2P153

スピンラベルEPRによるヒト心筋トロポニンC構造変化の研究

○植木 正二^{1,2}、中村 志芳³、荒田 敏昭^{1,2} (¹ 阪大院・理・生物、²JST・CREST、³JST・ERATO)

トロポニン (Tn) は、骨格筋や心筋におけるカルシウム依存的筋収縮制御に関わるタンパク質である。心筋 Tn の変異による機能障害が、さまざまな心臓疾患を引き起こすことが知られている。Tn 分子のサブユニットの一つであるトロポニン C (TnC) の N 末ドメインへのカルシウムイオン結合が、筋収縮のトリガーになる。TnC の N ドメインは5つの α -ヘリックス (N_A-D) からなり、2つの EF-hand モチーフを持つ。骨格筋 TnC の場合、それぞれの結合サイト I, II にカルシウムイオンが結合すると、B および C ヘリックスが D ヘリックスから遠ざかるように移動することが示されている。この構造変化により露出した疎水性部位とトロポニン I サブユニット (TnI) が相互作用する。一方、心筋 TnC ではサイト I が不活性であり、N ドメインにはカルシウム結合部位が一つしかないにも関わらず、骨格筋 TnC 同様の变化をすると考えられている。その心筋 TnC-N ドメインにおける構造変化を詳細に検討することは、筋収縮制御のメカニズム解明だけでなく、心臓疾患治療に関する見地からも重要である。我々は、TnC-N ドメイン上にスピンラベルを2つ導入し、電子常磁性共鳴 (EPR) でスピン間相互作用の大きさを測定することにより、ラベル間距離を見積もった。具体的には、B/D ヘリックス上、および C/D ヘリックス上にラベルし、スピン間距離がどのように変化するかを調べた。結果より、C ヘリックスはカルシウム依存的に移動すること、TnI との相互作用によって B ヘリックスが影響を受けることが分かった。また、心筋 TnI は特有の N 末領域を持ち、そこに存在するセリン残基のリン酸化/脱リン酸化によって、サイト II のカルシウム親和性を調節している。TnI リン酸化による TnC-N ドメイン構造変化への影響についても報告したい。

S. Ueki, M. Nakamura and T. Arata : Site-directed spin-labeling EPR study of the structural transition of human cardiac troponin C

2P155

近接場光を用いた運動アッセイ系におけるアクチン繊維の滑り運動観察

○国田 美穂子¹、櫻沢 繁¹、本多 元² (¹ 公立はこだて未来大院・システム情報科学、² 長岡技大・生物系)

アクチン繊維の滑り運動は、運動アッセイによって観察することができるが、通常の蛍光観察では2次元的な運動解析しかできない。しかしながら、その運動中にアクチン繊維が交差しながらも運動を継続するなど、運動アッセイ系におけるアクチン繊維の滑り運動では2次元的な運動解析のみでは説明できない運動も観察されている。そこで、アクチン繊維の運動を3次元的に捉えるために、近接場光を用いてアクチン繊維を観察した。

実験には、ウサギ骨格筋から抽出・精製したアクチンと HMM を用いた。近接場光を用いてアクチン繊維を観察し、その画像を 30fps で記録した。得られた画像の輝度分布を用いて、アクチン繊維の進行方向に対して垂直方向の変位から求めた横方向揺らぎと輝度の変化から求めた輝度揺らぎをそれぞれ測定した。この輝度揺らぎは、ガラス面に対して深さ方向の揺らぎを定性的に示すと考えられる。

はじめに、ライゴール条件下でアクチン繊維を観察した。HMM 濃度が飽和する 0.05mg/ml まで HMM 濃度を増加させたとき、横方向揺らぎは減少したが輝度揺らぎは増加した。これは、HMM 濃度の増大に伴う HMM の同調的な運動の発生によって生じた可能性がある。次に、近接場光を用いて運動アッセイを行い、まだらに標識したアクチン繊維の運動を観察した。その結果、標識されたスポットが点滅しながら運動する様子が記録された。このときの、スポットの軌跡と輝度の変化を測定したところ、輝度が大きく変化しながら運動していた。これらの結果は、運動アッセイ系において、アクチン繊維がガラス面に対して深さ方向に大きく揺らぎながら三次元的に滑り運動している可能性を示唆している。

M.Kunita, S.Sakurazawa, and H.Honda : Observation of sliding movement of actin filament in a motility assay using near-field light

2P154

146-174の間の7残基ごとにシングルシステインを導入した変異 Tm の性質

○日下部 貴久、木邑 智恵子、佐久間 紹子、尾上 敦洋、三木 正雄 (福井大学・工学研究科)

Tm・Tn 複合体の結晶構造解析から、TnI, TnC, & C-terminal region of TnT からなる Tn 球状領域は Tm のアミノ酸配列 150-180 に結合していることが報告されている (White et al. (1987) Nature 325, 826-828)。Tn 球状領域と Tm との相互作用について調べるため、Tm のアミノ酸配列 146-174 の間の 7 残基ごとにシングルシステインを導入した 5 つの変異 Tm (TmI146C、TmH153C、TmR160C、TmR167C & TmS174C) を調製した。更にこのシステイン残基に色素 DABMI をラベルした。これらシステイン残基は、Tm の α -helical coiled coil 構造の 7 repeat において、いずれも f の位置にあるので、ラベルによる Tm の α -helical coiled coil 構造への影響は少ないと思われる。これらシステイン置換により、更には DABMI 導入による Tm の構造の安定性、アクチンへの結合能、actomyosin ATPase 活性のカルシウムによる制御能におよぼす影響を、ATPase 測定、共沈実験、示差走査熱量計 (DSC) 測定により調べた。システイン置換においては、TmR167C はその生理機能が大きく影響を受け、カルシウムによる actomyosin-ATPase 制御が正常に機能しなくなった。DABMI ラベルでは、TmR160C が、制御機能に大きく影響を受けた。これら結果は 160,167 番目近辺がトロポニン球状領域とのカルシウム濃度依存性相互作用部位として重要であると思われる。これら変異 Tm、更にはアクチンやトロポニン存在下での DSC 測定により、アミノ酸置換による Tm の熱安定性への影響やアクチンやトロポニンとの相互作用について調べた結果を報告する。

T. Kusakabe, C. Kimura, A. Sakuma, A. Onoue, M. Miki : The effects of point mutation in the region 146-174 of Tm on the regulation-ability and the thermal stability.

2P156

筋制御タンパク質トロポニンとアクチンの結合の構造基盤

○村上 健次¹、湯本 史明²、大木 進野³、安永 卓夫⁴、田之倉 優²、若林 健之¹ (¹ 帝京大・理工系・バイオサイエンス、² 東大・農学系・応用生命化学、³ 北陸先端大・ナノマテリアル、⁴ 九州工業大・情報工学系・生命情報工学)

筋収縮は細いフィラメントと太いフィラメントとの“滑り運動”によって生じている。骨格筋、心筋では、この“滑り運動”は細いフィラメントの構造変化によって制御されている。最も受け入れられている細いフィラメントの制御モデルは、カルシウムによってトロポニンが構造変化を起こし、トロポミオシンの位置をシフトさせるというものである。そしてシフトしたトロポミオシンはアクチン上のミオシン結合領域を覆い、ミオシン結合を阻害すると考えられている。現在、アクチン、トロポニン、トロポミオシンの個々の原子構造はほぼ解かれているものの、お互いどのように相互作用し、“滑り運動”を制御しているかは不透明である。お互いの相互作用を明らかにするために、まず NMR 分光法によって分子量 52kD のトロポニン T2C1 複合体を構成する個々のドメインの運動性に関する知見を得た。次に、トロポニンのアクチン結合領域のみを発現・精製し、アクチンフィラメントに結合させ、クライオ電子顕微鏡解析によってアクチンフィラメント上での結合位置を同定した。これらの知見に基づいて、細いフィラメントの電子顕微鏡密度マップ (Narita et al., 2001) にトロポニン、トロポミオシンの原子構造をドッキングし、細いフィラメントの原子モデルを得た。このモデルでは、トロポニンの TnI C 端領域が、アクチンのアウトードメインにカルシウム依存的に結合していた。TnI C 端領域に引っ張られたトロポニンのコイルドコイル領域は、トロポミオシンと立体障害を起こし、その結果、トロポミオシンをシフトさせていることが容易に予想された。私たちは、トロポニンコイルドコイル領域によって引き起こされたトロポミオシンシフトの分子機構を提唱する (Murakami et al., 2005)。

K.Murakami, F.Yumoto, S.Ohki, T.Yasunaga, M.Tanokura, T.Wakabayashi : Structural basis for Ca²⁺-regulated muscle relaxation at interaction sites of troponin with actin and tropomyosin