1E1630

筋収縮中のトロポニンX線反射の強度変化による構造解析

○杉本 泰伸¹、武澤 康範¹、与那嶺 光彦¹、小林 孝和²、田中 秀洋³、若林 克三¹ ¹ 阪大院・基礎工、² 芝浦工大・工、³ 帝京平成短大)

時分割X線回折法を用いて、骨格筋の収縮制御機構を担うトロポニンの周期構造に由来する子午反射の強度変化を測定した。実験はサルコメア長を変化させたフルオーバーラップとノンオーバーラップの二状態で行い、子午軸上にあらわれる38.5nm周期のトロポニン1、2、3次反射の強度を、CCDベースTV検出器を用いて時間分解能15ミリ秒で測定した。その結果、フルオーバーラップでは1、2次反射が張力の発生とはば並行して強度減少する一方で、3次反射は張力に先行する形で強度増大を示すことが分かった。またノンオーバーラップ状態では2、3次反射の顕著な強度変化は観測されなかったが、1次反射はフルオーバーラップ状態よりも早い強度増大を示した。ノンオーバーラップではフルオーバーラップの場合とは異なりミオシンとの相互作用はないので、活性化のみによるトロポニンの構造変化を反映していると考えられる。したがって観測されたような反射強度の振る舞いは、収縮初期過程とそれに続く張力発生過程の二段階で構造変化が起こっていることを示唆した。このような回折強度の変化を理解するために繊維軸投影モデルによる解析を行った。フルオーバーラップとノンオーバーラップのそれぞれについて静止状態と収縮状態での最適モデルを求めた。その結果、収縮初期過程でトロポニン分子のフィラメントに沿った全長が短縮し、力発生過程では再びのびる方向に変化するモデルで強度変化を説明できた。

Y.Sugimoto, Y.Takezawa, M.Yonamine, T.Kobayashi, H.Tanaka and K.Wakabayashi : Structural analysis of troponin on activation of skeletal muscle by time-resolved measurements of troponin-associated reflections

1E1700

トロポニン-アクチン繊維の滑り運動の調節

○水野 裕昭¹、羽鳥 晋由¹、本多 元¹、嶋田 勝彦²、松野 孝一郎¹ ¹ 長岡技科大・生物系、² 名市大・芸術工)

生体中で筋収縮はトロポニン (Tn)、トロポミオシン (Tm) によってカルシウムに依存した調節を受けている。我々はTmを介さないで直接Tnとアクチン繊維を混合したところ結合することをすでに報告している。アクチンとTnをモル比で1:3で混合し、低イオン強度、5mM ATP存在下で結合させるとアクチン1分子に対して0.4分子結合した。蛍光標識したアクチン繊維とTnを結合させて観察すると、滑り運動している繊維数はカルシウムイオン濃度が低下すると減少した。しかし同条件での滑っている繊維の速度は上昇した (図参照)。これらの結果から、低カルシウムイオン濃度では、Tnはアクチン繊維全体が滑り運動をするか、しないかを決定しており、さらに滑っているアクチン繊維に関しては滑り速度を上昇させた。これらの現象は、1本のアクチン繊維とアクティブに相互作用しているミオシン頭部の数と関係していると考えている。Tnでその数が変えられると考え実験を進めている。

H. Mizuno, K. Hatori, H. Honda, K. Shimada, K. Matsuno, : Regulation of sliding movement of troponin-actin filaments

1E1645

筋原線維 I-filament 上における phalloidin 分子の局在変化とその機構の解析

○都田 博子、黒田 正明 (島根大・生科・生物科学)

蛍光 phalloidin (PHD) はアクチン線維の検出に広く利用されているが、骨格筋の I-線維では反応初期に不均一な染色像を生じる。この現象を Lehrer らは、nebulin (Nb) 分子がアクチンの PHD 結合部位を阻害しており、PHD との長時間の反応により Nb が I-線維上から離脱し I-線維全域が染色されると説明している。私達が、抗 Nb 血清を調製し蛍光 PHD と二重染色を行った結果、Nb は PHD によって I-線維から解離していないことが示された。さらに PHD による染色像でも、I-線維全域が染色された後、Z 線上の蛍光が特異的に消失することがわかった。これらの結果は PHD と Nb の競合では説明できない。さらに、筋原線維に TxR-PHD を反応させた後 FITC-PHD を加えても、すでに染色されている領域にしか結合しないことから、むしろアクチン線維自身の構造変化が原因と考えられる。そこで、筋原線維のアクチン線維と PHD の相互作用を検討した。まず、PHD 結合能に関しては F-アクチン (FA)、筋原線維ともにアクチンに対するモル比 1:1 まで PHD を結合する。しかし、筋原線維では飽和値に達するまでに 10 時間以上を要した。興味深いことに、短時間 (30 分) PHD との反応後、外液の PHD を洗浄除去した状態でも筋原線維上の蛍光 PHD の染色域が変化することより、PHD 分子がアクチン線維上を移動する可能性が示唆される。また、KI 処理によるアクチンの脱重合に対する PHD の影響を調べたところ、FA がアクチンに対するモル比 0.3 の PHD で安定化されたのに対し、筋原線維のアクチンはその半量の PHD で安定化された。筋原線維では、PHD が直接接していないアクチン分子にも影響を及ぼす可能性が考えられる。

H. Miyakoda and M. Kuroda : The analysis on conformation of actin filament which affects the staining pattern of fluorescence phalloidin on myofibrils.

1E1715

トロポミオシンの柔軟性と機能

○佐野 健一¹、志鷹 裕司²、三木 正雄²、前田 雄一郎¹ ¹ 理研播磨・構造生物化学、² 福井大・工学部)

α -helical coiled-coil 構造は、蛋白質の安定な構造モチーフとして知られている。他方、インフルエンザウイルスや HIV の感染において、表面蛋白質複合体の coiled-coil 構造の崩壊・再構成が必須であることが知られている。このことは coiled-coil 構造が単に蛋白質 (特に複合体) の安定化に関与するだけではなく、ある程度の柔軟性を持ち、その柔軟性が機能に重要であることを示唆する。トロポミオシンは分子の全長にわたって平行な 2 本鎖の α -helical coiled-coil 構造を取ることから、 α -helical coiled-coil 構造のモデルとしてよく調べられている。ウサギ骨格筋 α トロポミオシンは、蛋白質分解素による限定分解; アミノ酸配列からの構造予測によって、4 番目のアクチン結合領域に柔軟な部分が存在することが示唆されている。昨年の年会において、我々はアクチン結合領域 2,3,4 を欠失した変異体 (D234Tm) を使って、 α -helix 含量 (円偏光二色性) と示差走査熱量測定の結果を解析し、柔軟な構造の存在を示した (第 39 回年会 志鷹 他)。また、最近の研究 (D234Tm の機能解析; 家族性心筋症の解析; トロポミオシンの結晶構造) から、4 番目のアクチン結合領域の柔軟性が筋肉のカルシウム調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで本研究では 4 番目のアクチン結合領域の柔軟性が減少するような変異を設計し変異トロポミオシンを作出した。蛋白質分解酵素による限定分解や円偏光二色性を用いた熱変性実験は、この変異トロポミオシンでは分子の柔軟性が欠如することを示した。また、この変異トロポミオシンのアクチン結合能は損なわれていなかった。現在、再構成した細いフィラメントのカルシウム調節能について検討を加えている。

KI. Sano, Y. Shitaka, M. Miki and Y. Maeda : Flexibility and function of tropomyosin