2H1630

線虫の野生型及び変異型トロポニン C の結晶化

○大塚 広志、寺見 浩美、香川 弘昭 (岡山大・院・自然科学)

X 線回折、NMR などのにより、シチメンチョウ、ウサギ、ヒトなど脊椎動物のトロポニン C の構造解析が行われている。しかし、無脊椎動物のトロポニン C ではアカザラガイなどで構造を示唆するような間接的な解析は行われているが、X 線回折による構造解析は未だ成されていない。線虫体壁筋のトロポニン C 遺伝子 *pat-10* の塩基置換により、二折期で胚発生が停止し致死となる *pat-10(st575)* 変異体が単離されている。*pat-10(st575)* 変異体ではトロポニン C に二ヶ所 (D64N と W153 *) の変異がみられる。一個の変異のみを持つ変異型トロポニン C; TnC-M1 (D64N), TnC-M2 (W153 *) を大腸菌で産生してそれぞれ解析したところ、前者は Ca²⁺結合能がなくなり、後者はトロポニン I と結合しなかった (Terami et al, 1999)。本実験では、野生型及び変異型トロポニン C の構造解析を行い、両者の構造と機能を分子レベルで理解して、変異型トロポニン C が個体レベルで胚発生や運動機能不良になる因果関係を明らかにする事を目的としている。まず線虫野生型トロポニン C と相同なアミノ酸配列を持つタンパク質をコードするベクターを構築した。また、上述した二つの変異型トロポニン C についても同様に発現ベクターを構築した。現在、大腸菌から野生型トロポニン C を調製し超遠心 (90000rpm, 3hr) により粗分画した後、DEAE-トヨパール 650M (東ソー) カラム担体、MONO-Q (ファルマシア) カラム担体を使用したイオン交換クロマトグラフィーにより精製を行っている。得られた試料をハンギングドロップ法により結晶化を行っている。変異型についても順次実験する予定である。

H.Ohtsuka, H.Terami and H.Kagawa : Crystallization of The Wild Type and Mutants Troponin C in *Caenorhabditis elegans*

2H1700

線虫のパラミオシン GFP を用いた分子集合の解析

○山本 大輔、香川 弘昭 (岡山大・院・自然科学)

パラミオシンは無脊椎動物の、筋肉の太い線維の芯を構成する蛋白質である。線虫パラミオシンはアミノ酸側鎖の電荷相互作用により正しく配向し、疎水性領域は分子集合の開始に関わる。単離されたパラミオシン変異は C 末端に集中しており、パラミオシンの C 末端領域は分子集合において重要である。本研究では、異なる 3 つの *unc-15::gfp* 融合遺伝子を野生型 N2 およびパラミオシン欠損変異 *unc-15 (e1214)* 株へ導入し、得られた形質転換体のパラミオシン分子集合を解析した。N2 の形質転換体では、完全長パラミオシン GFP は分子集合して筋繊維を形成したが、C 末端欠失パラミオシン GFP は分子集合せず、筋繊維を形成しなかった。GFP を完全長パラミオシン C 末端に融合した場合、形質転換体の筋繊維形成に乱れが生じたが、N 末端に融合した場合、形質転換体では筋繊維が観察された。C 末端領域の有無や GFP の位置による違いは、欠損変異体の運動量、体長、産卵数など線虫の機能回復にも影響した。また、形質転換体一匹を用いてパラミオシンとパラミオシン GFP の量比をウェスタン解析により定量したところ、パラミオシン GFP はパラミオシンに比べ過剰発現していた。N2 の形質転換体の太い線維では、パラミオシンとパラミオシン GFP が共重合していた。それに対し、*e1214* 株の形質転換体の太い線維はパラミオシン GFP のみである。今後、パラミオシン GFP の量を抑えた形質転換体を作成し、パラミオシン GFP の分子集合への影響を検討すると共に、他のパラミオシン変異体も機能回復させたい。

D. Yamamoto and H. Kagawa : Molecular assembly of three paramyosin-GFPs in transgenic *C. elegans*

2H1645

線虫変異トロポニン C の胚発生や運動機能に及ぼす影響

○寺見 浩美、香川 弘昭 (岡山大・院・自然科学)

線虫の筋肉は、骨格筋類似の体壁筋と心筋類似の咽頭筋の二つに大別される。体壁筋トロポニン C 遺伝子 *pat-10* (Paralyzed arrest at embryonic two-fold stage) の変異体は、発生が 2-fold 期で停止し、孵化するが致死になる。*pat-10 (st575)* では、トロポニン C に D64N および D153 * のアミノ酸置換と欠失が起きている。我々は *pat-10* 変異が胚致死になる原因を調べるため、st575 変異のどちらか一つを持つ変異トロポニン C、PAT-10-m1 (D64N) と PAT-10-m2 (D153 *) を調製した。in vitro では、PAT-10-m1 はカルシウム濃度依存性の泳動度変化を示さず、PAT-10-m2 はトロポニン I と結合しない。また変異体の胚では体壁筋の筋繊維が正しく形成されてない。従って *pat-10 (st575)* 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、致死になると推察される。本研究は、生化学的な実験から見出された変異トロポニン C の性質が、実際に線虫個体の筋形成、筋収縮にどのように影響するかを調べることを目的としている。現在、*pat-10-m1* 及び *pat-10-m2* を導入した形質転換線虫の作製を行っている。これまでに、*pat-10*、*pat-10-m1*、*pat-10-m2* の cDNA を *pat-10* 上流 1.2kbp とつなげたインジェクションベクターを作製した。*pat-10* cDNA を *RW3608* 株 (*st575* /-) に導入して、胚発生致死からの回復を確認した後、*pat-10-m1*、*pat-10-m2* cDNA の導入を行う。得られた形質転換体の表現型を観察し、胚発生と運動機能におけるトロポニン C の役割を明らかにしたい。

H. Terami and H. Kagawa : Effect of the *C. elegans* mutant troponin C on the embryogenesis and locomotion

2H1715

線虫トロポニン C 変異蛋白質のカルシウム結合

○上田 知生¹、梶原 維子¹、吉岡 修¹、勝崎 秀和¹、村瀬 智彦¹、寺見 浩美²、香川 弘昭²、飯尾 隆義¹ (¹ 名大院物理、² 岡山大生物)

前回の年会において我々は、線虫トロポニン C の N 端ドメイン C 端ドメインとも結合定数が 10^6M^{-1} 付近の低い親和性を持つカルシウム結合部位を持つことを示唆する結果を報告した。特に線虫の C 端ドメインの特性は、骨格筋トロポニン C のそれと極めて異なっていた。今回の発表では、線虫トロポニン C の C 端ドメインのカルシウム結合特性に焦点をあてて線虫トロポニン C の変異蛋白質 CeTnC-1-M1 を用いた研究を発表する。CeTnC-1-M1 は、64 番目のアスパラギン酸がアスパラギンに置き換わった変異蛋白質で、N 端ドメインのカルシウム結合能が失われた蛋白質である。CeTnC-1-M1 の C 端ドメインにある Trp153 の蛍光分光滴定曲線から C 端ドメインのカルシウム結合定数が $2.0 \pm 1.1 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ と求められた。またカルシウム結合定数は、5mM MgCl₂ 存在下では $1.6 \pm 0.9 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ 、10mM MgCl₂ 存在下では $1.3 \pm 0.9 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ であった。低いカルシウム結合能を示す C 端ドメインのカルシウム結合定数が、MgCl₂ の存在によらないことから線虫トロポニン C の C 端ドメインは骨格筋トロポニン C の N 端ドメインと同様のカルシウム特異性結合部位を持つことが示される。蛍光分光ストップフロー法により CeTnC-1-M1 の C 端ドメインからのカルシウムの解離反応を見た。その速度定数は $380 \pm 40 \text{s}^{-1}$ であった。上で求めたカルシウム結合定数とこのカルシウムの解離速度定数からカルシウムの結合速度定数が $7.6 \pm 4.9 \times 10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ と求められる。この値は、やはり骨格筋トロポニン C の N 端ドメインとはほぼ同じオーダーの値である。従って線虫トロポニン C の C 端ドメインのカルシウム結合特性は、骨格筋トロポニン C の N 端ドメインのカルシウム結合特性と同様であることが明らかになった。

T.Ueda, Y.Kajiwar, O.Yoshioka, H.Katuzaki, T.Murase, H.Terami, H.Kagawa, T.Iio : Calcium Binding Properties of *C.elegans* Troponin C Mutant