

## ガマ・マツおよびトウモロコシ花粉の カルモジュリンとその結合タンパク質

原 彰\*・玉腰 修\*・小岩井麻代\*・船隈 透\*

Calmodulin and its Binding Proteins from Pollen Grains of *Typha latifolia*, *Pinus thunbergii* and *Zea mays*

Akira HARA\*, Osamu TAMAKOSHI\*, Asayo KOIWA\*  
and Tooru FUNAGUMA\*

\* Laboratory of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Meijo University,  
Tempaku-ku, Nagoya 468, Japan

Calmodulins were purified from pollen grains of *Typha latifolia*, *Pinus thunbergii* and *Zea mays*. They had almost the same specific activities for the activation of bovine brain phosphodiesterase and showed the typical behaviors as "calmodulin" in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  or EGTA by the electrophoresis on a polyacrylamide gel. Three kinds of pollen grains contained calmodulin in a level of 0.05-0.10 mg/g fresh weight and their extracts had the protein bands, seemingly calmodulin-binding proteins, by the electrophoresis on a polyacrylamide gel. The extract of *Typha* pollen grains, after fractionated by the chromatography on a DEAE-cellulose column, yielded some bands showing different mobilities in the presence of calmodulin +  $\text{Ca}^{2+}$  and EGTA by the electrophoresis.

**Key words :** Calmodulin of pollen, Calmodulin-binding protein,  $\text{Ca}^{2+}$ -function of pollen

### 結 言

$\text{Ca}^{2+}$  は今や重要な情報伝達物質の1つとして揺るぎない地位を確保しているように見えるが、 $\text{Ca}^{2+}$  の機能が明確に認識され始めたのは最近のことである。 $\text{Ca}^{2+}$  が情報伝達体として働くのは、2つのケースがある。すなわちカルモジュリンと結合してさまざまな酵素系を活性化し代謝系を調節する場合と、 $\text{Ca}^{2+}$  が結合したタンパク質がそれ自体で酵素活性を示す場合である<sup>(1)</sup>。

$\text{Ca}^{2+}$ -カルモジュリンの役割は、動物では酵素の活性化や細胞機能において明らかにされつつあるが、植物では細胞に普遍的にカルモジュリンの存在が認められるにもかかわらず、 $\text{NAD}^+$  キナーゼの活性化<sup>(2-4)</sup>を

除くとほとんど未解明である。

花粉では Tirlapur & Shiggaon が *Vinca rosea* の花粉について  $\text{Ca}^{2+}$  が細胞質膜部分に高濃度で含まれていることを報告し、カルモジュリンやカルモジュリン阻害物質との関連について言及している<sup>(5)</sup>。

我々は調べた限りの花粉において著量のカルモジュリンの存在を確認したが、これが短時間にドラスチックに変化する花粉の発芽にどのような役割を果たしているかを明らかにするために、ガマ、マツおよびトウモロコシ花粉からカルモジュリンの純化を試み、合わせてカルモジュリン結合タンパク質の検索を行った。

### 材料および方法

#### 1. 花 粉



マツ花粉は1987年5月、名古屋市大高緑地公園にて採取、ガマ花粉は1987年6月、愛知県日進町の休耕田において採取、またトウモロコシ花粉は1987年8月、名古屋市名城大学内で栽培したハニーバンタム種から採取し、それぞれ室温で2日間乾燥させた後、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## 2. 試薬

ホスホジエステラーゼはウシの脳より、日高の方法<sup>(6)</sup>によって調製した。3',5'-cyclic AMP は半井化学薬品から入手した。アルカリホスファターゼ(比活性 2500 units/mg)はBoehringer Mannheim社から、Sephadex G-100(Superfine)、Epoxy activated-Sepharose 6BはPharmacia Fine Chemicals社から、DE-52(DEAE-cellulose)はWhatman TSK gell TOYOPEARL DEAE-650Sは東洋ソーダ社からそれぞれ入手した。

## 3. カルモジュリン調製用アフィニティゲルの調製

5gのEpoxy-activated-Sepharose 6Bを水で膨潤させた後、ガラスフィルター上に移し、水で洗浄した。洗浄ゲルに50mlの500mg N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩を含む20%ジオキサン-0.1M炭酸緩衝液(pH 10.5)を加え、穏やかに回転させながら $37^{\circ}\text{C}$ で、16時間反応させた。反応懸濁液をガラスフィルター上に移し20%ジオキサン-0.1M炭酸緩衝液(pH 10.5)、水、0.1M炭酸緩衝液(pH 8.0)、0.1M酢酸緩衝液(pH 4.0)の順でそれぞれ200mlを用いて洗浄した。未反応の活性基をブロックするため、洗浄ゲルを50mlの1Mエタノールアミンに懸濁させ、一夜放置後ガラスフィルターに移し、水で洗浄して使用時まで $5^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## 4. カルモジュリンの活性測定

カルモジュリンの活性は3',5'-cyclic AMPを基質としたホスホジエステラーゼの活性化によって測定した。実際の反応ではホスファターゼをカップリングさせてジエステラーゼ作用によって生じた5'-AMPをアデノシンと無機リン酸に転換させた。すなわち、50mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)、0.5mM

MgCl<sub>2</sub>、0.05mM CaCl<sub>2</sub>、0.1単位のアルカリホスファターゼ、0.01単位のホスホジエステラーゼ、2mM cyclic AMP およびカルモジュリンを含む1mlの反応液を $30^{\circ}\text{C}$ で30分間保温後、0.5mlの0.3M過塩素酸を加えて反応を停止した。遊離した無機リン酸はFurchgott & Gudareffの方法<sup>(7)</sup>に従って測定した。

上記反応条件下においてホスホジエステラーゼの最大活性の50%を与えるカルモジュリン量を1単位とした。

## 5. タンパク質の定量

タンパク質の定量はHartreeらによるLowry変法<sup>(8)</sup>によって行った。

## 6. カルモジュリンの調製

カルモジュリンの調製は基本的には矢沢の方法<sup>(9)</sup>に準じて行った。ガマ花粉20gに200mlの50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 5.7)および4mlの0.25M EDTAを添加し、10mlずつ、テフロン-ガラスホモジナイザーで10分間処理した。ホモジネートを $17,000 \times g$ で10分間の遠心分離を行い、上清176mlを得た。この上清に1/10容の50%トリクロロ酢酸(w/v)を徐々に添加し、10分間攪拌した。これを6M NaOHでpH 5.2に調整し、1/100容の0.25M EDTAを加えて1時間攪拌を続けた。残存する沈澱を $17,000 \times g$ で10分間の遠心分離を行い、上清189mlを得た。上清に1/10容の50%トリクロロ酢酸を徐々に添加し、10分間攪拌した後、再び $17,000 \times g$ で10分間の遠心分離を行った。得られた沈澱に少量の1M Trisを加えて中和溶解させ、0.1M NaClおよび5mM CaCl<sub>2</sub>を含む10mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.0, Buffer A)に対して一夜透析を行った。透析内液の不溶物は $17,000 \times g$ で10分間の遠心分離で除去し、上清(13.8ml)を得た(粗カルモジュリン画分)。粗カルモジュリン画分をBuffer Aで平衡化したN-1-ナフチルエチレンジアミン-Sepharoseカラムに添加し、約40mlのBuffer Aで洗浄した後、0.1M NaCl、3mM EGTAを含む10mM Tris-HCl緩衝液(pH 5.7)によって溶出し、活性画分(13.3ml)を得た。活性画



分をミリポアフィルターを用いて約1mlに濃縮後、0.1 M NaCl を含む 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5、Buffer B) で平衡化した Sephadex G-100 superfine カラム (3 × 30cm) に添加し、同緩衝液でゲルろ過を行った。

活性画分 (15.9ml) は Buffer B で平衡化した TS K gel DEAE-650S カラム (2 × 20cm) に添加して日本分光社製 HPLC 装置 TRIROTAR V ポンプを用いてイオン交換クロマトグラフィを行った。約20 ml の Buffer B で洗浄後、300 ml の Buffer B と 300 ml の 0.5 M NaCl を含む 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) とで構成される食塩の直線的濃度勾配によって溶出し、活性画分 (16.8ml) を得た。

トウモロコシ花粉およびマツ花粉についても、上記に準じて調製を行った。

#### 7. カルモジュリン結合タンパク質の検索

ガマ花粉18g を 180ml の 0.1mM EDTA、4 mMメルカプトエタノールを含む20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5、Buffer C) にけん濁させ、10mlずつ、テフロンーガラスホモジナイザーで10分間処理した。ホモジネートを 17,000 × g で10分間の遠心分離を行い、上清 150 ml を得た。上清に硫酸を 0.4 飽和度となるように加え、30分間放置後、17,000 × g で10分間の遠心分離を行い沈澱を除去した。上清に 0.75 飽和度となるように再び硫酸を加え、30分間放置後、17,000 × g で10分間の遠心分離を行った。沈澱を少量の Buffer C を加えて溶かし、同 Buffer C を加えて溶かし、同 Buffer に対して透析を行った。透析内液 (24ml) を Buffer C で平衡化した DE-52 カラム (1.5 × 28 cm) に添加し、50ml の Buffer C で洗浄後、150ml の Buffer C と 150ml の 1M NaCl を含む Buffer C とで構成される食塩の直線的濃度勾配法で溶出した。フラクションは 4ml ずつ集め、予備的電気泳動によってタンパク質のバンドを確認し、フラクション No. 43—45, No. 46—48, No. 49—51 および No. 52—54 をまとめて、電気泳動試料として供した。

#### 8. 電気泳動

カルモジュリンおよびカルモジュリン結合タンパク質についてのポリアクリルアミドゲル電気泳動は、基本的には Davis の緩衝液<sup>(10)</sup> を用いて行った。ゲルは厚さ 1mm のスラブ (13.8 × 10cm) で 7.5%、15% 濃度または 5—15% の濃度勾配を用いた。

## 実験結果

### 1. カルモジュリンの精製

ガマ、マツおよびトウモロコシ花粉のカルモジュリンの精製結果を Table 1 に示す。比活性は 3 種類のカルモジュリンとも、ほぼ近い数値を示した。これらについて 15% ゲル濃度でのポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を Fig. 1 に示す。電気泳動は  $Ca^{2+}$  または EGTA の存在下で行ったが、いずれも、カルモジュリンに典型的な挙動を示し移動度も同程度であった。

しかしながら、マツ花粉のカルモジュリンは  $Ca^{2+}$  の存在下で 2 つのバンドが見られ、EGTA では 1 つになっているように見える。ガマ花粉のカルモジュリンも  $Ca^{2+}$  の存在下で 2 つのバンドが重なっているように見えるが、EGTA 存在下では 2 つの明瞭なバンドとなっている。トウモロコシ花粉カルモジュリンは  $Ca^{2+}$  または EGTA の存在下で単一のカルモジュリン様バンドが観察されるが、うすいバンドが陰極に近い方に認められる。このバンドはカルモジュリンとは逆に EGTA 存在下で移動度が小さかった。

### 2. カルモジュリンによるホスホジエステラーゼの活性化

花粉から調製したカルモジュリンのウシ脳から得られたホスホジエステラーゼに対する活性化を調べた。Fig. 2 に示すように、いずれのカルモジュリンもほぼ 0.1—0.2  $\mu$ g/ml の濃度でホスホジエステラーゼを活性化した。

### 3. カルモジュリン結合タンパク質

ガマ、マツおよびトウモロコシの各花粉から得られた抽出液 (カルモジュリンを含む) について、電気泳動を行ったところ、ほぼ類似した移動度のところに、 $Ca^{2+}$  と EGTA の存在下で異なる移動度を示すバンド

**Table 1.** Purification of calmodulins from pollen grains.

(A) Calmodulin from <i>Typha</i> pollen grains					
Step	Volume (ml)	Protein (mg)	Total act. (units)	Specific act. (units/mg)	Yield (%)
TCA precipitate	13.8	92.6	29,256.0	315.9	100.0
Affinity Chromatography	13.3	3.2	25,521.4	7,975.4	87.2
Sephadex G-100	15.9	2.4	21,542.9	8,976.2	73.6
DEAE-TOYOPEARL 650S	16.8	0.84	11,351.8	13,514.0	38.8

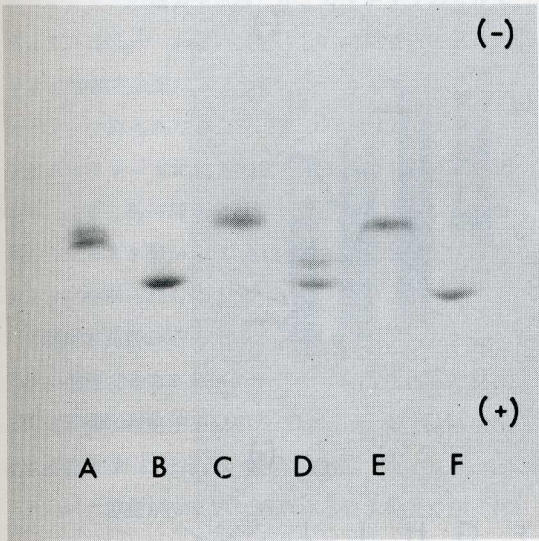
  

(B) Calmodulin from <i>Pinus</i> pollen grains					
Step	Volume (ml)	Protein (mg)	Total act. (units)	Specific act. (units/mg)	Yield (%)
TCA precipitate	26.0	49.4	13,182.0	266.8	100.0
Affinity chromatography	22.7	2.64	7,559.1	2,863.3	57.3
Sephadex G-100	16.0	0.50	4,972.2	9,944.4	37.7
DEAE - TOYOPEARL 650S	12.8	0.169	2,060.0	12,189.3	15.6

(C) Calmodulin from <i>Zea</i> pollen grains					
Step	Volume (ml)	Protein (mg)	Total act. (units)	Specific act. (units/mg)	Yield (%)
TCA precipitate	41.0	350.1	14,877.1	42.5	100.0
Affinity chromatography	15.5	0.884	5,181.7	5,861.7	34.8
Sephadex G-100	13.5	0.351	3,281.9	9,350.1	22.1
DEAE - TOYOPEARL 650S	8.0	0.232	2,343.2	10,100.0	15.8



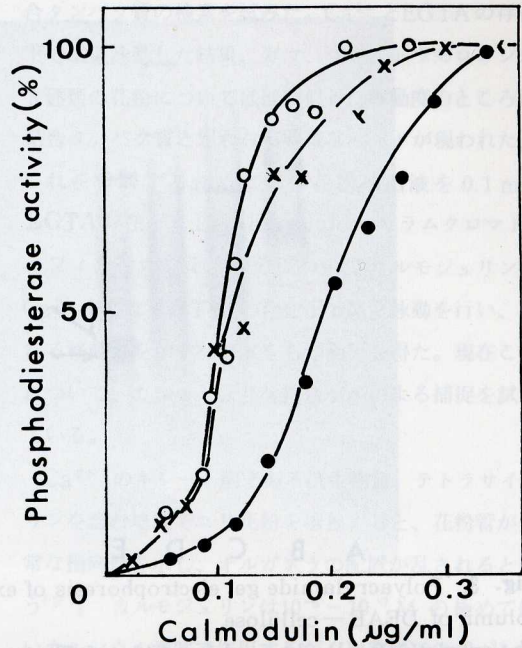


**Fig. 1.** Polyacrylamide gel electrophoresis of calmodulins purified from pollen grains.

Electrophoresis was carried out on 15% polyacrylamide gel in 50 mM Tris/384 mM glycine at a constant current of 20 mA. The gel was stained for proteins with coomassie brilliant blue R.

Lane: (A) *Pinus* calmodulin + 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , (B) *Pinus* calmodulin + 2 mM EGTA, (C) *Typha* calmodulin + 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , (D) *Typha* calmodulin + 2 mM EGTA, (E) *Zea* calmodulin + 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , (F) *Zea* calmodulin + 2 mM EGTA.

が観察された。これらがカルモジュリン結合タンパク質であるかどうか調べるために、ガンマ花粉について 0.1 mM EGTA 存在下で抽出液を調製し、DEAE-セルロースカラムによって分画した試料について電気泳動を行った。結果を Fig. 3 に示す。カルモジュリンと  $\text{Ca}^{2+}$  を添加した画分と EGTA を添加した画分とを比較することによって、矢印で示されるように異なる移動度を示すバンドがいくつか認められた。このバンドが相互にどのように対応するかは分からないが、カルモジュリンと  $\text{Ca}^{2+}$  の添加、無添加によって移動度が



**Fig. 2.** Effect of calmodulin from pollen grains on activation of bovine brain phosphodiesterase.

The reaction mixture (1 ml) consisting of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.05 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.1 unit of alkaline phosphatase, 0.01 unit of bovine brain phosphodiesterase, 2 mM cyclic AMP and calmodulin at the concentrations indicated above was incubated at 30°C for 30 min and Pi liberated was measured by the method of Furchgott and Gudareff<sup>(7)</sup>. The final specimens of calmodulin described in Table 1 were used. x—x, *Typha* calmodulin., o—o, *Pinus* calmodulin., ●—●, *Zea* calmodulin.

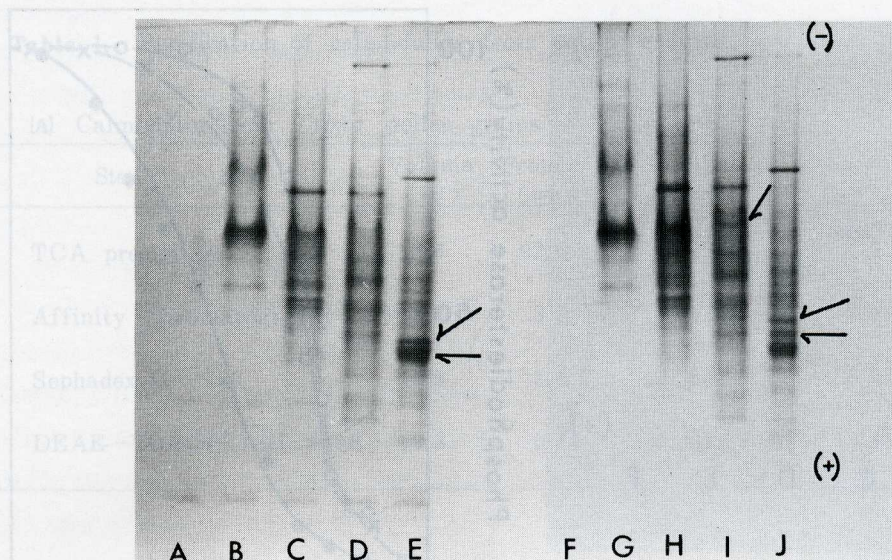
異なるタンパク質の存在することが確認された。

このような現象はマツ花粉抽出液の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィ画分の電気泳動によっても観察された。

## 考 察

カルモジュリンは原生動物から高等動物、高等植物に至るまで普遍的に分布している。原生動物であるテトラヒメナとウシ脳のカルモジュリンの一次構造を比較すると、148 アミノ酸残基中わずかに 12 残基異なる





**Fig. 3.** Polyacrylamide gel electrophoresis of extract from *Typha* pollen grains fractionated on a column of DEAE-cellulose.

The extract (150 ml) obtained from 18g of *Typha* pollen grains in 20mM Tris-HCl, pH7.5, containing 0.1mM EGTA and 0.5M sucrose (Buffer C) was 40% saturated with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  with constant stirring and allowed to stand for 30 min. The precipitate was removed by centrifugation at  $17,000 \times g$  for 10min. The supernatant was 75% saturated with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  with constant stirring and allowed to stand for 30min. The mixture was centrifuged at  $17,000 \times g$  for 10min. The resultant precipitate was dissolved in small amount of Buffer C and dialyzed against Buffer C. The dialysate was put on a DEAE-cellulose column (1.5  $\times$  28cm) and washed with 50ml of Buffer C. The proteins were eluted with a linear 0-1.0M NaCl gradient (total volume of 300ml) in Buffer C. Four-ml fractions were collected. Fractions of No.43-45, No.46-48, No.49-51 and No.52-54 were combined respectively and used as samples of polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis was carried out on 5-15% gradient gel in 20mM Tris/122mM glycine at a constant current of 20mA. The gel was stained for proteins with coomassie brilliant blue R.

Lane: (A) *Typha* calmodulin+2mM  $\text{Ca}^{2+}$ , (B) *Typha* calmodulin + Frac. No. 43-45 + 2mM  $\text{Ca}^{2+}$ , (C) *Typha* calmodulin+ Frac. No. 46-48 + 2mM  $\text{Ca}^{2+}$ , (D) *Typha* calmodulin+Frac. No.49-51 + 2mM  $\text{Ca}^{2+}$ , (E) *Typha* calmodulin+Frac. No.52-54 + 2mM  $\text{Ca}^{2+}$ , (F) *Typha* calmodulin+2mM EGTA, (G) Frac. 43-45 + 2mM EGTA, (H) Frac. No.46-48 + 2mM EGTA, (I) Frac. No. 49-51 + 2mM EGTA, (J) Frac. No. 52-54 + 2mM EGTA. The arrows indicate the proteins showing different mobilities in the presence of calmodulin +  $\text{Ca}^{2+}$  and EGTA.

だけであり、脊椎動物ではカルモジュリンはすべて同一の一次構造を持っていると考えられている<sup>(11)</sup>。これはカルモジュリンが細胞の中で極めて基本的な機能に関係していることを示唆するが、多機能であることこそタンパク質構造の保守性が要求されるのであろう<sup>(12)</sup>。

カルモジュリンの機能は主に動物によって明らかにされており、多くの酵素の活性化や筋細胞、非筋細胞、

微小管や腫瘍の細胞分裂における役割が証明されている。植物では種子、葉、果実組織からカルモジュリンは均一に得られているけれども、NAD<sup>+</sup>キナーゼの活性化<sup>(2-4)</sup>、膜結合型ATPase<sup>(13)</sup>、quinate : NAD<sup>+</sup> oxidoreductase<sup>(14)</sup>、タンパク質のリン酸化への関与<sup>(15)</sup>が知られているに過ぎない。

我々はガマ、マツおよびトウモロコシの花粉からカ



ルモジュリンの精製を試みたが、ガマやマツのカルモジュリンは $\text{Ca}^{2+}$ あるいはEGTAの存在下で常にわずかに移動度の異なる2つのバンドが観察され、均一のバンドは得られなかった。この原因はカルモジュリンがプロテアーゼによる限定水解をうけていることその他に、必ずしも一種類ではないことも考えられる。事実、ウシやブタ脳からはAla-Lysが欠損したカルモジュリンが得られている<sup>(11)</sup>。

3種類の花粉からのカルモジュリンは0.1—0.2  $\mu\text{g}$ /mlの濃度でホスホジエステラーゼを活性化したが、これは同様の測定法を用いたTeshima & Kakiuchiによる報告<sup>(16)</sup>にほぼ近い数値である。

タンパク質量が少ないためやや正確さを欠くが、花粉のカルモジュリン含量は収率から逆算するとガマ、マツおよびトウモロコシとも成熟花粉1 g当たり0.05—0.1 mgである。Tirlapur & Shiggaonはニチニチソウ花粉の $\text{Ca}^{2+}$ の局在性について報告した<sup>(5)</sup>が、その中でウシ脳から精製したカルモジュリンが花粉の発芽を促進すると述べている。我々が得たデータから、花粉が少なくないカルモジュリンをもつことを考えると外在性のカルモジュリンの効果には疑問が残る。このカルモジュリンが花粉の中でどのような役割を果たしているかを明らかにするために、カルモジュリン結

合タンパク質の検索を試みた。 $\text{Ca}^{2+}$ とEGTAの存在下で電気泳動した結果、ガマ、マツ、トウモロコシの3種類の花粉についてはほぼ類似した移動度のところに、結合タンパク質と思われる明確なバンドが現われた。これを分離するためにガマ花粉抽出液を0.1 mM EGTA存在下でDEAE-celluloseカラムクロマトグラフィーを行い、その画分についてカルモジュリンと $\text{Ca}^{2+}$ またはEGTAの存在下で電気泳動を行い、異なる移動度を示すバンドをもつ画分を得た。現在これについて、カルモジュリン結合ゲルによる捕捉を試みている。

$\text{Ca}^{2+}$ のキレート剤である抗生物質、テトラサイクリンを含む培地でユリ花粉を培養すると、花粉管が異常な指向性を示し、オルガネラの配置が乱されるとい<sup>(17)</sup>。カルモジュリンは $10^{-5}$ — $10^{-7}$  Mの極めて低いカルシウム濃度で作用するが、現象面での $\text{Ca}^{2+}$ の効果と生化学レベルでの $\text{Ca}^{2+}$ 機能との接点がどこにあるのか、今後の重要な課題である。

謝辞 本研究は昭和61—62年度の文部省科学研究費一般C(課題番号61560107)および昭和61年度の名城大学学術研究助成費による補助を受けたものである。また本研究に協力された、棚橋崇成、園部幸代、外山勝治、前田睦、榎本晴美の各氏に感謝致します。

## 文 献

- (1) 榎森康文、大野茂男、今城 忍、川崎博司、鈴木宏一：細胞工学 5, 285—295 (1986)
- (2) Anderson J. M. and M. J. Cormier : Biochem. Biophys. Res. Commun., 84, 595—602 (1978)
- (3) Anderson J. M., H. Charbonneau, H. P. Jones, R. O. Macann and M. J. Cormier : Biochemistry, 19, 3113—3120 (1980)
- (4) Dieter P. and M. Dieter : Plant Physiol., 27, 1327—1333 (1986)
- (5) Tirlapur U. K. and S. U. Shiggaon : 花粉誌 33, 1—5 (1987)
- (6) 日高広義、遠藤登代志：カルモジュリン— $\text{Ca}^{2+}$ 受容タンパク質、講談社、pp37—39 (1983)
- (7) Furchgott R. and T. de Gudareff : J. Biol. Chem., 223, 377—388 (1956)
- (8) Hartree E. F. : Anal. Biochem., 48, 422—427 (1972)
- (9) 矢沢道生：カルモジュリン— $\text{Ca}^{2+}$ 受容タンパク質、講談社、pp47—51 (1983)
- (10) Davis B. J. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404—427 (1964)
- (11) 磯辺俊明、奥山典生：蛋白質核酸酵素、27, 2127—2147 (1982)

- (12) 八木康一：カルモジュリン-Ca<sup>2+</sup> 受容タンパク質、講談社、pp 19-25 (1983)
- (13) Dieter P. and D. Marme : FEBS Lett. **125**, 245-248 (1981)
- (14) Ranjeva R., G. Refeno, A. Boudet and D. Marme : Proc. Natl. Acad. Sci USA, **80**, 5222-5224 (1983)
- (15) Salimath B. P. and M. Dieter : Planta, **158**, 560-568 (1983)
- (16) Teshima Y. and S. Kakiuchi : J. cyclic Nucleotide Res., **4**, 219-231 (1978)
- (17) Reiss H-D and W. Herth : Planta, **156**, 218-225 (1982)

(受理日 1988年3月29日)