B385

筋肉の細いフィラメント上でのトロポミオシンのC端側の構造変化について

○三木 正雄¹、海 宏¹、佐伯 喜美子²、志鷹 裕司¹、佐野 健一³、前田 雄一郎³、若林 健之⁴ (¹福井大・工、²東大・理、³理研・播磨、⁴帝京大)

以前、トロポミオシンの87番目と190番目に特異的に蛍光エネルギー供与体となる色素をつけ、一方アクチンのLys-61、Gln-41、Cys-374、ADP結合部位にそれぞれ蛍光エネルギー受容体となる色素を結合させて蛍光エネルギー移動測定を行い、トロポミオシンはカルシウムのトロポニンへの結合によってはアクチン上で位置を変えないことを報告した(Miki et al., (2000) J. Biochem. 123, 1104-1111)。一方、成田達(Narita et al., (2001) J. Mol. Biol. 308, 241-261)は電子顕微鏡像3次元再構成から、トロポミオシンの87や190のN端側の位置はあまり変化しないが、C端側は大きく位置変化するという報告をした。そこで、C端側に唯一のシステインをもつ変異トロポミオシン(Tm(T237C), Tm(S245C), Tm(T247C), Tm(S252C) 4種類を調製して、そのシステイン残基に特異的にエネルギー供与体の色素IAEDANSをつけ、アクチンのGln-41やCys-374にラベルしたエネルギー受容体との間の蛍光エネルギー移動実験を行った。これらの変異および、蛍光色素ラベルによるトロポミオシンの機能にたいしての影響はActo-S1-ATPaseを測定して調べ、これらラベルした変異トロポミオシンは制御機能を持っていることを確かめた。しかしながら、蛍光エネルギー移動測定で位置変化を調べてみると、これらすべての変異トロポミオシンのラベルと、アクチンのラベルとの距離はカルシウムのトロポニンへの結合によって変わらなかった。これら蛍光エネルギー移動測定による結果はトロポミオシンはアクチンフィラメント上で大きく位置をかえないことを示唆している。

M. Miki, H. Hai, K. Saeki, Y. Shitaka, K. Sano, Y. Maeda, T. Wakabayashi : Conformational change of the C-terminal region of tropomyosin on reconstituted thin filaments.

B387

赤外分光法によるアカザラガイトロポニンC変異体(E142Q)のMg²⁺結合に関する研究

○奈良 雅之¹、湯本 史明²、永田 宏次²、田之倉 優²、鍵 裕之³、尾島 孝男⁴、西田 清義⁴ (¹東医歯大・教養・化学、²東大院・農学系・応生化、³東大院・理学系・地殻化学、⁴北大・水産)

トロポニンC(TnC)は筋収縮を制御するCa²⁺結合タンパク質である。脊椎動物骨格筋TnCはCa²⁺結合部位を4箇所持ちし、その結合部位はEFハンドモチーフで構成されている。一方、アカザラガイ閉殻筋TnCはサイトIVの1箇所のみがCa²⁺と結合し、その他のEFハンドモチーフはCa²⁺配位に必要なアミノ酸残基が欠けている。これまでに天然型アカザラガイTnCとCa²⁺、Mg²⁺の相互作用について、Glu-142の側鎖COO⁻基はCa²⁺と二座配位型で結合するが、Mg²⁺とは結合しないことを報告した。今回はアカザラガイTnCの変異体E142QのMg²⁺配位構造について赤外分光法を用いて調べた。

COO⁻逆対称伸縮振動バンドは金属イオンに結合するCOO⁻基の配位様式についての情報を与える。E142Qの二価金属イオンフリー状態とMg²⁺負荷状態を比較すると、1601 cm⁻¹のバンド強度が増加していた。この変化はAsp-131、Asp-133の側鎖COO⁻基はpseudo-bridging型でMg²⁺と結合したものと解釈できる。E142QのMg²⁺負荷状態のスペクトルは、これまでに報告した天然型のMg²⁺負荷状態の結果とはほぼ一致した。そこで、Mg²⁺滴定を行って1601 cm⁻¹のバンドの強度変化を調べたところ、Mg²⁺の親和性は天然型とE142Qでほぼ同じであることがわかった。したがって、天然型のGlu-142の側鎖COO⁻基はMg²⁺配位に関与していないことが結論づけられた。さらに、E142QのMg²⁺結合の影響についてCDや蛍光スペクトルについても調べたところ、金属フリー型とはほぼ同じスペクトルパターンを示したので、Mg²⁺結合によるE142Qの高次構造変化は起こっていないと考えられる。アカザラTnCの活性化の機構についてMg²⁺並びにCa²⁺の配位構造に基づいて議論する。

M. Nara, F. Yumoto, K. Nagata, M. Tanokura, H. Kagi, T. Ojima and K. Nishita : Infrared spectroscopic study on the binding of Mg²⁺ to a mutant Akazara scallop troponin C (E142Q)

B386

線虫の人為変異トロポニンCを用いたCa²⁺依存性トロポニンI結合能の解析

○高谷 智英¹、寺見 浩美¹、香川 弘昭^{1,2} (¹岡大院・自然科学、²岡大・理・生物)

線虫*Caenorhabditis elegans*の体壁筋トロポニンC(TnC-1)の突然変異*pat-10(st575)*株は胚性致死Patとなる。この変異体ではTnC-1にアミノ酸置換D64N(m1)とC末端Hヘリックスの欠失W153stop(m2)が生じている。TnC-1はEF-handのサイトII、IVにCa²⁺が結合するが、m1によりサイトIIのCa²⁺結合能が、m2によりサイトIVのCa²⁺結合能とTnI結合能が失われる(Terami et al. 1999, Ueda et al. 2001)。TnC-1ゲノムDNAを用いた*pat-10(st575)*変異体の機能回復実験から、Patの原因がm2であることがわかった。

サイトIVのCa²⁺結合不良とTnI結合不良の分子機構を調べるため、サイトIV、Hヘリックスにアミノ酸置換及び欠失を持つ12種類の人為変異TnC-1を作製した。これらにTnIをオーバーレイし、Ca²⁺の有無によるTnI結合能の変化を抗TnI抗体を用いてWestern解析した。Hヘリックスに変異を持つTnC-1は、5mM EGTAを加えるとTnI結合能が完全に消失した。特にF152、W153を置換したものは、Ca²⁺の有無に関わらずTnIと結合しなかった。しかし、サイトIVのCa²⁺結合部位を置換したTnC-1はTnIと結合した。以上の実験から、TnC-TnI複合体の形成にはHヘリックスの特定の構造が必須であり、TnC-1へのCa²⁺結合により促進されるが、サイトIVへのCa²⁺結合能は重要ではないことが示された。

これらの人為変異TnC-1を持つ形質転換線虫を作製すれば、TnC-TnIの分子間相互作用が個体の表現型にどのように影響するかを明らかにできるだろう。

T. Takaya, H. Terami and H. Kagawa : Analysis of the Ca²⁺-dependent troponin I binding to the mutagenized troponin C of *Caenorhabditis elegans*

B388

SDSL-ESRによるヒト心筋トロポニンCの動的構造解析

○植木 正二¹、中村 志芳¹、原 英之²、荒田 敏昭¹ (¹阪大院・理学・生物科学、²ブルカー・バイオスピン)

筋収縮の制御は、アクチンフィラメント上のトロポニン分子によって行われている。トロポニン分子を構成するサブユニットの一つ、gロポニンC(TnC)はアレイ型をした分子である。TnCにカルシウムイオンが結合し、N末端側のNドメインの構造が変化することが筋収縮の引き金になると考えられている。そこで我々は部位特異的スピンラベル電子スピン共鳴法(SDSL-ESR)を用いて、TnC Nドメインの構造変化を測定した。ヒト心筋由来TnCに天然に存在するシステイン35および84残基の一方をセリンに置換し、残ったシステイン残基にスピンラベルを結合させた。ESR測定により、Cys35付近ではカルシウム結合による環境の変化はほとんどないことがわかった。一方Cys84では、カルシウムイオン非存在下ではラベル運動性の早い成分(回転相関時間τ=1.9ns)と遅い成分(τ=5.5ns)の2成分が観測された。カルシウムイオンを添加すると、遅い成分が劇的に減少した。これは構造変化により、Cys84まわりの立体障害が減少したことを示唆している。また、Cys35とCys84両方にスピンラベルしたTnCのESRスペクトルを解析することにより、スピン間距離~27 Åを見積もった。また、パルスESRを用いたpulsed-ELDOR法でもスピン間距離~26 Åとなり、良い一致をみた。スピン間距離のカルシウム依存性はほとんどないこともわかった。結晶およびNMR構造解析により、Dヘリックス上にあるCys84への立体障害は、BもしくはCヘリックスの接近によるものと推測される。そこで、Bヘリックス上にシステインを持つGly42CysとCヘリックス上のMet60Cysを調製し、SDSL-ESRでその構造を考察する予定である

S. Ueki, M. Nakamura, H. Hara and T. Arata : SDSL-ESR study of the structural change in human cardiac troponin C