

### 植物カルモデュリンの標的分子認識 3

原田靖之、神保雄次、和泉義信 山形大院理工、竹澤大輔 埼玉大院理工  
林 宣宏 東工大院生命理工、松嶋範男 札医大医療人育成センター

[1] カルモデュリン(CaM)はCa<sup>2+</sup>結合に伴う立体構造変化を通じて標的タンパク質の活性化および制御を行う多機能Ca<sup>2+</sup>センサーである。これまで動物由来のCaMの立体構造と機能に関する研究が詳細に行われてきた。しかし、植物由来のCaM (PCaM)の構造と機能に関する知見は十分に得られていない。馬鈴薯から発見されたPCaM (PCM6)が、唯一結晶構造解析がなされたPCaMである。しかし、PCM6 と標的タンパク質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明らかにされていない。

本研究では、放射光小角X線散乱によりCa<sup>2+</sup>と標的分子存在下でのPCM6 の溶液構造が解析された。標的分子としては、細胞伸長タンパク質DWF1、ヒメツリガネゴケのペプチダーゼPhypaCaMPNの予測CaM結合部位(標的ペプチド)およびCaM阻害剤のTrifluoperazine (TFP)が用いられた。小角散乱で得られた溶液構造をもとにPCaMの標的分子認識機構、動物CaMとPCaMの構造と機能の違いについて言及する。

[2] PCM6 は既報告に従って調製された(Takezawa他,(1995)*Plant Mol. Biol.* 27,693-703)。合成された標的ペプチドは1文字表記で表に記載された。測定はKEK/PF/BL100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、回転半径(*R<sub>o</sub>*)と形状が評価された。

[3] DWF1 ペプチド存在下のPCM6 の溶液構造: Ca<sup>2+</sup>/PCM6 と各DWF1 ペプチドは1対1で球状複合体を形成することが報告された。小角散乱の結果から、DWF1 ペプチドのN末端から8番目のI、11番目のF、14番目のVがPCM6 とDWF1 の球状複合体形成に大きく寄与していることが見て取れる。これら以外にアンカーとなる残基が見つからないことから、DWF1 とPCM6 の球状複合体形成は既存のモチーフに依るものではないことが示唆される。しかし、Ca<sup>2+</sup>/PCM6 とDWF1 の球状複合体が、これら3残基のみで形成されるとは考えにくいので、これらに加えてNまたはC末端側にある塩基性残基の寄与も考えられる。

PhypaCaMPNペプチド存在下のPCM6 の溶液構造: Ca<sup>2+</sup>/PCM6 とPhypaCaMPNペプチドとは1対1で球状複合体を形成することが示された。PCM6 はPhypaCaMPNペプチド内に存在する1-8-14モチーフを認識して、球状複合体を形成したと考えられる。

TFP存在下のPCM6 の溶液構造: Ca<sup>2+</sup>/PCM6 をTFPで滴定したところ、1対1でなく1対4のモル比のとき、PCM6 とTFPとの複合体は最もコンパクトになることが示された。この結果は、既報告の動物CaMの場合と同様である。

表 Ca<sup>2+</sup>/PCM6/標的ペプチド複合体の構造パラメータ

Sample Name	Sequence	<i>M<sub>exp</sub></i> / <i>M<sub>cal</sub></i>	<i>R<sub>o</sub></i>	Shape
Ca <sup>2+</sup> /PCM6			21.2	Dumbbell
Ca <sup>2+</sup> /PCM6/DWF1_WT_Cys	□RKKYRA□GTFMS□YYKSKKGR	1.07	18.5	Globular
Ca <sup>2+</sup> /PCM6/DWF1_A524W_Cys	CRKKYRWIGTFMSVYYKSKKGR	1.06	18.8	Globular
Ca <sup>2+</sup> /PCM6/DWF1Y522D_Cys	CRKKDRAIGTFMSVYYKSKKGR	1.06	18.6	Globular
Ca <sup>2+</sup> /PCM6/DWF1I525D_Cys	CRKKYRADGTFMSVYYKSKKGR	1.15	20.0	Globular
Ca <sup>2+</sup> /PCM6/DWF1_F528D*	RKKYRAIGTDMSVYYKSKKGR	1.15	20.7	Globular
Ca <sup>2+</sup> /PCM6/DWF1_V531D*	RKKYRAIGTFMSDYKSKKGR	1.05	19.3	Globular
Ca <sup>2+</sup> /PCM6/PhypaCaMPN	AR□RKNSKA□KLTTA□QGK	1.13	18.9	Globular

囲い込み線:推測されるアンカー残基、二重線:変異箇所、\*:後藤公平(2007)山形大学修士論文