1P145

ウサギ骨格筋トロポミオシンC末端フラグメントの結晶構造解析

○似内 靖^{1,2}、前田 佳代^{1,2}、小田 直子^{1,2}、南方 志帆^{1,2}、前田 雄一郎^{1,2} (¹ 理研播磨・構造生物化学、² 科技振・ERATO)

【目的】骨格筋や心筋のトロポミオシンは284残基、400Åの長さのCoiled-coil蛋白質であり、トロポニンと共にこれらの筋肉のカルシウム濃度依存的な筋力調節に関与している。トロポミオシン全長では良好な結晶が得られないため、原子レベルにおける構造は今もって不明な点が多い。特に、トロポミオシンの機能はCys190を中心としたC末端側に集中していることが知られているが、この部分の原子レベルの構造情報がまったく存在せず、構造生物学的な研究の障害になっている。この現状を打破するため、本研究室ではCys190を含むトロポミオシンフラグメントについて広範囲の結晶化条件探索を行い、解析可能な結晶を得、構造解析に成功した。

【結果】結晶中において、トロポミオシンフラグメントは全長にわたってCoiled-coil構造を保持していたが、Tyr214-Glu218-Tyr221周辺で約10度の曲がりが見られた。さらに、Glu180からTyr214は電子密度が他の部分よりも低く、この部分の運動性は他の部分よりも高いと考えられた。

【考察】Coiled-coil蛋白質は7残基ごとの繰り返し配列を持ち、その1残基目と4残基目に疎水性残基が来ることによりCoiled-coil構造が安定化される。しかし、トロポミオシンは繰り返しの1残基目にGlu218を持っている。グルタミン酸はCoiled-coil構造を大きく不安定にすることが知られており、これは上記の構造解析結果に対応する。他方、この異常なGlu218は線虫から人間まで広範囲に保存されており、Glu218の生み出す不安定性こそがトロポミオシンの機能に本質的であることを示唆すると考えられる。

Y. Nitani, K. Maeda, N. Oda, S. Minakata, Y. Maeda: The Crystal Structure of C-terminal Fragment of Rabbit Skeletal α -Tropomyosin

1P147

トロポニンを含めた細いフィラメントのX線回折による構造解析

○松尾 龍人¹、上野 豊²、武澤 康範¹、大島 勘二¹、若林 克三¹ (¹ 阪大院・基礎工、² 産総研・脳神経情報)

骨格筋の弛緩状態と収縮状態のX線回折像を比較すると、細いフィラメント由来の第1層線、第2層線の強度が逆転している事が大きな特徴として挙げられる。これは、細いフィラメントが弛緩状態から収縮状態に移行すると4回回転対称性を強めるような構造変化を起こしている事を示唆する。底角の層線反射には周期の大きいらせん成分が効いてくるが、その候補としてトロポミオシン、トロポニンT1、アクチンの長いストランドの動きが挙げられる。今回は、広角領域の層線強度と合うFアクチン+トロポニンコアドメインのモデルを構成し、それにトロポミオシン、トロポニンT1を導入して底角の層線強度分布に合うようなモデルを検討した。モデル計算においては、トロポニンコアドメインはヒト心筋の結晶構造を用いた。トロポニンT1は結晶構造が得られていない為、一本の長いらせんで近似した。結果として幾つかのモデルが得られたが、いずれのモデルにおいてもトロポミオシンが、アクチンのサブドメイン1と3の間からアクチンモノマー間へ移動するような動きがあった。その動きの小さいモデルではトロポニンコアドメインがトロポミオシンの長軸に対して交差していた。この配置はFRETから解析された配置とよく類似していた。(図)

T. Matsuo, Y. Ueno, Y. Takezawa, K. Oshima, K. Wakabayashi: Structure Analysis of the Thin Filament Including Troponin by X-ray Diffraction

1P146

蛍光エネルギー移動(FRET)法より求められたデータに基づくトロポミオシン上のトロポニンの分子配置

○木邑 智恵子¹、上野 豊²、上早稲 敏子³、若林 克三³、三木 正雄¹ (¹ 福井大・工、² 産総研、³ 阪大・基礎工)

TnはT,I,Cから構成され、大きく二つの領域頭部と尾部に分けられる。頭部は球状領域でI、C、T2(TのC端領域)から成り、TmのC端2/3付近に位置している。尾部は主にT1(TのN端領域)から成り、隣のTmのN末端付近まで伸びている。近年二種類(Takeda et al.: human cardiac, Vinogradova et al.: chicken fast skeletal)のTnコアドメイン(T2, I, C)の結晶構造が報告された。いずれもT2の一部はI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。我々はTnコアドメインがTmに対してどのような位置関係にあるかを調べるため、蛍光エネルギー供与体、受容体それぞれを導入したTn(T25k: 60, 73, 127, 153, 200, 250, I: 1, 9, 133, 181, C: 98番目)とTm(13, 146, 174, 190, 209, 230, 271, 279番目)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(FRET)法により距離を測定した。その結果以下の結果が得られた。(1) Tn球状領域内のI: 1, 9, 133, 181, T: 200, 250はTm174と190の間付近に位置する。(2) IT-armの付け根部分に位置するT200はTm結合領域付近にあるT250に比べTmから離れている。(3) T1領域のうちT25kのN末端部分に位置する60, 73は隣のTmのN端付近(Tm13)まで伸びている。(4) T1領域の中間部分に位置するT127はTm230に非常に近い。以上よりTn球状領域はTm174と190の間付近に位置しており、T25kのN末端はTmのN端付近まで伸びていることが示唆された。現在これらFRETのデータを使い、計算機実験によりTnコアドメインのTm上での最適配置を探索している。座標決定されている領域のマルチプルアライメントに基づきアミノ酸配列を対応づけたところ、IT-armはTmと平行ではなくある程度角度を持たせる必要性があり、T1領域を α -ヘリックスのモデルとするとTmから少し離れる傾向にある。当日これらモデル計算の方法についても議論したい。

C. Kimura, Y. Ueno, K. Uewasa, K. Wakabayashi, and M. Miki: Placing Troponin on Tropomyosin by using FRET Data

1P148

Tetramethyl-rhodamine-5-maleimideで標識したトロポニンによる細いフィラメントの運動阻害

○三沢 忍、水野 裕昭、本多 元 (長岡技科大・生物系)

筋収縮は、トロポニン(Tn)及びトロポミオシン(Tm)によってカルシウムイオン濃度に依存して調節されている。これまでに、我々は低イオン強度条件下でアクチンとトロポニン(Tn)が直接結合することを報告している。今回、我々はアクチン繊維上のTnを可視化するために、Tnをtetramethyl-rhodamine-5-maleimide(TRM)で修飾しアクチン繊維と結合させ、それを確認する試みを行った。TRM-Tnだけを用いて細いフィラメントを再構成したところ標識された繊維が確認できた。しかし、再構成したフィラメントの滑り運動を確認することはできず、カルシウムイオン非存在下ではHMMと結合しなかった。そこで、未標識のTnとTRM-Tnを混合し細いフィラメントを再構成したところ、カルシウムイオン存在下で、波打ち運動や不規則に運動を停止することがわかった。これは1本の繊維の中でTRM-Tnによって運動が阻害される領域が存在しているためと考えられる。現在、このTRM-Tnによる運動性の変化を詳細に解析している。

上:[アクチン:TRM-Tn]=1:1
下:[アクチン:TRM-Tn]=1:0.2
スケールバー:2.0 μ m

S. Misawa, H. Mizuno, H. Honda: Unusual movement of actin filaments decorated with TRM-labeled-Troponin