1E1415

トロポニン T1/トロポミオシン複合体の結晶化

○南方 志帆¹、武田 壮一²、若林 克三¹、前田 雄一郎² (¹ 阪大院・基礎工学研究科・生物工学、² 理研播磨)

横紋筋収縮のカルシウム調節は、トロポニン (Tn)、トロポミオシン (Tm) のコンフォメーション変化により行われる。Tn は TnT、TnI、TnC の3つのサブユニットで構成されている。さらにTnTは、Tmと結合するN末端部のTnT1と、TnIおよびTnCと結合するC末端部のTnT2に分けられる。またTnは構造、機能的にTnT2、TnI、TnCからなる調節に必須なコアドメインと、TnT1のテイルドメインからなり、TnT1はTnをTmに結合させるために必要である。TnT1はヘリックス含量が高く、 α -helical coiled-coilのダイマーであるTmとトリプルコイル構造を形成している可能性が高い。本研究は、現在構造未知であるTnT1およびTnT1/Tm複合体についての構造を明らかにすることを目的として行った。TnT1/Tm複合体の構造を得て、最近明らかにされたTnのコアドメインの構造や繊維回折実験における結果を組み合わせることにより、最終的にアクチンフィラメント上でのTnの構造とその変化も明らかにしたいと考えている。TnT1は、超可変領域を除いた25kDaのTnTフラグメントとして大腸菌に発現の後、TnT1とTnT2の境界付近にある唯一のメチオニン残基で、臭化シアンを用いて化学的切断を行うことにより、純度の高い標品を得た。またTmについては、TnT1が結合すると考えられているC末端側の、長さの異なる断片を数種調製した。TnT1/Tm複合体は、それぞれ別々に発現、精製したTnT1とTmを等モル比になるよう再構成し、結晶化試料とした。このようにして得られたTnT1およびTnT1/Tm複合体について、それぞれ結晶化およびX線回折実験を行った。今回、その途中経過について報告する。

S.Minakata, S.Takeda, K.Wakabayashi, Y.Maeda : Crystallization of Troponin T1/Tropomyosin Complexes

1E1445

ヒト心筋トロポニン I 側鎖スピラベルの複合体 C-I-T における ESR 動的解析

○相原 朋樹¹、中村 志芳¹、植木 正二¹、山本 行男²、荒田 敏昭¹ (¹ 阪大院・理・生物科学、² 京大院・人間環境)

トロポニン (Tn) を構成する Tn C はカルシウム (Ca) 結合部位を持ち、その濃度変化によって構造変化することはヒト心筋 Tn C を用いたこれまでの ESR 測定からも明らかである。Tn C の構造変化に伴い、Tn I の調節機能部位がアクチンに作用することで筋収縮制御に関わっていると想定されている。そこでまず、Tn I の Tn C・Tn T と相互作用する部位や機能性部位の同定とその部位の動的構造変化を調べるため、ヒト心筋 Tn I に天然に存在するシステイン残基 80、97 の側鎖 SH 基にスピラベル剤を導入して Tn C-I-T 複合体における ESR スペクトルを調べた。その結果、複合体では、Tn I の側鎖スピラベルの運動性は速い成分 (相関時間: $\tau < 1$ ns) とともに抑えられている成分 ($\tau > 10$ ns) が見られ、システイン 80、97 の領域が、Tn C、Tn T と直接に接する部位または付随的に構造が変わる部位であるため、側鎖運動の制限を受けることを示唆している。さらに Tn C へのカルシウム結合に伴う Tn T の ESR スペクトルの変化を調べたところ、 $\pm$ Ca での大きな違いは見られなかった。このことはカルシウム結合による Tn C の構造変化は Tn I の残基 80、97 の存在する領域には伝わらないと考えられる。今後さらに 80-97 間スピンスピン相互作用距離測定で空間情報を明らかにする予定である。またトロポミオシンを介してアクチンフィラメントへ結合させた場合について解析するとともに、Tn C のようにラベルの著しい固定化が予想される (また 2 価性スピラベルも併用してみる) ので、さらにドメイン運動や配向角度計測を行いたい。現在、Tn I の調節機能部位と想定されている部位へのスピラベル剤の導入のため、システイン置換変異体をいくつか作成中であり、その結果についても報告する予定である。

T. Aihara, M. Nakamura, S. Ueki, Y. Yamamoto and T. Arata : ESR structural analysis of human cardiac troponin C-I-T complex which spin labeled at troponin I

1E1430

Molecular interactions of tissue specific isoforms between Troponin I and Troponin C in *Caenorhabditis elegans*

○Ruksana Razia、寺見 浩美、作部 保次、香川 弘昭 (岡山大院・自然科学)

Troponin complex locates on the thin filament and consists of three subunits, a tropomyosin-binding subunit Troponin T (TnT), an inhibitory subunit Troponin I (TnI), and a Ca²⁺-binding subunit Troponin C (TnC). There are some results of TnC and TnT but is still little information on TnI in *Caenorhabditis elegans*. Our previous result showed that there were four TnI-genes (tni-1, tni-2, tni-3 and tni-4) that encoded four isoforms. Three genes tni-1, -2 and -3 were expressed in body wall and one gene, tni-4 was expressed in pharyngeal muscles, respectively. On the other hand each of two TnC genes: tnc-1 and tnc-2 is expressed in body wall and pharynx, respectively. Now our aim to investigate how the single Ca²⁺-binding protein TnC interacts with which TnI isoforms during Ca²⁺ regulation in muscle contraction. We performed protein overlay assay by using bacterially expressed proteins and detected the interaction patterns of two isoforms of TnC and four isoforms of TnI. We observed different characteristic in TnI-4, where C-terminal extension was absent and was expressed in pharynx and finally showed very weak interaction with the body wall isoform, TnC-1. The result of protein overlay assay confirmed the tissue specific molecular-interactions obtained by the promoter::lacZ expression patterns. Finally these results will allow us to know the mechanism of how these four isoforms are tissue specifically involved in molecular interaction with each of the both TnCs.

R. Ruksana, H. Terami, Y. Sakube and H. Kagawa : Molecular interactions of tissue specific isoforms between Troponin I and Troponin C in *Caenorhabditis elegans*

1E1500

トロポニン三量体の結晶構造と筋収縮制御機構のモデル

○武田 壮一、山下 敦子、前田 佳代、前田 雄一郎 (理研・播磨・構造生物化学)

横紋筋のカルシウム調節機構の中心をなすトロポニン (Tn) は、構造および機能的に大きく2つのドメインから成ることが知られている。1つはTnTのC末端領域 (TnT2) を含み、調節に必須の「コアドメイン (TnT2/TnC/TnI)」で、他方はTnTのN末領域 (TnT1) から成り、Tmとの強い結合に必須な「テイル・ドメイン」である。最近、我々はヒト心筋 Tn、コアドメインの X 線結晶構造解析に成功した (投稿中)。2 種類の異なる結晶から、計 4 分子のコアドメインの構造精密化を行った結果、コアドメインがさらに複数の「サブドメイン」から構成され、それぞれのサブドメインがフレキシブルなリンカーで結合されていることが明らかになった。TnI の中央部 (90-136 残基) と TnT (226-271 残基) は α -helical coiled-coil を形成し、TnI の N 末端部および TnC の C-lobe と共に、長く異方的な構造のサブドメイン (IT-arm) を構成する。一方、カルシウムを結合した TnC の N-lobe は TnI の Inhibitory Region の下流に存在する両親媒ヘリックスと結合し、頭部サブドメイン (Regulatory head piece) を構成する。これら 2 つのサブドメインは TnC の D/E リンカーにより結ばれ、単離された状態では互いに自由な相対配置を取り得ることが予想される。得られた結晶構造を基に、カルシウム結合に伴い Tn と Tm およびアクチンとの相対関係がどのように変化するかについて検討し、モデルを作成した。このモデルでは、TnC の N-lobe へのカルシウム結合により、(1) TnI の C 末端領域のアクチンへの結合が解除されること、(2) Tm のローカルな構造変化が引き起こされること、の 2 つの事象が同時に起こることを提案し、Tn による調節機構を説明する。

S. Takeda, A. Yamashita, K. Maeda and Y. Maeda : Crystal structures of Troponin ternary complexes and insights into regulation of muscle contraction.