2P149

アカザラガイ・トロポニン T の N 末端側および C 末端側領域の機能解析

○鈴木 潜¹、田中 啓之¹、大槻 磐男²、尾島 孝男¹ (¹ 北大院・水産、² 慈恵医大)

脊椎動物横紋筋では、トロポニン (Tn) の Ca^{2+} 結合サブユニットであるトロポニン C (TnC) の N 末端側ドメインへの Ca^{2+} 結合により、筋収縮が引き起こされる。一方、軟体動物筋では TnC の C 末端側ドメインへの Ca^{2+} 結合により収縮が引き起こされる。さらに軟体動物 Tn では、収縮調節は主にアクチン-ミオシン相互作用の Ca^{2+} 依存的な活性化によって行われるなどの特徴がある。本研究では、このような軟体動物 Tn の機能と関連する構造領域に関する知見を得るため、アカザラガイ Tn の α -キモトリプシン消化物を調製し、その性質を調べることにした。アカザラガイ Tn を 1/2000 (w/w) の α -キモトリプシンにより限定消化した結果、トロポニン T (TnT) のみが速やかに 33K 断片と 6K 断片に切断され、それに伴ってアクトミオシン-トロポミオシン Mg-ATPase 活性の Ca^{2+} 依存的活性化作用が消失することが明らかとなった。N 末端配列の分析により、33K 断片は TnT の N 末端側領域、6K 断片は C 末端 55 残基の領域と同定された。この C 末端 6K 領域は脊椎動物 TnT には存在しない無脊椎動物 TnT 特有の C 末端伸長領域であった。ゲルろ過により精製した 33K 断片、トロポニン I (TnI) および TnC からなる複合体は、インタクト Tn とは異なり Ca^{2+} 存在下でアクチン-トロポミオシンから解離する性質を示した。このような性質は、脊椎動物では TnI-TnC 二成分複合体において知られているが、アカザラガイ TnI-TnC では認められなかった。これらの結果より、アカザラガイ TnT の C 末端 6K 領域は Ca^{2+} 存在下において Tn をアクチン-トロポミオシンに結合させる機能を、また、33K 断片の領域は TnI-TnC 二成分複合体のアクチン-トロポミオシンへの結合に Ca^{2+} 感受性を与える機能を有することが示唆された。

H. Suzuki, H. Tanaka, I. Ohtsuki, and T. Ojima : Functional analysis of NH_2 - and COOH - terminal regions of Akazara scallop troponin-T

2P151

電子分光クライオ電子顕微鏡法を用いた ATP 加水分解中間状態のミオシン II の可視化

○太田 好則¹、梅木 伸久³、丸田 晋策³、片山 栄作²、安永 卓生⁴ (¹ 九工大院・情報工・情報科学、² 東大・医科研・分子構造解析、³ 創価大・工・生物工学、⁴ 九工大・情報工・生命)

ミオシン II は ATP 加水分解とともにアクチンフィラメントとの結合・解離を繰り返すことにより滑り運動を起こす。しかし、このメカニズムの詳細は依然不明であり、それを明らかにするためには、運動中のミオシン II の構造変化の詳細を知ることが重要である。そこで本研究では、重メロミオシン (以下 HMM) を用いて、ATP 加水分解反応の中間状態に近い構造を取ると考えられる、pPDM-HMM・ADP、HMM・ADP・Vi およびヌクレオチド・フリー (HMM・apo) の 3 種類の試料を作成し、氷包埋法と電子分光クライオ電子顕微鏡法を用いて、その電子顕微鏡画像 (2 次元投影像) を取得した。次に、デフォーカス (5 ~ 9 μm) による像のボケを補正するために、計算機による画像処理を施した。得られた 2 次元画像を X 線結晶解析による原子モデル像と比較したところ、HMM・apo、HMM・ADP・Vi では結晶構造とおおよそ一致したのに対して、pPDM-HMM・ADP の構造は他 2 者と著しく異なり、コンパタードドメインとレバーアームが伸びた構造をしていた。次に、結果をアクチン-ミオシン滑りメカニズムの仮説として現在最も広く信じられているレバーアーム仮説と対応させると、pPDM-HMM・ADP は HMM・ATP から HMM・ADP・Vi 状態に移行する途中、あるいはその後のアクチン再結合直前の状態に相当する可能性が考えられる。更に詳細な議論を可能にするために、現在、これらの 3 種類の構造について 3 次元再構成像の獲得を目指している。結果は本会にて報告する予定である。

Y.Ohta, N.Umeki, E.Katayama, S.Maruta and T.Yasunaga : Visualization of the ATP hydrolysis intermediate of myosin II by electron cryo-microscopy

2P150

電子分光クライオ電子顕微鏡法を用いた二枚貝キャッチ筋キャッチ機構の分子メカニズムの解明

○三瀬 大海¹、安永 卓生²、吉雄 麻喜³、山田 章³ (¹ 九工大院・情報工・情報科学、² 九工大・情報工・生命、³ 情報通信研・関西・生体物性)

二枚貝キャッチ筋は、通常の骨格筋と同様に、ATP の存在下で細胞内の $[\text{Ca}^{2+}]$ が増加すると強い張力を発生する。その後、細胞内の $[\text{Ca}^{2+}]$ が減少すると、通常の骨格筋では張力が減少するのに対し、二枚貝キャッチ筋では ATP 加水分解速度は低下するものの強い張力を維持する。この状態をキャッチ状態という。キャッチ状態は脊椎動物平滑筋のラッチ状態に似ている。共同研究者である山田らは、in vitro でキャッチ再構成系を確立し、キャッチに必須なタンパク質がアクチン、ミオシン、ツイッチンの 3 者であることを解明した。そこでアクチン、ミオシン、ツイッチンがどのように相互作用し、キャッチ状態を生み出すのかを解明するために、電子顕微鏡法を用いて構造学の観点から研究を進めた。

電子顕微鏡を用いた観察で、キャッチ条件 (脱リン酸化ツイッチン)、弛緩条件 (リン酸化ツイッチン) とともに細いフィラメント (アクチン) と太いフィラメント (ミオシン・ツイッチン複合体) を観察できた。弛緩状態では細いフィラメントが太いフィラメントと解離しているのに対し、キャッチ条件ではフィラメント間に架橋構造が見られた。この架橋構造は、太さ 3nm 4nm、長さ 10nm 11nm であり、結晶構造から推測されるミオシンの構造とかなり一致する。また、共沈法等の結果からツイッチンとアクチンの直接相互作用はほとんど観察できないことから、架橋構造はミオシンである可能性が高い。

しかし、この複合体はバンドルを形成し易く詳細な構造を観察することが困難である。この問題を解決するために、溶液中に浮遊している余分なミオシン、アクチン、ツイッチンを取り除く試料作製法を現在検討している。本会では、架橋構造についての詳細な観察を行い、キャッチメカニズムに迫りたい。

H.Mise, T.Yasunaga, M.Yoshio and A.Yamada : Elucidation of molecular mechanism for the 'catch' state of invertebrate smooth muscle by electron cryo-microscopy

2P152

ESR による細いフィラメント上のトロポミオシンの動的解析

○植田 啓介¹、相原 朋樹¹、植木 正二^{1,2}、木邑 智恵子³、三木 正雄⁴、荒田 敏昭^{1,2} (¹ 阪大院・理・生物科学、² CLEST・JST、³ ERATO・前田プロジェクト、⁴ 福井大・工・生物応用化学)

筋収縮制御タンパクのトロポミオシンは長い棒状分子で、アクチンフィラメントのらせんに沿って結合している。トロポミオシンの末端にはカルシウム (Ca^{2+}) 感受性タンパクのトロポニン複合体が結合しており、 Ca^{2+} の結合により、その構造を変化させ、トロポミオシンの位置をずらすかどうか調べるため、スピララベル ESR (電子スピン共鳴) を用いて、 Ca^{2+} によるトロポニン側鎖の動的変化を解析することを目的とした。天然のトロポミオシン (284 残基: Cys 残基 36、190) はウサギ骨格筋から抽出し Cys 残基にスピララベルして、細いフィラメント再構成系で Ca^{2+} 存在下、非存在下について ESR 測定を行った。その結果、 Ca^{2+} 存在下、非存在下におけるスペクトルにわずかな違いが見られ、 Ca^{2+} 存在下ではスピララベル運動性が若干高くなることを示すものとなった。この結果から、 Ca^{2+} 存在下ではトロポミオシン-アクチンフィラメント間またはトロポミオシン-トロポニン間の相互作用 (側鎖立体障害) の大きさが小さくなることで、トロポミオシン側鎖スピララベルの運動性が大きくなったことが示唆される。また、ミュータントトロポミオシンを用い、36、190、279 番目単独の Cys 残基を置換し、スピララベルを結合させ、同様に測定を行った。そのスペクトルを比較すると、36、190、279 の順でスピララベル運動性が高くなることも確認でき、C 端から N 端に近づくほどより固定化されていることが考えられた。このシステイン領域では Ca^{2+} の効果は殆どなく、トロポミオシンの全長にわたる大きな動きがあることには否定的である。しかしながら、他の領域では異なるスピララベル側鎖運動性やスピン間距離の変化を示す可能性があるので、さらに多くの領域の特定の amino 酸残基にラベルを付けて ESR 測定し、トロポミオシンが部分的に動くのか全体的にどう動くのか、考察し報告する予定である。

K.Ueda, T.Aihara, S.Ueki, C.Kimura, M.Miki and T.Arata : ESR measurement of tropomyosin molecule on the thin filament by site-directed spin label scanning