is containing 209 amino acids.

### [ 材料と方法 ]

#### 2. 赤芽球の培養

赤芽球の培養及び免疫染色は、秋田大学医学部内科学澤田賢一教授との共同研究で行われた。

ヒト抹消血から分離した血液幹細胞を培養して CD34 陽性細胞を得た。さらにエリスロポエチンの添加により赤芽球に分化誘導した。CD34 陽性細胞を得た時を Day 0 として脱核するまで経時的に細胞を採取した。細胞は固定後、内因性のペルオキシダーゼを 3% 過酸化水素水 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 処理により不活性化し、一次抗体として、家兎抗 4.1G Exon16 領域抗体を反応させた。西

洋ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体を反応させ、diaminobenzidine (DAB) で発色可視化した。

## 2. 組換え蛋白質の作製

組換え 4.1G の 30kDa domain、Band 3、GPC 及び p55 の細胞内 domain の作製と CaM の精製は第 1 項に記載した。4.1G の HP 及び HP+30kDa domain (以下 GHP30) は GST fusion protein として大腸菌に発現させた。cDNA (4.1G) から、HP 及び HP30 領域を *EcoRI* 及び *Sall* 制限酵素切断部位を付加した特異プライマーによる PCR で増幅し、pGEX-4T2 ベクター (Amersham Biosciences) に組換えた。4.1G は、tag 領域を欠失させた pET31 (Novagen) に組換えた塩基配列を確認後、大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) を形質転換した (4.1G には tag は付加されていない)。LB 培地にて大腸菌を 37°C 一定条件下で震盪培養し、OD600 の値が 0.4~0.8 に達した時に、IPTG を最終濃度 (1mM) 添加し、さらに 37°C 一定条件下で 3 時間震盪培養した。pGEX-4T2 ベクターで形質転換した大腸菌は、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4°C、8 分間) 沈澱後、1mM EDTA、1mM DFP、1mM 2ME を添加した B-PER™ (PIERCE、USA) に懸濁し溶菌した。溶菌液は氷上 10 分間の超音波処理後、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間) の上清を得た。上清は、Glutathione-Sepharose (Amersham Biosciences) と懸濁し、GST 融合蛋白質を分離した。GST 融合蛋白質はトロンビン処理により標的蛋白質と GST を切断した後、GST を Glutathione-Sepharose にて吸収し、Q-Sepharose (Amersham Biosciences) で更に精製した。pET31b ベクター (4.1G) で形質転換した大腸菌は、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4°C、8 分間) 沈澱後、1mM DFP、を添加した PBS (第 1 項参照) に懸濁し、氷上 10 分間の超音波処理後、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間) の上清を得た。上清は、35% 硫酸沈澱後、Q-Sepharose、CaM-Sepharose により精製した。蛋白質の純度は SDS-

PAGEにて検定した。蛋白質量はUV法を用いた（280nmと260nmを測定し、蛋白質濃度 (mg/ml) =  $1.45 A_{280} - 0.74 A_{260}$ ）。

### 3. 反転膜小胞 (inside-out-vesicle: IOV) との結合解析

健康成人男性に対して、十分な実験趣旨の説明をした上で本人了承を得た上で、血液をヘパリン存在下で腕静脈から採取し、赤血球を分離した。赤血球は、5mM リン酸緩衝液の低張条件下で溶血し、ヘモグロビン等細胞内成分を除去し、所謂赤血球膜ゴースト分画を得た。赤血球膜ゴーストは、1mM EDTA 溶液 (pH8.5) に懸濁し、遠心沈澱分画（反転膜分画）を得た。反転膜分画は、さらに、10mM NaOH、pH11で処理し膜結合の蛋白質を変性除去し、PBSで十分に洗浄の後、結合解析に供した。本文では、このpH11で処理した反転膜をIOVとした。総蛋白質量は、便宜上、牛血清アルブミンを標準としたブラッドフォード法（試薬はPIERCE社、USAより購入）により測定した（目安の蛋白質量として用い、絶対量ではないことを認識の上で使用した）。種々の濃度の組換え4.1R<sup>135</sup>（作製法は先に詳述）IOVと37℃で30分間反応後、20%シュクロース溶液に懸濁液を重層し、ローター（RPR20-2）を用いて18000rpm、30min、4℃で行い沈澱分画（IOV-蛋白質結合分画）をSDS-PAGE用処理液に懸濁した。一定量のサンプルをSDS-PAGEに掛け、蛋白質染色（Coomassie Brilliant Blue G250）を行った。

### 4. 細胞内強制発現

cDNA（4.1R<sup>135</sup>及びHP30）をpEGFPベクターに組み込み、塩基配列を確認後、大腸菌（*Escherichia coli*）DH5 $\alpha$ を形質転換した。大腸菌から無菌的にベクターを分離精製し、サブコンフルエントのCOS7細胞に導入試薬を用いて形質転換した。顕微鏡は、Zeiss LSM 510 confocal microscopeを用いた。

## 5. 蛋白質-蛋白質間の結合解析。

蛋白質-蛋白質間および蛋白質ペプチド間の反応速度論的解析には、Affinity Sensor 社（ケンブリッジ、UK）の Resonant Mirror Detection (RMD)法による IAsys 装置を用いた（Fig.5 参照）。蛋白質或いはペプチドは、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4 緩衝液（0.1M NaCl を含む、以下 PBS と略記）に 100 μg/ml の濃度に溶解しアミノシランキュベット上に、BS<sup>3</sup>（PIERCE 社、USA）を介して固相化した。ペプチドの固相化には、一旦アミノシランキュベット上に BSA を BS<sup>3</sup> で固相化した後、NHS/EDC にて BSA のアミノ基を活性化する方法も併用した。反応には、10mM Tris HCl 緩衝液 pH7.5、0.1M NaCl（Buffer A）に対して 1mM EGTA 或いは 1mM EGTA と 2mM CaCl<sub>2</sub> を加えて用いた（Fig.2 参照）。キュベット内の反応温度は 25℃一定に保ち、一定速度で攪拌した。反応に関わるパラメーター（結合速度定数、解離速度定数、最大結合量）は専用解析ソフトを用いて計算した（Fig.5B 参照）。平衡解離定数 ( $K_{(D)kin}$ ) は、結合速度定数 ( $k_a$ ) と解離速度定数 ( $k_d$ ) の比から以下の式で求めた。

$$K_{(D)kin} = k_d / k_a$$

（本文中では、平衡解離定数は  $K_{(D)}$  で表示した）。

## 3. CaM-Sepharose への 4.1R 結合性の解析

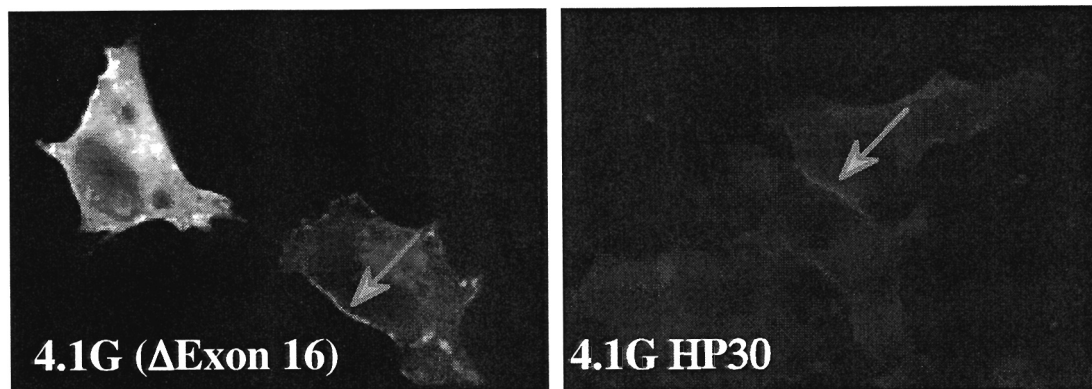
CaM-Sepharose（Amersham Biosciences）のカラムを 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.1M NaCl と 1mM CaCl<sub>2</sub> 含有で十分に平衡化し、同緩衝液で透析平衡化した蛋白質溶液を添加した。カラムに結合した蛋白質は 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.1M NaCl と 5mM EGTA および 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.6M NaCl あるいは 5mM EGTA で順次溶出した。



## [ 結果 ]

### 1) 赤芽球に於ける 4.1G の細胞膜局在

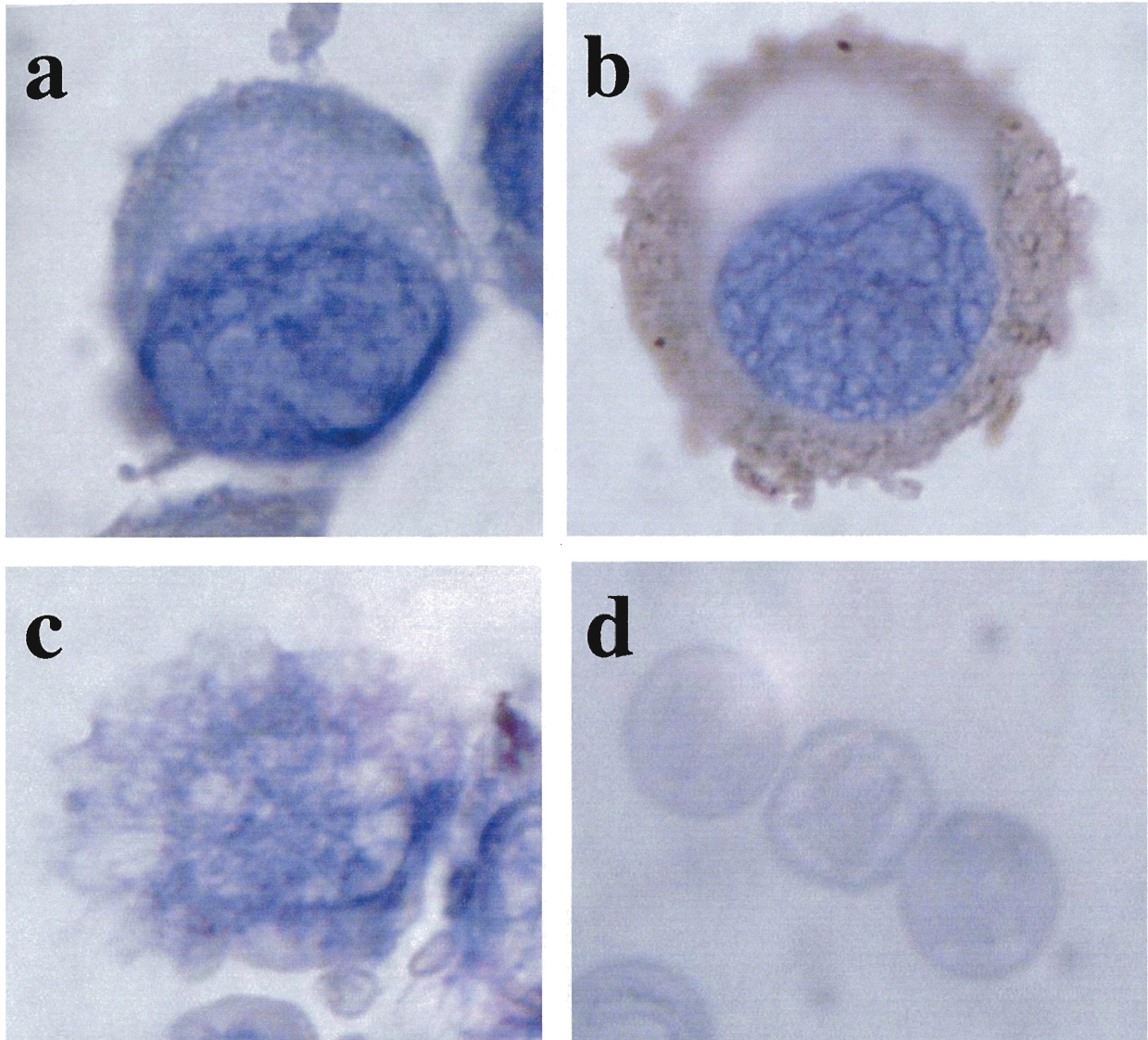
赤芽球培養 (Day7) で 4.1G の細胞膜での局在が観察されたが、Day5 以前、Day10 以降では全く観察されなかった (Fig.44)。Day 7 では、GPC は細胞膜で染色された (Fig.34)。4.1G の細胞膜結合性が示唆されたので、4.1G 及び 4.1G・HP30 を上皮細胞の COS7 で強制発現した時に、実際に細胞膜に集積することを確かめた。Fig.45 に示したように、GFP との 4.1G 及び 4.1G・HP30 は、細胞膜に集積局在することから、確かに細胞膜に局在することが確認された (但し、COS7 細胞内での実際の 4.1G が標的とする膜蛋白質は同定されていない。この実験では、Exon16 欠失蛋白質を用いているので少なくとも Spectrin/actin filament への結合ではない。また、HP30 は CTD がある種の受容体と結合するとの報告も有るが、HP30 は細胞膜へ集積した)。



**Fig.45 4.1G and 4.1G HP30 located at the plasma membrane of COS7 cell.**

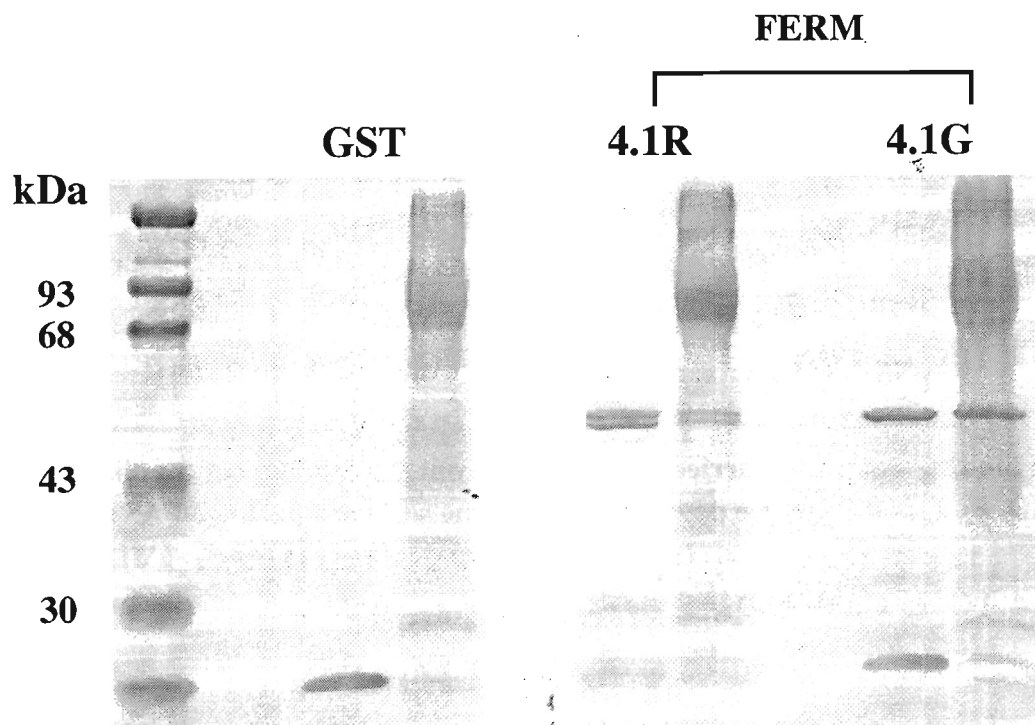
### 2) IOV と 4.1G の結合解析

赤芽球において、4.1G は一過性に細胞膜での局在が観察された。4.1G と IOV の結合解析を行った。その結果、4.1G FERM domain は、4.1R FERM



**Fig. 44. Expression of 4.1G in erythroblasts.** Note that 4.1G expressed at the Day7 (*b*) but not Day5 (*a*), Day10(*c*) and matured red blood cells (*d*). x1000

domain と同様に IOV と結合した。GST は IOV に結合しなかった。上記の結果を踏まえ、4.1G と膜蛋白質（GPC、Band 3 及び p55）との IAsys™による速度論的解析を行った。



**Fig.46 FERM (30kDa) domain of 4.1R and 4.1G bound to IOV.** IOV and GST fusion protein was incubated at 37C for 30 min. The IOV separated and put into SDS-PAGE. In each right lane showed IOV binding FERM domain and in each left lanes showed in put protein as control. Note that GST fusion protein of 4.1G FERM domain was bound to IOV as well as 4.1R FER domain. GST, as a negative control, did not precipitated with IOV.

## 2) 4.1G と 膜蛋白質の結合

IAsys™による 4.1G と膜蛋白質との速度論的解析結果を Table XX に総括した。4.1G と GPC、Band 3、p55 との結合の平衡解離定数はいずれも  $K_{(D)} \sim 10^{-7}$  M であった。また、4.1G FERM domain と GPC、Band 3、p55 との結合

の平衡解離定数はいずれも  $K_{(D)} \sim 10^{-7}$  M であった (data not shown) 。4.1G の HP は、Band 3、GPC、p55 とは結合しなかったことから、HP は、FERM domain の膜結合を制御しないことが明らかになった。

**Table XX. 4.1G binding to membrane proteins**

Ligand	$k_a$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_{(D)}$ (nM)
GPC cyt	$5.6 \times 10^4$	$9.1 \times 10^{-3}$	167
Band3 cyt	$2.4 \times 10^4$	$1.9 \times 10^{-2}$	458
p55	$4.7 \times 10^4$	$8.5 \times 10^{-2}$	181

The binding assay was carried out in TBS. From the binding curves obtained by RMD,  $k_a$ ,  $k_d$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.

### 3) 4.1G と CaM との結合

上記の結果を踏まえ、4.1G の CaM 結合性を CaM-Sepharose を用いたカラム法で検証した。4.1G 及び HP30 (data not shown) も同様に、 $Ca^{2+}$  存在下で CaM-Sepharose に結合し、5mM EGTA で溶出された (Fig.47B) 。HP は、GST 融合蛋白質として精製した後、トロンピンで両者を切断した混合液を CaM-Sepharose に添加した。GST はカラムを素通りしたが、HP はカラムに結合していた。HP は、5mM EGTA で溶出された (data not shown) 。

CaM と 4.1G の IAsys™ による結合解析の結果を Table XXI に示した。4.1G は CaM と  $Ca^{2+}$  存在下では平衡解離定数： $K_{(D)} = 54$  nM で結合したが、EGTA 存在下では、その平衡解離定数は  $K_{(D)} = 22$  nM であった。以上の結果は、4.1G は、 $Ca^{2+}$  存在下で CaM-Sepharose と結合し、EGTA で溶出された結果と矛盾しないと判断した。HP を除いた 4.1G の 30kDa domain は、CaM と平衡解離定数： $K_{(D)} \sim 10^{-7}$  M で結合した (data not shown) 。4.1G の CaM 結合部位は未定であるが、4.1R<sup>135</sup> の HP と似たアミノ酸配列が存在した (Fig.48 A) 。

**A.**

**Bacteria Lysate: 1**



35% ppt: **2**, (after dialysis: **3**)

50% ppt: **4**

50% sup: **5**

↓  
**Q Sepharose: 6**

50mM TB, pH7.5,

1mM EDTA

0.1M-0.6M NaCl

↓  
**CaM Sepharose**

50mM TB, pH7.5,

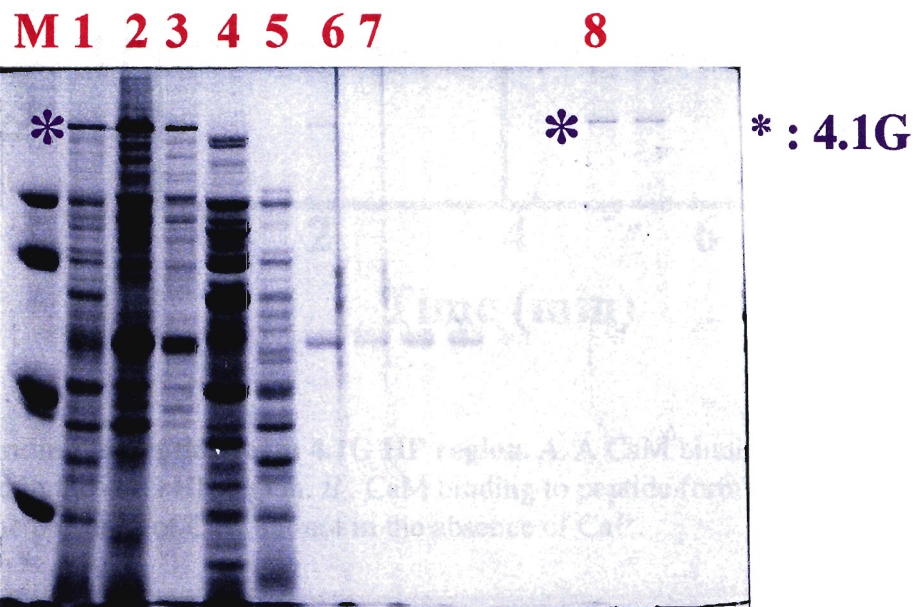
1mM EDTA

0.1M NaCl

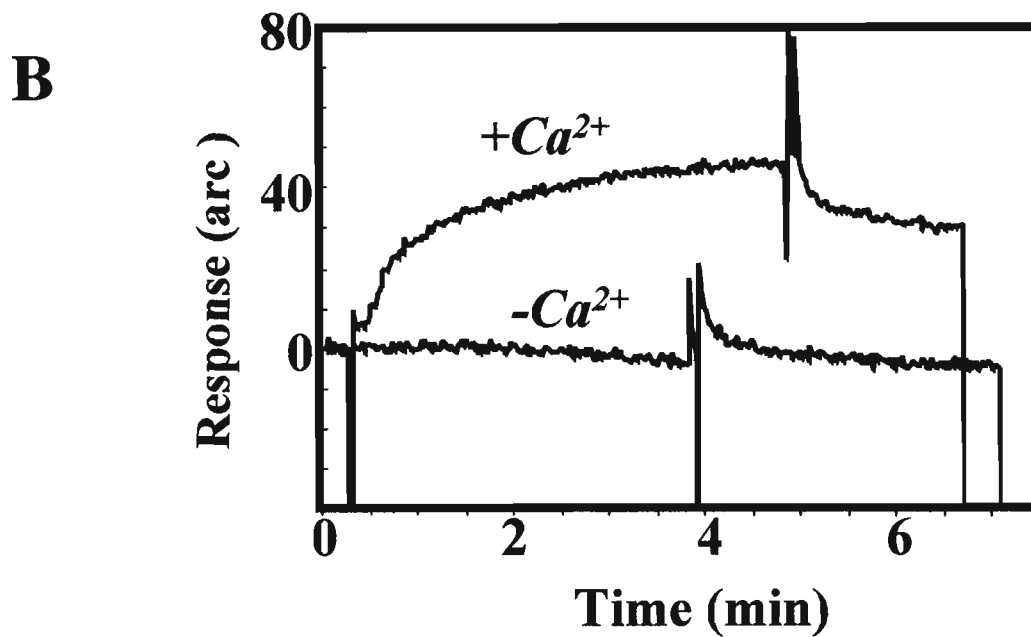
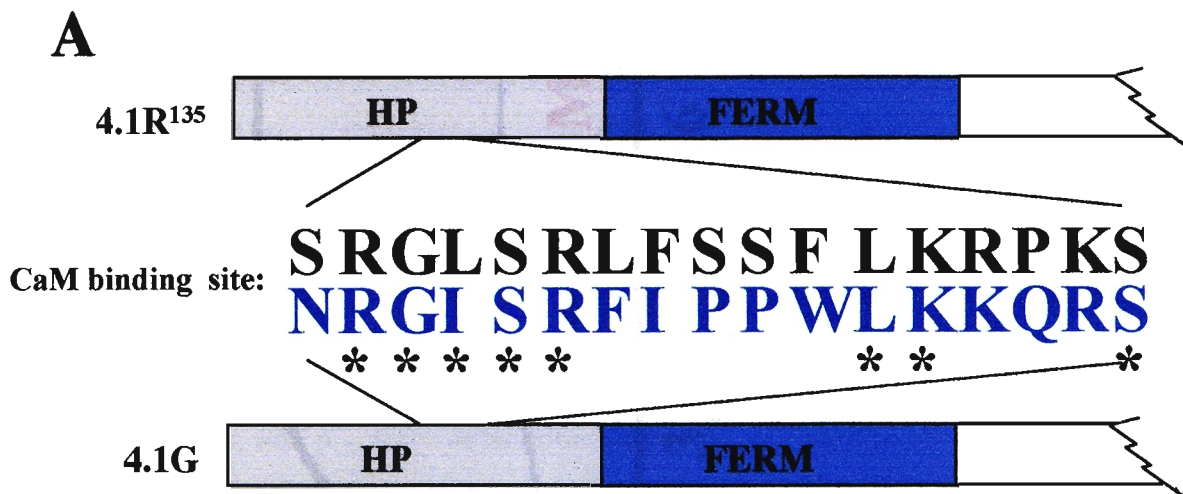
0.5mM  $\text{CaCl}_2$  : **7**

5mM EGTA : **8**

**B.**



**Fig. 47 Purification of 4.1G.** A, Procedure of purification of 4.1G; B, SDS-PAGE of 4.1G. Note that 4.1G was eluted from CaM-Sepharose by 5mM EGTA.



**Fig.48 CaM binding to peptide form 4.1G HP region.** A. A CaM binding sequence of 4.1R HP is conserved in the 4.1G HP region. B. CaM binding to peptide form 4.1GHP region (blue letters in A) in the presence of  $Ca^{2+}$  but not in the absence of  $Ca^{2+}$ .

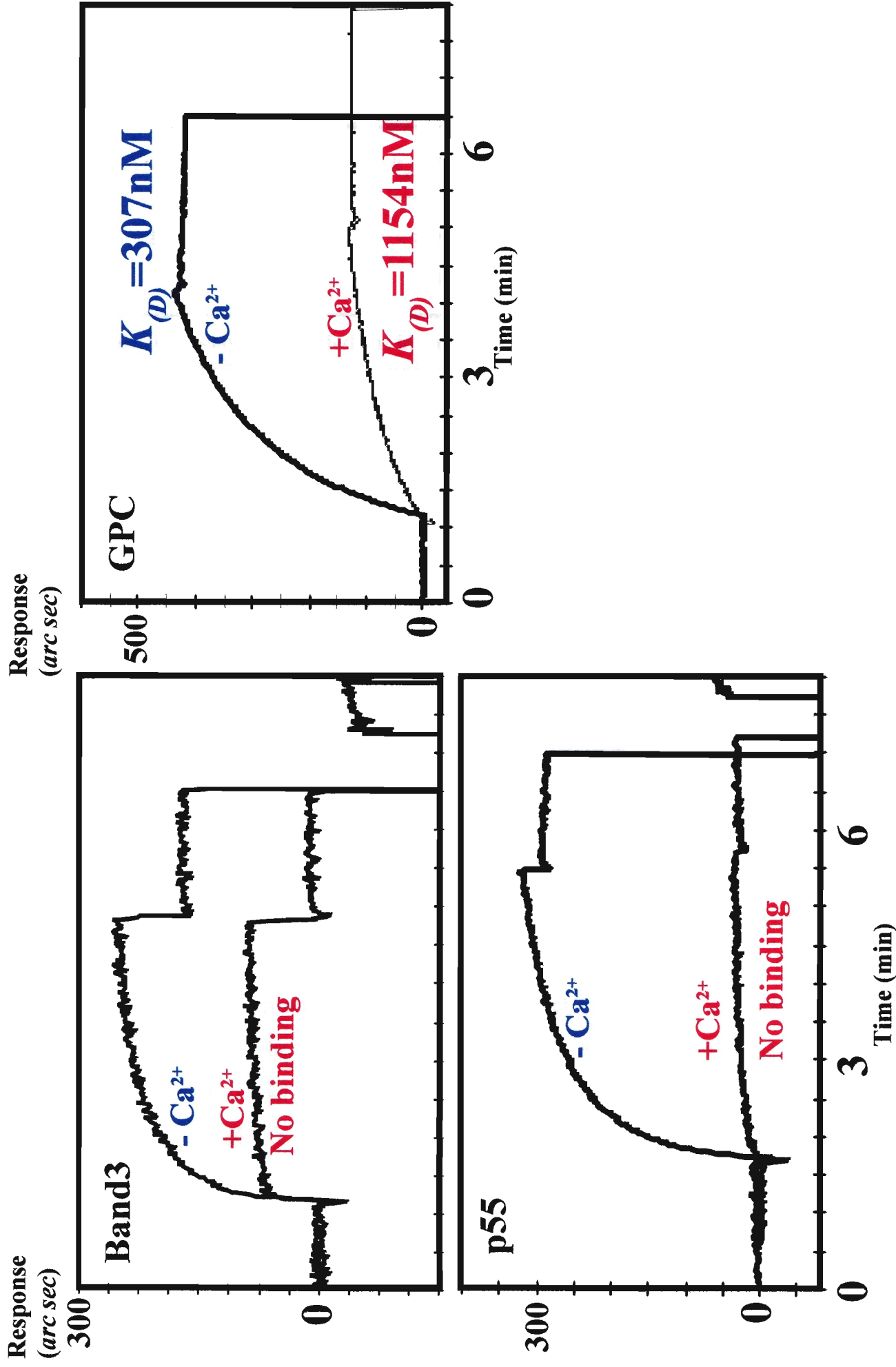


Fig.49 Ca<sup>2+</sup>/CaM regulates 4.1G binding to membrane proteins

Table XXI. 4.1G binding to CaM

Analyte	Condition	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{(D)}$ (nM)
4.1G	EGTA	3.7 x10 <sup>3</sup>	8.3 x10 <sup>-3</sup>	2243
	Ca <sup>2+</sup>	9.4 x10 <sup>4</sup>	5.1 x10 <sup>-3</sup>	54

The binding assay was carried out in Buffer A. From the binding curves obtained by RMD,  $k_a$ ,  $k_d$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.

そのペプチド；

## NRISRFIPPWLKKQRS

を化学合成し、アミノシランキュベット上に固相化した。CaMはこのペプチドと結合したが (Fig.48B)、その親和性は $\sim 10^{-6}$ Mであった。現在、さらに調査中である。

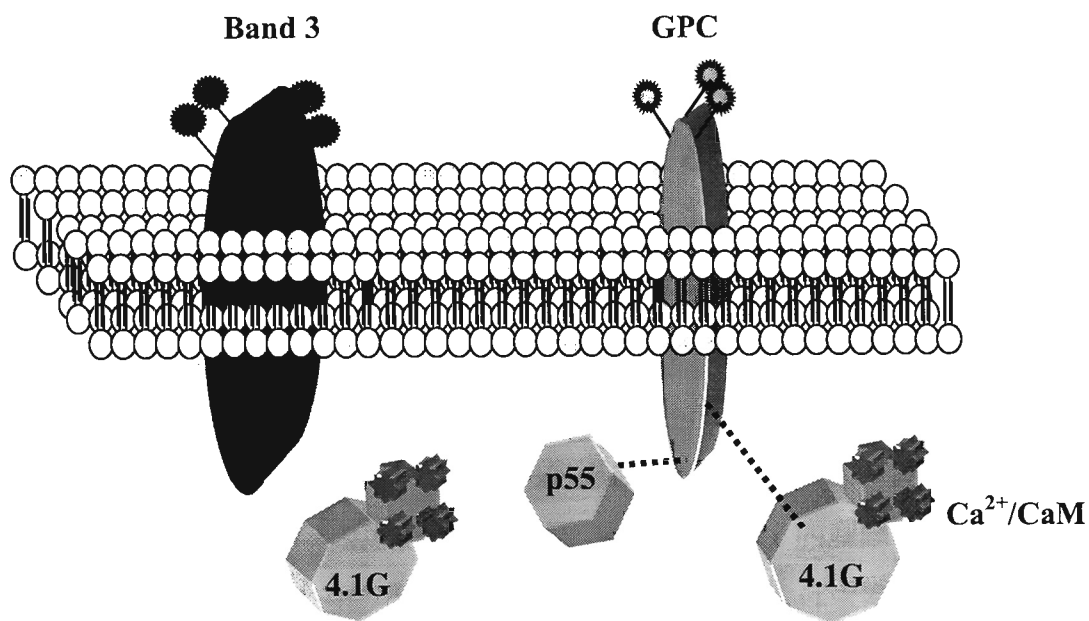
### 4) Ca<sup>2+</sup>/CaMによる4.1R<sup>135</sup>の膜蛋白質結合の制御

以上までに、4.1GはCa<sup>2+</sup>存在下でCaMに結合することを明らかにした。4.1Gは、GPCの細胞内domainと平衡解離定数3.01 x10<sup>-7</sup> Mで結合した。CaMと、4.1Gの複合体(モル比5:1以上)はCa<sup>2+</sup>非存在下では、GPCの細胞内domainと平衡解離定数2 x10<sup>-6</sup>Mで結合したが、Ca<sup>2+</sup>存在下では、GPCの細胞内domainとは平衡解離定数1.2 x10<sup>-6</sup> Mで結合し、親和性の低下が観察された(Fig.48A)。最大結合量がCa<sup>2+</sup>非存在下(100%の結合量とする)での半分の結合量になるCa<sup>2+</sup>濃度はおよそ $\sim 10^{-7}$  Mであり、細胞内でのCa<sup>2+</sup>濃度と一致していた(data not shown)。4.1Gはp55と平衡解離定数181nMで結合した。CaMと4.1Gの複合体(モル比5:1以上)はCa<sup>2+</sup>非存在下では、p55と平衡解離定数410nMで結合したが、Ca<sup>2+</sup>存在下では、p55とは全く結合しなかった(Fig.49)。CaMと4.1Gの複合体(モル比5:1以上)はCa<sup>2+</sup>非存在下では、Band 3の細胞内domainと



平衡解離定数 458nM で結合したが、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下では、Band 3 の細胞内 domain とは全く結合しなかった(Fig.49)。

この CaM の  $\text{Ca}^{2+}$  存在下での完全な 4.1G の膜結合抑制は、4.1G は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇により、細胞膜蛋白質と完全に解離すると推察される。4.1G が細胞内で、4.1R<sup>80</sup> 同様に spectrin/actin filament と結合していることが上皮細胞で確かめられている(Kontrogiani-Konstantopoulos, A. et al. *J Biol. Chem.* (2001) **276**, 20679-20687)。4.1G が spectrin/actin filament と結合しているとすれば、細胞膜裏打ち構造が、 $\text{Ca}^{2+}$  の上昇により 4.1G を中心に解体されると推察される (Fig.50) 。しかし、4.1G の赤芽球での細胞膜結合蛋白質はまだ同定されていない。また、4.1G が何故、赤芽球培養 7 日目前後に一過性に発現するのか、不明である。



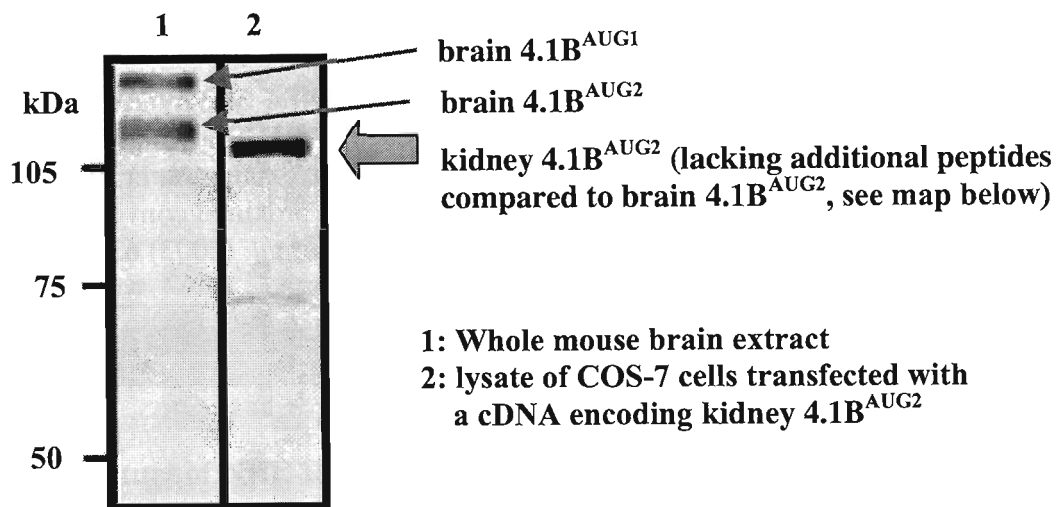
**Fig. 50  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM regulates 4.1G binding to membrane proteins**

## 第 6 項 腎型 protein4.1B (4.1B<sup>AUG2</sup>) と PDZ 蛋白質の結合解析。

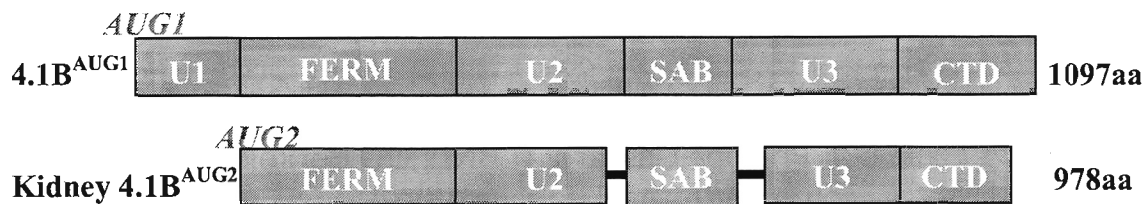
第 6 項 腎型 protein 4.1B (4.1B<sup>AUG2</sup>) と膜蛋白質の結合解析は、この蛋白質を初めて記載した Philippe Gascard (LBNL, UC Berkeley) 博士との共同研究として行われた。

### [ 目的 ]

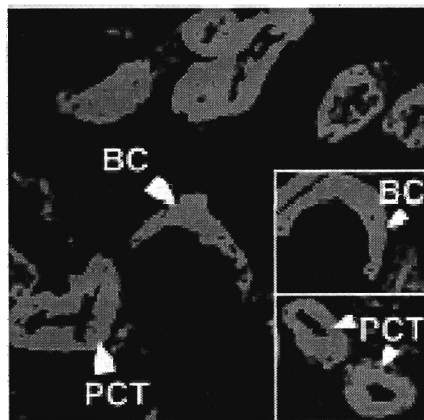
腎では脳型 protein 4.1 (4.1B<sup>AUG1</sup>) と翻訳開始点を異にする isoform (4.1B<sup>AUG2</sup>) (Fig.51, 52) が apical 側と基底膜側の両方に発現している (Fig.53) 。4.1B<sup>AUG2</sup> は、4.1B<sup>AUG1</sup> の 30kDa domain NH<sub>2</sub>末端部の 104 アミノ酸 (head-piece、HP) のポリペプチドが欠落している。本研究では、腎細胞の apical 側に発現する NHE-RF と 4.1B<sup>AUG2</sup> の *in vitro* 分子間相互作用の速度論的解析により、腎細胞に 4.1B<sup>AUG2</sup> が発現する理由について考察した。



**Fig.51. Characterization of renal 4.1 proteins in mouse whole kidney extracts.** Western blot analysis of mouse kidney, spleen or brain extracts (60  $\mu$ g total protein) and of lysates of COS-7 cells transfected with cDNAs encoding hemagglutinin (HA) epitope-tagged mouse kidney 4.1B splice forms was carried out.



**Fig.52. Primary structure of 4.1B<sup>AUG1</sup> and 4.1BAUG2.** U, unique sequence among 4.1 family proteins; FERM, Protein four point one, Ezrin Radixin Moesin conserved domain, SAB, spectrin and actin filament binding domain; CTD, C-terminal domain.



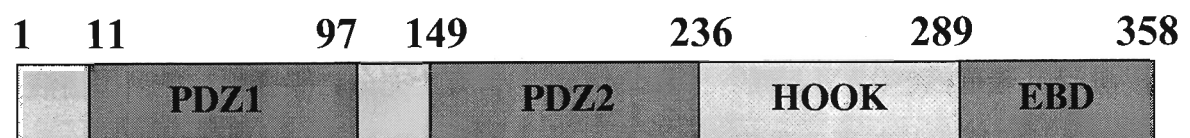
**Fig. 53. Tissue distribution of 4.1 proteins in kidney.** Wild-type mouse kidney sections were stained with antibodies specific for each 4.1BU2 shown as Fig.51. Insets in first left panel of third row highlight 4.1B diffuse expression in Bowman's capsule (BC) (upper inset) and apical expression in some proximal convoluted tubules (PCT) (lower inset) (Ramez, M. et al., *Kidney International*. (2003) **63**, 1321-1337).

## [材料と方法]

### 1. 組換え蛋白質の作製

組換え 4.1B<sup>AUG2</sup> は、tag 領域を欠失させた pET31 (Novagen) に組換えた塩基配列を確認後、大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) を形質転換した。LB 培地にて大腸菌を 37°C 一定条件下で震盪培養し、OD600 の値が 0.4~

0.8 に達した時に、IPTG を最終濃度 (1mM) 添加し、さらに 37°C 一定条件下で 3 時間震盪培養した。4.1B<sup>AUG2</sup> で形質転換した大腸菌は、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4°C、8 分間)沈澱後、1mM DFP、を添加した PBS (第 1 項参照) に懸濁し、氷上 10 分間の超音波処理後、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間) の上清を得た。上清は、35% 硫酸沈澱後、Q-Sepharose, CaM-Sepharose により精製した。NHERF の各 domain (PDZ1, PDZ2, HOOK, Ezrin binding domain (EBD)、Fig.53 参照) は pGEX-4T2 ベクター (Amersham Biosciences) に組換え GST fusion protein として大腸菌に発現させた。LB 培地にて大腸菌を 37°C 一定条件下で震盪培養し、OD600 の値が 0.4~0.8 に達した時に、IPTG を最終濃度 (1mM) 添加し、さらに 37°C 一定条件下で 3 時間震盪培養した。大腸菌は、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、8000rpm、4°C、8 分間)沈澱後、1mM EDTA、1mM DFP、1mM 2ME を添加した B-PER™ (PIERCE、USA) に懸濁し溶菌した。溶菌液は氷上 10 分間の超音波処理後、遠心 (RPR20-2 ローター、日立工機、18,000rpm、20 分間) の上清を得た。上清は、Glutathione-Sepharose (Amersham Biosciences) と懸濁し、GST 融合蛋白質を分離した。GST 融合蛋白質はトロンビン処理により標的蛋白質と GST を切断した後、GST を Glutathione-Sepharose にて吸収し、Q-Sepharose (Amersham Biosciences) で更に精製した。蛋白質の純度は SDS-PAGE にて検定した。蛋白質量は UV 法を用いた (280nm と 260nm を測定し、蛋白質濃度 (mg/ml) = 1.45 A<sub>280</sub> - 0.74 A<sub>260</sub>) 。



**Fig53. Structure of NHE-RF (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor).**

## 2. 蛋白質-蛋白質間の結合解析。

蛋白質-蛋白質間の反応速度論的解析には、Affinity Sensor 社（ケンブリッジ、UK）の Resonant Mirror Detection (RMD)法による IAsys 装置を用いた（Fig.5 参照）。蛋白質或いはペプチドは、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4 緩衝液（0.1M NaCl を含む、以下 PBS と略記）に 100 μg/ml の濃度に溶解しアミノシランキュベット上に、BS<sup>3</sup>（PIERCE 社、USA）を介して固相化した。反応には、10mM Tris HCl 緩衝液 pH7.5、0.1M NaCl

（Buffer A）に対して 1mM EGTA 或いは 1mM EGTA と 2mM CaCl<sub>2</sub> を加えて用いた。キュベット内の反応温度は 25℃一定に保ち、一定速度で攪拌した。反応に関わるパラメーター（結合速度定数、解離速度定数、最大結合量）は専用解析ソフトを用いて計算した（Fig.5 参照）。平衡解離定数

（ $K_{(D)kin}$ ）は、結合速度定数（ $k_a$ ）と解離速度定数（ $k_d$ ）の比から以下の式で求めた。

$$K_{(D)kin} = k_d / k_a$$

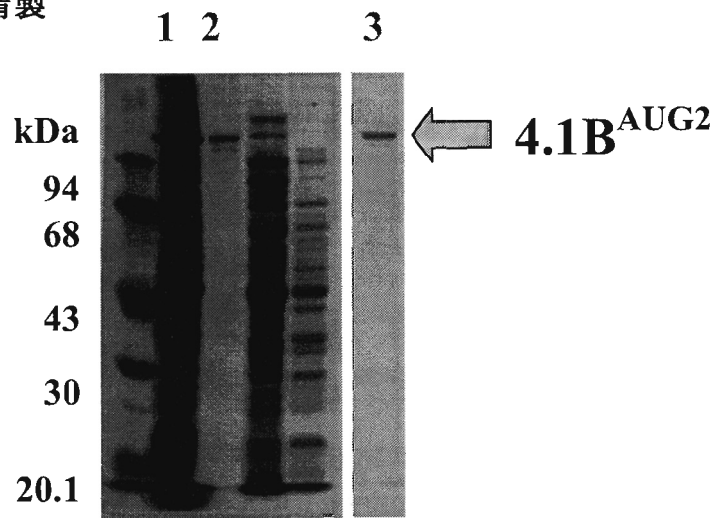
（平衡解離定数は、本文では、 $K_{(D)}$ で表示）

## 3. CaM-Sepharose への 4.1R 結合性の解析

CaM-Sepharose（Amersham Biosciences）のカラムを 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.1M NaCl と 1mM CaCl<sub>2</sub> 含有で十分に平衡化し、同緩衝液で透析平衡化した蛋白質溶液を添加した。カラムに結合した蛋白質は 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.1M NaCl と 5mM EGTA および 50mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液、0.6M NaCl と 5mM EGTA で順次溶出した。

## [結果]

### 1. 4.1B<sup>AUG2</sup> の精製



**Fig.55 SDS-PAGE of 4.1B<sup>AUG2</sup>.** Recombinant 4.1B<sup>AUG2</sup> was purified from bacteria lysate by salting out (35%), Q-Sepharose and CaM-Sepharose. 0.6M NaCl eluted 4.1BAUG2 from CaM-Sepharose. *Lane 1*: Bacteria lysate; *Lane 2*: salting out (35%), *Lane 3*: 4.1B<sup>AUG2</sup> eluted from CaM-Sepharose by 0.6 NaCl. 10% gel was used.

4.1B<sup>AUG2</sup> は、35%飽和硫酸で塩析され、50mM Tris HCl 緩衝液 pH7.5 で平衡化された Q-Sepharose からは 0.25M NaCl で溶出された。CaM Sepharose に対して 4.1B<sup>AUG2</sup> は、Ca<sup>2+</sup> 非依存性に結合し (EGTA 存在下でも結合していた)、0.6M NaCl で溶出された (Fig.55, *Lane 3*)。この結合は、4.1B<sup>80</sup> と同様であった。IASys™による解析では、4.1B<sup>AUG2</sup> は Ca<sup>2+</sup> 非依存性に CaM 固相化キュベットに結合し、その親和性は、 $K_{(D)} = \sim 10^{-7}M$  ( $\sim 200nM$ ) であった (Table XXII)。

### 2. NHE-RF と NHERF との結合。

NHE-RF と 4.1B<sup>AUG2</sup> との平衡解離定数 ( $K_{(D)}$ ) は  $\sim 10^{-8}M$  であった。NHE-RF の各 domain (方法の項参照) と 4.1B<sup>AUG2</sup> の結合解析を行うと、アミノ酸番号 236 番目から 289 番目の PDZ2 domain と Ezrin 結合部位の間に存在することが明らかとなった (Table XXIII)。PDZ 蛋白質の 4.1 結合部位であるので HOOK domain と呼称した。NHE-RF の HOOK domain

と、p55 あるいは Dlg の HOOK domain では、アミノ酸配列の共通性、特に p55 と Dlg の特徴的配列である塩基性アミノ酸のクラスターの共通性はなかった。

**Table XXII. 4.1B<sup>AUG2</sup> binding to CaM**

Analyte	Condition	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{(D)}$ (nM)
4.1B <sup>AUG2</sup>	EGTA	9.4 x10 <sup>4</sup>	2.1 x10 <sup>-2</sup>	223
	Ca <sup>2+</sup>	8.0 x10 <sup>4</sup>	1.6 x10 <sup>-2</sup>	200

The binding assay was carried out in Buffer A. From the binding curves obtained by RMD,  $KD$ ,  $k_a$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.

**Table XXIII. 4.1B<sup>AUG2</sup> binding to NHE-RF**

Analyte	Ligand	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{(D)}$ (nM)
4.1B <sup>AUG2</sup>	full	4.4 ±0.1 x10 <sup>5</sup>	2.8 ±0.1 x10 <sup>-2</sup>	64
	PDZ1	No binding	No binding	No binding
	PDZ2	No binding	No binding	No binding
	HOOK	7.5 ±0.7 x10 <sup>5</sup>	3.3 ±0.1 x10 <sup>-2</sup>	44
	EBD	No binding	No binding	No binding

EBD: Ezrin binding domain The binding assay was carried out in Buffer A. From the binding curves obtained by RMD,  $k_a$ ,  $k_d$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.

#### 4. Ca<sup>2+</sup>/CaM/4.1B<sup>AUG2</sup> 複合体と NHE-RF の結合。

CaM と、4.1B<sup>AUG2</sup> の複合体（モル比 5 : 1 以上）は Ca<sup>2+</sup> 非存在下では、NHE-RF と平衡解離定数 4.9 x10<sup>-8</sup> M（49nM）で結合したが、Ca<sup>2+</sup> 存在下では、平衡解離定数 1.4x10<sup>-7</sup> M（139nM）で結合した (Table XXIV)。この変化は、4.1R<sup>80</sup> と GPC 等膜蛋白質との結合での変化に比べると小さかった。

Table XXVI. *Effect of Ca<sup>2+</sup>/CaM on 4.1B<sup>AUG2</sup> binding to NHE-RF*

Analyte	Ligand	Condition	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{(D)}$ (nM)
4.1B <sup>AUG2</sup> +CaM	NHE-RF	EGTA	3.2 ±0.1 x10 <sup>5</sup>	1.5 ±0.1 x10 <sup>-2</sup>	49
		Ca <sup>2+</sup>	1.8 ±0.1 x10 <sup>5</sup>	2.5 ±0.1 x10 <sup>-2</sup>	139

The binding assay was carried out in Buffer A. From the binding curves obtained by RMD,  $k_d$ ,  $k_a$  and  $K_{(D)}$  were determined using the software package FAST-Fit™.

#### [考察]

4.1B<sup>AUG2</sup> は、Ca<sup>2+</sup>/CaM により 30kDa domain の膜蛋白質との結合性が制御されず、細胞内での Ca<sup>2+</sup> 濃度が変化しても膜結合性を維持していると考えられた。

現在のところ、NHE-RF 及び NHE3 と 4.1B<sup>AUG2</sup> が直接細胞内で結合していることの実験的証明は成功していない (Gascard, P. 博士私信)。しかし、4.1R<sup>80</sup> と構造上似ている 4.1B<sup>AUG2</sup> に Ca<sup>2+</sup>/CaM が結合していても、その結合にあまり影響しないことは、僅かなアミノ酸配列の違いが機能的違いになると考えられる。実際に細胞内で 4.1B<sup>AUG2</sup> に結合する蛋白質が同定されれば、さらに詳しい解析ができると期待される。4.1B<sup>AUG2</sup> のファミリー蛋白質である DAL-1 は、TSLC1 (Tumor Suppressor Lung Cancer 1, GPC 相同膜貫通蛋白質) と結合し癌細胞の転移増殖を抑制する機能がある。4.1B<sup>AUG2</sup> の結



合解析は、がん細胞の細胞膜構造を理解する助けになると思われ、現在、科学研究費補助金基盤研究 C「細胞膜裏打ち蛋白質群の構造的多様性による情報伝達制御機構の統合生物学的解析」（15570123、研究代表者：布村渉、平成 15～17 年度）に継続中である。

## 第7項 その他の研究成果。

### (1)小麦胚芽レクチンによる赤血球膜変形能の低下。

小麦胚芽レクチン (WGA) を凝集が起こらない程度で赤血球膜 (ゴースト) に作用させると赤血球膜の変形能が低下した。WGA 存在下で、赤血球膜の反転膜小胞を作ることはできなかった (data なし)。この事実は、WGA によって、赤血球膜裏打ち構造の GPC を介する 4.1R-spectrin/actin filament network の結合が強化され反転膜が作製出来なかったと考えられた。

### (2)マラリア蛋白質の結合解析。

マラリア由来の蛋白質 PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1) と Knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) の結合様式と結合部位の同定を行った。Knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) は、赤血球膜表面に表出するマラリア由来の膜貫通蛋白質である。マラリアが新たな膜貫通蛋白質を産生し、赤血球膜に繫留されるために必要と考えられる。つまり、KAHRP との結合はマラリアの生存戦略と何らかの関わりがあると思われる。一方、PfEMP1 は、Ankyrin と結合することを解明した。マラリアは、種々の蛋白質と結合して赤血球膜を繫留し、免疫反応を回避している可能性が示唆された (詳細は添付の論文別刷り参照 ; *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 1 associates with the Band 3 binding domain of ankyrin in the infected red cell membrane. Magowan, C., Nunomura, W., et al. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1502**:461-470)。

## 第 8 項 統括討論

本研究では、膜骨格蛋白質の一つである 4.1R の膜結合 domain である N 末端 30kDa 領域 (FERM domain) に焦点をあて、まず、その膜蛋白質及び調節蛋白質としての CaM との結合部位を明らかにした。次に結合様式を反応速度論的解析と熱力学的解析が得られた結果を、X 線結晶構造解析結果と照合することで、蛋白質の構造-機能相関の解析を試みた。特に、蛋白質-蛋白質間、蛋白質-ペプチド間の結合を結合速度と解離速度を測定することは、結合様式を理解する上で有益であった。

本研究において、4.1R<sup>80</sup> と CaM の結合部位明らかになった。この結合は、Ca<sup>2+</sup> 非依存性であるが Ca<sup>2+</sup> が 4.1R<sup>80</sup> の結合を制御 (抑制) することが明らかとなった。Ca<sup>2+</sup> 非依存性の結合は、Ca<sup>2+</sup> によってエントロピックな結合からエンタリピックな結合に変化することが明らかになった。4.1R<sup>80</sup> が Ca<sup>2+</sup> と結合しないことを考慮すると、この変化は Ca<sup>2+</sup> による CaM の構造変化に起因すると考えられる。

赤血球膜で、4.1R<sup>80</sup> が Ca<sup>2+</sup>/CaM の作用を受けることについて、その生物学的意義は不明である。また、4.1R<sup>80</sup>-GPC-p55 で構成される三者複合体は、各々二者間で相互に $\sim 10^{-7}$ M の結合をしていることから、Ca<sup>2+</sup>/CaM によって、それぞれの親和性が 10 分の 1 に低下したとしても、三者複合体が完全に解離することはないと想定される。つまり、Ca<sup>2+</sup> の濃度変化 (上昇) が軽微に起きても 4.1R<sup>80</sup> が膜から解離しないような仕掛けになっているのかもしれない。4.1R<sup>135</sup> が成熟赤血球内で三者複合体 (4.1R<sup>135</sup>-GPC-p55) を構成したならば、Ca<sup>2+</sup> の微妙な上昇でも膜から解離し、裏打ち構造の破綻を来すと思われる。4.1R<sup>135</sup> は、4.1R<sup>80</sup> と異なり、Ca<sup>2+</sup> 依存性の CaM と結合をし、Ca<sup>2+</sup> によって膜から完全に解離すると考えられる。このことは、赤芽球が脱核をする時に、膜打ち構造の連携を弱めることに合理的であると思われる。4.1R<sup>135</sup> の HP domain は、膜結合の制御 domain であり、Ca<sup>2+</sup>/CaM によって構造変化が起き、膜結合性がなくなると考えられた。脱核の機構は未だに

不明であるが、4.1R<sup>135</sup>のHP domainは脱核のシグナル伝達に直接関わっていると考えられた。

本研究により、4.1R (4.1R<sup>80</sup>と4.1R<sup>135</sup>)、4.1R<sup>135</sup>と4.1G、4.1R<sup>80</sup>と4.1Bの間では、それぞれ膜結合部位の構造は似ているにも関わらず、膜貫通蛋白質との結合性、CaMとの結合性(Ca<sup>2+</sup>依存性)とその作用が異なっていた。結晶構造解析により、4.1RとRadixinのFERM domainは極めて似た構造であることが明らかになったが、アミノ酸配列や表面荷電の違いにより結合特性が変わっていると想定される。4.1蛋白質ファミリー(R、G、B)の膜結合domainではさらにアミノ酸配列の相同性が高く、構造も似ていると思われる。4.1蛋白質ファミリーの多様性の生物学的意義については、継続して研究中である。今回得られた結果をもとに、4.1B<sup>AUG1</sup>の脳特異的発現と4.1B<sup>AUG2</sup>の腎特異的発現、またDAL1の肺特異的発現の生物学的意義の解明に焦点を当てている。

当初計画した細胞外からの刺激と細胞膜骨格(裏打ち構造)との関連性については、小麦胚芽レクチン(WGA)存在下での赤血球膜反転膜の作製が不可能であったことから遂行できなかった。しかし、WGAにより膜の変形能が低下すること、反転しないことからGPC-4.1R<sup>80</sup>-spectrin networkの一連の結合が強化されたと推察された。

マラリアは、赤血球膜内で自己産生した膜貫通蛋白質(VARC)に自身の細胞を繫留させるためにKAHRPとAnkyrinと結合すると考えられた。これらの蛋白質の相互の結合関係は不明であり、今後の研究による解明が期待される。

以上。