

骨格筋収縮調節蛋白質 Troponin C と  
ペプチド Melittin の  
構造変化の研究

佐野 浩樹<sup>1</sup>

平成10年 7月 5日

名古屋大学図書	
和	1280606

<sup>1</sup>名古屋大学大学院 理学研究科

## Abstract

骨格筋の収縮は筋肉中の細いフィラメント上に存在する troponin によって主に調節されている。私はその機能が troponin 中のサブユニットの一つである troponin C の立体構造変化によって引き起こされるのではないかという立場から、兎骨格筋 troponin C の生理活性溶液条件下での構造変化について研究した。

研究をするにあたり、troponin 複合体中の troponin C の機能について調べたかった。そこで troponin C と機能上特に重要な相互作用をおこなっていると思われる troponin I の inhibitory peptide との相互作用に注目した。本研究では、このペプチドと構造がよく似ていて、ほかのカルシウム結合蛋白質でも良く研究の対象となっている melittin との複合体を用いて、特定部位間の距離を測定して複合体の構造変化の測定をおこなった。方法としては蛍光色素を複合体中に 2 カ所導入し、そのあいだで起こる蛍光励起エネルギーの移動度を測定し、Förster の理論から蛍光分子間の距離を割り出すという方法を用いた。

蛍光分子のプローブは、troponin C の 4 つのカルシウムイオン結合ユニットのうち生理活性に関係が深いと考えられている N 端側のドメイン中の helix A にある Methionine25 と、C 端側のドメイン中で、helix E にある Cysteine98 に導入した。また melittin と、この各々のプローブ間の相対的な位置を調べるために、native の melittin 中では 19 番目の位置にある Trp の位置を N 端側から 2, 5, 8, 13 番目に移した melittin を合成し、native の melittin と共にこの Trp と蛍光色素間での距離も調べた。

その結果、4 個あるカルシウム結合部位の 2 個以下に金属イオンが結合した場合 ( $-Ca^{2+}$  条件と表現する) と、4 個結合した場合 ( $+Ca^{2+}$  条件と表現する) で複合体の構造が大きく変化することがわかった。Troponin C-melittin の複合体では troponin C 中の Met25 と Cys98 の間の距離は  $-Ca^{2+}$  条件で約  $32\text{\AA}$  であったのに、 $+Ca^{2+}$  条件では約  $50\text{\AA}$  となった。また melittin 中のいくつかの部位に導入した Trp と troponin C 上の Met25, Cys98 の間の距離を測定したデータから、melittin は troponin C の Met25 と Cys98 を結ぶ線に対して垂直に結合していて、その位置も  $-Ca^{2+}$  条件と  $+Ca^{2+}$  条件で異なっており、melittin 分子が troponin C の上であたかも転がるような変化をしているということがわかった。

目次	1
----	---

## 目次

<b>I 序</b>	<b>5</b>
1 筋収縮について	5
2 Troponin Cについて	7
3 Melittinについて	9
4 蛍光測定法について	14
<b>II 測定の原理</b>	<b>16</b>
5 定常光励起における蛍光、励起エネルギー移動について	16
6 蛍光異方性と Perrin-Weber プロット	21
7 蛍光計の周波数特性についての保証	25
8 蛋白質に蛍光色素が100%付かないことに対する補正	29
<b>III 材料と方法</b>	<b>32</b>
9 材料 (製品)	32
10 兎骨格筋 troponin C の調製	33
11 Melittin の精製	34
12 蛍光色素の結合について	34
13 蛋白質の濃度の決定	36
14 吸収、蛍光測定について	36
15 量子収率の測定について	37

目次	2
16 Perrin-Weber プロット、蛍光異方性の測定について	38
17 SDS ポリアクリルアミド電気泳動法について	38
<b>IV 結果と考察</b>	<b>38</b>
18 量子収率の測定結果	38
19 エネルギー移動実験の 1: DANZ-IAE	42
20 エネルギー移動実験の 2: Trp-DANZ	46
21 エネルギー移動実験の 3: Trp-AEDANS	50
22 蛍光異方性のデータから読みとれること	53
23 考察	58

## 表目次

1	量子収率の表	42
2	Troponin C中のDANZ, IAE間の励起エネルギー移動実験 で得られた測定値	45
3	Troponin C-melittin複合体中のTrp, DANZ間の励起エネ ルギー移動実験で得られた測定値	48
4	Troponin C-melittin複合体中のTrp, AEDANS間の励起エ ネルギー移動実験で得られた測定値	52

## 図目次

1	骨格筋の筋原線維の模式図	6
2	サルコメア単位の模式図	6
3	細い線維の模式図	7
4	Troponin Cの構造	8
5	EF-handの模式図	9
6	Calmodulinの立体構造	11
7	CalmodulinとTroponin Cのアミノ酸配列	12
8	Melittinの立体構造の模式図	13
9	MelittinとTroponin I(101-113)のアミノ酸配列	13
10	1, 5-I-AEDANS, DANZ, IAEの分子構造	15
11	励起エネルギー移動のベクトル関係	18
12	蛍光の偏光成分の測定	21
13	励起分子のEの方向と蛍光の偏光特性	22
14	蛍光同期スペクトル	26
15	蛍光励起スペクトル	27
16	試料分子全体に対して一部だけ蛍光ドナー分子が結合して いるときの概念図	30
17	試料分子に対して一部だけ蛍光ドナー分子が結合し、さら に一部にだけ蛍光アクセプター分子が結合しているときの 概念図	30
18	Melittin誘導体のアミノ酸配列	32
19	Quinine sulfateの吸収、蛍光スペクトル	39
20	Troponin C-DANZの吸収、蛍光スペクトル	40

21	Troponin C-melittin の吸収、蛍光スペクトル . . . . .	41
22	Troponin C-melittin 複合体中の DANZ,IAE の吸収、蛍光 スペクトル . . . . .	43
23	Troponin C-melittin 複合体中での蛍光エネルギー移動の様子	44
24	Troponin C-melittin 複合体中の Trp, DANZ の吸収、蛍光 スペクトル . . . . .	46
25	Troponin C-melittin 複合体中での蛍光エネルギー移動の様子	47
26	melittin 中の Trp の位置と、それに伴う Trp-DANZ 間の距 離の推移 . . . . .	49
27	Troponin C-melittin 複合体中の Trp, AEDANS の吸収、蛍 光スペクトル . . . . .	50
28	Troponin C-melittin 複合体中での蛍光エネルギー移動の様子	51
29	melittin 中の Trp の位置と、それに伴う Trp-AEDANS 間の 距離の推移 . . . . .	53
30	Troponin C-melittin 複合体中での Trp の蛍光異方性のデータ	54
31	Troponin C-melittin 複合体中での DANZ の蛍光異方性の データ . . . . .	55
32	Troponin C-melittin 複合体中での AEDANS の蛍光異方性 のデータ . . . . .	56
33	Troponin C-melittin の立体構造の想像図 (-Ca 条件) . . . . .	62
34	Troponin C-melittin の立体構造の想像図 (+Ca 条件) . . . . .	63

## Part I

# 序

### 1 筋収縮について

生物は自分で動くことができる。動物が動くのはすでにご存じであろうと思うが、植物であっても動く。何も個体の位置を変える事だけが運動ではない。時間がたてばお日様を追っかけるように廻る植物もいるし、その中では生命を維持するために細胞内の物質をゆき渡らせるために絶えず運動している。動くためのメカニズムはいろいろ知られているが、主なものとして actin, myosin による系、microtubule, kinesin による系、microtubule, dynein による系などが知られている [1]。今回私が取り上げた troponin C は、動物の骨格筋を構成している actin, myosin 系において、筋収縮を直接制御している蛋白質である [2]-[5]。

骨格筋の収縮は、長さが  $2\mu\text{m}$  の sarcomere を基本単位として行われる。Sarcomere には主に myosin を中心とする太い繊維 (thick filament) と、actin を中心とする細い繊維 (thin filament) があり、収縮の時には両者が互いに滑り込むことが知られている [6]。Troponin は細い繊維の中に含まれていて、筋収縮の調節を行っている蛋白質群の一つである。Troponin は細い繊維の actin filament の上に tropomyosin と共に結合していて、その存在比は

$$\text{actin} : \text{tropomyosin} : \text{troponin} = 7 : 1 : 1$$

となっている。それぞれの蛋白質同士が決まった位置関係をとることが知られており、筋肉を収縮、弛緩させる信号であるカルシウムイオン濃度によって細い繊維の構造が変化する。この構造変化が筋収縮の制御に直接的に関係しているともいわれているが、未だ確証は得られていない [7][8]。

Troponin は3つのサブユニット (sub unit) からなり、それぞれ troponin I, troponin T, troponin C と呼ばれる [2]。Troponin I は actin と myosin の滑り運動を抑制する作用があり、troponin C が同時に存在すれば、カルシウムイオンの存在の有無で滑り運動の抑制作用が異なる。つまり、カルシウムイオン非存在下では滑り運動を抑制するが、カルシウムイオンの存在下では滑り運動の抑制効果が消失する。この troponin C の作用は

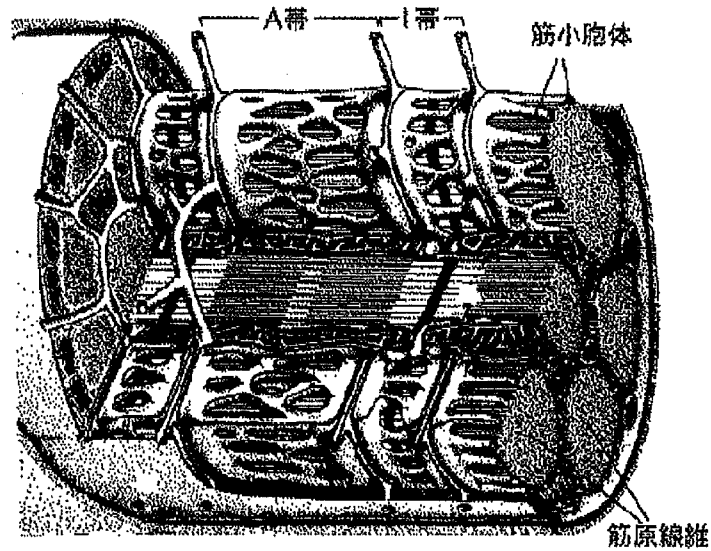


図 1: 骨格筋の筋原線維の模式図

出典：医科 生理学展望 [9]

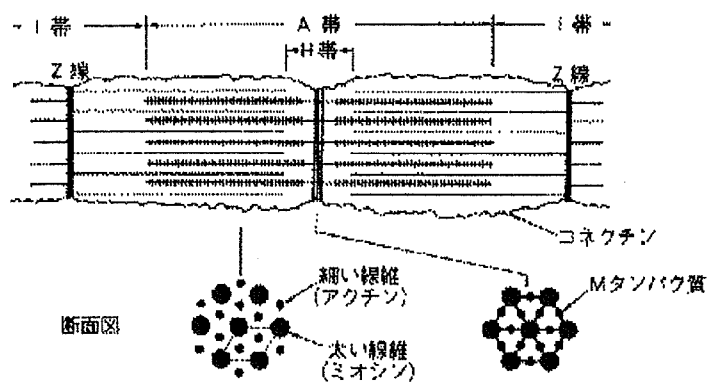


図 2: サルコメア単位の模式図

出典：筋肉 [10]



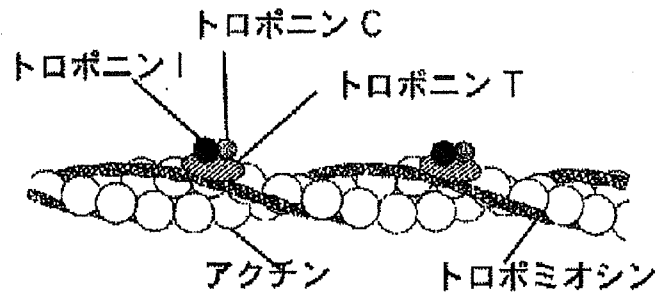


図 3: 細い線維の模式図

出典：筋肉[11]

カルシウムイオンの存在量によってのみ決まり、可逆的に起こることから troponin C が生理条件でのカルシウムイオンの受容に大きく関係しており、troponin C でのカルシウムイオン感受性がそのまま筋収縮の制御に関係していると考えられている。Troponin T は主に troponin のサブユニットを actin, tropomyosin に結合させる役目を持っているのだろうと考えられているが、筋収縮の調節に関与しているのかは今のところわかっていない。(See reviews in Refs. [2]–[5])

## 2 Troponin C について

Troponin C は 2 つの頭を持ったダンベルの形をしている。X 線による結晶構造の解析や、近年では NMR を用いた解析によって、詳しい立体構造が調べられている [12]–[18]。そのうち C 端側の 2 箇所は high affinity site と呼ばれ、カルシウムイオンに対して結合定数  $K = 2 \times 10^7 M^{-1}$ 、マグネシウムイオンに対して結合定数  $K = 5 \times 10^3 M^{-1}$  を持つ。N 端側の 2 箇所は low affinity site と呼ばれ、カルシウムイオンに対して結合定数  $K = 3 \times 10^5 M^{-1}$  を持つことが知られている [19]–[22]。Troponin C は high affinity site, low affinity site へのカルシウムイオンの結合によってその構造を変えることが知られており、troponin I による滑り運動の抑制効果を troponin C が押さえ込むのは low affinity site へのカルシウムイオンの結合であると考えられている [19]。特に兎骨格筋の troponin C に

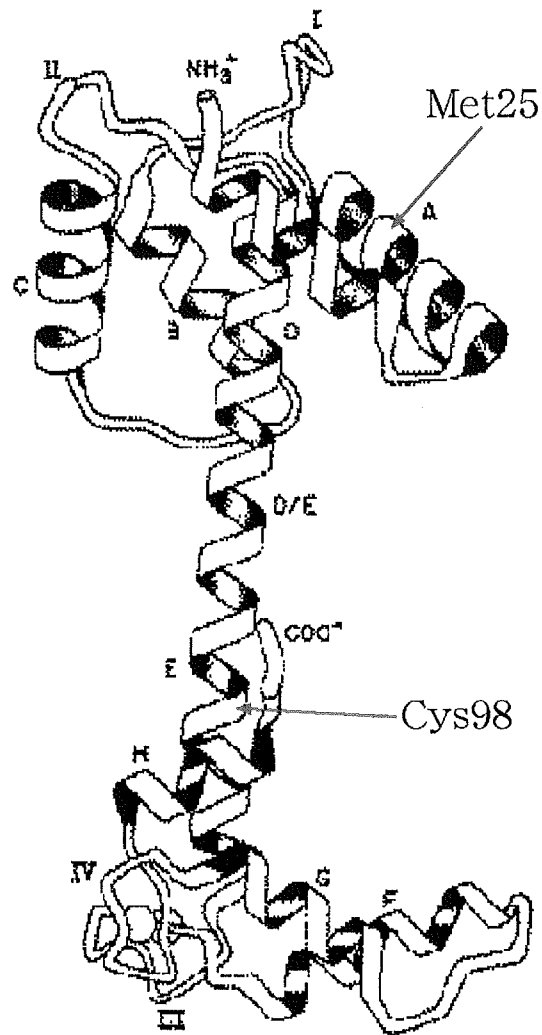


図 4: Troponin C の構造

X線解析による troponin C の構造 [12]  
この構造では C 端側の二つのサイトにのみ金属イオンが結合している。  
図中の Met25, Cys98 の位置に蛍光色素を結合して測定を行った。

についてはアミノ酸の配列も知られており、EF-handと呼ばれるカルシウムイオン結合部位を4箇所持っていることも知られている。

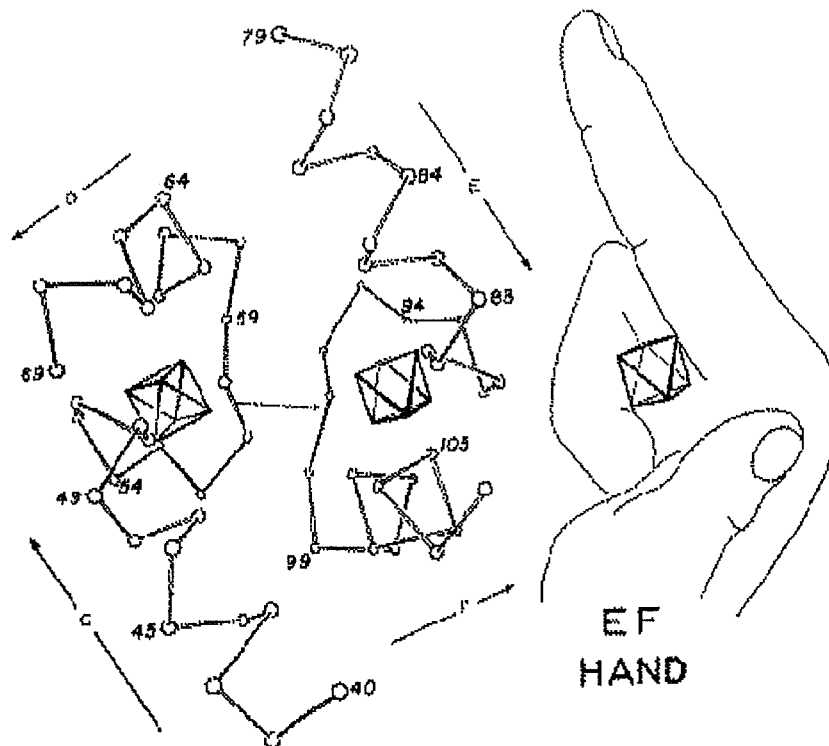


図 5: EF-hand の模式図

parvalbumin の EF-hand の模式図 [23]

これと同じ構造が troponin C 中に 4 個存在している [23]

### 3 Melittin について

骨格筋中での troponin C の機能と構造変化を研究するには、troponin C の複合体構成要素として troponin I を選ぶのが近道のように考えられる。しかし構造の複雑さなどからなかなか明快なデータを提供できていないのが現状である。そこで我々は troponin C-troponin I 複合体のモデルとし

て、troponin Iの代わりとしてペプチドの melittin を用いることにした。Troponin Cはtroponin 複合体中でtroponin Iの inhibitory peptide(アミノ酸番号でいえばtroponin Iの101-113番アミノ酸)と呼ばれる部位と結合することが知られている [5][24]-[29]。この部位は $\alpha$ -helix構造をとっている。Melittinも $\alpha$ -helixの構造をとっており、カルシウム結合蛋白質に結合するターゲット分子としてその構造の相同性からよく用いられている。Troponin Cとよく似た構造を持つカルシウム結合蛋白質に calmodulin がある [30] (図6, 7参照)。4個のカルシウムイオンを結合した calmodulin はターゲットとなる蛋白質に結合し、この結合はカルシウム依存で起こる [31]。Calmodulin は melittin や mastoparan といったいくつかの細胞外ペプチドも結合することができ [31]、calmodulin の結合相手のモデルとして melittin が使われることも多い [32][33]。参考となるように troponin I の101-113番のアミノ酸配列と、melittin のアミノ酸配列を載せておく。(図9) Persechini and Kretsinger[34]によると、calmodulin は  $Ca^{2+}$  条件で中央ヘリックス中のリンカーの部分が柔らかい構造をしていて、ターゲットとなるペプチドの $\alpha$ -helix部分を両側のドメインで挟み込んでしまうという。Ikura et al.[33]と Meader et al.[35][36]のグループはそれぞれマルチファンクショナルNMRとX線結晶構造解析を用いてこの提案を確認している。

Troponin Cは calmodulin とは異なり、筋肉中の細いフィラメント中で troponin I, troponin T, tropomyosin, actin の各々の分子と常に結合しており、troponin C単独で存在することはないと考えられている。しかし同様の構造をもつ calmodulin は単独で存在し、カルシウムイオン依存で生理的な役割を担っているのも事実である。そこで本研究において troponin C-melittin による実験系が calmodulin-melittin の実験系と対比をなし、かつ troponin C-troponin I複合体の機能と形状の関係を明らかにするモデルになると考えた。

Melittin は女王蜂や働き蜂腹腺で合成される毒素の主要成分の一つであり、26残基からなるペプチドである [37]。Melittin は細胞膜に作用し、貫通性の穴をあけて細胞を溶解する作用があるということが知られている。このペプチドはカルシウムイオンの有無に依らずに troponin C と結合することが調べられており、特に  $+Ca^{2+}$  条件では結合定数  $5 \pm 2 \times 10^9 M^{-1}$  で強く結合することが知られている [38]。また  $-Ca^{2+}$  の条件でも troponin C に結合することが知られている [39]。

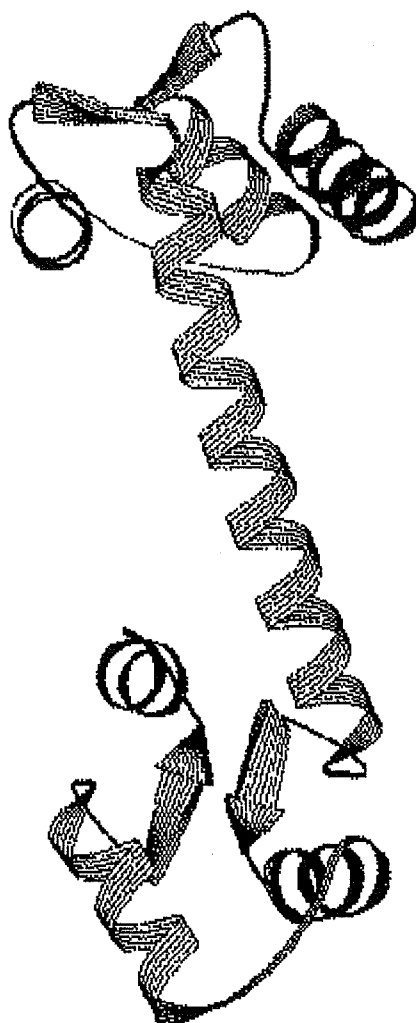


図 6: Calmodulin の立体構造

X線構造解析による calmodulin の立体構造[40]

	1	10	20	30
TnC:	DTQQA	EARSY	LSEEMIA	EFK AAFDMFDADG
CaM:		ADQ	LTEEQIA	EFK EAFSLFDKDG
	31	40	50	60
TnC:	GGDISV	KELG TVMRMLG	QTP TKEELDA	IIIE
CaM:	NGTITT	KELG TVMRSLO	QNP TEAELQ	DMIN
	61	70	80	90
TnC:	EYDE	DSGTI DFEEFL	VMMY RQMKED	AKGK
CaM:	EVDADG	NGTI DFPEFL	TMMMA RKMK	DTD
	91	100	110	120
TnC:	SEEE	LAECFR IFDRN	ADGYI DAEELAE	IFR
CaM:	SEEE	IREFR VFDKD	GNGYI SAAELR	HVMT
	121	130	140	150
TnC:	ASGEHV	TDEE IESLMK	DGDK NNDGR	IDFDE
CaM:	NLGE	XLTDDEE VDEMIRE	ANI DGDGE	VNYEE
	151	159		
TnC:	FLKMME	GVQ		
CaM:	FVQ	MMTAK		

注 X: Trimethyllysine

青字: 塩基性アミノ酸  
 赤字: 酸性アミノ酸  
 緑字: その他の親水性アミノ酸  
 黒字: 疎水性アミノ酸

図 7: Calmodulin と Troponin C のアミノ酸配列

一次元構造でも非常によく似た構造をとっていることがわかる。  
 Troponin C のアミノ酸配列は [20] から  
 Calmodulin のアミノ酸配列は [41] からとった。

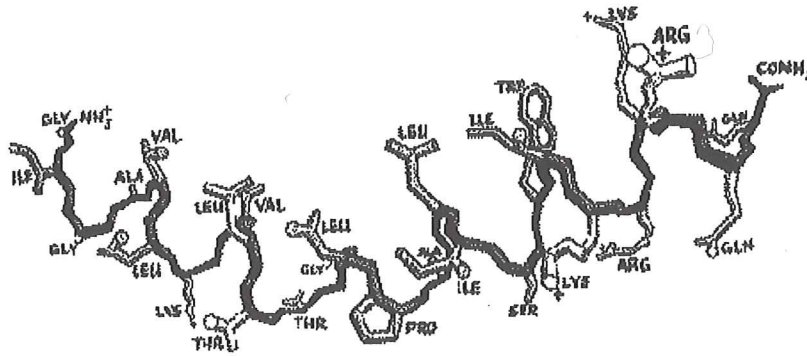


図 8: Melittin の立体構造の模式図

11番目と12番目のアミノ酸の位置で約60°  
曲がっているのがわかる [42]

	1	10	20	26
Melittin:	GIGAVLKVLT	TGLPALISWI	KRKR	QQ
TnI	: DLRGKFKRPP	LRR		
	101	113		

青字： 塩基性アミノ酸  
 赤字： 酸性アミノ酸  
 緑字： その他の親水性アミノ酸  
 黒字： 疎水性アミノ酸

図 9: Melittin と Troponin I(101-113) のアミノ酸配列

Melittin のアミノ酸配列は [37] から  
 TnI(101-113) のアミノ酸配列は [5] からとった。

## 4 蛍光測定法について

Tropoin Cの構造を調べるに当たり、今回私は蛍光色素による観察を手段として選んだ。構造を調べる手段としては、X線構造解析や近年進歩の著しいNMRを用いた方法などが有名である。しかしこれらの方法は詳しい構造がわかる反面、結晶化が困難であったり、得られたデータから構造を再現するのに大変な努力を要するのも事実である。最近ではNMRによるtroponin Cの溶液中での構造解析ですら可能になってきたようであるが、簡便さでは蛍光法には遠く及ばない。蛍光法では間接的ではあるが、蛍光色素の周囲の環境変化を鋭敏に捉えることができる。今回はtroponin C分子中の2箇所、methionine 25に5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl aziridine (dansyl aziridine, DANZと略記)を、cysteine 98に5-(iodoacetamido)eosin (IAEと略記)もしくはN-iodoacetyl-N'-(5-sulfo-1-naphthyl)ethylenediamine (1,5-I-AEDANSと略記)という蛍光色素を探針として導入し、またmelittin中のtryptophan分子の蛍光も利用してtroponin C-melittin複合体の生理条件下での構造変化を蛍光励起エネルギー移動法という手法により研究した。蛍光色素の分子構造を図10に記します。



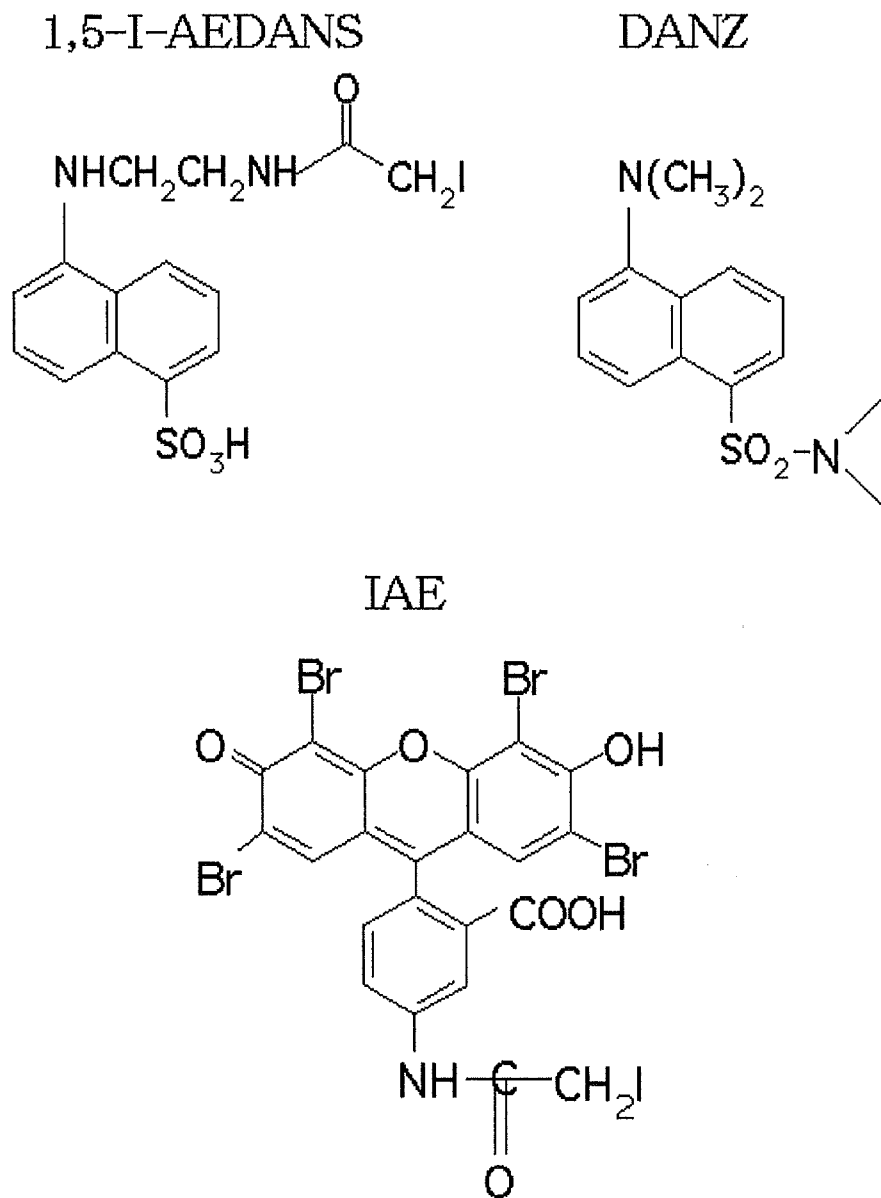


図 10: 1, 5-I-AEDANS, DANZ, IAE の分子構造

## Part II

# 測定の原理

## 5 定常光励起における蛍光、励起エネルギー移動について

蛍光分子が光を吸収して励起された直後の励起状態の多くはエネルギー的に不安定な状態であり、過剰な励起エネルギーは周りの分子との衝突などによって散逸し、励起後  $10^{-13} \sim 10^{-11}$  s ぐらいで第1励起状態の最低次の振動レベルにまで落ちる。これは励起状態の中ではもっとも安定な状態であり、電子の滞在時間はもっとも長く、通常の蛍光分子でこの状態は  $10^{-9} \sim 10^{-8}$  s 程度持続するので、励起状態での滞在時間はほとんどこの状態にある時間で近似される [43]。

第一励起状態から基底状態に移る遷移では、発光過程と無輻射過程が競合する。励起エネルギー移動が起こる系ではこれも加わる。まず、励起されたエネルギーが発光遷移と無輻射遷移でのみ散逸する過程を考える。時刻  $t = 0$  に励起された同種の蛍光分子  $N_0$  個が単位体積中にあり、発光遷移、無輻射遷移の速度定数をそれぞれ  $k_f$ ,  $k_{nr}$  とおく。時間  $t$  が経過する間に、励起状態にある蛍光分子はそれぞれの過程を経て基底状態に遷移する。時刻  $t$  で励起状態にある蛍光分子の数  $N(t)$  は

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_f + k_{nr})N(t) \quad (1)$$

$$\therefore N(t) = N_0 \exp \{ -(k_f + k_{nr})t \} \quad (2)$$

$$= N_0 \exp \left( -\frac{t}{\tau} \right) \quad \left( \because \frac{1}{\tau} \equiv k_f + k_{nr} \right) \quad (3)$$

と書ける。よって測定によって観測される蛍光強度  $F(t)$  は

$$F(t) = k_f N(t) \quad (4)$$

$$= k_f N_0 \exp \left( -\frac{t}{\tau} \right) \quad (5)$$

となる。励起された蛍光分子のうち、発光遷移するものの確率を量子収率という。これは式で書くと次のようになる。

$$\Phi = \frac{1}{N_0} \int_0^{\infty} F(t) dt \quad (6)$$

$$= k_f \tau \quad (7)$$

$$= \frac{k_f}{k_f + k_{nr}} \quad (8)$$

次に励起エネルギー移動も起こる系を考える。励起エネルギー移動の速度定数を  $k_{trans}$  とおくと、

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_f + k_{nr} + k_{trans})N(t) \quad (9)$$

$$\therefore N(t) = N_0 \exp \{ -(k_f + k_{nr} + k_{trans})t \} \quad (10)$$

$$= N_0 \exp \left( -\frac{t}{\tau'} \right) \quad \left( \because \frac{1}{\tau'} \equiv k_f + k_{nr} + k_{trans} \right) \quad (11)$$

$$\Phi' = \frac{1}{N_0} \int_0^\infty F(t) dt \quad (12)$$

$$= k_f \tau' \quad (13)$$

$$= \frac{k_f}{k_f + k_{nr} + k_{trans}} \quad (14)$$

とかけることになる [43]。

Förster[44] の計算によると、 $k_{trans}$  は次のように表わされる。

$$k_{trans} = \left\{ \frac{9000 (\ln 10)}{128 \pi^5 n^4 N_A} \times \frac{\kappa^2}{R^6} \times J \right\} k_f \quad (15)$$

但し、

$n$  : 溶媒の屈折率

$N_A$  : アボガドロ数

$\kappa^2$  : 配向因子

$J$  : donor の蛍光スペクトルと acceptor の吸収スペクトルの重なりを表す量

である。また、 $R$  は donor と acceptor の間の距離を表す。 $J$  は次のような積分で定義されている。

$$J = \frac{\int \varepsilon_a(\lambda) F_d(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F_d(\lambda) d\lambda} \quad (16)$$

$\varepsilon_a(\lambda)$  : acceptor のモル吸光係数

$F_d(\lambda)$  : 光子数で表した donor の発光スペクトル

$\lambda$  : 波長

配向因子  $\kappa^2$  は、donor と acceptor のそれぞれの遷移双極子モーメントの向きに関係した量で、

$$\kappa^2 = \left[ \mathbf{E}_d \cdot \mathbf{A}_a - \frac{3(\mathbf{E}_d \cdot \mathbf{R})(\mathbf{A}_a \cdot \mathbf{R})}{R^2} \right]^2 \quad (17)$$

$$= [\cos \theta_t - 3 \cos \theta_d \cdot \cos \theta_a]^2 \quad (18)$$

$$= [\sin \theta_d \cdot \sin \theta_a \cdot \cos \varphi - 2 \cos \theta_d \cdot \cos \theta_a]^2 \quad (19)$$

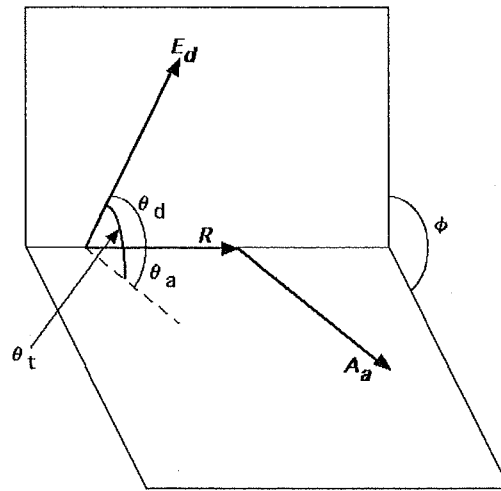


図 11: 励起エネルギー移動のベクトル関係

である。 $\mathbf{E}_d$ ,  $\mathbf{A}_a$  があらゆる向きに速い回転運動をしていると考えられる条件ではすべての  $\theta_d, \theta_a, \varphi$  の取り得る値の平均値  $2/3$  を用いる。しかし蛍光色素が完全に自由回転出来るとは限らない場合の方が実際には多い。19式から、 $\kappa^2$  は  $0(\theta_d = \theta_a = \theta_t = \varphi = 90^\circ)$  から  $4(\theta_d = \theta_a = \theta_t = 0^\circ)$  までの値をとることがわかる。蛋白質分子に結合した蛍光色素が、結合した位置を頂点とする角度  $\Psi$  を自由に回転でき、その回転による異方性として

$$\langle d^x \rangle = \frac{3 \langle \cos^2 \Psi \rangle - 1}{2} \quad (20)$$

を持つと仮定して計算した Dale 等の方法 [45] によると、 $\kappa^2$  の値は個々の蛍光色素の蛍光の異方性を用いてその最大値と最小値を導くことができ

る。彼らの計算によれば、

$$\langle \kappa^2 \rangle_{\min} = \frac{2}{3} \left[ 1 - \frac{\langle d^X_d \rangle + \langle d^X_a \rangle}{2} \right] \quad (21)$$

$$\langle \kappa^2 \rangle_{\max} = \frac{2}{3} \left[ 1 + \langle d^X_d \rangle + \langle d^X_a \rangle + 3 \langle d^X_d \rangle \langle d^X_a \rangle \right] \quad (22)$$

と書ける。 $\langle d^X_d \rangle$ 、 $\langle d^X_a \rangle$  はそれぞれ蛍光 donor, acceptor の蛍光異方性を表すパラメタであり、それぞれ完全に固定された蛍光分子の蛍光異方性  $r_{fundamental}$  と、回転運動を止められた蛋白質に結合していて、結合部を頂点とする円錐面内で自由に動ける蛍光分子の蛍光異方性  $r_{limiting}$  を用いて

$$\langle d^X \rangle = \left( \frac{r_{limiting}}{r_{fundamental}} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (23)$$

のように書かれる。このように、 $\kappa^2$  の値は理想値  $\kappa^2 = \frac{2}{3}$  に対して、実験で用いる試料の種類によってある範囲にばらつくことになる。この値が式 15 のように励起エネルギー移動の速度定数に関係するため、あとで蛍光色素間の距離を求めるさいなどには推定値が幅を持つことになる。 $\kappa^2$  の値は蛍光分子の局所的なダイポールの向きによって決まるため、各条件での  $\kappa^2$  の値がすべて等しいとは限らない。現実の色素間の距離に変化がみられない場合でも、 $\kappa^2$  の値が異なるために距離が異なるような印象を持つこともあるので、注意が必要である。 $r_{fundamental}$  と  $r_{limiting}$  は Perrin-Weber のプロットによって求めることにした。

さて、実際に観測できる量は蛍光の強さ  $F$  である。この蛍光の強さは、励起光の強さ  $J_{ex}$  と、蛍光分子のモル吸光係数  $\epsilon$ 、基底状態にある蛍光分子のモル濃度  $c$ 、量子収率  $\Phi$  を用いて

$$F \propto J_{ex} \epsilon c \Phi \quad (24)$$

と書ける。Donor のみを結合した試料からの蛍光強度を  $F_d$ 、donor, acceptor のふたつの蛍光色素を結合した試料での donor からの蛍光強度を  $F_{da}$  とすると、その蛍光強度の比は

$$\frac{F_{da}}{F_d} = \frac{J_{ex} \epsilon c \Phi_{da}}{J_{ex} \epsilon c \Phi_d} \quad (25)$$

$$= \frac{k_f}{\frac{k_f + k_{nr} + k_{trans}}{k_f + k_{nr}}} \quad (26)$$

$$= \frac{k_f + k_{nr}}{k_f + k_{nr} + k_{trans}} \quad (27)$$

$$= \left(1 + \frac{k_{trans}}{k_f + k_{nr}}\right)^{-1} \quad (28)$$

である。

$$R_0 = \sqrt[6]{\frac{9000 (\ln 10)}{128\pi^5 n^4 N_A} \times \kappa^2 \times J \times k_f \times \tau} \quad (29)$$

とおくと、この比は

$$\frac{F_{da}}{F_d} = \left(1 + \frac{k_{trans}}{k_f + k_{nr}}\right)^{-1} \quad (30)$$

$$= \left(1 + \frac{9000 (\ln 10)}{128\pi^5 n^4 N_A} \times \frac{\kappa^2}{R^6} \times J \times \Phi_d\right)^{-1} \quad (31)$$

$$= \left\{1 + \left(\frac{R_0}{R}\right)^6\right\}^{-1} \quad (32)$$

$$= \frac{R^6}{R^6 + R_0^6} \quad (33)$$

の様に donor-acceptor 間の距離を使って表せる。式中から解るように  $R = R_0$  となる距離では蛍光二重標識することで蛍光ドナーの蛍光強度が  $\frac{1}{2}$  となる。つまり  $R_0$  を決定すると、この長さを基準にして蛍光強度比から  $R$  を推定することが出来る。 $R_0$  の単位を  $cm$ ,  $J$  の単位を  $M^{-1}cm^4$  にとると、 $R_0$  は

$$R_0^6 = \frac{9000 (\ln 10)}{128\pi^5 n^4 N_A} \times \kappa^2 \times J \times k_f \times \tau \quad (34)$$

$$= \frac{9000 (\ln 10)}{128\pi^5 N_A} \times \frac{\kappa^2 \times J}{n^4} \times \frac{k_f}{k_f + k_{nr}} \quad (35)$$

$$= 8.785 \times 10^{-25} \times \kappa^2 \Phi_d n^{-4} J \quad (36)$$

と書くことができる。この  $R_0$  の値は  $\kappa^2$  の値によって変化するため、 $R_0$  も最大値と最小値を持つことになる。また、エネルギーの移動効率  $E$  は

$$E = \frac{k_{trans}}{k_f + k_{nr} + k_{trans}} \quad (37)$$

$$= 1 - \frac{k_f + k_{nr}}{k_f + k_{nr} + k_{trans}} \quad (38)$$

$$= 1 - \frac{\tau'}{\tau} \quad (39)$$

$$= \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6} \quad (40)$$

となる。

## 6 蛍光異方性と Perrin-Weber プロット

蛍光色素は分子として励起される方向と蛍光を放射する方向が決まっている。この性質を用いることによって、蛍光分子の周りの状態を探る事ができる。

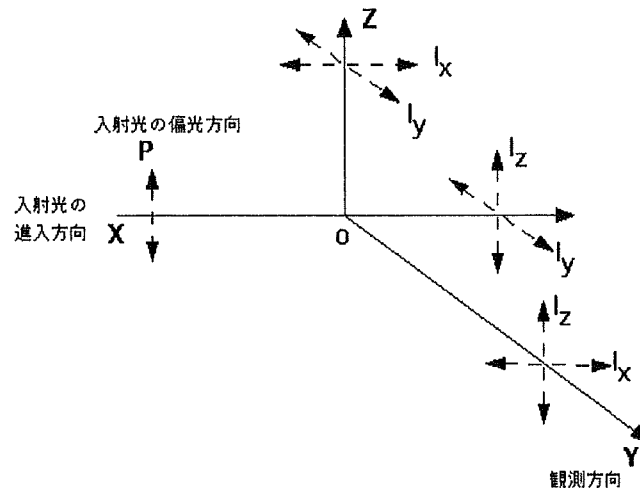


図 12: 蛍光の偏光成分の測定

図12の様に X 軸の負の方向からの入射光（偏光の方向は Z 軸方向とする）によって原点におかれた蛍光分子を励起する。蛍光分子からの蛍光は全方向に放射されると考えられるが、これを Y, Z 軸で観測したとする。Y 軸上で観測できる蛍光強度は X 軸に偏光した蛍光の成分  $I_x$  と、Z 軸に偏光した蛍光の成分  $I_z$  から成り立っている。同様に Z 軸上で観測できる蛍光は  $I_x$  と  $I_y$ 、X 軸上で観測できる蛍光は  $I_y$  と  $I_z$  から成り立っていることがわかる。そして、すべての方向への蛍光強度を足し合わせたものは、 $I_x + I_y + I_z$  に比例することがわかる。試料となる蛍光分子の置か

れている方向が等方的であるとすると、放射される蛍光強度はZ軸に対して対称的に分布するはずである。つまり  $I_x = I_y$  となるので、すべての方向への蛍光強度は  $I_z + 2I_x$  に比例する。Y軸方向で偏光子を用いて観測すれば、 $I_x$  と  $I_z$  を測定することができるので、全方向に放射される蛍光の強さを見積もることができる。 $I_z, I_x$  方向は入射光の偏光方向に対して、それぞれ平行、垂直な方向の偏光成分であるので、 $I_{//}, I_{\perp}$  を用いて表す。

偏光の度合いを表すために  $I_z$  と  $I_x$  の差を考える。蛍光の偏光が強ければ、この量の絶対値は大きくなり、また偏光が解消されればこの量は0になる。全方向への蛍光強度で規格化して、この偏光の度合いを示す量を次のように定義する。

$$r \equiv \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}} \quad (41)$$

この値  $r$  を蛍光異方性と呼ぶ。

蛍光の偏光性を決める因子について考える。蛍光分子の吸収モーメント  $\mathbf{A}$  と発光モーメント  $\mathbf{E}$  の、溶液内での分布が蛍光の異方性に影響を与えるのであるが、簡単のために吸収のモーメントと発光のモーメントが同じ向きにある場合から考える。分子運動による偏光解消が加わらない場合の蛍光異方性を  $r_0$  とする。

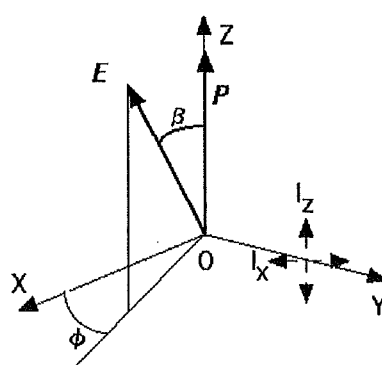


図 13: 励起分子の  $\mathbf{E}$  の方向と蛍光の偏光特性

図 13 のように入射光の偏光方向  $\mathbf{P}$  (Z 軸と同じ方向にとってある) と、 $\mathbf{E}$  のなす角を  $\beta$  とする。Y 方向で蛍光強度の 2 つの成分  $I_z, I_x$  を観測



すると、この分子からの蛍光の寄与はそれぞれ

$$i_z = k \cos^2 \beta \quad (42)$$

$$i_x = k \sin^2 \beta \cos^2 \varphi \quad (43)$$

となる。角度  $\varphi$  は、 $\mathbf{E}$  の  $Z$  軸の周りの方位角である。 $Z$  軸に関して偏角  $\beta$  を持っている集団について考えれば、これは  $Z$  軸について等方的に分布しているから、蛍光分子は  $\varphi = 0 \sim 2\pi$  の間で等確率に分布する。よって  $\cos^2 \varphi$  は平均値  $1/2$  で置き換えてよい。これらを蛍光異方性の式に代入すると、次の関係を得る。

$$r_0(\beta) = \frac{3\cos^2 \beta - 1}{2} \quad (44)$$

ここで蛍光分子がランダムに分散されている場合、 $Z$  軸方向での光の選択性を考慮に入れて  $\cos^2 \beta$  の平均値を計算する必要がある。これは次のように計算される。

$$\overline{\cos^2 \beta} = \frac{\int_0^{\pi/2} \cos^2 \beta \times \Omega(\beta) d\beta}{\int_0^{\pi/2} \Omega(\beta) d\beta} \quad (45)$$

$$\Omega(\beta) d\beta = 3\cos^2 \beta \times \sin \beta d\beta \quad (46)$$

である。この計算を行うと、 $r_0 = 0.4$  が得られる [43]。吸収のモーメントと発光のモーメントの方向が異なる場合には、 $\Omega(\beta)$  の取り方が異なってくる。ここで詳しくは論じないが、吸収のモーメントと発光のモーメントのなす角  $\omega$  を用いて、 $r_0$  は次のように求められる。

$$r_0 = 0.4 \times \frac{3\cos^2 \omega - 1}{2} \quad (47)$$

$\omega$  は  $0 \sim 90^\circ$  の範囲で変化する量であるから、 $r_0$  は

$$0.4 \geq r_0 \geq -0.2 \quad (48)$$

で与えられる。

蛍光分子が回転していて、励起の時点での  $\mathbf{E}$  と発光の時点での  $\mathbf{E}$  が角度  $\delta$  だけずれる場合には、上の議論を元に考えて

$$r = 0.4 \times \frac{3\cos^2 \omega - 1}{2} \times \frac{3\cos^2 \delta - 1}{2} \quad (49)$$

$$= r_0 \times \frac{3\cos^2 \delta - 1}{2} \quad (50)$$

だけ偏光解消を起こす[43]。このとき、 $\cos^2\delta$ の平均は、回転ブラウン運動の理論によって求めることができる。Weber[46]によると、 $\cos^2\delta$ の平均値は

$$\overline{\cos^2\delta} = \frac{1}{3} + \frac{2}{3} \exp\left(-\frac{3t}{\rho}\right) \quad (51)$$

と書けるので、

$$\frac{3\overline{\cos^2\delta} - 1}{2} = \exp\left(-\frac{3t}{\rho}\right) \quad (52)$$

である。 $\rho$ は回転の緩和時間と呼ばれるパラメタで、蛍光の回転相関時間と呼ばれる量 $\theta$ とは

$$\theta = \frac{\rho}{3} \quad (53)$$

の関係がある。

全蛍光強度 $S(t)$ と蛍光の異方性 $r(t)$ が共に単一の時定数で表現されるとすると、

$$S(t) = S_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (54)$$

$$r(t) = r_0 \exp\left(-\frac{t}{\theta}\right) \quad (55)$$

と書けるので、

$$\bar{r} = \frac{\int_0^\infty S(t)r(t) dt}{\int_0^\infty S(t) dt} \quad (56)$$

$$= r_0 \times \frac{\theta}{\tau + \theta} \quad (57)$$

$$\therefore \frac{1}{\bar{r}} = \frac{1}{r} \left(1 + \frac{\tau}{\theta}\right) \quad (58)$$

となる。蛍光色素を結合した基質分子が体積 $v$ の等価な剛体球であると仮定すると、球状粒子の回転拡散定数 $D$ と回転相関時間 $\theta$ の間には

$$\theta = \frac{1}{6D} \quad (59)$$

の関係があるので、絶対温度 $T$ と、溶媒の粘度 $\eta$ を用いて、

$$\frac{1}{\theta} = \frac{k_B T}{v\eta} \quad (60)$$

の関係が成立する。すなわち、 $A$ を適当な定数として、次のように書ける。

$$\frac{1}{\bar{r}} = \frac{1}{r_0} \left\{ 1 + k_B \times \frac{\tau}{v} \times \frac{T}{\eta} \right\} \quad (61)$$

$$= \frac{1}{r_0} \left\{ 1 + A \times \frac{T}{\eta} \right\} \quad (62)$$

このことから、適当な溶媒を用いて溶媒の粘度と温度を制御し、蛍光分子の運動を完全に止めたときの $r_0$ の値を外挿によって実験的に求めることができる。この値が $r_{fundamental}$ である。また、温度のみ一定に保って粘度を変化させると、蛋白質分子自身の回転運動はコントロールされるけれども蛋白質に対する蛍光色素の運動には影響を与えないという条件をつくることができる。この条件下で測定した $r_0$ をlimiting anisotropyといい、 $r_{limiting}$ と表す。

## 7 蛍光計の周波数特性についての保証

蛍光測定で用いる光源は、あらゆる波長で均一な強度の光を発することが望ましいが、残念ながら光源の強度は波長ごとに異なる。また、受光器の測定感度も波長によって異なるため、蛍光計全体としてみたときの周波数特性を知らなければ各波長領域での相対的な蛍光強度の比較を行うことができない。

蛍光計で実際に測定できる蛍光強度 $F_{em}(\lambda)$ は、希薄溶液に関しては真の発光スペクトル $\varphi_{em}(\lambda)$ に、蛍光装置系の感度 $T_{em}(\lambda)$ と分光器の波長半値幅 $\Delta\lambda_{em}(\lambda)$ を掛けたものとなる。

$$F_{em}(\lambda) = T_{em}(\lambda) \times \Delta\lambda_{em}(\lambda) \times \varphi_{em}(\lambda) \quad (63)$$

発光側の分光器として回折格子分光器が用いられていれば、波長半値幅 $\Delta\lambda_{em}(\lambda)$ は波長によらずに一定になるため、蛍光装置系の分光感度特性 $T_{em}(\lambda)$ がわかればよいことになる[43]。

$T_{em}(\lambda)$ を求める方法として、光量子計と光散乱子を用いた方法が良く用いられている。光量子計は各波長領域において総ての励起光を吸収し、特定の波長の光に変換できる高濃度の蛍光分子であり、光散乱子は磨りガラス状の散乱子によって励起光を一定の割合で散乱するものである。光量子計を用いると、励起光の各波長での強度比を求めることができ、光散乱子で得られたデータからは励起光の強度に対する受光器の感度特

性を求めることができる。つまり、励起スペクトルの強度  $J_{ex}(\lambda)$  と、光散乱子で測定した同期スペクトル  $H(\lambda)$  を用いると、分光感度特性  $T_{em}(\lambda)$  は次のように書ける [43]。

$$T_{em} = \frac{H(\lambda)}{J_{ex}(\lambda)} \quad (64)$$

今回用いた蛍光装置では、励起スペクトルの強度  $J_{ex}(\lambda)$  を  $200 \sim 600nm$  では rhodamin-B の ethylenglycol 溶液 (濃度は  $3g/l$ ) を用い、 $640nm$  での蛍光を測ることで求めた。また  $500 \sim 730nm$  での励起光については methylenblue の ethylenglycol 溶液 (濃度は  $1.5g/l$ ) を用いて  $740nm$  での蛍光を測って求めた。同期スペクトル  $H(\lambda)$  は光散乱子を用いて  $200 \sim 900nm$  の波長領域について求めた。Rhodamin-B, methylenblue による励起スペクトルと光散乱子による同期スペクトル  $H(\lambda)$  はグラフ 14 のようになった。

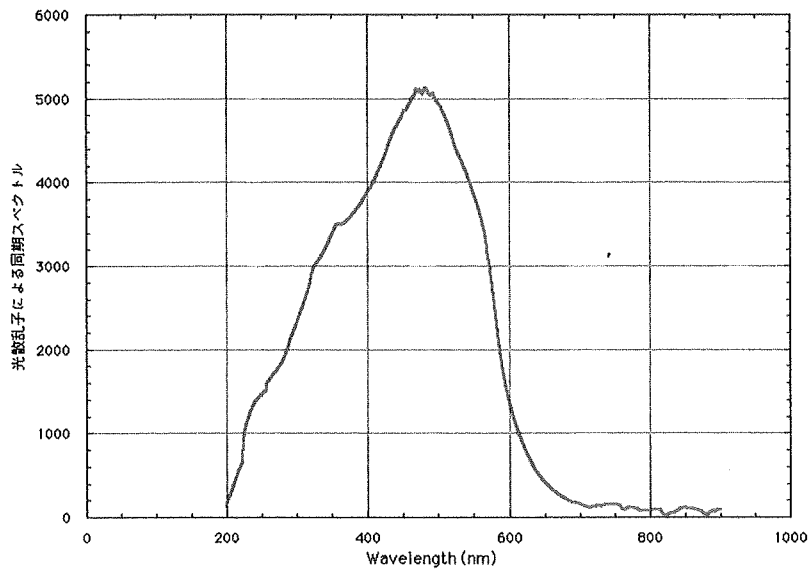


図 14: 蛍光同期スペクトル

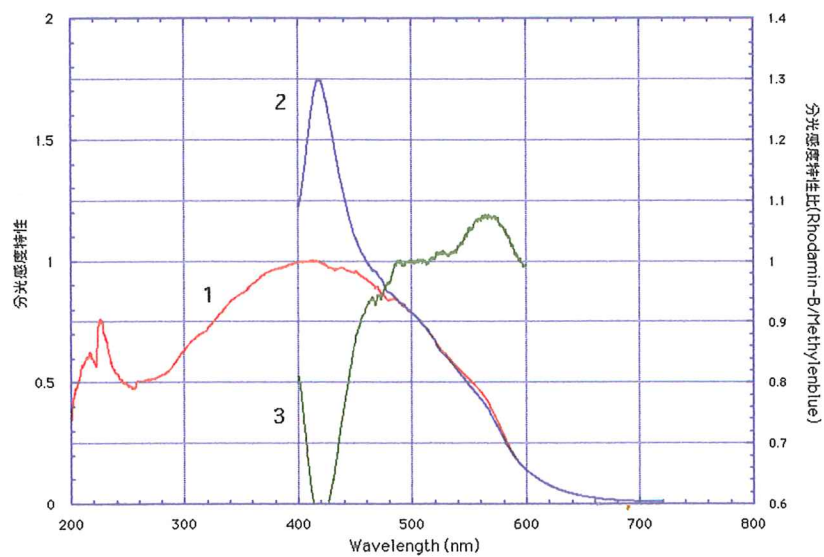


図 15: 蛍光励起スペクトル

- 赤(1) : Rhodamin-B の励起スペクトル
- 青(2) : methylenblue の励起スペクトル
- 緑(3) : 励起スペクトルの比 (Rhodamin-B / Methyleneblue)

400～600nmの波長範囲について rhodamin-B と methylenblue の励起スペクトルの強度の比をとると、グラフのようになり、500nm 付近でその比が一定になったので、励起スペクトルとしては 200～500nm を rhodamin-B で、500～730nm を methylenblue で測定したものをつないで使うこととした。

## 8 蛋白質に蛍光色素が100%付かないことに対する補正

蛋白質に蛍光色素を結合させるとき、残念ながら色素と蛋白質が一對一に結合しないということがよく起こる。しかし測定においては純粋にすべての蛋白質に蛍光色素を結合している蛍光強度を知りたいのも事実である。そこで以下のような補正を考え、すべての蛋白質分子に理想的に色素がついているときの蛍光強度を算出することにする。但しこの方法の適用限界は、その原理から蛍光色素の二重標識によって各々の色素の吸収、蛍光スペクトル波形が単標識の時と比べて変化していない時に限られる。

まず、一部のみ二重標識された試料からの蛍光をもとにして、純粋にすべての試料が二重標識されたときの蛍光強度を見積もることを考える。まず、蛋白質分子に対する蛍光ドナー分子、蛍光アクセプター分子の結合の割合を  $f_d, f_a$  とおく。簡便のために蛋白質の濃度はすべて同じものとしておく。すべての蛋白質分子に蛍光色素がついたときに予想される蛍光強度を  $F_d, F_a$  とし、実際に観測される蛍光強度はそれらのテイルダ付きで表すことにする。蛍光ドナー分子のみで標識した試料から観測される蛍光強度は

$$\tilde{F}_d = F_d \times f_d \quad (65)$$

である。よってすべてに蛍光ドナー分子が結合しているならば、蛍光強度は以下の様に表現されることになる。

$$F_d = \frac{\tilde{F}_d}{f_d} \quad (66)$$

同様に二重標識された場合の蛍光強度について考える。二重標識されたときの蛍光強度は図17より以下のように導かれる。

$$\tilde{F}_{da} = F_d \times f_d \cdot (1 - f_a) + F_{da} \times f_d \cdot f_a + F_a \times (1 - f_d) \cdot f_a \quad (67)$$

$$\therefore F_{da} = \frac{\tilde{F}_{da} - F_d \times f_d \cdot (1 - f_a) - F_a \times (1 - f_d) \cdot f_a}{f_d \cdot f_a} \quad (68)$$

蛍光として  $F_a$  が観測されない波長域では  $F_a$  を省いてよいので、

$$F_{da} = \frac{\tilde{F}_{da} - F_d \times f_d \cdot (1 - f_a)}{f_d \cdot f_a} \quad (69)$$

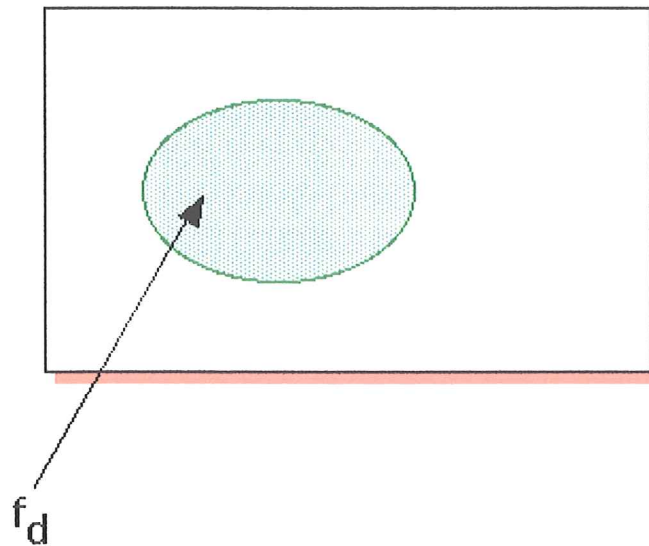


図 16: 試料分子全体に対して一部だけ蛍光ドナー分子が結合しているときの概念図

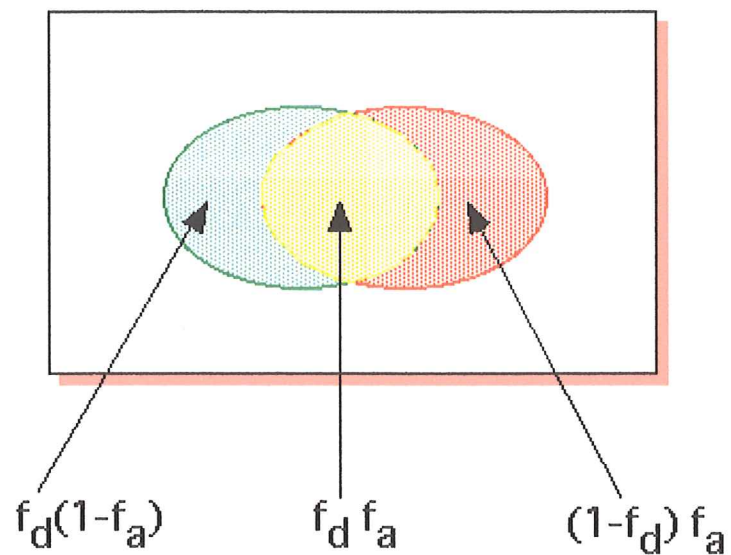


図 17: 試料分子に対して一部だけ蛍光ドナー分子が結合し、さらに一部にだけ蛍光アクセプター分子が結合しているときの概念図



と書ける。

次に、蛍光ドナー分子から発せられた蛍光の一部を蛍光アクセプター分子が吸収する際の効果を考える。二重標識された分子中では、蛍光ドナーの励起エネルギーは発光過程と無輻射過程、エネルギー移動の過程で散逸される。しかし蛍光ドナー分子だけで標識された分子からは発光過程と無輻射過程のみでエネルギーが散逸される。ここで考慮に入れたいのは、蛍光ドナー分子だけで標識された分子から発せられた光が、直接蛍光アクセプター分子に吸収されうるということである。ある波長での蛍光アクセプター分子の吸光度を $\epsilon(\lambda)$ とする。元来、強度 $I_0$ の光は溶液の光路長 $d$ の間に減衰してしまう。透過光の強度はLambert-Beerの法則に従い、次のように書くことができる。

$$I = I_0 \times 10^{-\epsilon(\lambda) \cdot cd} \quad (70)$$

蛍光計のランプの光は照射面積が非常に小さく、1cmセルの中央部に照射されていると仮定すると、蛍光ドナー分子から発せられた蛍光がセル中を透過して観測される量は

$$F_d(\lambda) \times f_d \cdot (1 - f_a) \cdot 10^{-0.5 \times \epsilon(\lambda) \cdot c} \quad (71)$$

と書くことができるので、すべての波長での二重標識された蛍光強度は次のように書き直すことができる。

$$F_{da} = \int F_{da}(\lambda) d\lambda \quad (72)$$

$$= \int \frac{\tilde{F}_{da}(\lambda) - F_d(\lambda) \times f_d \cdot (1 - f_a) \cdot 10^{-0.5 \times \epsilon(\lambda) \cdot c}}{f_d \cdot f_a} \quad (73)$$

## Part III

## 材料と方法

## 9 材料 (製品)

5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl aziridine (dansyl aziridine, DANZ と略記) と methylenblue は Merck Chemical から、5-(iodoacetamido)eosin (IAE と略記) は Molecular Probes から、N-iodoacetyl-N'-(5-sulfo-1-naphthyl)ethylenediamine (1,5-I-AEDANS と略記) は Sigma Chemical Company から、quinine sulfate は岩城製薬株式会社から、ethylene glycol bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA と略記) は同仁科学研究所からそれぞれ購入した。その他の薬品は和光純薬工業から買った。また native の melittin は Merck Chemical から購入し、melittin の誘導体は京都大学化学研究所の高橋 徹教授に固相法によって作成していただきました。作成していただいた melittin のアミノ酸配列を図 18 に示します。

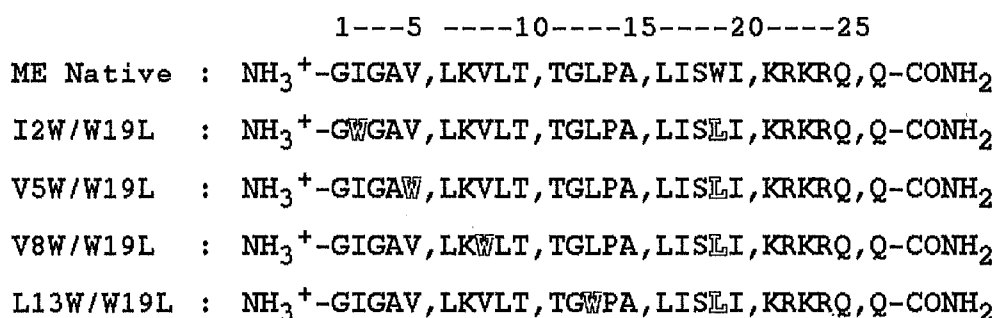


図 18: Melittin 誘導体のアミノ酸配列

また rhodamin-B は日立製作所の蛍光分光計 F-4500 付属のもの (和光純薬工業製) を、光散乱子は同じく付属品 (部品番号 650-1576) を使った。

## 10 兎骨格筋 troponin C の調製

江橋の原法 [47] を基に調製した。兎の首を耳の側から切断し、よく血抜きをした後に後足の側から皮を剥ぎ、両前足、後足と背筋を切り離し、白筋のみを取り出す。電動ミキサーにて挽肉にし、挽肉 1 キログラムに対して 3 リットルの Straub 液 ( $0.3M$   $KCl$ ,  $0.1M$   $KH_2PO_4$ ,  $50mM$   $K_2HPO_4$ ,  $pH6.4$ ) で 15 分攪拌し、低速遠心機 (SAKUMA SEISAKUSYO 製 30CFS) で 5000 回転/分で 10 分間遠心する。沈殿を集めて冷水でさっと洗った後、 $20mM$   $KCl$ ,  $0.2mM$   $NaHCO_3$  中で 20 分ほど攪拌し、ナイロンゴースで溶液をよく濾した後、再び  $20mM$   $KCl$ ,  $20mM$   $NaHCO_3$  中で 5 分ほど攪拌する。溶液を  $1mM$   $NaHCO_3$  に換えて同様の操作を比較的速い間隔で 2~3 回行い、最後に冷水で 1 回洗い、 $1mM$   $NaHCO_3$  に一晩 (おおよそ 20 時間) 浸けて水溶性の troponin などと actin などを分離する。

$KCl$  を  $20mM$  になるように加え、低速遠心機で 5000 回転/分で 45 分間遠心し、抽出液を得る。沈殿は actin を含んでいる。上澄み液 100ml あたり固形  $(NH_4)_2SO_4$  を少量ずつ 25g 加え、15 分間攪拌した後に低速遠心機で 5000 回転/分にて 30 分間遠心する。次に上澄み液 100ml あたり固形  $(NH_4)_2SO_4$  を少量ずつ 12.5g 加え、15 分間攪拌した後に低速遠心機で 5000 回転/分にて 30 分間遠心する。今度は沈殿を集めて少量の  $1mM$   $NaHCO_3$  に溶かし、 $1mM$   $NaHCO_3$  に透析して  $(NH_4)_2SO_4$  を除去する。

$0.4M$   $LiCl$  に一晩透析した後、 $1N$  の  $HCl$  を加えて  $pH$  を 4.5 にする。途中、 $pH$  を一度 2.0 まで下げ、15 分間攪拌し、その後  $0.5N$  の  $NaOH$  を加えて  $pH$  を 4.5 にする。これは強い酸性条件にさらすことで筋肉中に存在していた酵素を失活させる目的で行った。 $pH4.5$  で 15 分間攪拌した後、低速遠心機 (日立工機株式会社製 himac CR20) で 10000 回転/分で 15 分間遠心し、上澄みを集める。上澄みの体積の半分の量の  $0.4M$   $LiCl$  を沈殿に加え、15 分間攪拌した後に低速遠心機で 10000 回転/分で 15 分間遠心する。

上澄みを集めて、 $0.5N$   $NaOH$  にて  $pH$  を 7.0 にし、上澄み液 100ml あたり固形  $(NH_4)_2SO_4$  を 30g ざっと加え、15 分間攪拌した後に低速遠心機で 10000 回転/分にて 15 分間遠心する。引き続き上澄み液 100ml あたり固形  $(NH_4)_2SO_4$  を 10g ざっと加え、15 分間攪拌した後に低速遠心機で 10000 回転/分にて 15 分間遠心する。沈殿に  $1mM$   $NaHCO_3$  を少量加えて溶かし、 $1mM$   $NaHCO_3$  に対して透析して  $(NH_4)_2SO_4$  を除去する。

不溶物を低速遠心機にて遠心除去 (10000 回転/分、15 分間) し、

tropomyosin が溶液中に存在しないことを SDS ポリアクリルアミド電気泳動法 [48] で調べた後、20mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (*Tris* と略記)–HCl pH7.5 で DEAE-Sephadex A25 カラムに吸着させた後、20mM *Tris* – HCl 存在下で KCl 濃度を 0 ~ 0.6M で変え、遊離してくる troponin 複合体をフラクシオンコレクターを用いて回収した。troponin 複合体の濃度は吸光係数  $A_{278} = 0.45(\text{mg/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$  [49] で決定した。

Troponin 複合体のサブユニットへの分離は Jean-Paul van Eerd and Yukishige Kawasaki の方法 [50] を用いた。純化された troponin 複合体を DEAE Sephadex A25 カラムに 6M urea, 2mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 20mM *Tris* – HCl, pH8.5 中で吸着させ、同じバッファー存在下で KCl 濃度を 0 ~ 0.6M に変化させることによりサブユニットを分離した。この条件では troponin I はカラムに吸着せず、素通りで出てくる。Troponin T は 0.17M の KCl で遊離し、troponin C は 0.45M の KCl で遊離することが知られている。Troponin C の濃度は  $A_{277} = 0.23(\text{mg/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$  の吸光度で決定した [51]。また分子量は 18,000 である [20]。

## 11 Melittin の精製

Melittin の精製は Yves et al. の方法 [52] を参考にした。10mg の melittin 及びその誘導体を CM Sephadex C25 カラムに 0.05M ammonium acetate, 4M urea, pH4.5 中で吸着させ、同じバッファー組成で KCl 濃度を 0 ~ 1M に変えることにより分画した。引き続き、Sephadex G25F (14mm  $\times$  1100mm) に通して脱塩をし、同時にバッファーを 0.1M KCl, 4mM EGTA, 20mM *Tris* – HCl, pH7.5 に交換した。melittin の濃度は  $A_{280} = 5470M^{-1}\text{cm}^{-1}$  の吸光度で決定した [53]。

## 12 蛍光色素の結合について

蛍光分子の DANZ を troponin C 中の Met-25 へ結合させるには Johnson らの方法 [54] をもとにして行った。DANZ はまず ethanol に溶かしておき、アスピレータによって 2 時間吸引、脱気を行って溶存酸素を取り除いておく。Troponin C 100 $\mu$ M を 0.1M KCl, 2mM EGTA, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 20mM *Tris* – HCl, pH7.5 に対して透析しておき、アスピレータによって 2 時間吸引、脱気を行って溶存酸素を取り除いておく。これにモル比で 2 倍量の DANZ の ethanol 溶液を加え、25°C にて 24 時間シェイクした。

シェイカーから取り出した後、バッファーを  $0.1M$  *KCl*,  $4mM$  *EGTA*,  $20mM$  *Tris - HCl*,  $pH7.5$  とした Sephadex G25F(15mm × 280mm) で troponin C に結合しなかった色素を取り除きつつ、バッファー交換を行った。バッファー中の DANZ の濃度は  $A_{350} = 3900M^{-1}cm^{-1}$ 、troponin C 中の DANZ の濃度は  $A_{350} = 3980M^{-1}cm^{-1}$  の吸光度を用いて決定した [54]。

蛍光分子 IAE を troponin C 中の Cys-98 へ結合させるには Richard J. Cherry [55] と Herbert C. Cheung et al. の方法 [56] を参考にした。IAE はバッファーに溶かしておき、アスピレータによって 2 時間吸引、脱気を行って溶存酸素を取り除いておく。Troponin C  $50\mu M$  を  $0.1M$  *KCl*,  $4mM$  *EGTA*,  $20mM$  *Tris - HCl*,  $pH7.5$  に対して透析しておき、アスピレータによって 2 時間吸引、脱気を行って溶存酸素を取り除いておく。これにモル比で 4 倍量の IAE の溶液を加え、 $25^{\circ}C$  にて 24 時間シェイクした。シェイカーから取り出した後、バッファーを  $0.1M$  *KCl*,  $4mM$  *EGTA*,  $20mM$  *Tris - HCl*,  $pH7.5$  とした Sephadex G25F(15mm × 280mm) で troponin C に結合しなかった色素を取り除きつつ、バッファー交換を行った。バッファー中の IAE 濃度は  $A_{519} = 1.05 \times 10^5 M^{-1}cm^{-1}$ 、troponin C 中の IAE の濃度は  $A_{528} = 8.3 \times 10^4 M^{-1}cm^{-1}$  の吸光度を用いて決定した [55]。

蛍光分子 1,5-I-AEDANS を troponin C 中の Cys-98 へ結合させるには Grabarek et al. の方法 [57] を用いた。1,5-I-AEDANS は  $1M$  *KOH* にてアルカリ性にしたバッファーに溶かしておき、アスピレータによって 2 時間吸引、脱気を行って溶存酸素を取り除いておく。1,5-I-AEDANS は  $pH8$  以上でないと溶解しない。Troponin C  $50\mu M$  を  $0.1M$  *KCl*,  $4mM$  *EGTA*,  $25mM$  *Tris - HCl*,  $pH7.5$  に対して透析しておき、アスピレータによって 2 時間吸引、脱気を行って溶存酸素を取り除いておく。これにモル比で 5 倍量の 1,5-I-AEDANS の溶液を加え、 $25^{\circ}$  にて 24 時間シェイクした。シェイカーから取り出した後、バッファーを  $0.1M$  *KCl*,  $4mM$  *EGTA*,  $20mM$  *Tris - HCl*,  $pH7.5$  とした Sephadex G25F(15mm × 280mm) で troponin C に結合しなかった色素を取り除きつつ、バッファー交換を行った。バッファー中の 1,5-I-AEDANS 濃度は  $A_{337} = 6000M^{-1}cm^{-1}$ 、troponin C 中の IAE の濃度は  $A_{337} = 6000M^{-1}cm^{-1}$  の吸光度を用いて決定した [58]。

Troponin C を DANZ, IAE で二重標識する場合は、先に DANZ を結合させてから IAE を結合させた。

### 13 蛋白質の濃度の決定

基本的に、troponin 複合体、troponin C、melittin の蛋白質濃度はこれまでに引用してきた吸光度をもとに決定した。Melittin の誘導体の濃度は、後で述べる Lowry et al. の方法 [59] と吸光度による測定を同時に行ったところ、native の melittin の吸光度がそのまま適用できることがわかったため、吸光係数  $A_{280} = 5470 M^{-1} cm^{-1}$  を用いて決定した。

蛍光色素で標識した troponin C については、吸光係数による蛋白質濃度の決定が困難なため、Lowry et al. の方法 [59] を用いて蛋白質濃度を決定した。2% の酒石酸ナトリウムと 1% の  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  を 1 容ずつ混合後、2%  $Na_2CO_3$ , 0.1N  $NaOH$  100 容で希釈し、アルカリ性銅試薬とする。5 ~ 100  $\mu g$  の蛋白質を含有する試料溶液を 0.6ml 小型試験管にとり、アルカリ性銅試薬 3ml を素早く加えて 15 分間常温で放置する。次に希釈 Folin 試薬 (1N) 0.3ml を素早く加えた後直ちに混合し、40 分間常温で放置する。混合するまでの時間、混合するときの勢いなどで反応性が変わるという意見もあるため、ボルテックミキサーを用いて常に同じ混合状態になるように気を配った。750nm の吸収を複数の濃度によって測定し、同時に測定した濃度が既知の蛋白質溶液 (通常は牛血清アルブミンを用いる) で測定した標準曲線から蛋白質濃度を割り出す。

### 14 吸収、蛍光測定について

吸収測定は日立製作所製の U-3300 Spectrophotometer を使った。測定温度は室温 (約 25°C) で行い、スリット間隔は 1nm、サンプリング間隔は 0.2nm で行った。

蛍光測定は日立製作所製の F-4500 Fluorescence Spectrophotometer を用い、測定はサンプルホルダーでの実測値で  $25 \pm 0.1^\circ C$  で行った。DANZ-IAE 間での励起エネルギーの測定では励起側、蛍光側ともスリット幅を 5nm とし、サンプリング間隔は 0.2nm とした。またフォトマルに印加する電圧は 700V とした。Trp-DANZ, Trp-AEDANS 間での励起エネルギー測定では、troponin C 中の Tyr の蛍光が測定の影響とならないように Trp を励起する必要がある。そのため、励起波長を 300nm に設定する必要がある。蛍光の強度が非常に弱くなるので、フォトマルに印加する電圧は 950V とし、そのかわり励起側、蛍光側のスリット幅をそれぞれ 2.5nm に設定した。蛍光計固有の感度特性は測定の原理の章で述べた方法でキャ

リブレーションを行った。

## 15 量子収率の測定について

Quinine sulfate の絶対量子収率を基準として、troponin C 中の DANZ の量子収率と、troponin C-melittin (及びその誘導体) 中の Trp の量子収率を、R. A. Velapoldi の review[60] をもとに相対測定法によって求めた。測定はそれぞれの測定条件で行った。溶液条件は  $0.1M$  KCl,  $20mM$  Tris-HCl,  $pH7.5$  のバッファーに次の試薬を混ぜたものである (i)EGTA 溶液条件:  $4mM$  EGTA; (ii) $Mg^{2+}$  条件:  $4mM$  EGTA,  $4mM$   $MgCl_2$ ; (iii) $Ca^{2+}$  条件:  $4mM$  EGTA,  $5mM$   $CaCl_2$ 。

Review によると、求めたい蛍光物質の量子収率  $\Phi_x$  は

$$\Phi_x = \Phi_{st} \times \frac{FA_x}{FA_{st}} \times \frac{A_{st}}{A_x} \times \frac{J_{ex,st}}{J_{ex,x}} \times \frac{n_x^2}{n_{st}^2} \quad (74)$$

と書ける。 $FA$  は蛍光スペクトルを波長に対して積分したもの、 $A$  は励起波長での蛍光物質の吸光度、 $J_{ex}$  は励起波長での励起光の強度、 $n$  は発光波長領域全体における平均の溶媒の屈折率である。Quinine sulfate の  $1N$   $H_2SO_4$  溶液中、 $25 \pm 0.1^\circ C$  での絶対量子収率は  $0.510$  である事[61] がわかっていて、さらに励起波長を変化させた場合の quinine の量子収率の変化も少ない[62] ので、quinine sulfate を標準試料として用いた。

Quinine sulfate は濃度  $2mg/ml$  の溶液を作り、吸収は  $81$  倍に希釈したもので測定し、蛍光は  $3^6 \sim 3^9$  に希釈した溶液で複数回測定した。特に蛍光測定時にはサンプルホルダーの実測温度で  $25 \pm 0.1^\circ C$  に保ち、 $313nm$  で励起し、 $380 \sim 600nm$  で蛍光を積分した。

Troponin C 中の DANZ の量子収率は次のようにして求めた。吸収の測定では、 $30\mu M$  の troponin C に DANZ が  $100\%$  結合したサンプルを用い、蛍光の測定では  $10\mu M$  の troponin C に DANZ が  $57.3\%$  結合したサンプルと  $5\mu M$  の troponin C に DANZ が  $100\%$  結合したサンプルのふたつを用いて行った。蛍光のサンプルホルダーを実測温度で  $25 \pm 0.1^\circ C$  に保ち、 $350nm$  で励起し、 $400 \sim 670nm$  で蛍光を積分した。

Troponin C-melittin 複合体の量子収率決定には  $5\mu M$  の濃度のサンプルを用いて吸収、蛍光測定を行った。蛍光サンプルホルダーを実測温度で  $25 \pm 0.1^\circ C$  に保ち、 $300nm$  で励起し、 $300 \sim 450nm$  で蛍光を積分した。

Quinine sulfate の溶液の屈折率は、ナトリウムランプの輝線スペクトル  $D_{589.3nm}$  に対しての水の屈折率  $n = 1.3330(20^\circ C)$ [63] を用い、troponin

Cの溶液の屈折率と、troponin C-melittin複合体の溶液の屈折率は希薄な蛋白質溶液の代表的な屈折率 $n = 1.4$ [64]を用いた。

## 16 Perrin-Weber プロット、蛍光異方性の測定について

蛍光異方性の測定には、測定の方法の章で述べた方法を用いた。粘度の調整には ethylenglycol を用いた。蛍光の測定はこれまでと同じく  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$  で行い、偏光板を用いて定常光の蛍光を用いて蛍光異方性を求めた。

## 17 SDS ポリアクリルアミド電気泳動法について

Hermann Schägger and Gebhard von Jagow による方法[48]を用いた。アクリルアミドの濃度は10%を用い、SDSの濃度は0.1%、過硫酸アンモニウムは $1\text{mg/ml}$ 、tetramethyldiamineは0.1%で混合し、ゲルを架橋した。30mAの定常電流にて泳動した。

## Part IV

# 結果と考察

## 18 量子収率の測定結果

材料と方法の章で述べた方法に従って、troponin C-melittin 複合体中の DANZ、troponin C-melittin 及びその誘導体からなる複合体中の Trp についての量子収率を求めた。Quinine sulfate の  $1\text{N H}_2\text{SO}_4$  中での吸収スペクトルと  $313\text{nm}$  で励起した蛍光スペクトルは図19のようになった。計算式中の蛍光スペクトルの積分値は波長  $380 \sim 600\text{nm}$  で計算し、 $n_{\text{quinine}}$  は  $1.3330$  を用いた[63]。

DANZ の量子収率を求めるにあたっては、励起波長  $350\text{nm}$  及び  $313\text{nm}$  での励起光の強度比が  $J_{\text{ex,quinine}}/J_{\text{ex,DANZ}} = 0.777$  であることを用いた。蛍光、吸収のデータは troponin C の濃度  $5\mu\text{M}$ 、DANZ の結合率100%のものを用いて行った。(図20) 計算式中の蛍光スペクトルの積分値は波長



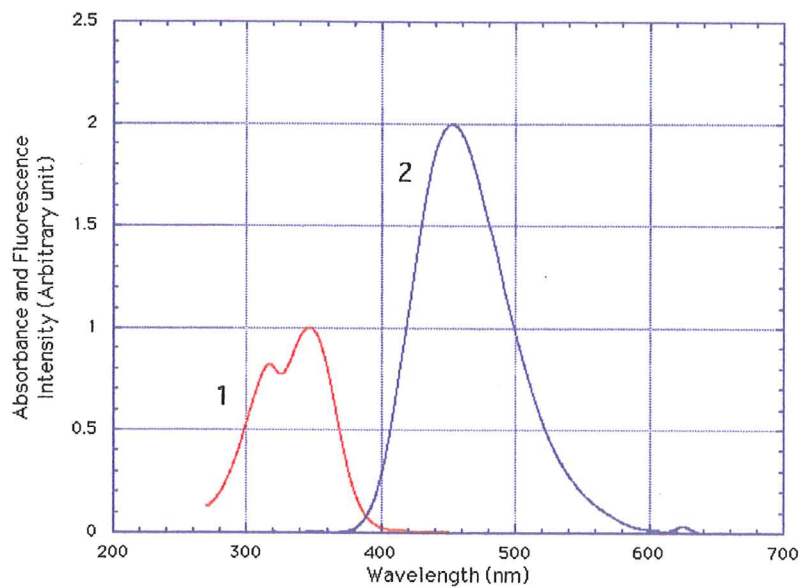


図 19: Quinine sulfate の吸収、蛍光スペクトル

1 : 吸収スペクトル

2 : 蛍光スペクトル (*ex* : 313nm)

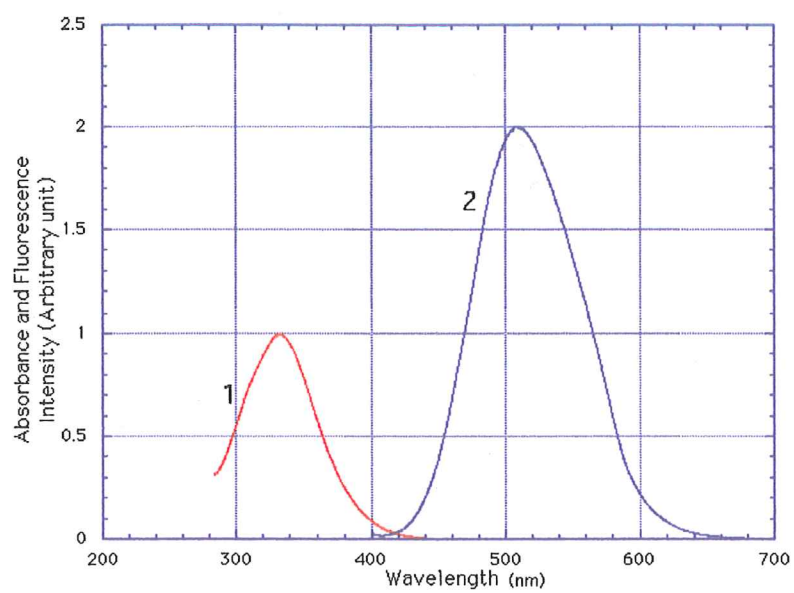


図 20: Troponin C-DANZ の吸収、蛍光スペクトル

- 1 : 吸収スペクトル
- 2 : 蛍光スペクトル ( $ex : 350nm$ )

400 ~ 700nm で計算し、 $n_{DANZ}$  は 1.4 を用いた [64]。結果は表 1 に記す。

melittin 及びその誘導体中の Trp の量子収率を求めるにあたっては、励起波長 300nm 及び 313nm での励起光の強度比が  $J_{ex,quinine}/J_{ex,Trp} = 1.134$  であることを用いた。蛍光、吸収のデータはそれぞれの複合体の濃度が  $5\mu M$  のものを用いて行った。(図 21) 計算式中の蛍光スペクトルの積分値は波長 300 ~ 450nm で計算し、 $n_{melittin}$  は 1.4 を用いた [64]。結果は表 1 に記す。

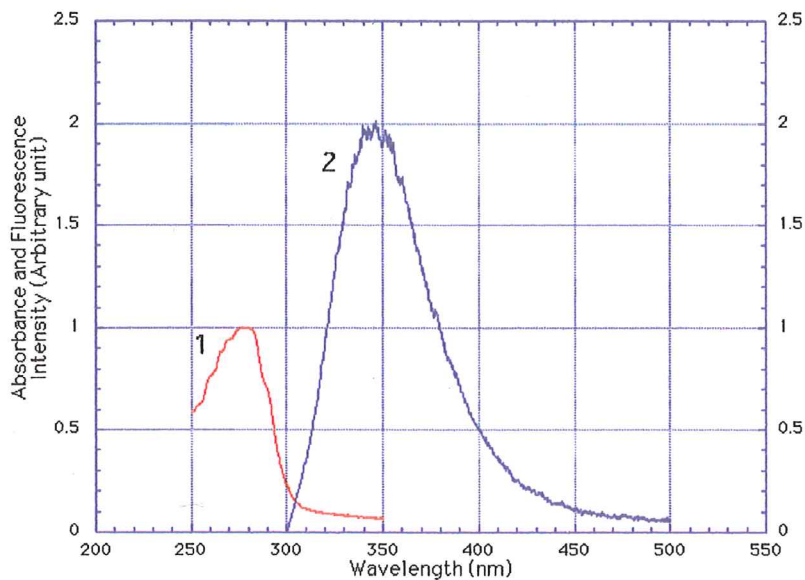


図 21: Troponin C-melittin の吸収、蛍光スペクトル

- 1: 吸収スペクトル  
2: 蛍光スペクトル ( $ex : 300nm$ )

計算式

$$\Phi_x = \Phi_{quinine} \times \frac{FA_x}{FA_{quinine}} \times \frac{A_{quinine}}{A_x} \times \frac{J_{ex,quinine}}{J_{ex,x}} \times \frac{n_x^2}{n_{quinine}^2} \quad (75)$$

$$x = \{DANZ \text{ or } Trp\} \quad (76)$$

表 1: 量子収率の表

	蛍光色素	EGTA	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
Troponin C <sup>DANZ</sup>	DANZ	0.187	0.160	0.336
Troponin C <sup>DANZ</sup> -melittin		0.298	0.245	0.328
Troponin C-I2W/W19L	Trp	0.0644	0.0378	0.0401
Troponin C-V5W/W19L		0.0544	0.0340	0.0379
Troponin C-V8W/W19L		0.0358	0.0343	0.0255
Troponin C-L13W/W19L		0.0333	0.0305	0.0368
Troponin C-melittin		0.0733	0.0739	0.0916

## 19 エネルギー移動実験の1: DANZ-IAE

Troponin C に結合した蛍光分子 DANZ の蛍光スペクトルと IAE の吸収スペクトルは図 22 のようになった。それぞれ蛍光ドナー分子の蛍光スペクトルと蛍光アクセプター分子の吸収スペクトルがうまく重なっていることが確かめられる。蛍光ドナー分子の DANZ の蛍光が、蛍光アクセプター分子である IAE 分子によって弱められてしまう現象は図 23 に示した。350nm で励起しているにも関わらず、DANZ の蛍光と IAE の蛍光が観察されていることから、励起エネルギー移動現象が起こったことが確認できる。IAE の蛍光スペクトルは 500nm 以下では無視できることがわかったので、励起エネルギー移動で取り扱う蛍光の波長に対する積分は 400 ~ 470nm で行うことにした。Troponin C 中の DANZ, IAE 間の励起エネルギー移動に関する各測定値を表 2 に記す。Troponin C 単体では各溶液条件で DANZ, IAE 間の距離はほぼ 42Å と一定しているのに対し、melittin を系に加えることで +Ca<sup>2+</sup> 条件で約 50Å, それ以外の条件で約 32Å の距離を示した。

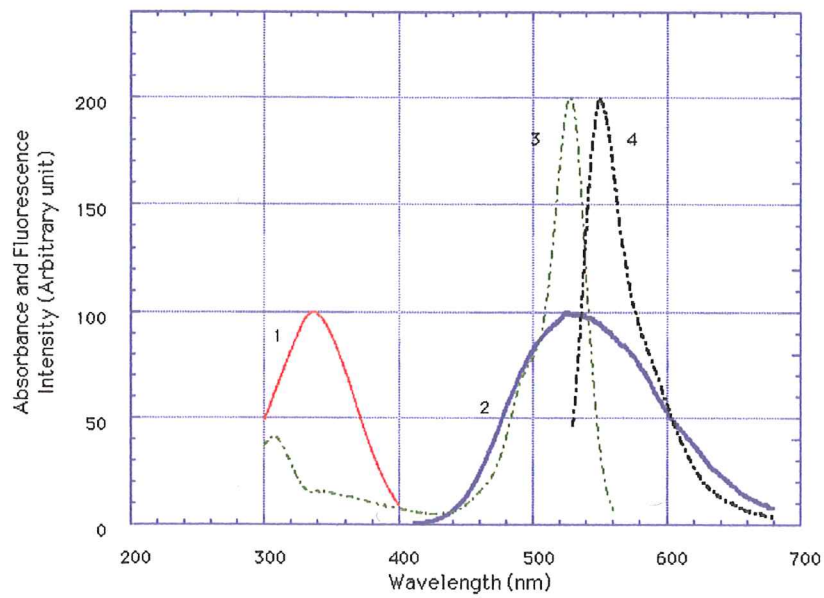


図 22: Troponin C-melittin 複合体中の DANZ,IAE の吸収、蛍光スペクトル

- 1: Troponin C<sup>DANZ</sup> の吸収スペクトル
- 2: Troponin C<sup>DANZ</sup> の蛍光スペクトル (*ex* : 350nm)
- 3: Troponin C<sup>IAE</sup> の吸収スペクトル
- 4: Troponin C<sup>IAE</sup> の蛍光スペクトル (*ex* : 519nm)

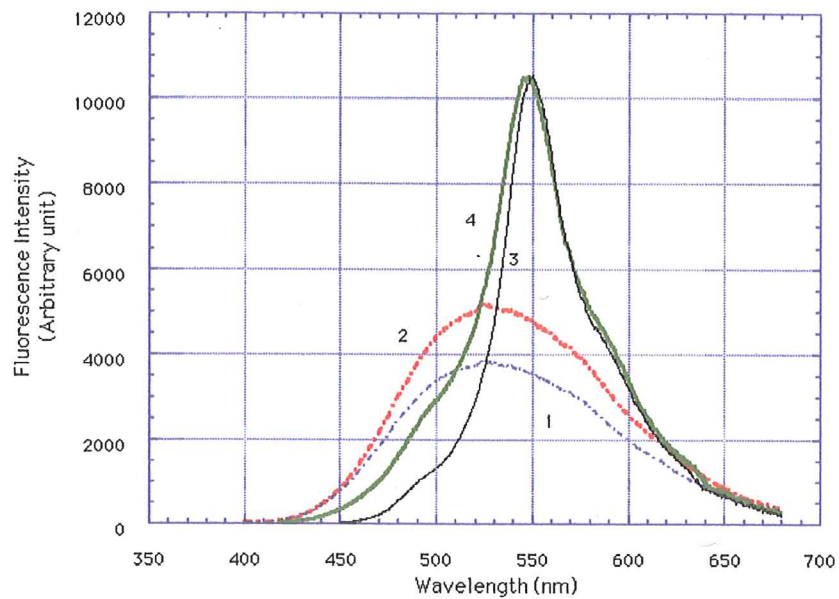


図 23: Troponin C-melittin 複合体中での蛍光エネルギー移動の様子

- 1: Troponin C<sup>DANZ</sup>-melittin の蛍光スペクトル  
(EGTA 条件,  $ex : 350nm$ )
- 2: Troponin C<sup>DANZ</sup>-melittin の蛍光スペクトル  
( $Ca^{2+}$  条件,  $ex : 350nm$ )
- 3: Troponin C<sup>DANZ,IAE</sup>-melittin の蛍光スペクトル  
(EGTA 条件,  $ex : 350nm$ )
- 4: Troponin C<sup>DANZ,IAE</sup>-melittin の蛍光スペクトル  
( $Ca^{2+}$  条件,  $ex : 350nm$ )

表 2: Troponin C 中の DANZ, IAE 間の励起エネルギー移動実験で得られた測定値

	Troponin C			Troponin C-melittin		
	<i>EGTA</i>	$Mg^{2+}$	$Ca^{2+}$	<i>EGTA</i>	$Mg^{2+}$	$Ca^{2+}$
$E(\%)$	59.0	55.7	67.1	92.2	89.0	44.2
$J(\times 10^{13}$						
$M^{-1} \cdot cm^3)$	2.74	2.72	2.51	2.55	2.60	2.48
$Q_d$	0.187	0.160	0.336	0.298	0.245	0.328
$\kappa_{min}^2$	0.0347	0.0430	0.0243	0.0323	0.0283	0.0257
$\kappa_{max}^2$	3.725	3.663	3.805	3.741	3.773	3.795
$R_{0(2/3)}(\text{\AA})$	44.7	43.4	48.4	47.6	46.2	48.1
$R_{0(min)}(\text{\AA})$	27.3	27.5	27.9	28.7	27.3	28.0
$R_{0(max)}(\text{\AA})$	59.5	57.6	64.7	63.4	61.7	64.7
$R_{(2/3)}(\text{\AA})$	42.0	41.7	43.0	31.5	32.6	50.0
$R_{(min)}(\text{\AA})$	25.7	26.4	24.8	19.0	19.3	29.1
$R_{(max)}(\text{\AA})$	55.9	55.3	57.5	42.0	43.5	67.3

## 20 エネルギー移動実験の2: Trp-DANZ

Troponin C-melittin 及びその誘導体からなる複合体中の Trp の蛍光スペクトルと DANZ の吸収スペクトルは図24のようになった。

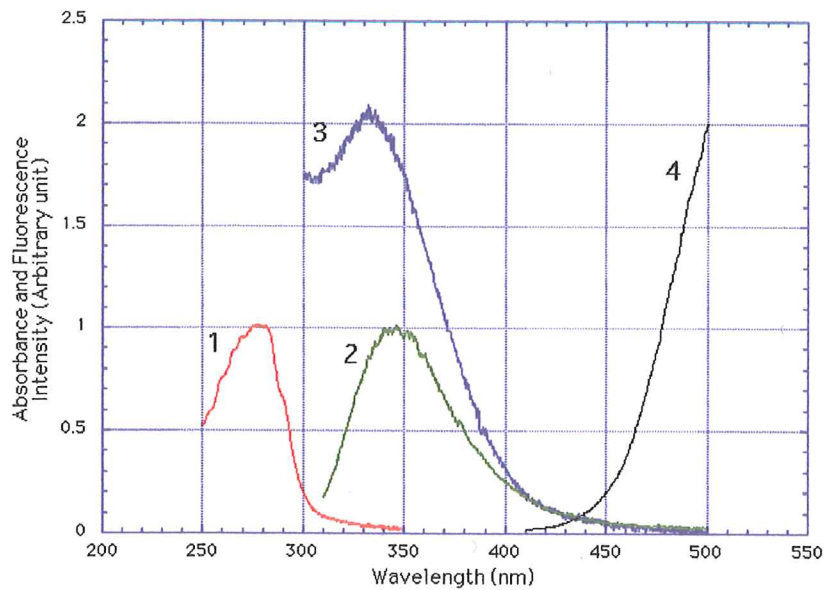


図 24: Troponin C-melittin 複合体中の Trp, DANZ の吸収、蛍光スペクトル

- 1: Troponin C-melittin 複合体の吸収スペクトル
- 2: Troponin C-melittin 複合体の蛍光スペクトル  
(*ex* : 300nm)
- 3: Troponin C<sup>DANZ</sup>-melittin 複合体の吸収スペクトル
- 4: Troponin C<sup>DANZ</sup>-melittin 複合体の蛍光スペクトル  
(*ex* : 340nm)

それぞれ蛍光ドナー分子の蛍光スペクトルと蛍光アクセプター分子の吸収スペクトルがうまく重なっていることが確かめられる。蛍光ドナー分子の Trp の蛍光が、蛍光アクセプター分子である DANZ 分子によって弱められてしまう現象は図25に示した。300nm で励起しているにも関わらず、Trp の蛍光と DANZ の蛍光が観察されていることから、励起エネルギー移動現象が起こったことが確認できる。DANZ の蛍光スペクトルは 420nm



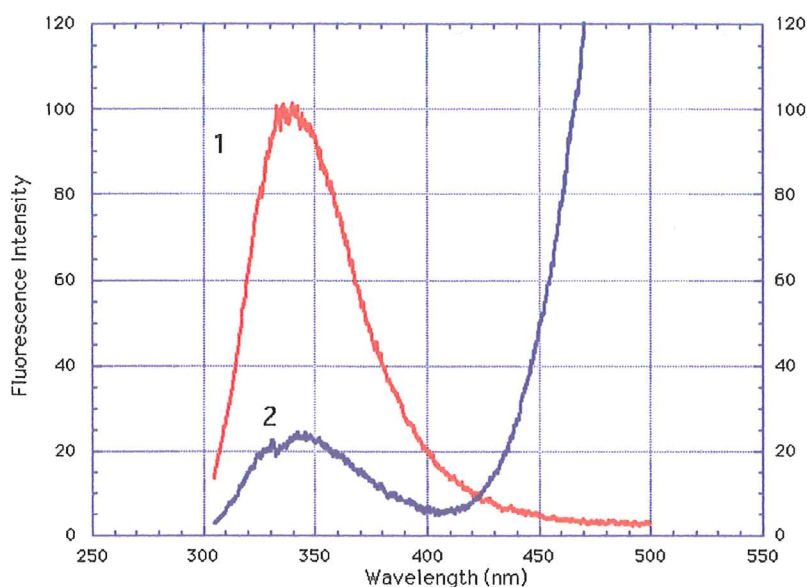


図 25: Troponin C-melittin 複合体中での蛍光エネルギー移動の様子

1: Troponin C-melittin 複合体の蛍光スペクトル

(*ex* : 300nm)

2: Troponin C<sup>DANZ</sup>-melittin 複合体の蛍光スペクトル

(*ex* : 300nm)

以下では無視できることがわかったので、励起エネルギー移動で取り扱う蛍光の波長に対する積分は300～400nmで行うことにした。melittin及びその誘導体中のTrpとDANZ間の励起エネルギー移動に関する各測定値を表3に記す。意外なことに、同じ溶液条件下ではTrp-DANZ間の距離がTrpの位置にあまり影響されていないことがわかった。また、+Mg<sup>2+</sup>条件では他の溶液条件よりもTrp-DANZ間の距離が大きくなっているような印象を受ける。Melittin中のTrpの位置と、それに対するTrp-DANZ間の距離の関係もグラフにしてみた(図26)。

表3 Troponin C-melittin中のTrp, DANZ間の励起エネルギー移動実験で得られた測定値

	TnC-I2W/W19L				TnC-V5W/W19L				TnC-V8W/W19L				TnC-L13W/W19L				TnC-ME		
	EGTA	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>		EGTA	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>		EGTA	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>		EGTA	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>		EGTA	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
E (%)	72.8	54.7	55.9		73.5	40.7	55.8		66.2	52.4	50.8		67.0	48.4	67.4		87.5	82.7	95.5
J ( $\times 10^9$ )																			
M <sup>-1</sup> · cm <sup>3</sup>	2.51	2.51	2.58		2.57	2.53	2.64		2.34	2.38	2.37		2.37	2.40	2.63		2.53	2.53	2.64
Q <sub>d</sub> ( $\times 10^{-2}$ )	6.44	3.78	4.01		5.44	3.40	3.79		3.58	3.43	2.55		3.33	3.05	3.68		7.33	7.39	9.16
$\kappa^2_{\min}$																			
( $\times 10^{-2}$ )	9.26	25.9	12.8		18.7	25.7	12.7		14.6	26.2	16.0		16.6	24.1	10.5		7.67	11.5	14.1
$\kappa^2_{\max}$	3.27	2.20	3.02		2.63	2.24	3.05		2.89	2.21	2.77		2.78	2.33	3.17		3.39	3.14	2.96
R <sub>0(2/3)</sub> (Å)	18.5	16.9	17.2		18.1	16.6	17.1		16.6	16.5	15.7		16.4	16.2	17.0		18.9	19.0	19.8
R <sub>0(min)</sub> (Å)	13.3	14.4	13.1		14.7	14.2	13.0		12.9	14.1	12.4		13.0	13.7	12.5		13.2	14.2	15.3
R <sub>0(max)</sub> (Å)	24.1	20.6	22.1		22.8	20.3	22.0		21.2	20.2	19.9		20.8	20.0	22.0		24.8	24.6	25.4
R <sub>(2/3)</sub> (Å)	15.7	16.4	16.5		15.2	17.7	16.4		14.8	16.2	15.6		14.6	16.4	15.0		13.7	14.6	11.9
R <sub>(min)</sub> (Å)	11.3	14.0	12.5		12.3	15.1	12.4		11.5	13.9	12.3		11.6	13.8	11.0		9.55	10.9	9.18
R <sub>(max)</sub> (Å)	20.5	20.0	21.2		19.1	21.7	21.1		18.9	19.8	19.8		18.5	20.2	19.5		18.0	18.9	15.3

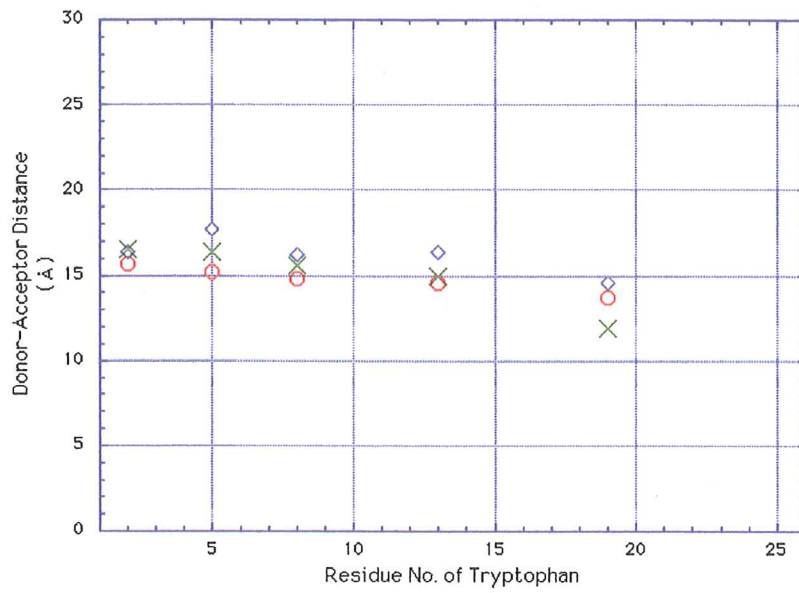


図 26: melittin 中の Trp の位置と、それに伴う Trp-DANZ 間の距離の推移

- : EGTA 条件
- ◇ :  $Mg^{2+}$  条件
- × :  $Ca^{2+}$  条件

## 21 エネルギー移動実験の3: Trp-AEDANS

Troponin C-melittin 及びその誘導体からなる複合体中の Trp の蛍光スペクトルと AEDANS の吸収スペクトルは図 27 のようになった。

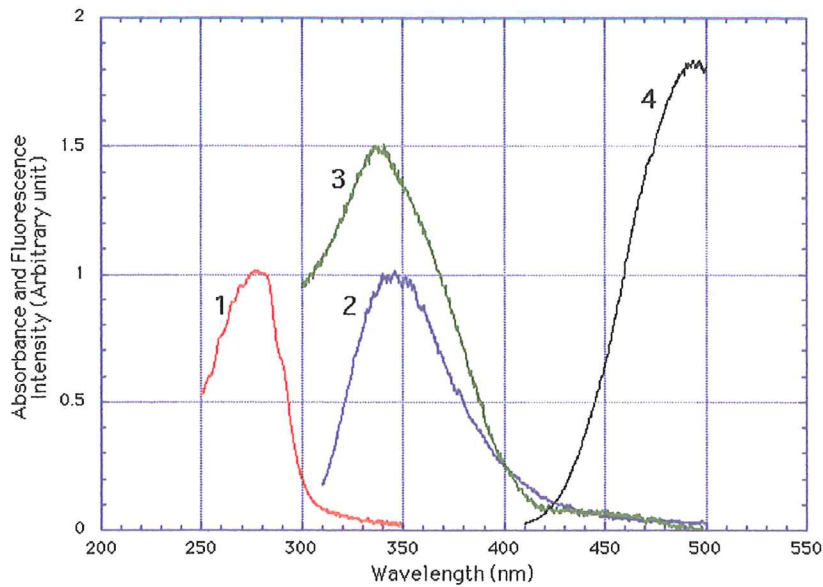


図 27: Troponin C-melittin 複合体中の Trp, AEDANS の吸収、蛍光スペクトル

- 1: Troponin C-melittin 複合体の吸収スペクトル
- 2: Troponin C-melittin 複合体の蛍光スペクトル  
(*ex* : 300nm)
- 3: Troponin C<sup>AEDANS</sup> の吸収スペクトル
- 4: Troponin C<sup>AEDANS</sup> の蛍光スペクトル  
(*ex* : 337nm)

それぞれ蛍光ドナー分子の蛍光スペクトルと蛍光アクセプター分子の吸収スペクトルがうまく重なっていることが確かめられる。蛍光ドナー分子の Trp の蛍光が、蛍光アクセプター分子である AEDANS 分子によって弱められてしまう現象は図 28 に示した。300nm で励起しているにも関わらず、Trp の蛍光と DANZ の蛍光が観察されていることから、励起エネルギー移動現象が起こったことが確認できる。AEDANS の蛍光スペクトルは 400nm

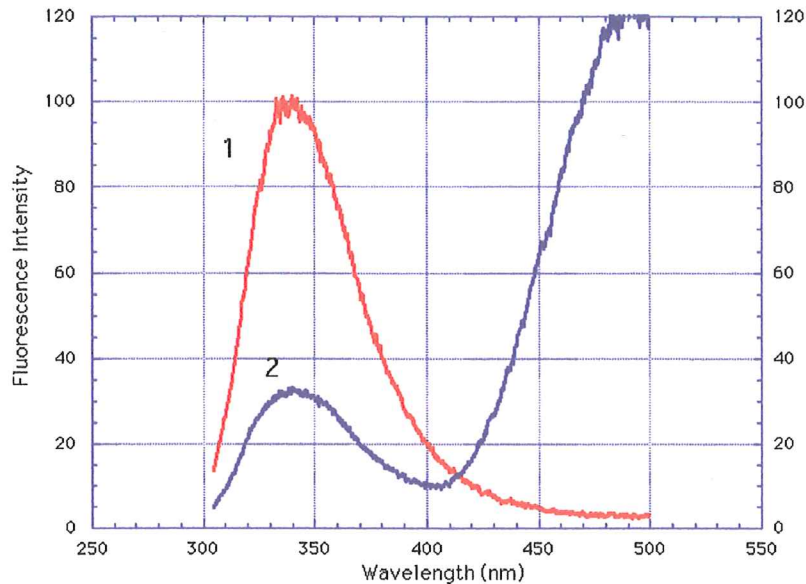


図 28: Troponin C-melittin 複合体中での蛍光エネルギー移動の様子

- 1: Troponin C-melittin 複合体の蛍光スペクトル  
(*ex* : 300nm)
- 2: Troponin C<sup>AEDANS</sup>-melittin 複合体の蛍光スペクトル  
(*ex* : 300nm)

以下では無視できることがわかったので、励起エネルギー移動で取り扱う蛍光の波長に対する積分は 300 ~ 370nm で行うことにした。melittin 及びその誘導体中の Trp と AEDANS 間の励起エネルギー移動に関する各測定値を表 4 に記す。これも Trp-DANZ の実験と同様に、Trp の位置によって Trp-AEDANS 間の距離は大きく変化しないという結果になった。ただ、melittin の C 端より Trp をつけたサンプルでは、AEDANS との距離が近づいている様であり、特に  $Ca^{2+}$  条件ではエネルギーの移動効率が 100% となってしまう、測定が不能となるくらい接近しているという結果になった。これも melittin 中の Trp の位置と、それに対する Trp-AEDANS 間の距離の関係をグラフ化してみた(図 29)。

表4 Troponin C-meittin中のTrp, AEDANS間の励起エネルギー移動実験で得られた測定値

	TnC-I2W/W19L			TnC-V5W/W19L			TnC-V8W/W19L			TnC-L13W/W19L			TnC-ME		
	EGTA	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	EGTA	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	EGTA	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	EGTA	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	EGTA	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
E (%)	71.5	64.2	72.7	70.2	38.7	64.6	48.6	53.0	— <sup>(a)</sup>	77.7	73.6	98.8	90.6	92.3	— <sup>(a)</sup>
J (×10 <sup>9</sup> M <sup>-1</sup> ·cm <sup>3</sup> )	2.48	1.67	1.93	2.51	1.64	1.94	2.35	1.58	1.84	2.40	1.62	1.97	2.52	1.69	2.01
Q <sub>d</sub> (×10 <sup>-2</sup> )	6.44	3.78	4.01	5.44	3.40	3.79	3.58	3.43	2.55	3.33	3.05	3.68	7.33	7.39	9.16
κ <sup>2</sup> <sub>min</sub> (×10 <sup>-2</sup> )	9.30	29.6	11.0	25.3	24.4	14.9	25.0	21.5	22.1	24.2	21.4	13.3	10.7	17.1	11.2
κ <sup>2</sup> <sub>max</sub>	3.26	2.02	3.12	2.27	2.31	2.91	2.28	2.48	2.44	2.32	2.49	2.99	3.19	2.73	3.16
R <sub>0(2/3)</sub> (Å)	23.9	20.5	21.2	23.3	20.1	21.0	21.5	20.0	19.5	21.3	19.7	21.0	24.5	23.0	24.5
R <sub>0(min)</sub> (Å)	17.2	17.9	15.7	19.8	17.0	16.4	18.3	16.6	16.2	18.0	16.3	16.1	18.1	18.3	18.2
R <sub>0(max)</sub> (Å)	31.1	24.7	27.4	28.6	24.7	26.8	26.4	24.9	24.2	26.2	24.5	27.0	31.8	29.1	31.7
R <sub>(2/3)</sub> (Å)	20.5	18.6	18.0	20.2	21.7	19.0	21.7	19.6	— <sup>(b)</sup>	17.3	16.6	10.4	16.8	15.2	— <sup>(b)</sup>
R <sub>(min)</sub> (Å)	14.8	16.2	13.3	17.2	18.3	14.8	18.4	16.2	—	14.6	13.7	7.95	12.4	12.1	—
R <sub>(max)</sub> (Å)	26.7	22.4	23.3	24.8	26.7	24.3	26.6	24.4	—	21.3	20.7	13.4	21.8	19.2	—

(a) ドナーの蛍光が完全に散逸してしまい、計測不可能。(b) R(2/3)は8Å以下と思われる。



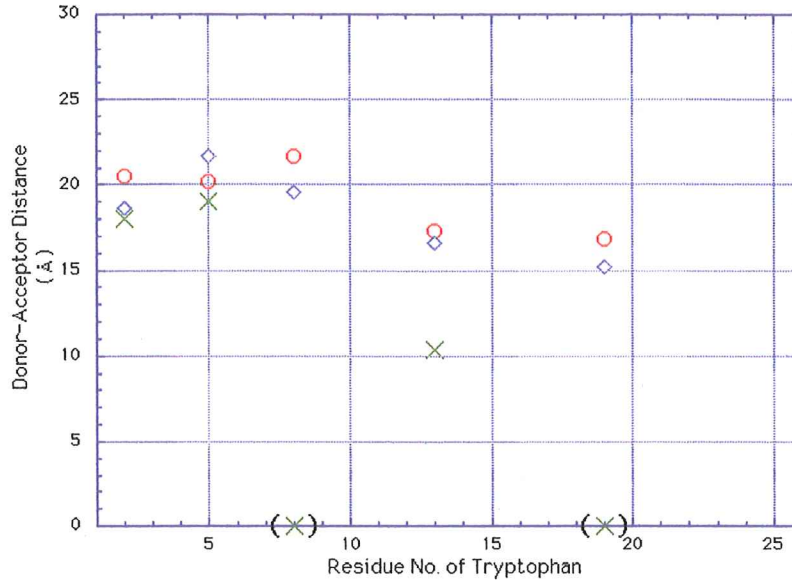


図 29: melittin 中の Trp の位置と、それに伴う Trp-AEDANS 間の距離の推移

- : EGTA 条件
- ◇ :  $Mg^{2+}$  条件
- × :  $Ca^{2+}$  条件

## 22 蛍光異方性のデータから読みとれること

蛍光異方性のデータを図 30, 31, 32 に示す。この計算では、溶液中の蛍光色素の基本蛍光異方性  $r_{fundamental}$  は理論的最大値の 0.4 を用いた。図 30 によると、Melittin 中の Trp の極限蛍光異方性  $r_{limiting}$  は native の位置にあるものもっとも高い。この  $\langle d_D^X \rangle$  の値は、0 に近いほど蛍光分子の蛋白質的運動に自由度があるということを示す。つまり、26 残基からなる melittin 中では、中央部に近い第 19 残基の近辺ではそれよりも N 端側のペプチド部分より動き易さの自由度が小さいことがわかる。また、図 31 からは、troponin C の Met25 に結合した DANZ 分子の内部回転自由度が推定できるのだが、溶液の条件として  $Mg^{2+}$  のものが他の溶液中よりも低い  $\langle d_A^X \rangle$  の値であることが読みとれる。これは DANZ と melittin 中の Trp との距離が他の溶液環境に比べて大きいことと関係があるのか

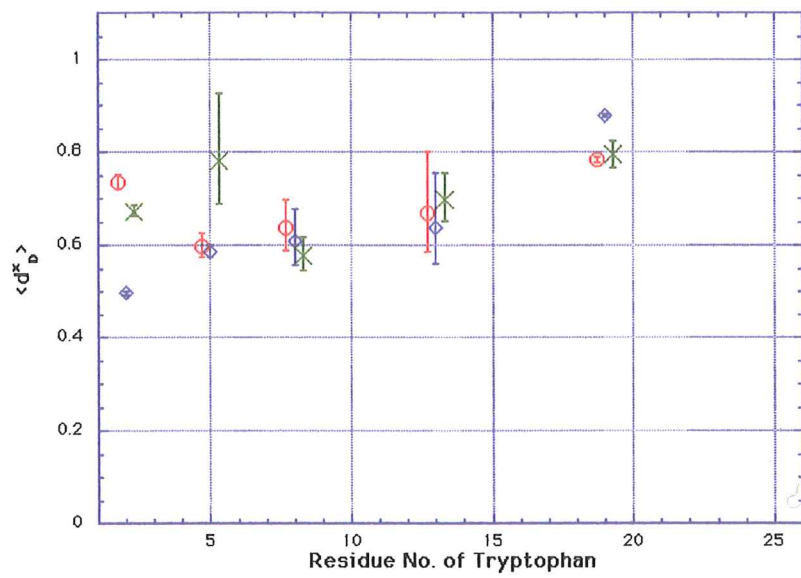


図 30: Troponin C-melittin 複合体中での Trp の蛍光異方性のデータ

- : EGTA 条件
- ◇ :  $Mg^{2+}$  条件
- × :  $Ca^{2+}$  条件



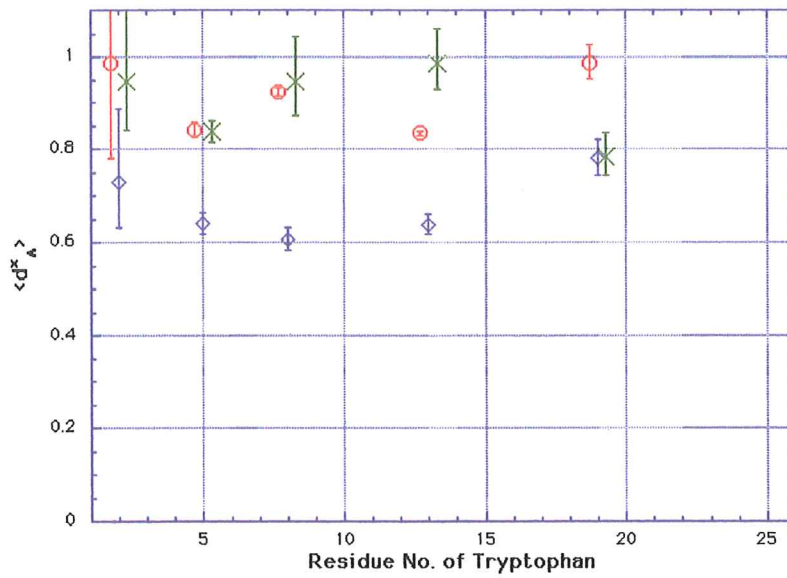


図 31: Troponin C-melittin 複合体中での DANZ の蛍光異方性のデータ

- : EGTA 条件
- ◇ :  $Mg^{2+}$  条件
- × :  $Ca^{2+}$  条件

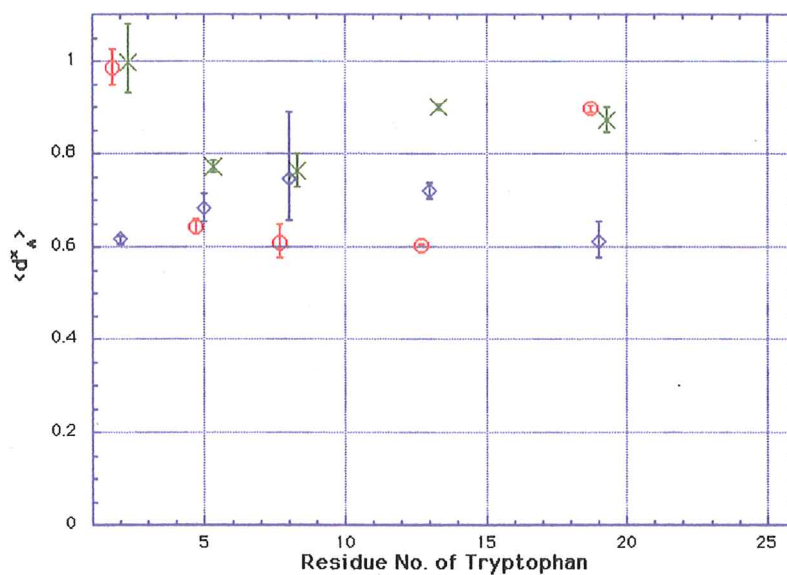


図 32: Troponin C-melittin 複合体中での AEDANS の蛍光異方性のデータ

- : EGTA 条件
- ◇ :  $Mg^{2+}$  条件
- × :  $Ca^{2+}$  条件

もしれない(表3)。というのは、DANZの分子が、より自由に回転しているということがこのデータから読みとれるからである。図32からは、troponin C 中の Cys98 に結合した AEDANS 分子の内部回転自由度が推定できる。全体としての傾向をつかむために、melittin の誘導体を用いたデータを溶液環境ごとに平均化してみた。というのは、本来 Cys98 の位置での蛍光分子の回転の内部回転自由度と melittin 誘導体中の Trp の位置との間には相関が無いと思われるからである。その結果であるが、 $Ca^{2+}$  条件で  $\langle d_A^X \rangle$  の値は他の溶液条件に比べてもっとも高く、0.861 であった。ちなみに  $Mg^{2+}$  条件では 0.675、EGTA 条件では 0.748 であった。つまり、AEDANS は  $Ca^{2+}$  条件でもっとも回転の自由度が制限されていて、 $Mg^{2+}$  条件ではかなり蛍光分子が回転できるということを示している。ただ、melittin 中の Trp の位置によって  $\langle d_A^X \rangle$  の値が異なる傾向があるのも事実である。実際 Trp の位置が 2 番残基と 19 番残基の位置にあるものに関して、 $Ca^{2+}$  条件と EGTA 条件では AEDANS の自由回転が抑制されているのに対し、 $Mg^{2+}$  条件では逆に自由回転が起りやすくなっている。この結果は melittin 中の Trp の位置と、troponin C 中の Cys98 に付けた色素との間で、何かしら相関があるかもしれないというデータを提供している。

## 23 考察

Troponin 複合体の生理的溶液条件下での構造変化を調べる目的で、troponin C-troponin I 複合体のモデルケースとしての troponin C-melittin 及びその誘導体の複合体中での構造変化を研究した。はじめに troponin C と native の melittin の複合体を用い、troponin C 中の Met25 と Cys98 の二箇所に蛍光色素を結合させてこの両色素間の距離の変化を蛍光励起エネルギー移動法で測定した。その結果表2のような結果を得た。以降の議論では特に断りがない限り蛍光ドナー分子と蛍光アクセプター分子はその場で自由に回転できると仮定し、 $\kappa^2 = 2/3$ の値を用いて計算された距離について述べることにする。蛍光ドナー分子である DANZ を結合している Met25 は troponin C の N 端側のドメイン、helix A に属していて、また蛍光アクセプター分子である IAE を結合している Cys98 は C 端側のドメイン helix E に属している。Troponin C 単体での蛍光ドナー分子と蛍光アクセプター分子間の距離の測定において、励起エネルギーの移動効率が生理条件を模した3種類の溶液条件で異なるにも関わらず、蛍光色素間の距離に関してはほとんど変化がみられなく、距離としては  $42\text{\AA}$  程度であった。これは個々の溶液条件について  $R_0$  の値が変化している効果と、励起エネルギー移動の効率の変化が全体として打ち消しあったためであると思われる。Herzberg et al.[13] は、troponin C の結晶構造解析から  $\text{Ca}^{2+}$  未結合の N 端側のドメインが  $\text{Ca}^{2+}$  を結合している C 端側のドメインに比べてより小さいということを指摘している。N 端側に2個のカルシウムイオンが結合したとき、C 端のドメインと同じような構造変化を起こすのであれば helix の B/C の組が helix の A/D の組に対して離れるのではないかと指摘している。実際、Wang et al.[65] によって、helix A の12番目の位置と helix B/C につながるポリペプチドの部分である49番目の位置との距離が、N 端側ドメインへのカルシウムイオンの結合によって大きくなるということが報告されている。このような描像のもとでは、Met25 と Cys98 の間の距離が N 端のドメインへのカルシウムイオンの結合によって増大しても良さそうではあるが、今回の私の実験ではそのような効果はみられなかった。

次に、troponin C と native melittin の複合体に関して同様の実験を行った。その結果、melittin を結合しない troponin C 単体の試料では両色素間の距離が生理条件を模した3種類の溶液条件でほとんど変化しないのに対して、melittin を結合した試料では両色素間の距離が  $\text{Ca}^{2+}$  条件とそれ以外で大きく異なるということがわかった。まず、N 端側にカルシウム

イオンさえ結合しなければ、Met25とCys98に結合した両色素間の距離は32Å程度にまで減少する。また、N端側のドメインにカルシウムイオンが結合することによってその距離は50Åにまで増大する。この距離の違いを決めている troponin C の N 端側のドメインへのカルシウムイオンの結合というのは、生理状態での筋の収縮、弛緩のスイッチになっているといわれる変化そのものである。ただ、この測定での  $\kappa^2$  のとり得る値の範囲は非常に大きく、蛍光色素の動きが制限されている可能性も高い。ひょっとすると IAE 分子の大きさがかなり大きいことが影響しているのかもしれない。この効果のため、Met25とCys98の間の距離は  $+Ca^{2+}$  条件と  $-Ca^{2+}$  条件でここで得られた数値ほどの変化がないのかもしれない。

Blechner et al.[66]のX線小角散乱の実験によると、高いカルシウムイオン濃度での troponin C-melittin 複合体は troponin C 単体に比べて縮んだ構造をしているという。つまり、troponin C は melittin を結合することによって、troponin C 自身のダンベル構造がつぶれて丸い形に変化するということなのである。彼らはカルシウムイオンを除いた実験を行っていないが、カルシウムイオン飽和の条件でなくとも melittin の結合によって troponin C のダンベル構造が変化をきたして丸い形をとると仮定すると、N端側にカルシウムイオンが結合しないときの距離の減少を説明しやすい。また、N端側にカルシウムイオンが結合した際の距離の増大は helix A と helix E の間で大きな構造変化が起きたことによると思われる。このような結果は Wang と Cheung による troponin C-troponin I 複合体での実験 [67] でも確かめられている。ただ、troponin I を用いた彼らの実験よりも私の melittin を用いた実験では、N端側へのカルシウムイオンの結合に対して起こる両色素間の距離の変化が大きい。Troponin I に比べて melittin はかなり小さいため、melittin 分子が troponin C の作用部位のより深い部位にまで入り込んで作用を起こしたのかもしれない。

蛋白質の構造変化を考えると、カルシウム結合蛋白質と両親媒性ペプチドとの複合体は興味深い実験系を提供するものであると思い、次の実験をおこなうことにした。つまり Melittin 及びその誘導体中の Trp と、troponin C 中の Met25, Cys98 との間の距離を測定し、troponin C と melittin の立体構造の描像を得ようと試みた。結果は表 3, 4 の様になった。Troponin C 中の Met25 と melittin 中の Trp の間での励起エネルギー移動実験では、励起エネルギー移動効率がそれぞれの溶液条件で異なるにも関わらず、Met25 とどの Trp との間の距離もほとんど変化せず、11.9~17.7Å の間に収まった。平均の距離は 15.4Å であった。これは個々の溶液条件に

ついて  $R_0$  の値が変化している効果と、励起エネルギー移動の効率の変化が全体として打ち消しあったためであると思われる。さらに Trp の位置によっても距離が変化しなかったのは、melittin の helix が 11 番目と 12 番目のアミノ酸の位置で約  $60^\circ$  曲がった棒状をしていて、Trp を導入した 2, 5, 8, 13, 19 番目のアミノ酸の位置が曲がった棒の内側に存在することと関係がありそうである。つまり melittin は troponin C 分子のほうに曲がっている様に思われる。

Troponin C 中の Cys98 と melittin 中の Trp の間での励起エネルギー移動実験では、蛍光プローブ間の距離が EGTA、 $Mg^{2+}$  の条件で変化がみられなかった。距離は EGTA 溶液条件で  $16.8 \sim 21.7 \text{ \AA}$ 、 $Mg^{2+}$  条件で  $15.2 \sim 21.7 \text{ \AA}$  であった。また 13 番目に Trp を導入した誘導体と、19 番目に Trp をもつ native のものでは距離がほかのものに比べて小さかった。 $Ca^{2+}$  条件では、8 番目に Trp を導入した誘導体と native のものではエネルギーの移動効率が 100% となってしまう、残基間の距離が測定にかからなくなる程度にまで近付いてしまった。これらの試料では、残基間の距離が  $8 \text{ \AA}$  以下になっていると思われる。13 番目に Trp を導入した誘導体での残基間の距離も  $10.4 \text{ \AA}$  であり、非常に小さい距離である。それ故、 $Ca^{2+}$  条件では melittin の中央付近において Trp は troponin C の Cys98 に非常に近く、距離にして  $10 \text{ \AA}$  以下ではないかと思われる。

Trp を 13 番目に持つ melittin 誘導体と troponin C の複合体での距離のデータを元にして、Met25, Cys98, Trp13 の空間配置について考えることにする。Melittin を結合した troponin C 中の Met25 と Cys98 との間の距離は  $R_{(2/3)}$  の値で考えると  $50.0 \text{ \AA}$  である。また、troponin C 中の Met25 と melittin 中の Trp13 との間の距離は  $R_{(2/3)}$  の値で  $10.4 \text{ \AA}$ 、troponin C 中の Cys98 と melittin 中の Trp13 との間の距離は  $R_{(2/3)}$  の値で  $15.0 \text{ \AA}$  である。Met25-Cys98 の測定において蛍光色素の回転の自由度が低かったことを考慮に入れ、Met25 と Cys98 の間の距離を  $R_{(min)}$  で、また Met25-Trp13 及び Cys98-Trp13 の距離を  $R_{(max)}$  で見積もれば、相対的な位置を割り出すことができる。すると表 2, 3 から Met25-Cys98 が  $29.1 \text{ \AA}$ 、Met25-Trp13 が  $19.5 \text{ \AA}$  であるので、Cys98-Trp13 を  $10 \text{ \AA}$  と見積もればよいことがわかる。つまりこの場合、melittin の 13 番目の残基の位置は Met25 と Cys98 を結ぶ直線上にあるということになる。Met25 は helix D に近く、Cys98 は helix E 上にあり、helix D と 11 個のリンカー残基、helix E で troponin C の中央ヘリックスを構成していることを考えると、 $Ca^{2+}$  条件では melittin の中央部分は troponin C の中央ヘリックスに非常に近い位置にあって、

どちらかというところtroponin CのC端側によっているということが想像できる。

EGTA条件と $Mg^{2+}$ 条件では、melittin上のTrpの位置を変化させてもTrp-Met25, Trp-Cys98の間の距離に目立った変化がみられない。これはmelittinがtroponin CのN端、C端の方向に曲がっていて、melittinのヘリックスとtroponin Cの中央ヘリックスが直交しているからではないかと思われる。EGTA条件、 $Mg^{2+}$ 条件では、Met25とmelittin上のTrpの距離がCys98とmelittin上のTrpの距離に比べて小さいので、melittinは比較的troponin CのN端よりにあるのではないかと思われる。Melittinの中央部分はカルシウムイオンがtroponin Cの4個の結合ドメイン総てに付くことでCys98に近づき、N端側の結合ドメインからのカルシウムイオンの解離でCys98から離れるようである。

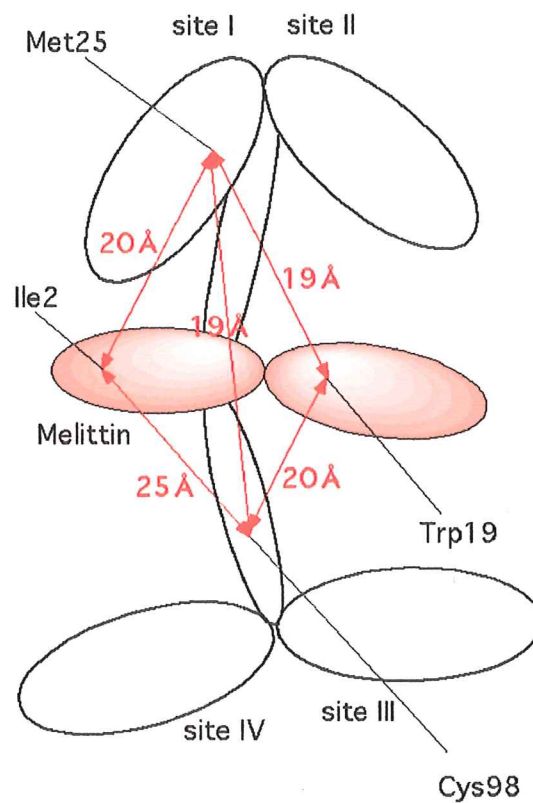


図 33: Troponin C-melittin の立体構造の想像図 (-Ca 条件)

Herzberg[12] の troponin C の描像を元にして、  
 今回のデータを使って描いた troponin C-melittin の立体構造  
 Met25-Cys98 は  $R_{min}$  を  
 Trp-Met25, Trp-Cys98 は  $R_{max}$  を用いた



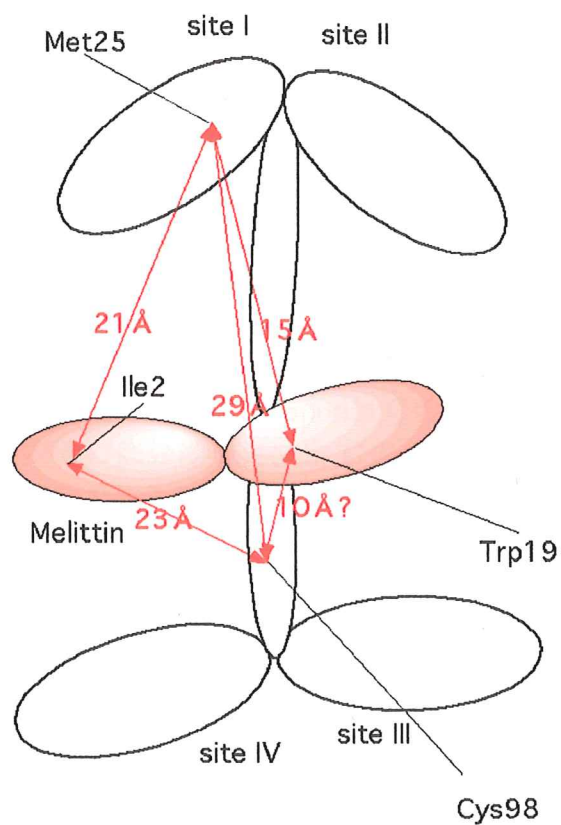


図 34: Troponin C-melittin の立体構造の想像図 (+Ca 条件)

Herzberg[12] の troponin C の描像を元にして、  
 今回のデータを使って描いた troponin C-melittin の立体構造  
 Met25-Cys98 は  $R_{min}$  を  
 Trp-Met25, Trp-Cys98 は  $R_{max}$  を用いた

蛍光異方性のデータからは、先に述べたように蛍光色素の回転の自由度を見積もることができる。今回得られたデータでは、melittin分子では中央部の19番残基のあたりで蛍光を発するTrpの動きがもっとも抑えられていた。またtroponin C中のDANZの自由度は $Mg^{2+}$ 条件でもっとも自由度が高く、troponin C中のAEDANSの自由度も $Mg^{2+}$ でもっとも高く、逆に $Ca^{2+}$ 条件でもっとも低いことがわかった。実験で用いたmelittin及びその誘導体は2, 5, 8, 13若しくは19番目の残基をTrpに置き換えられていて、またこれらの残基はmelittinの曲がった棒状の構造の内側に位置する[68]。Nativeのmelittinの立体構造[69]と、ダブルラベルしたtroponin C-melittin複合体での実験結果、melittin及びその複合体とDANZ, AEDANSで行った実験結果からtroponin C-melittin複合体の立体構造を予測してみた。EGTA及び $Mg^{2+}$ 条件では、melittinはその曲がった棒の外側をtroponin CのN端側に向け、melittinの2, 5, 8, 13, 19番目の残基をtroponin CのC端のドメインに向ける。一方、 $Ca^{2+}$ 条件では、melittinの曲がった棒の外側はtroponin Cの中央ヘリックスC端側に向き、melittinの内側の部分はtroponin CのN端側に向く。Troponin Cに対して $Ca^{2+}$ が結合することによって起こるmelittinの結合様式の変化が、troponin C中のMet25-Cys98間の距離を $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ を仮定したときに30Åから50Åへ変化させたのではないかと思われる。ただ、今回の一連の実験により、この測定において蛍光色素の蛋白質分子に対する自由回転が著しく制限されていることがわかったため、実際の距離の変化はこれほどまで大きく変化をしていないかもしれない。また、EGTA条件と $Mg^{2+}$ 条件でのmelittinの結合様式の違いは $\langle d_A^X \rangle$ のデータが示している。Met25に結合したDANZの自由回転がEGTA条件より $Mg^{2+}$ 条件のほうが起こりやすいのである。このことはmelittinがEGTA条件より $Mg^{2+}$ 条件でDANZから遠ざかっていることの証拠になっている。

$Ca^{2+}$ 条件において私の実験から得られたtroponin C-melittinの構造は、コンピュータシミュレーションによって得られたStrynadka and James [70]の結果とある一点が異なっている。すなわち、私の描像でmelittinの曲がった棒の外側がtroponin Cのhelix Dに向くのに対して、彼らの描像ではmelittinの曲がった棒の内側がtroponin CのC端の側に向くということである。Kobayashi et al.[71]によると、troponin Iの筋収縮抑制ペプチドである104～115残基は $Ca^{2+}$ 条件でtroponin Cの84～94番残基と60～61番残基に結合する。今回の私の実験結果は、このKobayashiの報告とも一致し、melittinがtroponin CのN端とC端の両方に作用す

るということも示すものであり、Strynadka and James[70]よりも実際の troponin C-troponin Iの相互作用に近いデータが得られたのではないかと思われる。

前出の Blechner et al.[66]の X線小角散乱実験で、カルシウムイオン飽和の条件で troponin C-melittin 複合体が球形をしているということを述べた。Troponin Cがカルシウムイオン飽和でなくても melittin を結合するという事実を考えあわせると、troponin C-melittin 複合体はカルシウムイオン不飽和でも球形をしているのではないかと思われる。

Troponin C と非常に良く似た構造を持つ蛋白質として calmodulin がある [30]。4個のカルシウムイオンを結合した calmodulin はターゲットとなる蛋白質に結合し、この結合はカルシウム依存で起こる [31]。Calmodulin は melittin や mastoparan といったいくつかの細胞外ペプチドも結合することができる [31]。Persechini and Kretsinger[34]によると、calmodulin は  $Ca^{2+}$  条件で中央ヘリックス中のリンカーの部分が柔らかい構造をしていて、ターゲットとなるペプチドの  $\alpha$ -helix 部分を両側のドメインで挟み込んでしまうという。Ikura et al.[33]と Meader et al.[35][36]のグループはそれぞれマルチファンクショナル NMR と X線結晶構造解析を用いてこの提案を確認した。Troponin C は calmodulin とは異なり、 $-Ca^{2+}$  条件でも melittin を結合する。おそらくこのことは troponin C が天然の状態では troponin I やほかの蛋白質と結合しているということに関係があるのではないかと思われる。Wang と Cheung の報告 [67] と本研究の Met25-Cys98 の間の距離のデータを比較する限り、troponin C に関してはペプチドや troponin I が  $-Ca^{2+}$ ,  $+Ca^{2+}$  の条件を問わずに結合することが本質的に重要なかもしれない。しかし  $-Ca^{2+}$ ,  $+Ca^{2+}$  の条件で、troponin C に対する melittin の結合状態が大きく変化していることから、想像を逞しく考えてみると、troponin C-troponin I の複合体においてもその結合部位、結合時の配置が  $Ca^{2+}$ ,  $+Ca^{2+}$  の条件で異なっていて、その作用で筋収縮系への信号の伝達を行っているのではないかと感じる。この件については後の研究に期待したいと思う。

## 参考文献

- [1] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson. Molecular biology of the cell. *Garland* , pages 788–863, 1991.
- [2] S. Ebashi. Regulatory mechanism of muscle contraction with special reference to the Ca-troponin-tropomyosin system. *Essays in Biochemistry* , 10:1–36, 1974.
- [3] S. Ebashi and M. Endo. Calciumion and muscle contraction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* , 18:123–183, 1968.
- [4] S. Ebashi. Regulation of muscle contraction. *Proc. R. Soc. London Ser. B* , 207:259–286, 1980.
- [5] P. C. Leavis and J. Gergely. Thin filament proteins and thin filament-linked regulation of vertebrate muscle contraction. *CRC Crit. Rev. Biochem* , 16:235–305, 1984.
- [6] H. Huxley and J. Hanson. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* , 173:973–977, 1954.
- [7] H. E. Huxley. Structural changes in the actin- and myosin-containing filaments during contraction. *Cold spring harbor symp. Quant. Biol.* , 37:361–376, 1972.
- [8] T. Tao, M. Lamkin, and S. S. Lehrer. Excitation energy transfer studies of the proximity between tropomyosin and actin in reconstituted skeletal muscle thin filaments. *Biochemistry* , 22:3059–3066, 1983.
- [9] W. F. Ganong 著 松田幸次郎 他訳. 原書10版 医科生理学展望. 丸善株式会社 , page 49, 1982.
- [10] 山本啓一 and 丸山工作 共著. 生命現象への化学的アプローチ 筋肉. 化学同人 , page 47, 1986.
- [11] 山本啓一 and 丸山工作 共著. 生命現象への化学的アプローチ 筋肉. 化学同人 , page 85, 1986.

- [12] O. Herzberg and M. N. G. James. Structure of the calcium regulatory muscle protein troponin-C at 2.8Å resolution. *Nature* , 313:653–659, 1985.
- [13] O. Herzberg, J. Moulton, and M. N. G. James. A model for the Ca<sup>2+</sup> - induced conformational transition of troponin C. A trigger for muscle contraction. *J. Biol. Chem.* , 261:2638–2644, 1986.
- [14] O. Herzberg, J. Moulton, and M. N. G. James. Refined crystal structure of troponin C from turkey skeletal muscle at 2.0Å resolution. *J. Mol. Biol.* , 203:761–776, 1988.
- [15] K. A. Satyshur, S. T. Rao, D. Pyzalska, W. Drendel, M. Greaser, and M. Sundaralingam. Refined structure of chicken skeletal muscle troponin C in the two-calcium state at 2-Å resolution. *J. Biol. Chem.* , 263:1628–1647, 1988.
- [16] S. M. Gagné, S. Tsuda, M. X. Li, M. Chandra, L. B. Smillie, and B. D. Sykes. Quantification of the calcium-induced secondary structural changes in the regulatory domain of troponin-C. *Protein Science* , 3:1961–1974, 1994.
- [17] S. M. Gagné, S. Tsuda, M. X. Li, L. B. Smillie, and B. D. Sykes. Structures of the troponin C regulatory domains in the apo and calcium-saturated states. *Nature structural biology* , 2:784–789, 1995.
- [18] C. M. Slupsky and B. D. Sykes. NMR solution structure of calcium-saturated skeletal muscle troponin C. *Biochemistry* , 34:15953–15964, 1995.
- [19] J. D. Potter and J. Gergely. The calcium and magnesium binding site on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* , 250:4628–4633, 1975.
- [20] J. H. Collins, M. L. Greaser, J. D. Potter, and M. J. Horn. Determination of the amino acid sequence of troponin C from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* , 252:6356–6362, 1977.

- [21] I. L. Sin, R. Fernandes, and D. Mercola. Direct identification of the high and low affinity calcium binding sites of troponin C. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* , 82:1132–1139, 1978.
- [22] P. C. Leavis, S. S. Rosenfeld, J. Gergely, Z. Grabarek, and W. Drabikowski. Proteolytic fragments of troponin C. Localization of high and low affinity  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites and interactions with troponin I and troponin T. *J. Biol. Chem.* , 253:5452–5459, 1978.
- [23] R. H. Kretsinger and C. D. Barry. The predicted structure of the calcium-binding component of troponin. *Biochim. Biophys. Acta* , 405:40–52, 1975.
- [24] Z. Grabarek, T. Tao, and J. Gergely. Molecular mechanism of troponin-C function. *J. Muscle Res. Cell Motil.* , 13:383–393, 1992.
- [25] Z. Sheng, B. S. Pan, T. E. Miller, and J. D. Potter. Isolation, expression, and mutation of a rabbit skeletal muscle cDNA clone for troponin I. The role of the  $\text{NH}_2$  terminus of fast skeletal muscle troponin I in its biological activity. *J. Biol. Chem.* , 267:25407–25413, 1992.
- [26] J. A. Tablot and R. S. Hodges. Synthetic studies on the inhibitory region of rabbit skeletal troponin I. relationship of amino acid sequence to biological activity. *J. Biol. Chem.* , 256:2798–2802, 1981.
- [27] D. C. Dalgarno, R. J. A. Grand, B. A. Levine, A. J. G. Moir, G. M. M. Scott, and S. V. Perry. Interaction between troponin I and troponin C. Definition of the topography by proton magnetic resonance spectroscopy. *FEBS Lett.* , 150:54–58, 1982.
- [28] P. J. Cachia, B. D. Sykes, and R. S. Hodges. Calcium-dependent inhibitory region of troponin: A proton nuclear magnetic resonance study on the interaction between troponin C and the synthetic peptide  $\text{N}^\alpha$ -Acetyl[FPhe<sup>106</sup>]TnI-(104-115) amide. *Biochemistry* , 22:4145–4152, 1983.
- [29] J. v. Eyk and R. S. Hodges. The biological importance of each amino acid residue of the troponin I inhibitory sequence 104-115 in the

- interaction with troponin C and tropomyosin-actin. *J. Biol. Chem.* , 263:1726–1732, 1988.
- [30] Y. S. Babu, J. S. Sack, T. J. Greenhough, C. E. Bugg, A. R. Means, and W. J. Cook. Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature* , 315:37–40, 1985.
- [31] A. Crivici and M. Ikura. Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* , 24:85–116, 1995.
- [32] M. Sellinger-Barnette and B. Weiss. Interaction of various peptides with calmodulin. *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* , 16:261–276, 1984.
- [33] M. Ikura, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, G. Zhu, C. B. Klee, and A. Bax. Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science* , 256:632–638, 1992.
- [34] A. Perschini and R. H. Kretsinger. Toward a model of the calmodulin-myosin light-chain kinase complex: Implications for calmodulin function. *J. Cardiovascular Pharmacology* , 12:S1–S12, 1988.
- [35] W. E. Meador, A. R. Means, and F. A. Quioco. Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4Å structure of a calmodulin-peptide complex. *Science* , 257:1251–1255, 1992.
- [36] W. E. Meador, A. R. Means, and F. A. Quioco. Modulation of calmodulin plasticity in molecular recognition on the basis of X-ray structures. *Science* , 262:1718–1721, 1993.
- [37] V. E. Habermann and J. Jentsch. Sequenzanalyse des Melittins aus den tryptischen und peptischen Spaltstücken. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* , 348:37–50, 1967.
- [38] R. F. Steiner and L. Norris. The interaction of melittin with troponin C. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 254:342–352, 1987.

- [39] T. Iio. Melittin-binding of Troponin C. *J. Biochem.* , 114:773-778, 1993.
- [40] N. C. J. Strynadka and M. N. G. James. Model for the interaction of amphiphilic helices with troponin C and calmodulin. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* , 7:234-248, 1990.
- [41] D. M. Watterson, F. Sharief, and T. C. Vanaman. The complete amino acid sequence of the  $Ca^{2+}$  -dependent modulator protein (Calmodulin) of Bovine brain. *J. Biol. Chem.* , 255:962-975, 1980.
- [42] T. C. Terwilliger and D. Eisenberg. The structure of melittin: II. interpretation of the structure. *J. Biol. Chem.* , 257:6016-6022, 1982.
- [43] 木下一彦 and 御橋廣眞 編. 蛍光測定 生物科学への応用. 学会出版センター , 3:1-43, 1983.
- [44] T. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. der Physik* , 6:55-75, 1948.
- [45] R. F. Dale, J. Eisinger, and W. E. Blumberg. The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophys. J.* , 26:161-194, 1979.
- [46] G. Weber. Rotational Brownian motion and polarization of fluorescence of solutions. *Adv. Protein Chem.* , 8:415-459, 1953.
- [47] S. Ebashi, A. Kodama, and F. Ebashi. Troponin I. Preparation and physiological function. *J. Biochem.* , 64:465-477, 1968.
- [48] H. Schägger and G. v. Jagow. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochem.* , 166:368-379, 1987.
- [49] S. Ishiwata and S. Fujime. Effect of calcium ions on the flexibility of reconstituted thin filaments of muscle studied by quasielastic scattering of laser light. *J. Mol. Biol.* , 68:511-522, 1972.



- [50] J. P. v. Eerd and Y. Kawasaki. Effect of calcium(II) on the interaction between the subunits of troponin and tropomyosin. *Biochemistry* , 12:4972–4980, 1973.
- [51] A. C. Murray and C. M. Kay. Hydrodynamic and optical properties of troponin A. Demonstration of a conformational change upon binding calcium ion. *Biochemistry* , 11:2622–2627, 1972.
- [52] Y. Maulet, B. M. Prevot, G. Kaiser, U. T. Rüegg, and B. W. Fulpius. Purification and chemical characterization of melittin and acetylated derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* , 625:274–280, 1980.
- [53] Y. Maulet and J. A. Cox. Structural changes in melittin and calmodulin upon complex formation and their modulation by calcium. *Biochemistry* , 22:5680–5686, 1983.
- [54] J. D. Johnson, J. H. Collins, and J. D. Potter. Dansylaziridine-labeled troponin C. A fluorescent probe of  $\text{Ca}^{2+}$  binding to the  $\text{Ca}^{2+}$ -specific regulatory sites. *J. Biol. Chem.* , 253:6451–6458, 1978.
- [55] R. J. Cherry. Measurement of protein rotational diffusion in membranes by flash photolysis. *Methods Enzymol.* , 54:47–61, 1978.
- [56] H. C. Cheung, C. K. Wang, and F. Garland. Fluorescence energy transfer studies of skeletal troponin C proximity between methionine-25 and cysteine-98. *Biochemistry* , 21:5135–5142, 1982.
- [57] Z. Grabarek, J. Grabarek, P. C. Leavis, and J. Gergely. Cooperative binding to the  $\text{Ca}^{2+}$ -specific sites of troponin C in regulated actin and actomyosin. *J. Biol. Chem.* , 258:14098–14102, 1983.
- [58] E. N. Hudson and G. Weber. Synthesis and characterization of two fluorescent sulfhydryl reagents. *Biochemistry* , 21:4154–4161, 1973.
- [59] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* , 193:265–275, 1951.
- [60] R. A. Velapoldi. Consideration on organic compounds in solution and inorganic ions in glasses as fluorescent standard reference materials.

- J. Res. National Bureau of Standards. A. Physics and Chemistry* , 76A:641–654, 1972.
- [61] W. H. Melhuish. Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: Effect of solvent and concentration of the fluorescent solute. *J. Phys. Chem.* , 65:229–235, 1961.
- [62] R. F. Chen. Some characteristics of the fluorescence of quinine. *Anal. Biochem.* , 19:374–387, 1967.
- [63] 国立天文台 編. 理科年表. 丸善株式会社 , page 517, 1992.
- [64] T. Tao, E. Gonell, G. M. Strasburg, J. Gergely, and P. C. Leavis.  $Ca^{2+}$  dependence of the distance between Cys-98 of Troponin C and Cys-133 of Troponin I in the ternary Troponin complex. Resonance energy transfer measurements. *Biochemistry* , 28:5902–5908, 1989.
- [65] Z. Wang, J. Gergely, and T. Tao. Characterization of the  $Ca^{2+}$ -triggered conformational transition in troponin C. *Natl. Acad. Sci. USA* , 89:11814–11817, 1992.
- [66] S. L. Blechner, G. A. Olah, N. C. J. Strynadka, R. S. Hodges, and J. Trehwella.  $4Ca^{2+}$ . troponin C forms dimers in solution at neutral pH that dissociate upon binding various peptides: Small-angle X-ray scattering studies of peptide-induced structural changes. *Biochemistry* , 31:11326–11334, 1992.
- [67] C. K. Wang and H. C. Cheung. Proximity relationship in the binary complex formed between troponin I and troponin C. *J. Mol. Biol.* , 191:509–521, 1986.
- [68] T. C. Terwilliger and D. Eisenberg. The structure of melittin. II. Interpretation of the structure. *J. Biol. Chem.* , 257:6016–6022, 1981.
- [69] T. C. Terwilliger and D. Eisenberg. The structure of melittin. I. Structure determination and partial refinement. *J. Biol. Chem.* , 257:6010–6015, 1981.

- [70] N. C. Strynadka and M. N. G. James. Model for the interaction of amphiphilic helices with troponin C and calmodulin. *Proteins Structure, Function, and Genetics* , 7:234-248, 1990.
- [71] T. Kobayashi, P. C. Leavis, and J. H. Collins. Interaction of a troponin I inhibitory peptide with both domains of troponin C. *Biochim. Biophys. Acta* , 1294:25-30, 1996.