3PB005

C. エレガンスの *pat-10* 変異をもたらすトロポニンCの機能解析

○寺見浩美、香川弘昭（岡大・理・生物）

線虫 *C. elegans* のトロポニンC 遺伝子 *pat-10* は、体壁筋や陰門筋で発現し、変異体は胚発生致死 *Pat* (*paralyzed arrest at two-fold*) になる。変異体 (*st575*) のトロポニンC には、第 II EF ハンドで D64N の置換と、W153* による C 末端ヘリックスの欠失が起きている。私は変異体の胚致死の原因を明らかにするため、*pat-10* 変異のうちそれぞれ一カ所ずつ変異を入れた 2 つのトロポニンC (*PAT-10-M1*; D64N, *PAT-10-M2*; W153*) を作製し、ウエスタン解析により Ca^{2+} 結合実験とトロポニン I との結合実験を行なった。その結果、M1 は Ca^{2+} 濃度差による泳動度の変化が見られず、M2 はトロポニン I と結合しなかった。また、抗トロポニンC 抗体を用いた *st575* 胚の間接免疫蛍光染色を行ったところ、トロポニンC が検出できなかった。従って、変異体ではトロポニンC の機能喪失により体壁筋が形成されず、致死になると示唆された。以上の結果は、トロポニンC が発生における筋形成に必須であることを示す。現在、M1 または M2 をもつ線虫がどのような表現型になるかを調べるため、プロモーター領域と、それぞれの変異トロポニンC の cDNA をつなげた融合ベクターを作製している。このベクターを導入した形質転換体の表現型を観察したい。

Hiroshi Terami, Hiroaki Kagawa. Functional analysis on the Troponin C of the *pat-10* mutant of *C. elegans*.

3PB007

家族性肥大型心筋症関連トロポニンT ミュータント

ΔE160 の機能解析

○原田景太¹、弥永富美¹、水上令子²、森本幸生¹、大槻啓男¹（¹九大院・医・臨床薬理、²九大・医短）

家族性肥大型心筋症は、その大半の症例において、発症にサルコメアを構成する蛋白質の変異が関与している事が明らかにされている。近年、トロポニンT にもこの疾患に関連した変異が見出されたので、その一つである 160 番目のグルタミン酸残基が欠損した ΔE160 変異トロポニンT を遺伝子工学的手法を用いて作成し、その機能の検討を行った。

大量のトロポニンT で処理することにより、内在性のトロポニン複合体を交換除去することができるトロポニンT 処理法を用い、ブタ心臓左心室より調整した筋原繊維に、組換えヒト心筋トロポニンC、トロポニンI、野生型および ΔE160 変異トロポニンT（以下それぞれ TnC、TnI、WT-TnT、ΔE160-TnT と記す）を組み込み、その作用を Ca^{2+} 感受性 ATPase 活性を測定する事により調べた。

ΔE160-TnT を組み込んだ筋原繊維標本の ATPase 活性の TnI による抑制は、WT-TnT を組み込んだ標本に比べ、より低濃度の TnC で Ca^{2+} 存在下に中和された。また、ΔE160-TnT を組み込んだ筋原繊維標本の ATPase 活性は、WT-TnT を組み込んだ標本の ATPase 活性より有意に高い Ca^{2+} 感受性と低い協同性を示した。現在は脱鞘筋繊維標本を用い、ΔE160-TnT の作用を調べている。

K.Harada, F.Yanaga, R.Minakami, S.Morimoto, I.Ohtsuki : Functional analysis of a troponin T mutant ΔE160 that causes familial hypertrophic cardiomyopathy

3PB006

GFP を用いた *C. elegans* のパラミオシン変異体の解析

○山本大輔・小笠原道生・香川弘昭（岡山大・理）

パラミオシンは、全長の殆どが α -ヘリックスモチーフをとる約 100kDa の分子で、無脊椎動物の太い繊維の芯を構成する筋蛋白質である。線虫のパラミオシンは、体壁筋及び咽頭筋で単一遺伝子 *unc-15* が発現している。変異体 *unc-15* (*e73*) 株では、アミノ酸側鎖の電荷が逆転して (E342K)、パラミオシン分子が異常集合するため運動不良 (Unc) になる。また、*e73* 株の復帰突然変異 *m209* 株は、逆転したパラミオシン分子の対合部位の電荷が逆転して (E835K)、分子集合が緩和して運動能が野生型に戻る。温度感受性変異を示す *e1402* 株は疎水性残基の置換 (L799F) をしているが具体的な分子集合機構は分かっていない。

本研究では DNA 微注入法により *unc-15::gfp* 融合遺伝子を線虫体内に導入し、パラミオシンの胚発生期および成体での発現を確認したので報告する。また、長さの異なるパラミオシン-GFP 融合蛋白質を発現する形質転換線虫を SDS-PAGE 及びウエスタン解析により融合蛋白質を定量し、筋繊維の集合に与える影響を推測した。*e1402* 株にも融合蛋白質を発現させ、温度感受性変異を解明する手がかりとしたい。

Daisuke Yamamoto, Mithio Ogasawara and Hiroaki Kagawa
Analysis on GFP-Paramyosin- transgenic animals of *C. elegans*

3PB008

線虫トロポニンCのカルシウム受容

○上田知生、勝寄秀和、村瀬智彦、寺見浩美*、香川弘昭*、飯尾隆義（名大院物理、岡山大生物*）

大腸菌につくせした線虫トロポニンC (CeTnC) およびその変異蛋白質 (CeTnC-M1) を用いて、線虫トロポニンCのカルシウム受容特性を蛍光分光法とストップフロー法で研究して以下の結果を得た。

(1) CeTnCのC端ドメインにあるTrp153の蛍光スペクトル強度のカルシウム濃度依存曲線からC端ドメインへのカルシウム結合定数が $6.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ と見積もられた。この値は 5 mM MgCl_2 の存在いかんによらなかった。またマグネシウムの添加によってTrp153の蛍光スペクトルは影響を受けなかった。したがってC端ドメインのカルシウム結合部位にはマグネシウムは結合しない、と結論づけられる。

(2) CeTnCのN端ドメインにあるCys77に dansylarizidine (DANZ) を結合させた。その試料の蛍光滴定曲線からN端ドメインへのカルシウム結合定数が $7.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ と見積もられた。この値はC端ドメインのものとはほぼおなじである。またこの値は 5 mM MgCl_2 の存在いかんにはよらなかった。一方、DANZ-CeTnCのDANZの蛍光はマグネシウム添加によってカルシウム添加によるものとは異なる変化をしめた。その蛍光滴定曲線からN端ドメインのマグネシウム結合定数が 200 M^{-1} と見積もられた。これらの結果はN端ドメインへはカルシウムもマグネシウムも結合するが、それらの結合場所はたがいに異なっていることを示している。

(3) 蛍光分光ストップフロー法によってCeTnC-M1のC端ドメインからのカルシウムイオンの解離反応を観測した。この解離反応を一つの指数関数型反応として解析すると、その速度定数の値は 400 s^{-1} であった。この値は同様の観測を骨格筋トロポニンCで行って得られたものより約100倍高い値である。上の (1) で求めた結合定数とあわせるとC端ドメインへのカルシウム結合の速度定数が $2.52 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と求められる。この値は骨格筋トロポニンCのN端ドメイン（制御部位）へのカルシウム結合の速度定数に近い値である。これら実験結果に基づいて、線虫トロポニンCの生理機能発現様式についても議論する。

T. Ueda, H. Katsuzaki, T. Murase, H. Terami, H. Kagawa, T. Ito : Calcium Binding of *C. elegans* Troponin C