3PB013

T処理したカエル骨格筋スキンドファイバーのX線回折

○ 竹森 重・山口 眞紀 (慈恵医大・生理学第1)

八木 直人 (高輝度光科学研究センター)

森本 幸生 (九州大学・医学部・臨床薬理学)

骨格筋の筋原線維はタンパク質分子の規則配列からできており、そのX線回折像は多くの強度ピークを示す。収縮等の生理的な状態変化に伴う強度変化も詳細に測定されているが、特にトロポニンやCタンパクのように比較的小量の少ないタンパクについては、それが反射に与える寄与が必ずしも明確になっていない。

そこで、細胞膜を取り除いたスキンドファイバーから特定のタンパクを取り除いて精細な回折像を記録する手法を開発している。このたび、ファイバーの微細構造を壊すことなくトロポニンCとトロポニンIを除去することに成功した。

標本はウシガエルの縫工筋から調製した単離スキンドファイバーを用い、X線回折実験にはSPring 8の放射光BL45XUを利用した。2,3-ブタンジオンモノオキシム(BDM)、アピラーゼ存在下に低温(5°C)で硬直にしたスキンドファイバーを、ウサギから精製したトロポニンT 1 mg/mlを含むイオン強度0.165 M, pH 6.2の硬直液で1時間処理した。このT処理後のファイバーを、精製したウサギトロポニンCとIそれぞれ1 mg/mlの溶液で30分から1時間処理すると、電気泳動でも、収縮のCa²⁺拮抗能から見ても、ファイバーにトロポニンCとIが再構成されたが、T処理によって減弱した子午線上38 nm⁻¹の反射も、このとき再現性良く回復することが確かめられた。

S.Takemori, M.Yamaguchi, N.Yagi, S.Morimoto : X-ray diffraction of Skinned Fibers of Frog Skeletal Muscle from which Troponins C and are extracted.

3PB015

DISTINCT STRUCTURAL PROPERTIES OF N- AND C- HALVES OF TROPOMODULIN

○ Alla S. Kostyukova¹, Kayo Maeda¹, Emiko Yamauchi², Hisaaki Taniguchi², Yuchiro Maeda¹¹ RIKEN Harima Institute at SPring-8; ² Institute of Comprehensive Medical Sciences, Fujita Health University

Tropomodulin (Tmod), a 40 kDa protein, is expressed in many tissues including muscles and it is the only known P-end capping protein of actin filaments (Fowler, 1987; Weber et al., 1994). According to literature the C-terminal half of Tmod may be involved in the P-end capping, although no evidence for direct interaction between this part and actin has been presented. On the other hand the N-terminal half is responsible for the tropomyosin binding. As a part of our search for a good tool serving for preparing short segment of actin-tropomyosin filament of an uniform length, we have been studying Tmod.

Firstly, good expression systems have been established for chicken muscle Tmod. Especially the variant that lacks 15 amino acids at its original C-terminus (the truncated Tmod) is advantageous. Compared to the complete molecule, the truncated Tmod binds to actin-tropomyosin equally well, while it is less susceptible to proteolysis. In the present study, therefore, the *E.coli* expressed truncated Tmod has been used.

Secondly, the domain structure has been studied. Limited proteolysis, mass-spectroscopy and near- as well as far UV CD have indicated that Tmod is an α -helix rich protein and consists of two distinct parts. The C-terminal half (20 kDa) forms a tight domain which is resistant to proteolysis and can be easily purified. In contrast, the N-terminal half likely has poorly definite tertiary structure. Limited proteolysis has indicated that, upon binding to actin-tropomyosin, the N-terminal half of Tmod becomes less susceptible to proteolysis. This may be accounted for either by transition into a more tightly folded conformation, or by protection by actin and/or tropomyosin

3PB014

Influence of divalent cations on Troponin ternary complex crystallization.

○ Inna Krieger¹, Soichi Takeda², Kayo Maeda², Pradeep Luther³ & Yuichiro Maeda²¹Moscow State University, ²RIKEN Harima Institute at SPring-8, ³London Imperial College

Troponin ternary complex (complex of TnC, TnI and TnT) crystallizes under conditions unusual for protein crystallization. Upon mixing PEG and divalent cations and the protein solution to make up set-ups, the protein forms a kind of transparent precipitate - "liquid protein droplets", which transforms into crystals. PEG alone does not cause precipitate of this kind. Addition of Zn or Cd in millimolar range is required, and Zn and Cd result in distinct crystal forms.

It is known that some of Ca-binding proteins (prolactin, γ -lactalbumin, S-100 proteins, parvalbumin) bind Zn and some other heavy divalent cations. Zn ions bind to specific sites distinct to the Ca-binding sites. According to the literature on S100A7, Zn-binding causes protein conformational changes which play functional roles. We are investigating a possibility that troponin also has distinct binding sites for Cd or Zn ions.

3PB016

軟体動物平滑筋の硬直状態におけるミオシン頭部の配置

○ 田嶋佳子、田嶋未来雄、岩崎元、¹牧野浩司、²若林克三 (都立大・物理、¹理研・播磨研、²阪大・生物工)

等尺性収縮中のムラサキイガイ前足糸牽引筋 (ABRM) のX線小角回折像には、硬直状態の筋肉の回折像と共通した特徴が見出される¹⁾。即ち、アクチンと相互作用するミオシン頭部が細いフィラメントの外側に細いフィラメントの構造周期に従った配置をとると示唆される。この類似性を更に詳しく調べるために、硬直状態のABRMの良質なX線小角回折像の撮影を前回の報告に引き続いて行った。

フィラメントの配向性を良くするために、次の3点を試みた。

1) グリセリン処理前に試料に張力発生を数回繰り返させてからキャッチ状態にして、細いフィラメントを太いフィラメントに近ずけておく。2) グリセリン処理液にBDM (2,3-butanedione monoxime) を6mM加えて、グリセリン処理中に試料に損傷を与える恐れのある張力発生を抑える。3) X線回折像の撮影中はなるべくフィラメントを引き伸ばしておくために、試料に約25g/mm²の荷重をかける。その結果、比較的フィラメントの配向性のよい回折像が得られ、等尺性収縮中と硬直状態の回折像の類似が確認された。

硬直状態では、59Å層線の下に細いフィラメントの構造周期に従った新しい反射が現われる。それらの中で比較的強度の強い第4, 9, 11層線反射のピーク位置からラセン半径を求めた。細いフィラメントと同じラセン対称性28/13によりそれらのベッセル関数の次数は4, -3, -5となり、ラセン半径74~81Åが与えられる。これは、急速凍結電顕法で観察されたS1修飾アクチンフィラメントにおけるS1のフィラメント軸からの距離とほぼ一致する²⁾。従って、この指数付けが正しいとみなされ、ミオシン頭部はアクチンと同じく28/13ラセンを形成していると考えられる。

1) Y. Tajima *et al.*, J. Synchrotron Radiation 6, 93(1999).

2) R. A. Milligan & P. F. Flicker, J. Cell Biology 105, 29(1987).

Y. Tajima, M. Tajima, H. Iwasaki, K. Makino, and K. Wakabayashi: Cross-Bridge Arrangement in a Molluscan Smooth Muscle in the Rigor State.