3L1415

心筋 SPOC における Connectin/Titin の働き

○阿部 洋介、佐々木 大輔、石渡 信一（早大院・理工研・生命理工）

心筋拍動は、ペースメーカー細胞からの電氣的パルスによって制御されている。一方、除膜横紋筋（心筋・骨格筋）は ATP・ADP・Pi 共存という溶媒条件下において、筋節長及び発生張力の自励振動 (ADP・SPOC) を生じる。SPOC 状態にある各筋節は、速い収縮相と遅い伸長相からなる鋸歯状の波形で周期的に振動し、伸長相は隣接する筋節へ等速に伝播していく。本研究では、弾性タンパク質 Connectin/Titin (C/T) の心筋 SPOC における働きを調べる為に、SPOC 溶液に Trypsin を加えることによって C/T を切断し、SPOC 周期の変化を調べた。また、C/T の分解を途中で止める目的で Trypsin インヒビターである Leupeptin (2mM; ペプチド研) を加えた SPOC 溶液を準備し、SPOC 中に溶液置換を行った。心筋線維束試料としてラットの左室乳頭筋を、実体顕微鏡下で 100mm 程度の太さに筋線維に沿って注意深く裂き、TritonX-100 処理で除膜し、ガラス底シャーレ上に長さ約 1 mm になるように両面テープで両端を固定した。この心筋線維束試料の表面に蛍光ビーズを付着させ、この軌跡を蛍光顕微鏡で観察・ビデオ記録し、往復並進運動周期を解析することにより、ラットの心筋 SPOC 振動周期を調べた。その結果、Trypsin 入りの SPOC 溶液では除々に SPOC 周期が長くなる事が確認された。骨格筋 SPOC には Trypsin の影響がないことから、骨格筋 SPOC には C/T は関与していないと結論されている。しかし心筋においては、C/T は静止張力に大きく寄与しているだけでなく、SPOC にも関与しているようである。一方意外な事に、2mM Leupeptin に SPOC の周期を短くする効果がある事が確認された。現在その原因を検討中である。

Y.Abe, D.Sasaki, S.Ishiwata : Roll of Connectin/Titin in cardiac muscle SPOC

3M0900

Dihydrolipoamide dehydrogenase の変性過程

○目野 浩二¹、西本 悦子²、古賀 淑哲³、山下 昭二¹（¹九大院・農学系・植物資源、²農生資、³産総研）

蛋白質の構造はペプチド部分間の凝集的な作用と、これを壊そうとする熱的な擾乱運動のバランスの上に成り立ち、後者が前者を上回るとき変性する方向に向かう。このような直感的なモデルに基づけば、熱による変性と変性剤による変性過程を比較してみるのに興味深い。今回、好熱菌 *B. stearrowthermophilus* のピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDC) の構成酵素である Dihydrolipoamide dehydrogenase (Lip-DH) を用いて、その熱変性と化学的変性過程を比較した。主に、Lip-DH の Trp 残基と FAD の蛍光特性に着目した時間分割蛍光法を用いた。化学的変性作用にはグアニジン塩酸塩 (GdnHCl) を用いた。

熱変性においては、NAD の還元を指標とする酵素活性、CD における楕円率の低下、FAD 蛍光強度の上昇が、70℃～85℃の30分間の熱処理で観測され、これらの変化の回復は認められなかった。即ち、Lip-DH はこの温度領域で不可逆的に変性した。一方、Trp 残基から FAD へのエネルギー移動効率は、30℃～50℃の間は一定であるが、50℃～65℃にかけて著しく上昇し、その後 Lip-DH の不可逆的な変性に至る温度領域では再び低下した。また、時間分割蛍光異方性の解析結果は、50℃～65℃にかけて、それ以下の温度では抑制されている FAD の内部運動自由度は増加した。また、これらの変化は可逆的であり、熱処理に引き続く 30℃、1時間のインキュベーションの後、完全に回復した。

GdnHCl による変性において、CD の楕円率は 1M の GdnHCl の存在下で低下し、定常状態での FAD 蛍光異方性は 0.5M の GdnHCl で既に減少した。

今回、熱処理および、GdnHCl 処理について得られた結果を基に Lip-DH の構造安定性について議論する。

K. Meno, E. Nishimoto, T. Koga and S. Yamashita : Unfolding process of Dihydrolipoamide dehydrogenase

3L1430

電子分光クライオ電子顕微鏡によるアクトミオシン硬直複合体の高分解能構造

○安永 卓生¹、若林 健之²（¹九工大・情報工、²帝京大・理工）

透過型電子顕微鏡法を用いた構造解析も、2次元結晶を用いれば原子モデル構築が可能な段階となった。また、分子量が 100 万を超える様な複合体では、単粒子解析の手法により 1 nm を超える分解能が実現している。しかし、分子量 10 万程度の分子では、未だその分解能が限られている。これは、クライオ電子顕微鏡法ではコントラストが低いことが原因である。一方で、アクトミオシンのような X 線結晶解析により原子モデルの得られている試料では、 α ヘリックスの配置が認識できれば、両者の情報を組み合わせることにより原子レベルの議論が可能である。そこで、我々は、アクチン・ミオシン複合体における α ヘリックスの配置を認識することができる 0.8 nm の分解能を目指すことを目的として、冷電界放出型電子銃、エネルギーフィルタ、高分解能高感度 CCD を備えた透過型電子顕微鏡電子顕微鏡法の開発・画像処理法の開発を行ってきた。

昨年の年会において、アクトミオシン硬直複合体の 0.8 nm を超える高分解能像へ向けての研究の途中経過として、2 nm 程度の分解能の像を報告した。電子分光法による画質の向上は著しく、単粒子解析をはじめとする電子顕微鏡画像解析において有効であると考えられた。電子顕微鏡法のさらなる改良と平均分子数の増大により、現在、1.5 nm を超える分解能を実現できている。年会ではサブナノメートルの分解能へ向けて、さらに平均分子数を増やし、高分解能化を目指す。また、分解能の構造を目指して、らせん対称性を仮定しない構造解析についても試みているので、その成果について報告する。

T. Yasunaga and T. Wakabayashi : High-resolution structure of actomyosin rigor complex elucidated by electroscopic electron cryo-microscopy

3M0915

ニガウリトリプシンインヒビターの変性過程 (III)

○高橋 大輔¹、古市 真木雄³、西本 悦子²、水野 洋²、山下 昭二¹（¹九大院・農学系・植物資源、²農生資、³NEC ソフト）

ニガウリ種子より得られるトリプシンインヒビター (BGTI) は 68 個のアミノ酸残基からなる比較的コンパクトな構造をもつ蛋白質である。この間、この BGTI を用いて、その変性およびフォールディングの過程について報告してきた。その中で、比較的小きな蛋白質においては考えにくいと思われた変性中間体がラクトアルブミン、リゾチーム等と同様にグアニジン塩酸の 2M から 4M の濃度範囲に渡り確認された。また BGTI の 2 つの Trp 残基のうちの 1 つは変性中間状態においては、その運動性が抑えられると同時により疎水的環境下におかれ、逆に、他の Trp 残基は、より親水的な雰囲気にとさらされた。2 つの Trp 残基が部位においてそれぞれ異なる変化を示した。この結果は変性中間体の構造と特徴づける上で興味深い。定常状態および時間分割蛍光法は蛋白質の変性および折りたたみ構造を明らかにする上で有用であるが、得られた情報をさらに定量的にするために今回 BGTI の構造を決定した。ニガウリ種子より精製した BGTI を蒸気拡散法により結晶化 (0.1M Na-Hepes, 0.8M Na-K-Tatrate) し、0.8 × 0.8 × 0.3 mm の結晶を得た。その結晶を用いて X 線による構造解析を行った。その時の R 値は 17.9%、分解能は 1.5 Å であった。S-S は 3 と 48 位に架橋され、分光学的解析に直接関わる Trp 9 の近傍には Gln 27、Lys 36 が配置されており、Trp 9 の蛍光は強く消光されることが予想される。もう 1 つの Trp 残基である Trp 54 の 4 Å 以内には大きな相互作用を示すアミノ酸残基は見あたらず、Trp 54 は溶媒に曝されているということが伺われる。今回決定された構造に基づき BGTI の変性過程および変性中間体のコンフォメーションについて考察する。

D. Takahashi, M. Furuichi, E. Nishimoto, H. Mizuno and S. Yamashita : Unfolding process of BGTI (III)