B397

細いフィラメント上における収縮調節蛋白質の中性子溶液散乱による構造解析

○松本 富美子^{1,2}、牧野 浩司²、前田 佳代²、Patzelt Heiko³、前田 雄一郎²、藤原 悟¹ (¹原研、²理研・播磨、³Max-Planck-Institute)

筋収縮の調節は、細いフィラメント上に局在しているトロポニン (Tn) によってカルシウム濃度依存的に行われている。筋収縮の制御機構を理解するためには Tn の構造やカルシウムによるその構造変化を知ることが重要である。Tn は TnT, TnI, TnC の 3 つの蛋白質の複合体であり、単体あるいは複合体の構造はすでに X 線結晶構造解析や NMR により調べられている。しかし機能を発揮している状態、すなわち細いフィラメント上における構造あるいは構造変化については未だ明らかではない。本研究では、選択的重水素化とコントラストマッチング法を組み合わせた中性子小角散乱実験を行うことにより、細いフィラメント上における TnC および TnI の構造を明らかにすることを試みた。測定は、日本原子力研究所原子炉 JRR-3M に設置された中性子小角散乱装置 SANS-J を用い、波長 0.65 nm において行った。試料として native な細いフィラメントと重水素化した TnC (d-TnC) または TnI (d-TnI) を含む再構成フィラメントを調製し、カルシウム存在下、非存在下の二つの条件下でそれぞれの散乱曲線を測定した。再構成フィラメントの散乱曲線から native な細いフィラメントの散乱曲線を差し引くことにより d-TnC, d-TnI のみからの散乱曲線を抽出した。TnC からの散乱曲線に対してモデルフィッティングを行った結果、細いフィラメント上の TnC はカルシウムの結合によって慣性半径をわずかに大きくし、またフィラメント軸の中心に近づくことが明らかとなった。現在 TnI の解析中である。年会では TnC についてのモデル計算の詳細および TnI の結果について発表する予定である。

F.Matsumoto, K.Makino, K.Maeda, H.Patzelt, Y.Maeda, S.Fujiwara : Structure of TnC and TnI on the thin filament by small-angle neutron scattering

B399

アクチンフィラメント再構成心筋における筋長効果

○佐々木 大輔¹、福田 紀男²、藤田 英明²、栗原 敏³、石渡 信一⁴ (¹早大院・生命理工、²ワシントン州立大・生理、³慈恵医大・第2生理、⁴早大・物理)

心筋は伸張によって発生張力及び Ca^{2+} 感受性が増大するという性質がある (筋長効果)。この性質は、静脈還流量の増加に伴って一回拍出量が増加する (Frank-Starling 則) という、生理的に重要な心機能を説明するメカニズムの一つと考えられている。本研究では、筋の Ca^{2+} 感受性を調節している収縮制御系タンパク質トロポニン (Tn)・トロポミオシン (Tm) の筋長効果発現における役割を明らかにすることを目的とした。(方法) ブタ心筋筋頭筋から、TritonX-100 を用いて除膜した幅 100-150 μm のグリセリン筋試料を調製した。試料の両端を張力測定装置のフックに固定し、レーザー光回折パターンをもとに筋節長 (SL) を調節した。ウシの血漿から精製したゲルゾリンを用い、細いフィラメントを解体した (発生張力の消失と、SDS-PAGE により確認)。その後、ブタ心室筋から精製したモノマーアクチンを重合条件下で加え、アクチンフィラメント (FA) をグリセリン筋内に再構成した (FA 再構成後の発生張力は、SL1.9 μm で元の約 7 割)。FA 再構成筋は Ca^{2+} 非存在下でも張力を発生するため、弛緩には BDM (40mM) を用いた。(結果) コントロール試料では、SL を 1.9 μm から 2.2 μm に引き伸ばすと、pCa4.8 における最大発生張力は約 1.4 倍に増強した。しかし、FA 再構成筋においては筋長効果はほとんど見られなかった。この結果は、筋長効果発現にとって、Tn・Tm の存在が重要であることを示唆するが、FA 再構成後の静止張力が SL2.2 μm において著しく増大しており、FA 再構成筋ではアクチンが弾性フィラメントに非特異的に結合して、筋長効果が観察されなかった可能性もある。今後は、FA 再構成筋に更に Tn・Tm を加えて再構成することにより筋長効果が回復するかどうか検討する。

D. Sasaki, N. Fukuda, H. Fujita, S. Kurihara and S. Ishiwata : Length dependence of tension generation in actin filament-reconstituted myocardium

B398

骨格筋張力発生に伴う細いフィラメント由来 X 線反射の 2 次元高速時分割測定

○田村 巧^{1,2}、若山 純一^{1,2}、井上 勝晶²、岡 俊彦²、八木 直人²、岩本 裕之² (¹理研播磨・構造生物化学、²Spring-8・JASRI)

溶液環境が自由に換えられる骨格筋スキンドファイバーを用いて張力発生時の細いフィラメントの構造変化を X 線回折法によって捉えるには 2 次元回折像を高速で撮像できるシステムが必要である。本実験では Spring-8 BL40XU の強い X 線と 3.4 ミリ秒の時間分解能をもつ高速 CCD カメラを利用し、(1) ケージドカルシウム閃光分解により筋線維を活性化したとき、(2) 急速開放 (線維長の 2%) 後の張力再上昇時の 2 条件で測定を行った。試料はウサギ骨格筋スキンドファイバーで、(1) では YAG レーザーの集光の関係で 20 本程度のバンドル、(2) では 30 本の単一筋線維列を用い、0℃、飽和カルシウム濃度で実験を行った。いずれの場合も試料 10 個以下のデータ加算でアクチン第 2 層線と第 6 層線の時間変化を追跡するのに十分な信号が得られた。まず (1) 実験では、2 種の反射はともに殆ど遅れがなく急速に立ちあがり、その後は張力上昇と共に緩やかに上昇した。(2) 実験では 2 種の反射は開放とともに大きく減少したあと 10 ミリ秒程度のうちに急速に中間レベルまで回復し、その後は徐々に開放前のレベルに向かって回復していった。第 2 層線は細いフィラメント上のトロポミオシン分子の動きを反映するといわれ、第 6 層線はアクチン分子そのものの構造変化を反映すると思われる。しかし以上から明かなように、2 種の反射は密接に関連した変化を示す。他の実験系 (生筋の収縮弛緩サイクル、ケージド ATP 分解後の硬直骨格筋線維の弛緩過程) でも同様の傾向が見られるので、アクチンの構造変化がカルシウム制御 (またはミオシン結合による細いフィラメントの協同的活性化) に何らかの役割を持つ可能性が示唆される。

T.Tamura, J.Wakayama, K.Inoue, T.Oka, N.Yagi and H.Iwamoto : High-speed time resolved X-ray diffraction studies on the thin filament structural changes during muscle force development

B400

フィラメント結合タンパク質構造の一般解法を目指して

○成田 哲博、牧野 浩司、山下 敦子、前田 雄一郎 (理研播磨・構造生物化学)

私たちは現在、電子顕微鏡を用いたフィラメント結合タンパク質構造の一般解法を構築することを目指して研究をすすめている。アクチンやチューブリンなどのタンパク質が重合したフィラメント構造は非常に多岐にわたる重要な役割を果たしており、その働きを制御するのがフィラメント結合タンパクである。タンパク質フィラメントの長さを厳密に制御する方法が現在無いため、フィラメント結合タンパクとフィラメント本体の複合体の構造が X 線結晶学で解かれたことは無い。それゆえ、電子顕微鏡での研究が盛んに行われており、フィラメント構成タンパクと 1:1 で結合できるタンパク質 (キネシンやミオシン S1 など) については電子顕微鏡とらせん対称性を用いた構造解析が行われてきて成果を上げてきた。しかし、フィラメント構成タンパクと 1:1 で結合できない重要な多くのタンパク質がある。たとえば、筋肉の収縮を制御するトロポニンとトロポミオシン、アクチンフィラメントの構築制御に非常に大きな役割をはたす CapZ、繊毛運動の主役ダイニンなどである。これらのタンパクとフィラメント本体の複合体の構造を電子顕微鏡写真から解くためには従来にない新しい画像解析システムが必要である。

使用するシステムの原型は Narita et al., 2001 の論文で再構成細いフィラメント構造を解くのに用いたものであり、それを発展、改良させながら、現在、アクチン-CapZ 複合体とウシ心筋の天然細いフィラメントの分解能 20 Å 程度の構造決定を目指して研究を進めている。この二つについては本年度中の構造決定を目指しており、年会ではその途中経過を報告したい。

A. Narita, K. Makino, A. Yamashita and Y. Maeda : Development of image analysis to reconstruct three-dimensional structures of filament binding proteins