1P141

二枚貝閉殻筋のキャッチ状態における actin-activated Mg-ATPase 活性

○山田 章、吉雄 麻喜、大岩 和弘（情報通信研・関西・生体物性）

二枚貝キャッチ筋では、軽鎖に Ca^{2+} が結合することによってミオシンが活性化され、収縮が起こる。低 Ca^{2+} 濃度においては、ミオシンの活性は低く抑えられ、トウィッチンのリン酸化状態によって、アクチン、ミオシン両フィラメント間に固い結合を生じるキャッチ状態と、結合を生じない弛緩状態をとる。キャッチ状態におけるミオシンの Mg-ATPase は弛緩状態のものとはほぼ同じくかなり低いとされているが、脱膜筋標本などを用いた研究では、他の ATPase を完全に除去して活性測定することは困難であり、両状態での Mg-ATPase 活性の違いはよくわかっていなかった。そこで、精製したタンパク質における Mg-ATPase 活性を、両状態で詳細に比較検討することにした。我々は、キャッチ筋から精製したミオシンとトウィッチン、ウサギ骨格筋のアクチンの、3 種類のタンパク質のみによって両状態を再構成することに成功しており [PNAS(2001), 98, 6635-40]、今回、この実験系で Mg-ATPase 活性を測定した。マガキ閉殻筋の平滑筋部分から精製したミオシンの Mg-ATPase は、低 Ca^{2+} 濃度ではトウィッチンの有無やそのリン酸化状態によらず、約 0.001s^{-1} であった。また、トウィッチン非存在下では、アクチンによる活性化はほとんど見られなかった。脱リン酸化したトウィッチンの存在下（キャッチ状態）では、アクチンを加えることによって $10 \sim 20$ 倍程度活性化された。これは、収縮状態に相当する高 Ca^{2+} 濃度でアクチン存在下における活性（約 0.8s^{-1} ）の $1/50 \sim 1/100$ であった。これに対し、リン酸化処理をした場合（弛緩状態）では、 $2 \sim 3$ 倍程度にしか活性化されなかった。これらのことは、キャッチ状態では、収縮状態における活性よりはかなり低いものの、脱リン酸化されたトウィッチンによって生ずるアクチンとの相互作用によって、ミオシンの Mg-ATPase が活性化されることを示している。

A.Yamada, M.Yoshio and K.Oiwa : Actin-activated Mg-ATPase activity under the catch state of bivalve adductor muscle

1P143

線虫体壁筋型トロポニン C のサイト IV Ca^{2+} 結合とトロポニン I 結合は個体発生に必須である

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

線虫 *Caenorhabditis elegans* の体壁筋は、脊椎動物の骨格筋に相当し、その筋形成は個体発生に必須である。分子機能と個体の表現型の関係を調べるため、体壁筋 TnC (TnC-1) に m1:D64N、m2:W153stop の変異を導入し、それらの形質転換体の解析を行った。m1 変異はサイト II の Ca^{2+} 結合能を失わせるが、形質転換体は正常に発生した。しかし成虫では形態異常や運動不良が観察され、サイト II が筋収縮制御に重要であることが示唆された。

一方、m2 変異はサイト IV の Ca^{2+} 結合と TnI 結合能を失わせ、形質転換体は致死となった。m2 変異を詳細に解析するため、サイト IV から H ヘリックスに至る領域に変異を導入し、これらの変異 TnC-1 の Ca^{2+} 結合および TnI 結合能を解析した。TnC-TnI の相互作用は Ca^{2+} によって促進されたが、サイト IV に Ca^{2+} 結合がない変異 TnC-1 も TnI と結合した。これらの変異 TnC-1 の形質転換体を作製したが、サイト IV の Ca^{2+} 結合と TnI 結合のどちらかが失われても、変異 TnC-1 は筋線維集合ができず、個体は致死となった。これらの解析から、生体内では TnC-1 における Ca^{2+} 結合と TnI 結合の関係がより密接になり、筋形成に必須となることが明らかになった。以上の結果より、トロポニン複合体の形成には、TnC-1 のサイト IV の Ca^{2+} 結合および TnI 結合の両方が必要であると言える。特に F152 と W153 残基は TnI 結合に必須であり、サイト IV の Ca^{2+} 結合にも関わっていた。両残基が、サイト IV の構造および H ヘリックスでの TnI 結合に関わると考えられる。これらの知見から、TnC-1 は筋収縮の制御を通して、個体発生にも重要な役割を担っていることが明らかになった。

T. Takaya, H. Terami, M. Sohda, T. Iio, and H. Kagawa : Ca^{2+} -binding to site IV and TnI-binding of body-wall muscle troponin C are essential for development in *Caenorhabditis elegans*

1P142

貝類筋肉（貝柱筋、牽引筋等）の Ca 制御機構の分類

○矢沢 洋一（北海道教育大・教育）

貝類筋肉（貝柱筋、牽引筋等）の Ca 制御機構の分類○矢沢洋一（北海道教育大・教育） [はじめに] 脊椎動物の筋収縮 Ca 制御は、骨格筋と心筋では細い繊維側に存在する TN-TM が行い、平滑筋ではミオシンを構成する軽鎖のリン酸化と脱リン酸化により行われていることはよく知られている。一方、軟体動物の貝類の筋収縮は、ミオシン軽鎖による Ca 制御によって行われているとされていたが、アクチン側に存在する TN-TM 様タンパク質も関与しているらしいことが報告されてきた。いずれにせよ、ミオシン側の制御が主であることはほぼ皆に認められているにもかかわらず、ミオシン側とアクチン側の Ca 制御機構に対する関与の程度等については、まだ報告されていない。今回は、二枚貝や巻き貝等 20 種類を研究材料として、各筋肉の Ca 制御について検討を行い、以下に示す三つのタイプに初めて分類出来た。[実験材料] 貝肉（貝柱筋、牽引筋等）より天然アクトミオシン (NAM) を調製した。さらに NAM の確分画により、ミオシン (M) を分離調製した。一方、各筋肉よりアクチン (A) や細い繊維を随時調製した。[実験結果] 以下の 3 タイプに分類された。 1. Ca 制御が M 側のみに存在しているもの—5 種類 2. ミオシン側制御が主であり、細い繊維側の関与により、Ca 制御がより効果的になるもの—15 種類 3. M 側制御が主であるが、2 とは逆に、細い繊維側の関与により Ca 制御がより低くなるもの—2 種類の牽引筋（ウバガイ、ミルカイガイ）

Y.Yazawa : The classification of Ca regulation types of shell muscle contraction

1P144

Tn 球状領域結合部位に変異を入れた Tm の性質

○佐久間 紹子、志鷹 裕司、木邑 智恵子、崎山 慶太、三木 正雄（福井大・工）

筋収縮制御タンパク質である Tm は、約 40 アミノ酸残基ごとに相同な配列を持ち、7 つの領域に分けられる。2,3,4 領域削除型 Tm (D234Tm) は、Actin・Tn への結合能は有するが、Ca 添加による acto-S1 ATPase の阻害の解除が行われない。Tm・Tn 複合体の結晶構造解析から、Tn 球状領域 (TnI & TnC) は Tm の 150-180 に結合していることが報告されている (White et al., (1987) Nature 325, 826-828)。D234Tm ではこの結合領域のうち 150-165 が削除され、領域 1 の 31-46 に置換されている。wild Tm の領域 4 とそれに対応する D234Tm の領域 1 を比較すると、この領域でアミノ酸の電荷の逆転もしくは電荷の消失が比較的多く見られる。このようなアミノ酸の配列の違いが本来あるべき Tn と Tm の相互作用を変化させ、Ca 調節を阻害しているのではないかと考えた。そこで、wild Tm の領域 4 のアミノ酸をそれに対応する領域 1 のアミノ酸に置換した、Tm 変異体の作製を試みた。1 つは Tn の球状領域結合部位内の 14 アミノ酸を置換した 14aaTm (152-165 → 33-46) であり、もう 1 つは Tn 球状領域結合部位以外の領域 4 での置換の影響を調べる為の slide14aaTm (134-147 → 15-28) である。これらの変異体を用いて thin filament での結合能、ATPase 活性、熱安定性を比較検討した。その結果、14aaTm は D234Tm と似た性質を示したが、slide14aa は wild Tm とさほど変わらなかった。現在、残基 152-165 内をさらに詳細に調べるために 7aaTm (center;156-162 → 37-43,front;152-158 → 33-39,back;159-165 → 40-46) を作製し、研究を進めている。これらの結果をもとに、Tm の Tn 球状領域結合部位の制御に対する役割について考察を述べる。

A.Sakuma,Y.Shitaka,C.kimura,K.Sakiyama,M.Miki : The Troponin Globular Portion Binding Domain of Tropomyosin is Critical for Ca^{2+} -Dependent Regularion of Striated Muscle Thin Filament