1P113

トロポミオシンの熱安定性

○志鷹 裕司¹、佐野 健一²、海 宏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・構造生物化学）
筋収縮制御タンパク質であるトロポミオシン (Tm) は、分子の全長に渡って二本鎖で平行な α -helical coiled-coil を形成する。Tm はやや柔軟な rod であり、この柔軟性が分子の機能に重要な役割を果たしていると考えられている。Tm の構造の安定化には、イオン性相互作用と疎水性相互作用の両方が寄与していて、熱に比較的安定な N 端領域と不安定な C 端領域に分けることができることが知られている。我々はウサギ横紋筋由来 α -Tm の欠失変異体の熱安定性の比較から、Tm の構造の安定化のメカニズムを明らかにすることを試みた。そこで示差走査熱量測定 (DSC) を用いて、温度変化による 3 次元構造の変化を追跡した。その結果、N 端領域の 2/3 (a.a. 49-167) を欠失した変異体 D234Tm の熱安定性は、低イオン強度下では野生型と同程度に保たれたが、イオン強度を高めると野生型では C 端領域と N 端領域によるものと思われる 2 つのピークが見られた。これに対して、D234Tm の熱安定性は野生型で見られた低い遷移温度と同じ位置に 1 つだけピークが見られた。このことは、Tm の α -helical coiled-coil 構造の安定化に寄与するイオン性相互作用は、N 端領域全体を必要とするのではなく、その N 端の 1/3 だけでも十分 C 端の不安定な領域の安定性を高めることができ、疎水性相互作用については、N 端の 1/3 だけでは C 端領域の不安定さが優勢になると考えられる。また円二色性 (CD) による温度変化に対しての α -helix 含量の測定でも同様の結果を得ている。現在、さらにイオン強度を上げたときの熱安定性の比較と、他の欠失変異体の測定を行っており、これらについても報告する。

Y.Shitaka, K.Sano, H.Hai, K.Maeda, Y.Maeda, M.Miki : Thermal stability of Tropomyosin

1P115

線虫トロポニン C とウサギ骨格筋トロポニン I の相互作用

○梶原 維子¹、吉岡 修¹、上田 知生¹、勝崎 秀和¹、村瀬 智彦¹、寺見 浩美²、大塚 広志²、香川 弘昭²、飯尾 隆義¹（¹ 名大院・物理、² 岡山大院・自然科学）
我々はこれまでに線虫体壁筋トロポニン C の N 端ドメインおよび C 端ドメインのカルシウム結合定数がそれぞれ 106M-1 程度の低い値を持ち、解離速度定数がそれぞれ 400 および 800s-1 程度の速い値を持つことを報告した。今回の発表では、こういったカルシウム結合特性をもつ線虫トロポニン C が筋収縮抑制成分トロポニン I と作用した場合に、この結合特性がどのように変化するかを報告する。ウサギ骨格筋トロポニンから精製したトロポニン I と結合させた、線虫トロポニン C のカルシウム結合定数を測定した。疎水性の非共有結合蛍光色素である TNS を用いて、蛍光分光滴定曲線からカルシウム結合定数を調べた結果、トロポニン C のみのときに比べて小さな値をとった。これはトロポニン I と作用することによりカルシウムの親和性が低くなるとを示している。さらに、線虫トロポニン C の変異蛋白質 CeTnC-1-M1, CeTnC-1-M2 を用いて、C 端ドメイン、N 端ドメインそれぞれについても研究を行い発表する予定である。

Y.Kajihara, O.Yoshioka, T.Ueda, H.Katsuzaki, T.Murase, H.Terami, H.Ohtsuka, H.Kagawa : Interaction between C.elegans TnC and rabbit skeletal TnI

1P114

マイクロ波誘電測定によるアクチンの G-F 変換における水和変化

○カビルソウド ラシエル¹、横山 慶一¹、御橋 廣真²、鈴木 誠¹（¹東北大院・工・金属工、²名古屋大院・理・生物）
Actin is a motor protein which generates force by interacting with myosin S1. We made a microwave dielectric measurement on actin solution to determine the hydration level of G-actin and F-actin. The hydration state of actin was determined by dielectric spectroscopy with microwave, in the frequency range between 0.2 and 20 GHz at 20.0 degC. The data were analyzed by a method recently devised, which can resolve the total amount of water restrained by proteins into two component, one with rotational relaxation frequency (fc) in gigahertz region (weakly bound water) and the other with lower fc (tightly bound water). The concentration of actin that used for dielectric measurement was 10 to 15 mg/ml. A fluorescent reagent, N-(1-pyrenyl) iodoacetamide PIAA was used to label actin. Labeled F-Actin showed double peaks at 345 and 365 nm in the UV absorption spectra, whereas labeled G-actin of low concentration showed a single peak at 345 nm. By this method we could estimate the fraction of F-actin of 10mg/ml actin solution in G-buffer (ATP 0.2mM, HEPES 2mM, CaCl2 0.1mM) as 0.3. The number of hydration water decreased by xxx per actin molecule, when G-actin converted to F-actin by the addition of salt mixture (final HEPES 10mM, KCl 50mM, MgCl2 2mM, ATP 0.8mM). Preliminary if all actin in G form and all converted to F form by the addition of salt then the expected hydration change will be xxx/0.7.

S.R. Kabir, K. Yokoyama, K. Mihashi and M. Suzuki : Hydration change of actin at G-F conversion by microwave dielectric measurement

1P116

トロポニン I はカルシウム依存的に二次構造変化を起こす

○村上 健次¹、新井 宗仁¹、佐伯 喜美子¹、松浦 能行²、安永 卓生¹、桑島 邦博¹、若林 健之¹（¹ 東大院・理学系・物理、² Medical Research Council (MRC)）
トロポニン (TnT、TnC、TnI の複合体) は細いフィラメント上に位置し、ミオシンの ATPase 活性を制御する。その中でダイナミックな構造変化を引き起こすのはトロポニンの中の TnI の C 末端であり、カルシウム依存的にアクチンや TnC に結合する (Narita et al. J.M.B. 308 (2001), 241-261)。その TnI の C 末端に含まれる疎水性の TnC 結合部位 (鶏骨格筋のアミノ酸残基で 113-128 付近) は非常に重要な部位であり、高カルシウム濃度で α ヘリックス構造を取って TnC の疎水性部位に結合することが示唆されているが、低カルシウム濃度でどのような役割を果たしているかは不明である。興味深いことにこの疎水性部位はカルモジュリンターゲット蛋白質 calspermin の M13 シーケンスと非常に良く似ている。多くのカルモジュリンターゲット蛋白質では M13 と呼ばれるカルモジュリン結合ペプチドを含み、活性化の際 (カルモジュリンと結合する際) の M13 の α ヘリックス転移は非常に重要である。今回私たちは TnI の C 末端の TnC 結合部位に対して同じようなカルシウム依存的二次構造変化を予想し、円二色性 CD 測定を行って α ヘリックス含量変化を調べた。実験は TnI の C 末端を欠失させた三つの変異体 (I182、I145、I116) を TnT、TnC との複合体にして行った。TnC binding site を含む 2 つの変異体 I182、I145 では、カルシウム濃度を下げると α ヘリックス含量の減少が観察されたが、TnC binding site を含まない変異体 I116 ではカルシウム濃度を下げても α ヘリックス含量の減少はほとんど見られなかった。ちなみに三つの変異体はどれもきちんとした複合体を形成していることはゲル濾過で確認しているので、トロポニン全体の構造は保たれたままである。このことから TnI に含まれる TnC 結合部位 (アミノ酸残基 113-128) はカルシウム濃度が低くなると、 α ヘリックス含量の低い構造へ転移することがわかった。
K.Murakami, M.Arai, K.Saeki, M.Yoshiyuki, T.Yasunaga, K.Kuwajima and T.Wakabayashi : Ca(2+)-induced secondary structural changes of troponin I.