

## 植物カルモデュリンの標的分子認識 2

原田靖之, 後藤公平, 嶋田信彦, 神保雄次, 和泉義信 山形大院理工,  
竹澤大輔 埼玉大理, 林 宣宏 藤田保健衛生大, 松嶋範男 札幌医大

[1] 植物には様々な種類のカルモデュリンが存在する。これらの植物カルモデュリン(PCaM)は環境刺激を受け  $Ca^{2+}$ 情報伝達系の活性化および制御に関わると考えられている。唯一結晶構造が報告されているのは馬鈴薯の PCaM (PCM6)である。しかし、PCM6 の溶液構造や PCM6 と標的タンパク質との複合体の溶液構造、さらにその標的分子認識機構などについてはほとんど明らかにされていない。ここでは、PCaM の標的タンパク質として、シロイヌナズナの細胞伸長タンパク質(DWF1)を取り上げた。DWF1 は、ブラシノステロイドの生合成の初期段階に関わっており、 $Ca^{2+}$ /PCaM が結合することによりその活性が制御される。さらに、DWF1 の CaM 結合部位を点変異させたものを用いると矮小型が生じる。このことから、 $Ca^{2+}$ /PCaM を介するシグナル伝達が DWF1 の機能制御に重要な役割を担っていることが示される。しかし、PCaM が DWF1 を認識する機構は明らかにされていない。

本研究の目的は、 $Ca^{2+}$ 非存在下と存在下の PCM6 の溶液構造および、 $Ca^{2+}$ /PCM6 と DWF1 の標的ペプチドとの溶液構造を放射光小角 X 線散乱により解明することである。

[2] PCM6 は既報告(Takezawa, et al., (1995) *Plant Mol. Biol.* **27**, 693-703)に従って調製された。合成された DWF1 ペプチドは 1 文字標記で表に記載された。DWF1 ペプチドは野生型 (WT)のもの、N 末端から 7 番目の A を W に変異させたものの 2 種である。測定は KEK/PF/BL10C に設置された酵素回折計を用いて行われ、散乱データから各試料の分子量比、回転半径 ( $R_0$ )および形状がそれぞれ評価された。

[3] 標的分子非存在下の PCM6 の溶液構造:

Kratkyプロットより、 $Ca^{2+}$ 非存在下と存在下の PCM6 の溶液構造は、動物CaMと類似の垂鈴型構造をとることが示された。しかし、動物CaMの場合と異なり、PCM6 の  $R_0$ 値は $Ca^{2+}$ 結合の有無にほとんど依存しないことが示された。

DWF1 ペプチド存在下の PCM6 の溶液構造:

$M_{exp}/M_{cal}$  の値から、 $Ca^{2+}$ /PCM6 と各標的ペプチドとが 1 対 1 の複合体を形成していることが見て取れる。また、Kratky プロットと  $R_0$  の値より各複合体は球状構造をとることが示された。既報告より、1-5-8-14 モチーフでは 7 番目の残基が W のような高い残基の場合、複合体は球状構造をとれないことが示されている。しかし、 $Ca^{2+}$ /PCM6/DWF1A524WCys 複合体が球状構造をとることから、PCM6 の DWF1 の認識モチーフとして、1-5-8-14 モチーフの可能性が低いことが示された。さらに、他のモチーフの可能性もほとんど考えられないことから、PCM6 は DWF1 に対して新規なモチーフで結合することが示唆された。

表 PCM6 と  $Ca^{2+}$ /PCM6/標的ペプチド複体のパラメータ

Name	Sequence	$M_{exp}/M_{cal}$	$R_0$	Shape
ApoPCM6			21.4	Dumbbell
$Ca^{2+}$ /PCM6			21.2	Dumbbell
$Ca^{2+}$ /PCM6/DWF1 WT Cys	□RKK□YRA□GTDMS□YYKSKKGR	1.07	18.5	Globular
$Ca^{2+}$ /PCM6/DWF1 A524W Cys	□RKK□YRW□GTFMS□YYKSKKGR	1.06	18.8	Globular

囲い込み線は推測されるアンカー残基、二重線は変異箇所