1P302

ピルビン酸脱水素酵素複合体の活性制御機構のモデル化

○齊藤 隆太¹、皿井 伸明²、松岡 達² (¹三菱ウェルファーマ株式会社、²京大院・医学研究科)

ピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDC) はミトコンドリアにおける TCA 回路の導入基質であるアセチル CoA 産生に携わり、ミトコンドリアにおける ATP 産生を制御する酵素の一つである。PDC はリン酸化・脱リン酸化を受けることで活性が制御され、脱リン酸化を担うピルビン酸脱水素酵素フォスファターゼ (PDP) は Ca^{2+} 依存的に活性化される。 Ca^{2+} 依存性 PDP 活性化による PDC の活性上昇は、ミトコンドリア ATP 産生増加につながるが、生化学的実験から示されている。しかしながら、興奮収縮連関と、 Ca^{2+} 依存性 PDP 活性化との関係は未だ明らかでない。そこで我々は、心筋細胞の興奮収縮連関とエネルギー代謝の Ca^{2+} を介したクロストークを解析するため、生化学的実験知見を基にして、PDC の活性制御モデルの開発を行った。PDC の反応機構は Ping-Pong モデルで表現し、汎用生体シミュレーションプラットフォーム (simBio) 上に実装した。ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ (PDK) はピルビン酸、ADP によって活性阻害、NADH、アセチル CoA によって活性化、PDP は Ca^{2+} 、 Mg^{2+} によって活性化される項を追加して、その反応機構を数式化した。PDC、PDP、PDK の酵素反応速度係数はそれぞれ、Kiselevsky *et al.* (1990) *Acta. Biochim. Pol.*, **37**, 135, Huang *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 17680, Bowker-Kinley *et al.* (1998) *Biochem. J.*, **329**, 191 の生化学的な実験データから求めた。PDC モデルの基質依存性は、実験データと良く一致することが確認できた。PDC モデルにおける Ca^{2+} に対する見かけの解離定数は $0.2 \sim 0.4 \mu\text{M}$ で、報告されているミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度変化範囲にあるため、正常心筋細胞において、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度変化に応じて PDC 活性が変化することが示唆された。

R. Saito, N. Sarai and S. Matsuoka : Modelling of the regulation of pyruvate dehydrogenase complex

1P304

線虫に見る動物の新しい概日時計機構

○長谷川 建治¹、三枝 徹²、田中 千貴² (¹北里大学・医、²北里大学院・医療系)

線虫でも、ショウジョウバエや哺乳動物の *period* に代表される時計遺伝子群の相同遺伝子が同定されている。しかしそれらは、主に発生に関与し、概日リズム形成には直接関与してない可能性が高いことが明らかにされている。我々は、線虫が成虫に成るとはつきりした行動の概日リズムを示すことを発見した。この発見は、線虫には、従来ショウジョウバエや哺乳動物で提唱されている概日時計の「時計遺伝子とその合成産物間のネガティブ・フィードバックループ説」とは異なる、より根源的な概日時計機構が存在することを示唆するものである。我々は目下、同時に 24 匹の線虫の行動を測定できる装置を開発して、概日時計機構に関与する可能性が考えられる遺伝子ホモログの変異体群の行動を測定している。その結果を基に、動物のより根源的な概日時計機構を考え、且つその「生体時間秩序発現機構」上の意義について考察する。

K. Hasegawa, T. Saigusa, K. Tanaka : A novel circadian clock system conceivable in *C. elegans*.

1P303

時計タンパク質 KaiA-KaiC 相互作用の化学量論

○林 史夫¹、伊藤 裕基²、藤田 真康¹、岩瀬 亮¹、宇津巻 竜也¹、石浦 正寛¹ (¹名大・遺伝子・植物ゲノム、²日立ハイテク)

多くの生物において、様々な生理活性が 24 時間の周期で変動することが知られており、これらのリズムを司る細胞内のリズム発振分子機構が「生物時計」である。我々は生物時計を精巧な分子装置である「生物時計装置」と捉え、生物時計装置を構築する時計タンパク質 (KaiA、KaiB、KaiC) の諸性質や相互作用を解析している。KaiA と KaiC との相互作用はリズム発振に非常に重要であり、我々はこの KaiA-KaiC 相互作用のストイキオメトリを決定した。AMPPNP 存在下で安定な KaiA-KaiC 複合体 (KaiC・AMPPNP・KaiA 複合体) の検出に成功した。2DNS-PAGE 解析やスキャッチャードプロット解析、生体分子間相互作用解析 (IASys) を適用し、KaiC・AMPPNP・KaiA 複合体のストイキオメトリは KaiA 二量体 : KaiC 六量体 = 2 : 1 であることを明らかにした。さらに、生体分子間相互作用解析より、ATP 存在下での KaiC・ATP・KaiA 複合体のストイキオメトリは KaiA 二量体 : KaiC 六量体 = 1 : 1 であることも明らかにした。また、KaiC リン酸化促進に対する KaiA の dose response を調べたところ、 $1/2 \text{ max}$ を与える分子数は 0.25 分子だった。これらの結果から、KaiA 二量体は一分子の六量体型 KaiC に二分子結合することができ、少なくとも一分子の KaiA 二量体の相互作用で KaiC のリン酸化活性を促進すると結論した。1) 2Dimensional Native and SDS-PAGE, 我々が確立した Native-PAGE で分離されたバンドを切り出し、SDS-PAGE で再展開することで構成タンパク質を同定、定量する方法。

F.Hayashi, H.Ito, M.Fujita, R.Iwase, T.Uzumaki, M.Ishiura : Stoichiometric interactions between cyanobacterial clock proteins KaiA and KaiC

1P305

線虫 *C.elegans* の代謝エネルギーと生物学的時間

○須田 斎 (東海大・開発工・生物工)

線虫 *C.elegans* は、老化・寿命の研究のために使用される究極のモデル動物である。最近、長寿変異体や短命変異体の発見により寿命遺伝子が明らかになってきた。寿命は、一般に代謝エネルギーと共役しており、相反関係にある。つまり、活性が高い動物ほど寿命が短い。そこで、「寿命」と「代謝エネルギー」とが同種内においてどの程度強く共役しているのか、寿命遺伝子によって制御された変異体の代謝エネルギーを測定して検証してみたので報告する。代謝エネルギー測定は、簡便な酸素濃度を測定する間接法で行った。酸素濃度は、通常クラーク電極法が用いられるが、線虫のように小さな虫を扱うには膨大な数が必要となり不便である。そこで、我々は光学式の新しい酸素測定法を採用した。これにより数 μL のチャンバーを使用して、究極的には 1 匹の線虫の代謝エネルギー測定が可能となる。ところで、酸素濃度の検出は、外径約 0.5mm Φ の光ファイバー先端にルテニウム錯体の薄膜をコーティングした検出器からなる。光ファイバーの他端から約 450nm の光を導入し、プローブ先端の薄膜面に入射すると外界の酸素濃度に比例して約 600nm の蛍光を発する。分光器を介して発した蛍光強度をフォトンカウンティングして酸素濃度の計測を行う。この測定機の最も大きな利点は、僅かな線虫で、究極的には 1 匹の線虫での代謝エネルギー測定が可能であるという点にある。一方、寿命測定は、同調培養した線虫を用いて行った。様々な環境下・変異体で生存曲線を求め、その解析を「拡散モデル」に基づいて行った。寿命を定量的に理解するには、遺伝子によってプログラムされている部分と環境に支配されている部分とからなることを含めて、生物学的時間の概念の転換によって時間を定義し直す必要があることを示す。

H. Suda : Energy metabolism and biological time in the nematode *C.elegans*