

微小管末端結合タンパク質 *Spiral2* の立体構造解析 Structural Analysis of Plant Specific Microtubule Associated Protein

林 郁子

横浜市立大学大学院生命医科学研究科

〒230-0037 神奈川県横浜市鶴見区末広 1-7-29

Ikuko Hayashi

Yokohama City University

1-7-29 Suehiro, Tsurumi, Yokohama, Kanagawa 230-0037, Japan

1 はじめに

植物細胞において微小管線維は細胞膜直下に存在し、その線維構造の並びによって細胞の恒常的な形態を保つとともに細胞の伸長方向も決定する。この微小管線維は表層微小管とよばれ、並びによって細胞さらには植物個体の成育の方向性を決定する。植物細胞は、動物細胞と異なり微小管形成中心をもたないことから、表層微小管は細胞小器官にはアンカーされず、微小管の両方の端はフリーでかつ伸長と短縮を繰り返す動態をもつ。

微小管はすべての真核生物に保存される細胞骨格因子であり、線維構造を用いてモータータンパク質のレールとなったり、細胞内の反応の場を提供したりする線維構造体である。微小管はチューブリンヘテロ二量体が重合した線維であるが、二量体の向きに応じて極性をもった線維構造となる。はやくチューブリンが重合する端をプラス端、脱重合が優勢に起こる端をマイナス端とよぶが、この運動性はチューブリンそのものがもつ重合性から生じるものであるとともに、微小管結合タンパク質によっても影響を受ける。すなわちこの微小管の並びと運動性により微小管と微小管結合タンパク質間のネットワークが保たれ、線維の配向を制御する。

わたしたちはこれまで動物細胞の微小管プラス端制御因子について構造機能解析を行ってきたが、本課題では植物細胞の微小管マイナス端に着目してマイナス端結合因子である *Spiral2* の構造解析を進めている。*Spiral2* は陸上植物に保存された微小管マイナス端に特異的に結合する微小管結合タンパク質である [1]。植物細胞中で微小管線維はプラス端で重合、マイナス端では比較的ゆっくりとした脱重合を行う。マイナス端には *Spiral2* が局在しており、このタンパク質の欠損により、表層微小管の配向が変わるとともに植物個体はねじれた表現型をとる [2]。*Spiral2* の欠損が細胞内微小管のマイナス端での脱重合速度を上昇させることから [3]、*Spiral2* は微小管安定化因子と考えられているが、*Spiral2* が引き起こす微小管の動態の変化と、細胞内での微小管の配向の関係はよくわかっていない。

Spiral2 は N 末側に微小管結合ドメインとなる HEAT Repeat 構造を、C 末側には機能未知の α ヘリックスに富んだ領域をもつ。ここではヒメツリガネゴケ由来の *Spiral2* について、機能未知の C 末領域の結晶構造を決定したのでここに報告する。

2 実験

Physcomitrella patens の *Spiral2* の遺伝子から、C 末領域 (Spr2C; 772–903 残基) を PCR により増幅し pET21 に His-tag 融合タンパク質となるよう挿入した。BL21-CodonPlus(DE3)-RILP 株を用いて発現させた後、His-tag アフィニティークロマトグラフィーにより粗精製し、TEVプロテアーゼにより His-tag を切断した後、陰イオン交換カラムを用いて精製した。セレノメチオニン導入された Spr2C についても同様に精製し、結晶化を行った。

Spr2C を 30 mg/mL mM に濃縮した後、0.1 M BICINE (pH 9.0), 1.5 M 硫酸アンモニウム、5% グリセロールの条件でシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。結晶を凍らせる際には母液に 20% グリセロール溶液を加えたものに結晶を浸して液体窒素でフラッシュフリーズした。X 線回折像の測定は、高エネルギー加速器研究機構 KEK BL5 ビームラインを利用して 100K で行った。データは XDS により処理を行い、CCP4 Crank2 を用いてセレノメチオニンの単波長異常分散法により位相を決定した。モデルの構築は Coot を用い、Refmac により精密化を行った。空間群は $P2_1$ ($a = 55.51 \text{ \AA}$, $b = 109.56 \text{ \AA}$, $c = 69.79 \text{ \AA}$, $\beta = 113.2^\circ$)、 2.16 \AA の分解能で立体構造を決定した。

サイズ排除クロマトグラフ-多角度光散乱法 (SEC-MALS) により Spr2C の会合状態を解析した。Wyatt miniDAWN システムを用いた。Superdex 200 Increase 10/300 GL カラムを用い、20 mM HEPES pH 8.0, 0.1 M NaCl, 5 mM 2-mercaptoethanol の溶液条件下で解析を行った。

3 結果および考察

Spr2 の C 末ドメインは all- α の立体構造をとることが明らかとなった (図 1)。非対称単位中に六つ

のサブユニットが存在し、二量体が三つ存在していた。また各二量体では分子間で S-S 結合が形成されていた。しかしこのシステイン残基は *Spiral2* では保存されないことから、結晶学的なアーティファクトである可能性が示唆された。また二量体間で塩橋 (Glu801:Arg806) が観察された。しかしその側鎖の向きは各二量体間で異なることから、Spr2C が二量体を形成するのか、SEC-MALS で確認した。

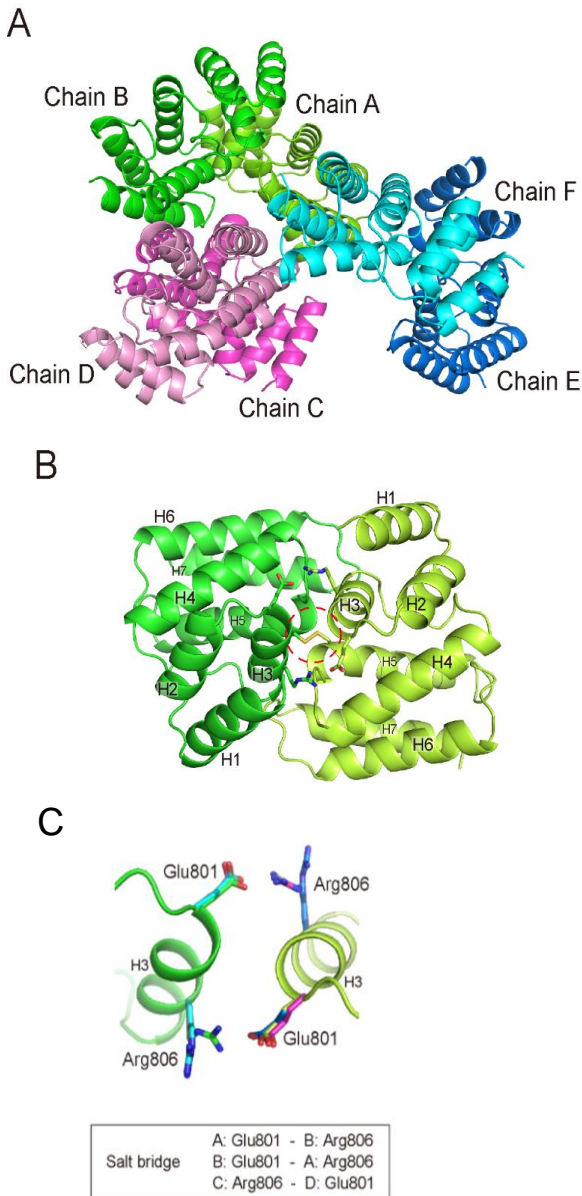


図 1 : Spr2C の結晶構造

- (A) 非対称単位中の Spr2C 分子。6つのサブユニットが観察できた。また二量体を形成していた。
- (B) Spr2C の結晶構造中に S-S 結合 (赤点線丸) がみられた。図は Chain A と B の二量体を示す。
- (C) 二量体中に観察された Glu801:Arg806 間の塩橋。6つの塩橋が期待されたが、実際には三対しかみられなかった。

結晶構造解析の結果を精査するため、SEC-MALS により分子の会合状態を解析した (図 2)。この結果、Spr2C は単量体であることが明らかとなった。

これまで Spr2C が生体内でどのような機能をもっているのか解析されていない。本研究は *Spiral2* 分子の最初の分子情報であり、今後はこの結晶構造をもとに機能解析を行っていく予定である。

謝辞

この結晶構造解析の結果は、PF スタッフのサポートがあって得られたものです。ここに感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Nakamura *et al.*, *J. Cell Biol.* **217**, 915-927 (2018).
 [2] Yao *et al.*, *J. Cell Sci.* **121**, 2372-2381 (2008).
 [3] Leng *et al.*, *Cell Struct. Funct.* **43**, 53-60 (2018).

成果

1. Ohno M, Higuchi Y, Hayashi I. (2023) Crystal structure of the C-terminal domain of plant specific microtubule-associated protein *Spiral2*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, **79**, 17-22.

* ihay@yokohama-cu.ac.jp