1P153

時間分割蛍光エネルギー移動法による D234Tm で再構成した細いフィラメント上の構造的な動きの速度論
○志鷹 裕司、木邑 智恵子、三木 正雄 (福井大・工)

横紋筋の収縮は、生体内の Ca 濃度の変化によりアクチンフィラメント上のトロポミオシン (Tm) とトロポニン (Tn) により調節されている。7つの内部領域の内 2,3,4 を削除した Tm (D234Tm) は通常の Tm と比べてアクチンに対する親和性は変わらないが、Ca 濃度に関わらず常に Actomyosin ATPase 活性を阻害することが報告されている。近年、当研究室の海、木邑らによって、アクチンの outer domain に導入した DABMI をエネルギー受容体とし、TnI の 1、133、181 番目と TnT25K の 60、250 番目に導入した IAEDANS をエネルギー供与体として用いて、蛍光エネルギー移動 (FRET) 法により D234Tm で再構成した細いフィラメント中の蛍光色素間の位置関係について報告した。その結果、通常の Tm と比較して、TnI では myosin subfragment 1 (S1) の添加による open 状態への誘導のされ方に違いはあるが、アクチン間との Ca 依存的な構造的な動きには顕著な違いは見られなかった。一方、TnT25K では 250 番目の Ca 依存的な動きの程度が小さくなり、60 番目に至っては全く変化しなかった。そこで、本研究では D234Tm 又は通常の Tm で再構成した細いフィラメント上の Tn の動的挙動の相違点を調べる目的で、Stopped-Flow 蛍光エネルギー移動法を用いて、三状態モデル (open, closed, relaxed 状態) に基づく Ca 濃度依存的な動きと S1 の結合・解離により生ずる動きの経時変化を追跡した。Ca 濃度依存的な動きでは、TnI 各部位の速度定数は通常の Tm で得られた速度定数と同程度であった。一方、TnT25K の 60 番目は蛍光強度の変化が見られず、250 番目は Tm で得られた速度定数より若干小さくなった。この結果により定常状態と時間分割の両観点から、TnT の動きが D234Tm で再構成した細いフィラメントの不活性化に関与しているのではないかと考えられる。また S1 の結合・解離による動きについても検討する。

Y. Shitaka, C. Kimura and M. Miki : KINETICS OF STRUCTURAL TRANSITION OF RECONSTITUTED MUSCLE THIN FILAMENTS WITH D234 TROPOMYOSIN STUDIED BY FLUORESCENCE ENERGY TRANSFER

1P155

蛍光エネルギー移動法による細いフィラメント上でのトロポニン T とトロポミオシン間の距離の解析
○木邑 智恵子、三木 正雄 (福井大・工)

トロポニン T (TnT) は I、C と Tn 複合体を形成し、細いフィラメント上でトロポミオシン (Tm) と相互作用している。TnT 分子は大きく二つの領域 (TnT1:N 端側、TnT2:C 端側) に分けられる。TnT1 は長く伸びた領域で Tm と Ca 濃度非依存的に相互作用している。N 末端領域には可変領域が存在するがこの領域を削除した 25kDa の fragment (TnT25k) で再構成した細いフィラメントは full length TnT と同様の acto-S1 ATPase 活性を示すことが報告されている。TnT2 は I、C と共に Tn の球状領域を形成し、C 末端部分は Tm と Ca 濃度依存的に相互作用する。昨年 Tm 相互作用部位を除いた TnT2 と I、C との複合体 (Tn コアドメイン) の結晶構造が報告され、TnT2 の一部は TnI と IT-arm と呼ばれる α -helical coiled coil を形成している事が示された (Takeda et al. Nature, 2003)。そこで我々は次の二点について着目した。(1) TnT2 の Tn コアドメイン内に含まれる部位および Tm 相互作用部位が Tm に対してどのような位置関係にあるのか。(2) TnT1 は Tm のどの辺りまで伸びているのか。これらの情報を得るため本研究では蛍光エネルギー供与体、受容体をそれぞれ導入した TnT25k (60, 73, 127, 153, 200, 250) と Tm (146, 174, 190, 209, 230, 271, 279) で再構成した細いフィラメントを用いて、蛍光エネルギー移動法により距離を測定した。その結果は次のとおりである。(1) TnT2 に含まれる TnT200 と 250 は共に Tm174 と 190 の間付近に位置するが、IT-arm の付け根部分に位置する TnT200 は Tm 結合領域に位置する 250 に比べ Tm から離れている。(2) TnT1 のうち TnT25k の N 末端部分に位置する 60, 73 は Tm の C 末端付近に位置している。(3) TnT1 の中間に位置する TnT127 は Tm230 に非常に近い。以上より TnT2 を含む Tn 球状領域は Tm174 と 190 の間付近に位置しており、TnT25k の N 末端は Tm の C 末端まで伸びていることが示唆された。

C. Kimura and M. Miki : The distances between Troponin T and Tropomyosin in the thin filament observed by FRET

1P154

アクチン-トロポニンは HMM との結合を阻害する

○水野 裕昭、羽鳥 晋由、本多 元、松野 孝一郎 (長岡技大院・生物系)

我々はこれまでに低イオン強度条件下でトロポニン (Tn) はトロポミオシン (Tm) を介さずに直接アクチンと結合することを報告した。その時に顕微鏡観察で Tn を直接結合させたアクチン繊維 (Tn-アクチン繊維) の数はカルシウム濃度の低下に伴って減少することを示した。このことからカルシウム非存在下では Tn がアクチンとミオシンの結合を直接阻害していると考えた。今回、カルシウム非存在下での Tn-アクチン-ミオシン間の結合を調べたところ、Tn の量が増加すると HMM とアクチンの結合量が低下することがわかった (図参照)。これは顕微鏡観察でカルシウム濃度の低下により、測定できる Tn-アクチン繊維数が減少する事と一致する。このことからカルシウム非存在下で Tn はアクチンとミオシンの結合を阻害していると考えられる。三木らは再構成 thin filament の調節は Tm の移動ではなく Tn の再配置によって導かれていると報告している。これらの事実から Tn は Tm を介さずともアクチン-ミオシン間の結合を阻害できるのではないかと考えられる。

H. Mizuno, K. Hatori, H. Honda and K. Matsuno : Direct contact of Tn and actin inhibits their binds to HMM

1P156

トロポニン I 断片を用いて再構成した細いフィラメントの運動

○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)

トロポニン I (TnI) はトロポニン (Tn) 複合体において、アクチン-ミオシン間の滑り運動を抑制する因子である。本研究では、TnI の C 末端をカルボキシペプチダーゼ Y によって切断した断片 (Δ C-TnI) を TnT、TnC、トロポミオシン-アクチンと再構成した細い繊維を用いて in vitro motility assay を行い、その運動性を調べている。昨年度年会では、 Δ C-TnI を含む細いフィラメントの滑り運動は、未消化の TnI も多く含んでいるにも関わらず、カルシウムイオン濃度の高い条件でさえ抑制されることを報告した。その後、さらに酵素分解が進んだ TnI (未消化の TnI がない Δ C-TnI) を含む細いフィラメントでも運動観察を行ったが、未消化の TnI を多く含む場合とほぼ同様の結果が得られた (Fig.1)。このことは、 Δ C-TnI を含む細いフィラメントは、カルシウムイオン濃度に依らず繊維全体が運動停止状態になることを示す。つまり、TnI の C 末端は、他の Tn サブユニットと相互作用することで抑制を解除するカギとなる領域であり、細いフィラメント活性化において重要な役割を担っているといえる。

Fig.1 カルシウムイオン濃度と動く繊維の割合

Y. Funamoto, H. Mizuno, H. Honda, K. Hatori and K. Matsuno : Unusual inhibition of TnI-fragments on the thin filament motility in vitro.