2H1315

X線溶液散乱で見るトロポモジュリンの形とトロポミオシンとの相互作用

藤澤 哲郎、Kostyukova Alla、○前田 雄一郎（理研播磨・構造生物化学）

トロポモジュリン(Tmod)はアクチンフィラメントのP端をキャップする蛋白質で、トロポミオシン(Tm)に結合する。我々は長さの揃った短いアクチンフィラメントを調製するなどの目的のために、Tmodのキャッピング作用を分子の構造から理解しようとしている。本研究では、この蛋白質のだいたいの形を知るために、ほぼ分子の全長を含むTmod(N39)と、C端側の半分を含むC20の2種類の断片（Alla Kostyukovaらの本年会発表を参照）について、溶液中のX線小角散乱をSPRING-8のBL45XUにて実行し、その強度分布から形を求めた。Svergun[1]らのアルゴリズムを用いると散乱強度分布から、モデルに依存しないで分子の形を得ることができる（高橋らの本年会発表を参。Tmod(N39)の半分（C端）は回転楕円体でC20に対応し、N端半分はほぼ円筒形である。このN端部分にTmと結合する部位があること、さらにC端半分は、アクチンともTmとも相互作用しないことを考慮して、下図のようなTmod/Tm/アクチン複合体の位置関係についてのモデルを構築した。C端半分は立体障害的にアクチン単量体のP端への結合を阻害していると考えられる。

[1]Svergun, D.I. (1999) *Biophys. J.*, **76**, 2879-2886.

T.Fujisawa, A.Kostyukova and Y.Maeda : Shape of tropomodulin deduced from X-ray solution scattering and the interaction with tropomyosin

2H1345

変異トロポニン T を使った再構成細いフィラメントの蛍光エネルギー移動測定

○紺田 佳孝¹、溝口 智恵子¹、前田 佳代²、前田 雄一郎²、三木 正雄¹（¹ 福井大工、² 理研播磨）

骨格筋の収縮は細いフィラメント上、カルシウムイオンに依存するトロポミオシン (Tm)-トロポニン (Tn) 間の相互作用により制御されている。この Tn を構成する TnI, TnC, TnT の3つのサブユニットのうち TnT は Tn を Tm に結合させている。TnC や TnI は細いフィラメント上でカルシウムイオンに依存した大きな構造変化をみせるが、この TnT がカルシウムイオンに依存してどのようにふるまうかについては明らかではない。ウサギ骨格筋の TnT はシステインを含まないで、蛍光色素を特異的につけるのが困難である。私達は TnT の可変領域である 1-58 残基部分を取り除き更に 250 番目のセリンをシステイン残基に改変した唯一のシステインを含む変異 TnT(S250C) を大腸菌培養により調製した。変異 TnT の Cys-250 に蛍光エネルギー供与体として 5-(2-iodoacetylaminooethyl) aminonaphthalen 1-sulfonic acid (IAEDANS) をラベルした。また、蛍光エネルギー受容体として Actin の Cys-374 には、4-methylaminophenyl - azophenyl 4'-maleimide (DABMI) を、また Gln-41 にはトランスグルタミナーゼ反応を利用して Fluorescein cadaverine (FLC) をラベルした。これらプローブ間の蛍光エネルギー移動の測定から TnT が再構成された細いフィラメント上でアクチンとどのような位置関係にあるかを調べ、またこの位置関係がカルシウムイオンに依存するのかを調べたので報告する。

Y.Konda, C.Mizoguchi, K.Maeda, Y.Maeda, M.Miki : FRET between TnT and Actin.

2H1330

TnI の C 末端と阻害領域との挙動の比較

○溝口 智恵子¹、海 宏¹、前田 佳世²、前田 雄一郎²、三木 正雄¹（¹ 福井大工、² 理研播磨）

筋収縮は Tn へのカルシウムイオンの脱着により調節されている。この Tn を構成する TnI, TnC, TnT の3つのサブユニットのうち TnI は Actin/Tm に結合することで Actin・Myosin 間の相互作用を阻害する。TnI の 96-116 のアミノ酸は阻害領域と呼ばれており、カルシウムイオン濃度依存的に Actin もしくは TnC に結合し、相互作用を阻害するために重要な領域であることが知られている。我々は2種の TnI を調製しそれぞれ C 末端 (181) と阻害領域 (133) に IAEDANS をラベルし蛍光偏光解消の測定を行った。C 端にラベルを導入するためには、野生型 TnI に存在する3つの cysteine 残基を他のアミノ酸に置換し 181 番目の serine 残基を cysteine 残基に置換した変異 TnI(C48A, C64A, C133S, S181C) を調製した。他方、阻害領域のラベルには野生型 TnI の Cys-133 を用いた。これらラベルした TnI を Thin filament の各成分と相互作用させ、蛍光偏光解消の測定を行い、TnI の C 末端と阻害領域との挙動の比較を行った。Perrin プロットから TnI 単独および Tn 複合体では C 末端部分は 133 番目と比較すると動きが二倍以上大きく、カルシウムイオンによる変化は見られなかった。一方 F-Actin, Tm 存在下でも C 端の方が動きが大きく、カルシウムイオン不在下では Cys-133 および Cys-181 共に動きが抑えられた。蛍光偏光解消で見られた違いをさらに蛍光エネルギー移動法により詳細に検討する。

C.Mizoguchi, H. Hai, K.Maeda, Y.Maeda, M.Miki : The behavior of C-terminal and inhibitory region in TnI

2H1400

D234 変異トロポミオシンを使った再構成細いフィラメントの蛍光エネルギー移動測定

○海 宏¹、佐野 健一²、前田 佳代²、前田 雄一郎²、三木 正雄¹（¹ 福井大工、² 播磨理研）

骨格筋の収縮は細いフィラメント上、カルシウムイオンに依存するトロポミオシン (Tm)-トロポニン (Tn) 間の相互作用により制御されている。Tm は七つの類似領域を持ち、細いフィラメント上でアクチン 7 分子をカバーしている。Tobacman 達は内部領域 2,3,4 を削除した変異 Tm は通常の Tm と比べて、アクチンに対するアフィニティが変わらないが、カルシウムイオン濃度に関わらず常に Actomyosin ATPase 活性を阻害すると報告した。(Landis, C. A., Bobkova, A., Homsher, E., and Tobacman, L. S. (1997) J. Biol. Chem. 272, 14051-14056) 私達はこの変異 Tm を用いて、再構成した細いフィラメントの Ca²⁺ イオン応答の構造変化について調べた。TnI の Cys133 に結合している IAEDANS をエネルギードナーとして、アクチンの Gln41 に導入を行った FLC をエネルギーアクセプターとして用い、蛍光エネルギー移動法により再構成した細いフィラメント中のプローブ間の位置関係の検討を行った。その結果、この変異 Tm 上で Tn は通常の Tm 上の Tn と同じようにオン状態とオフ状態に対応した細いフィラメント上の位置に変換している。さらに、変異 Tm の Cys190 につけている蛍光ドナーとアクチン Gln41 のアクセプター間の蛍光エネルギー移動を測定した。大腸菌由来の変異 Tm は N 末端がアセチル化されていないので、蛍光ラベルと副反応する可能性があるため、昆虫細胞由来の変異 Tm を用いた。どちらの変異 Tm も通常の Tm とアクチン上の同じ位置にあるではないことがわかった。一方、アクチンフィラメント上の変異 Tm は通常の Tm と同様、カルシウムイオン濃度により変化しなかった。

H.Hai, K.Sano, K.Maeda, Y.Maeda, M.Miki : FRET between actin and internal deletion mutant D234 tropomyosin