1P149

細いフィラメント再構成系でのトロポニン I 制御領域の ESR 解析

○相原 朋樹¹、植田 啓介¹、中村 志芳¹、植木 正二¹、木邑 智恵子²、三木 正雄²、荒田 敏昭² (¹ 阪大院・理学・生物科学、² 福井大・工)

骨格筋の収縮制御タンパクである Troponin(Tn) は、筋細胞内のカルシウム (Ca^{2+}) を結合すると筋肉を活性化することが知られている。前回、ウサギ骨格筋 Tn 複合体 (TnC-I-T or C-I) において、TnI の制御領域の Cys133 側鎖に spin-label を導入した実験から、Ca 依存的な側鎖運動性の変化；回転相関時間 $\tau = 10\text{ns}$ ($+\text{Ca}^{2+}$)、 2ns ($-\text{Ca}^{2+}$) が得られた。さらに今回、TnI 制御領域に spin-label を導入した Tn と、Tropomyosin(TM) と Actin を加えて、Thin-Filament(TF) 再構成系での Ca^{2+} に伴う側鎖運動性の変化を ESR により測定した。その結果、 $+\text{Ca}^{2+}$ では Tn 複合体のみとほとんど変わらないが (10ns)、 $-\text{Ca}^{2+}$ では非常に強く固定された $\tau \approx 100\text{ns}$ の成分がスペクトルから得られた。これらの ESR スペクトルから側鎖 spin-label の位置する二次・三次構造を経験的に予測する解析をおこなった。その結果、 $+\text{Ca}^{2+}$ で Tn、TF 上とも、small steric hindrance であった。 $-\text{Ca}^{2+}$ で Tn では loop like 状態、TF 上では large steric hindrance だった。これらの結果から、TF 上でも $+\text{Ca}^{2+}$ では Tn 複合体と同じように TnI 制御領域が TnC の N 末領域への相互作用し、 $-\text{Ca}^{2+}$ においては、Tn では TnI 制御領域が TnC から自由になっているが、TF では Actin へ強く相互作用していると考えられる。Tm についても site-directed に spin-label を導入し、TF 上での Ca^{2+} に伴う側鎖運動性の変化を測定し Tm の構造変化を調べている。これらの結果がまとまれば、合わせて報告したい。

T. Aihara, K. Ueda, M. Nakamura, S. Ueki, C. Kimura, M. Miki and T. Arata : ESR analysis of troponin I regulatory region in reconstituted thin filaments

1P151

トロポニン T の Ca^{2+} 調節作用における C 端領域の機能解析

○小田 洋士、木邑 智恵子、三木 正雄 (福井大・工)

TnT は、Tn が acto-S1 ATPase を Ca 濃度依存的に調節する為に重要とされ、Tm と Ca 濃度非依存的に相互作用する伸びた N 端側領域 (TnT1; 165 残基) と、TnI、TnC と複合体を形成し Ca 濃度依存的に Tm と相互作用する C 端側領域 (TnT2; 101 残基) をもつ。また、C 末端の 6 残基は種によらず良く保存されている。ウサギ骨格筋 TnT2 において C 末端の 17 残基の削除は、acto-S1 ATPase の Ca 調節作用を著しく減弱し、同時に TnT2 の Tm 結合能が消失することが報告されている。これは C 末端 17 残基が筋収縮制御に重要な部分であることを示唆している。Tm・Tn 複合体の結晶構造から、Tn 複合体の球状領域は Tm の残基 150 - 180 と相互作用していると考えられている。これらの相互作用部位の電荷アミノ酸を比較すると、Tm の残基 150 - 180 には負電荷のアミノ酸が比較的多く存在し、TnT の C 末端 17 残基には正電荷のアミノ酸のみが存在している。C 末端 17 残基の Ca 調節作用は、これらの正電荷アミノ酸の影響によるものと思われる。そこで、本研究では、正電荷アミノ酸に着目した TnT C 末端 17 残基の Ca 調節作用領域のさらなる限定と、正電荷アミノ酸の影響についての知見を得る事を目的とし、ウサギ骨格筋 TnT25K の C 末端アミノ酸を 6、11、16 個削除した変異体及び、Arg264・Lys266 を Glu に置換した変異体を調製した。これらの変異 TnT を Tn 複合体に再構成し acto-S1 ATPase 活性の制御能を測定し、TnT の Ca 調節作用の機能解析結果について報告する予定である。

H. Oda, C. Kimura, and M. Miki : Functional analysis of C-terminal region in TnT for Ca-regulatory interaction

1P150

筋原線維の水の束縛力

木村 雅子、○大野 哲生、千葉 允、山口 真紀、竹森 重 (慈恵医大・生理 1)

筋原線維懸濁液は粘性が高く、遠心してもなかなか高濃度にすることはできない。筋原線維間に反発力が働いているにせよ、筋原線維間距離は非常に長く、とても静電的な力では説明できないのではないかとと思われる。周りの水を巻き込んで、厚い水和層をつくっている可能性を考えて、筋原線維懸濁液の水プロトン NMR の信号の測定を行った。筋原線維懸濁液では主に、1 秒ほどの緩和時定数の成分 (成分 0) と、0.2 秒ほどの緩和時定数の成分 (成分 1) の 2 つが観察された。タンパク濃度が上昇するにつれて、成分 0 の割合は減少し、7mg/ml のところで、両成分の割合は逆転した。このタンパク濃度では、平均筋原線維間距離は数 μm 程度であると考えられるので、筋原線維は、静電的な作用で考えられる距離のおよそオーダーとして 10 の 3 乗くらい遠くの水まで、何らかの形で束縛している可能性があることがわかった。

T. Ohno, M. Kimura, M. Chiba, M. Yamaguchi and S. Takemori : Spin-spin relaxation of 1-H NMR signals from myofibril suspension of rabbit skeletal muscle

1P152

化学架橋トロポミオシンによる滑り運動の抑制 2

○中川 真一、本多 元、羽鳥 晋由、松野 孝一郎 (長岡技大・生物系)

筋収縮制御に関与する蛋白質の一つであるトロポミオシンは、平行な二本鎖の α -helical coiled-coil 構造をとっている。生体内でトロポミオシンはアクチン繊維と結合しその協同性を高める要素として考えられているが、それがどのようにして実現しているかは今のところわかっていない。昨年の年会において我々は、トロポミオシンのサブユニット間を架橋剤 DMS、DTBP 及び BM[PEO]3 で架橋した結果、架橋トロポミオシンはアクチン繊維の滑り運動を抑制することを報告した。さらに acto-HMM-ATPase 活性も架橋トロポミオシンを加えることにより抑制されることがわかった。(下図参照) 今回我々は、トロポミオシンとアクチンを個別に蛍光標識し、トロポミオシンを可視化することによりアクチン繊維上での動きを顕微鏡下で観察することを試みた。この観察結果から、架橋を行ったトロポミオシンがアクチン繊維の滑り運動をどのように抑制しているのか、またアクチン繊維上のトロポミオシンがどのように動いているのかを調査している。

S. Nakagawa, H. Honda, K. Hatori and K. Matsuno : Inhibition of sliding movement of actin filaments by crosslinked tropomyosins 2.