B389

トロポニンI断片を用いた再構成 thin filament の運動

○船本 祐作、水野 裕昭、本多 元、羽鳥 晋由、松野 孝一郎
(長岡技科大・生物系)

TnI は Tn 複合体において、actin-myosin 間の滑り運動を抑制する因子である。本研究では、TnI の C 末端を CPase Y によって切断した断片 (Fig. 1) を TnT、TnC、Tm-actin と再構成した繊維を用いて、in vitro motility assay を行った。その結果、Ca イオン濃度が低いときだけでなく、Ca イオン濃度の高い場合でも滑り運動をしている繊維は観られなかった。CPase Y による切断断片には、約 20kDa の断片と未消化の TnI が約 1:1 の mol 比で存在している。そのため、1 本の thin filament には、この 2 種類の TnI が混在して結合している状態となっている。Ca イオン濃度が高い状態でも繊維の運動が停止することから、20k Da 断片を含む thin filament は、Ca イオン濃度が高い状態でも "off" 状態になったと考えられる。また、1 本の繊維中には、完全な TnI が含まれているにも関わらず、全体の運動は停止した。このことは、20k Da TnI 断片を含む thin filament は、繊維全体で運動停止状態になることを示唆する。

Fig.1 TnI と 20k Da TnI 切断断片

Y.Funamoto, H.Mizuno, H.Honda, K.Hatori and K.Matuno : Cooperative Inhibition of sliding motility by CPase Y fragments of TnI

B391

線虫体壁筋におけるトロポニンCとトロポニンIとの相互作用

○宗田 充宏¹、高谷 智英²、香川 弘昭²、飯尾 隆義¹ (¹ 名大・院・理・物理、² 岡大・院・自然科学)

筋収縮制御タンパク質であるトロポニン (Tn) はトロポニンC (TnC)、トロポニンI (TnI)、トロポニンT (TnT) の3種のサブユニットから成り、筋弛緩状態において TnI はアクチン・ミオシンの相互作用を阻害しているが、TnC にカルシウムが結合するとその構造変化が TnI に伝わり、阻害が解除され筋収縮が誘起される。線虫 *Caenorhabditis elegans* はわずか 1000 個の細胞で構成されており、筋肉組織を有する生物としては最も単純であり、かつ各種データが扱えるモデル生物である。当研究室ではこの線虫の筋収縮制御をテーマとして種々の研究を進めている。線虫の筋肉には主として体壁筋と咽頭筋があり、我々は既に線虫体壁筋 TnC (TnC-1) のカルシウム結合特性を明らかにしてきた。すなわち、N 端ドメインおよび C 端ドメインにはカルシウムがそれぞれ 1 個ずつ合計 2 個結合し、カルシウム結合定数はそれぞれ 10^{-6}M^{-1} 程度の低い値をとり、カルシウム解離速度定数はそれぞれ 400s^{-1} および 800s^{-1} 程度の高い値を示した。これらはいずれも脊椎動物骨格筋 TnC の筋収縮制御部位である N 端ドメインの特性に酷似したものであった。現在これに引き続き、咽頭筋 TnC (TnC-2) の特性を明らかにすると並行して、TnC-1 と線虫体壁筋 TnI (TnI-1) との相互作用について研究中である。線虫 TnI-1 は脊椎動物骨格筋のそれとは相溶性が 30% 程度しかなく、また C 末端に連続した Glu 残基の配列が存在するなどの特徴を持っている。そのため、TnC-1 との相互作用は脊椎動物骨格筋のものとは大きく異なることが予想される。我々は、疎水性蛍光色素 2-p-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate (TNS) など各種プローブを用いた蛍光分光滴定法により、TnI-1 による TnC-1 のカルシウム結合特性の変化などの特性を測定している。本学会ではこれらの結果を報告する。

M.Soda, T.Takaya, H.Kagawa and T.Iio : Interaction between Troponin C and Troponin I of body wall in *Caenorhabditis elegans*

B390

Troponin 複合体における TnI-133 領域の土 Ca に伴う運動性の変化

○相原 朋樹¹、中村 志芳¹、植木 正二¹、三木 正雄²、荒田 敏昭¹ (¹ 阪大院・理・生物科学、² 福井大・工・生物応用化学)

筋収縮は Thin Filament (TF) 上に存在する Tropomyosin (Tm) と、カルシウム結合能を持つ Troponin (Tn) の作用によって制御されている。Tn は Tn C に Calcium (Ca) 結合サイトを持ち、特に N 末端領域 (N-lobe) における Ca 結合の情報が筋収縮制御機構に関与している。一方、Tn I の C 末端側には阻害・制御領域と呼ばれる Tn のスイッチ機構に重要な箇所が存在し、それぞれ Actin・Tn C と相互作用すると考えられている。これまでの報告で Tn は、TF 上には Tm 及び Tn T を介して支えられ、Tn I の阻害領域も Ca 低濃度下では Actin に相互作用する事が考えられている。さらに、Ca 濃度が上昇すると、今度は Tn I の C 末端領域は Tn C との Affinity が強くなり、阻害領域が Actin から離れる方向に変化することが FRET などの距離測定などから示唆されています。その Tn I の Tn C N-lobe と相互作用する制御領域が、大変重要な領域の一つと考えています。そこで、当研究ではウサギ骨格筋 Tn の制御領域に存在する Cysteine133 に Spin-label (SL) を導入し、複合状態での土 Ca における制御領域の運動性の変化 (動的変化) を、ESR を用いて解析した。その結果、Tn CIT、CI とも土 Ca で大きな運動性の変化を示した。MTS-SL を利用した Tn CIT の測定で、運動性の早い成分が +Ca 状態で 1.3×10^{-9} sec であるのに対し、-Ca 状態で 2.6×10^{-10} sec と緩和時間の速変が観られた。MT-SL を利用した測定でも、運動性がやや抑えられるものの、+Ca から -Ca への運動性の速変の傾向性は同様だった。コントロールとして、Tn I-133 が置換されているニワトリ骨格筋での測定も行い、それぞれ比較した。その結果土 Ca における運動性の変化は Tn CIT、CI とも観られなかった。このことは、Tn I-133 の存在する制御領域は、Ca 濃度の増大に伴って運動性が抑えられていることを意味するものであり、Tn C N-lobe との Affinity が強くなったものと考えられる。

T. Aihara, M. Nakamura, S. Ueki, M. Miki and T. Arata : Mobility change of troponin I-133 region in troponin complex induced by calcium

B392

トロポニン T2CI 複合体中におけるトロポニンIの NMR 解析

○村上 健次^{1,2}、湯本 史明³、大木 進野⁴、田之倉 優³、若林 健之² (¹ 東大院・理学系、² 帝京大・理工・バイオサイエンス、³ 東大院・農学系、⁴ 北陸先端大)

筋制御蛋白質トロポニンは、アクチン、トロポミオシンと共に細いフィラメントを形成しカルシウム濃度依存的な筋収縮スイッチの役割を果たす。今まで骨格筋において、カルシウム濃度依存的なトロポニンCの構造変化は結晶構造解析や NMR によって明らかであるが、それに続いて引き起こされるトロポニンIの原子レベルでの構造変化は、いまだ不明である。私たちは、トリ骨格筋トロポニンIの同位体標識発現系を作り、非標識トロポニンC、非標識トロポニンT2と複合体 (分子質量約 52 KDa) にして NMR 解析している。目的はトロポニン複合体中において特に運動性の高いと予想される TnI 中の二つのアクチン結合部位の解析である。まず 25 °C、pH 7.0 において測定し、トロポニンIの中で最も運動性の高い領域のみを抽出した。連鎖帰属によりこれらの領域は、アクチン第二結合部位などを含むトロポニンIのC端領域 (低カルシウム濃度条件でアミノ酸 R137-S182、高カルシウム濃度条件でアミノ酸 A138-S182) であることが明らかになった。そしてこれらの領域はカルシウム濃度の変化によって、一部 (環境変化による) 化学シフト変化が起きるものの、この領域内部で大きな構造変化はないことがわかった。またもう一つの重要なアクチン結合部位である IP 領域の構造解析をおこなうため、シグナルの広幅化の原因となる非交換性プロトンをランダムに重水素化し、測定条件を最適化することで、トロポニン複合体中における TnI の N 端ヘリックス、IP 領域などのアミノ酸をおおた帰属することが出来た。これらの領域に関するカルシウム濃度による変化などを報告したい。

K.Murakami, F.Yumoto, S.Ohki, M.Tanokura and T.Wakabayashi : NMR analysis of TroponinI in Troponin T2CI complex