

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07032

研究課題名(和文) 骨格筋・心筋収縮のカルシウム制御機構の高分解能クライオ電子顕微鏡法による解明

研究課題名(英文) Structural basis of regulation of striated muscle using electron cryo-microscopy

研究代表者

若林 健之 (WAKABAYASHI, Takeyuki)

帝京大学・理工学部・教授

研究者番号：90011717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋・心筋の収縮は、細胞内カルシウム濃度がマイクロモル未満の条件下では抑制され、トロポニンへのカルシウムの結合によって収縮がもたらされる。制御はカルシウムのシグナルが、トロポニン・トロポミオシン・アクチンと伝達され、ミオシンがアクチンと結合出来るようになる。低カルシウム濃度での収縮抑制の構造的基盤を得るために、アクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体のクライオ電子顕微鏡写真を数千枚収集し、その一部から約1万個の粒子像を解析し、二次元平均像としての分解能が約5Åに達しており、三次元像では構造の主体であるアクチンのらせん構造の他にトロポミオシン・トロポニンに対応する密度が観察できた。

研究成果の概要(英文)：The contraction of striated muscle is regulated by calcium concentration. The target of the calcium is troponin. The binding of calcium ions to troponin triggers the shifting of tropomyosin on the actin filaments and enables the muscle contraction. At low calcium ions concentration, a part of troponin named the mobile domain attaches firmly to the carboxyl-terminal region of actin molecule. To elucidate the structural basis of regulatory mechanism, the several thousand of cryo-electron micrographs of the ternary complex of troponin, tropomyosin, and actin were collected. A small portion of micrographs were analyzed by picking about 10,000 segments of the filaments. Two-dimensionally averaged images reached about 5 angstrom resolution. In the preliminary three-dimensional structure, the regions correspond to the regulatory proteins, i. e., troponin and/or tropomyosin, could be observed. The image analysis of total micrographs is in progress.

研究分野：生物物理学

キーワード：アクチン トロポニン トロポミオシン カルシウム 筋収縮制御 クライオ電子顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 1975年に若林ら(Wakabayashi *et al.* *J. Mol. Biol.*, **93**, 477-497 (1975))は、横紋筋のトロポミオシンがアクチンフィラメント上で収縮・弛緩に応じて、フィラメント軸に垂直な方向に移動することを三次元構造解析で直接的に示した。これ以前から、H.E. Huxleyらは骨格筋のX線小角散乱パターンでの収縮・弛緩での変化は、トロポミオシンの移動によって説明出来ることをモデル計算から示し、トロポミオシンがミオシンのアクチン結合を立体障害するとして「ステリックブロック説」を提唱していたが、直接的根拠は得られていなかった。これらの構造解析は、アクチンを含むフィラメントのらせん対称性を前提とし、トロポミオシンはアクチンフィラメントのラセン構造に沿って滑らかにラセンを描くとの仮定の下で行われた。トロポミオシン分子内には7個の擬似的リピートがあり、各モチーフは1分子のアクチン分子と対応しているため、このような仮定の下でもトロポミオシンの可視化は可能であった。収縮制御のシグナルである  $Ca^{2+}$ はトロポニンに結合するので、制御メカニズムの解明にはアクチンフィラメント上のトロポニン分子の可視化が必須である。しかし、トロポニン分子には擬似的リピートはないので、トロポニン分子をアクチンフィラメント上で可視化することは出来なかった。

(2) この状況を打開するために、若林らは単粒子解析法を導入した(Narita *et al.* *J. Mol. Biol.*, **308**, 241-261 (2001))。この解析法は対称性に依存せずに三次元像を再構成出来る。アクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体のクライオ電子顕微鏡像に単粒子解析を適用し、トロポニン分子をアクチンフィラメント上で可視化することに初めて成功した。その結果、

トロポニンは低  $Ca^{2+}$ 濃度ではアクチン分子のカルボキシル末端方向にシフトする。

トロポミオシンは低  $Ca^{2+}$ 濃度では、分子のカルボキシル末端側の約2/3ではアクチンのカルボキシル末端領域の方向にシフトしてアクチンのミオシン結合部を覆うが、アミノ末端側の約1/3ではほとんどシフトしない(差動的シフト)。これらの結果として、トロポミオシン分子はトロポニン結合部位の近傍では湾曲する。(一方で、高  $Ca^{2+}$ 濃度では、トロポミオシンはアクチンの二重らせんに沿って滑らかなラセンを描く)。

トロポミオシン分子には可視化しにくい領域があり、この領域はトロポミオシン分子間の重複的接合部位であり、むしろ密度が高いことが期待される場所である。などが新たに見いだされた。

## 2. 研究の目的

(1) アクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体の三次元構造は、低カルシウム濃度ではトロポニン分子の本体から突出している領域が観察され、アクチンを抱きかかえる腕のように見えるのでトロポニン・アームと名付けた。この突出部はトロポニンのコアドメイン(52 kDa)の結晶構造には観察されなかった。この突出部はトロポニン単体ではモバイルなため、結晶構造では可視化が難しかったと推察し、コアドメインのNMR分光を行ったところ、予想通り、コアドメインにはコンパクトでモバイルなドメイン(6.1 kDa)があり、その原子構造決定に成功し、モバイルドメインと名付けた。NMR分光法で解

かれたモバイルドメインの原子構造は、そのアミノ酸配列から、トロポニン阻害サブユニット(トロポニンI)のカルボキシル末端領域に対応する。この領域は収縮阻害に最も重要な役割をしている部位であることが、生化学的に示されている。モバイルドメインは静電的にアクチンと結合し、その変異がヒト心筋症を発症(11カ所の変異)させる機構が分かった。

(2) トロポニンとトロポミオシンの共結晶

構造の X 線結晶解析から、2 本のトロポミオシンのヘリックスはアミノ酸配列が同一であるにも拘わらず、片方は大きくヘリックス軸が湾曲しており、この湾曲している方にトロポニンが結合している。トロポニンとトロポミオシンの間には側鎖同士のスッキング相互作用があり、このアミノ酸の変異もヒト心筋症をもたらす。またトロポミオシン接合部でトロポミオシンのアミノ末端領域ではコイルドコイル構造が壊れて、一本のヘリックスのみが隣接するトロポミオシンに結合している事が分かり、トロポミオシンの密度が十分に可視化出来ない理由を説明できた。

そこで、本研究ではクライオ電子顕微鏡法により、アクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体の三次元構造の高分解能化により、トロポミオシン接合部位の特異な低密度領域構造も可視化し、トロポミオシン分子内の非対称にしている様子や、トロポニンのモバイルドメインとアクチンとの結合様式を明らかにしようとしている。これらを通して、筋肉収縮弛緩の分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

(1) ウサギ骨格筋のアクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体構造をヘリックスを可視化できる分解能(6-8 Å)で解くために、ダイレクトカメラ(Falcon2)を備えた高分解能クライオ電子顕微鏡(Titan-Krios)を用いて、数千枚のクライオ電子顕微鏡像を収集した。試料グリッドを作製する際には大阪大学超高压電子顕微鏡センターに設置されたイオン・コーターまたは大阪大学蛋白質研究所のGloQubeを用いてグローディスチャージし、急速凍結装置 Vitrobot を用いた。加速電圧は 300 kV で、ダイレクトカメラはムービーモードで7枚の画像に分割して記録した。この複合体のフィラメント構造の構

造単位は長さが約 40 nm で、アクチン×14、トロポミオシン×2、トロポニン×2からなる。この構造単位を単粒子として扱った。その際に RELION パッケージを用いて、単粒子をベイズ統計を用いた方法で分類した。

(2) 単粒子解析を精密に行うために、ダブルフォーカス法を開発して用いた。この方法では、同一視野を1枚目は弱い不足照準で撮影し、2枚目は強い不足照準で撮影する。後者ではフィラメント像が鮮明に観察出来るが、高分解能情報は余り含まれていない。前者ではコントラストが低くフィラメントの観察が困難であるが高分解能情報が含まれている。そこで、後者から得られたフィラメントの位置情報を用いて、前者からフィラメント像を抽出出来るようにした。

抽出したフィラメント像をセグメントに分割し、このセグメントを単粒子と見なし、EOSまたはRELION2.1bパッケージを用いてモーション・コレクションを行った後に、単粒子解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 単粒子解析用コンピュータシステムの構築：画像解析用ソフトウェアであるEOS、RELION(後述)を稼働させるために、オペレーティングシステムとして、CentOS(Linux系)を選択した。計算を加速するために新たに購入したGPU(Graphics Processing Unit)を搭載し、ソフトウェアからこれを認識できるようにしたところ、計算速度は3-5倍加速され、一晩かかる計算が、2-3時間でできるようになった。解析の際のパラメーターの最適値の探索は計算負荷が高いが、実用的な時間内に最適化が出来るようになった。

(2) クライオ電子顕微鏡用グリッドの前処理の条件の決定：クライオ電子顕微鏡法では試料を液体窒素温度で凍結する際に、薄層の非晶質氷に包埋する。薄層の厚さは、薄す

ぎると試料が薄層に包埋仕切れずに排除されたり、また表面に近すぎて変形してしまったりする。一方、厚すぎると電子線が氷によって非弾性的に散乱される頻度が増し、良い像は得られなかった。適切な厚さを得るためにはグリッドに張られたカーボン膜の前処理が重要であり、使用の数日前に、新たに薄いカーボンを真空蒸着し、更に使用直前に適当な条件でグローディスチャージすることが重要であった。

グローディスチャージの結果として、カーボン膜がどの程度親水的であるかによって氷薄層の厚さは変化した。親水性が高すぎると、氷は厚くなり、疎水性が高すぎると試料溶液はプロットングの際に失われる。クライオ電子顕微鏡が手近にないので、これらの条件を探索することは困難であったので、貴重なクライオ電子顕微鏡使用時間が有効に生かせなかった。そこで、簡便なテストとして、スライドガラスにカーボン膜を蒸着し、様々な条件下（アミルアミン蒸気の濃度など）でグローディスチャージして、試料溶液を数マイクロリットル滴下した際の液滴の形状を観察する方法を考案した。親水性が高すぎると液滴は平板状となり、逆に疎水性が高すぎると半球状となった。実際に、この方法は実際にクライオ電子顕微鏡で最適条件を見付ける上で有用であることが分かり、その後のクライオ電子顕微鏡使用時間を有効に使えるようになった。

(3) 高分解能クライオ電子顕微鏡法のための試料条件の決定： 薄層の非晶質氷に包埋されたフィラメントの像を得るための条件のうちで、電子顕微鏡グリッドの前処理条件は前項に記述した方法で決定できたが、試料の蛋白質濃度と塩溶液条件、急速凍結のための試料の容量、急速凍結装置である Vitrobot の使用上諸条件（インキュベーション時間、プロット時間、プロット後の放置時間）の確

立は、実際にクライオ電子顕微鏡を用いて探索し、確立することができた。

この条件下で、高分解能クライオ電子顕微鏡写真を数千枚収集した。ダブルフォーカス法（後述）を用いたので、視野数は画像数の約半分である。

(4) 電子顕微鏡像からフィラメント像を切り出すソフトウェアの作成： クライオ電子顕微鏡像は、フォーカスが合っている場合はコントラストが低く、フィラメントを目視では認識出来ない。そこで、同一視野で二枚の写真を撮った。二枚目に撮ったデフォーカス量の多い画像でフィラメントの位置を目視で確認し、その座標を用いて一枚目のよりデフォーカス量が少なく（正焦点に近い）高分解能情報を含むが手動ではフィラメントの認識が難しい画像から自動的にフィラメント像を切り出すプログラムを作成し、実際にこの方法で切り出したフィラメントを単粒子解析ソフトウェアパッケージである RELION システムで処理できることを確認した。これによってダブルフォーカス法は完成した。

(5) フィラメント像のラセン対称性のフーリエ解析による吟味： 若林らが以前に開発した画像解析パッケージである EOS (Yasunaga & Wakabayashi: *J Struct. Biol.* 116:155-60 (1996)) を用いて画像のフーリエ変換を計算して、ラセン対称性の保存の程度を吟味した。一本のフィラメント像のフーリエ変換強度マップで  $1/(27.3)$  の子午線上の反射スポットを観察できることを確認した。また、大多数のフィラメントで  $1/(59)$  の層線が観察でき、この層線の強度分布は子午線に関してほぼ左右対称であり、ラセン対称性が良く保存されていることを示した。そこで、試料であるアクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体のフィラ

メントは急速凍結後も十分にらせん対称性を保持していることを確認出来た。

#### (6) フィラメント像の単粒子解析：

電子線ダイレクトディテクター (Falcon2) を用いて、一つの視野をムービーモードで7枚ずつ撮影した。これらのクライオ電子顕微鏡像を Motion Correction 用のソフトウェアで撮影中の像の移動と回転を補正した。移動量や回転量が多いものは棄却したが、そのような画像は例外的であった。デフォーカス条件下で撮影したので、CtfFIND または Gctf を用いてコントラスト伝達関数の決定を行ったが、電子顕微鏡写真のデフォーカス量は自動的に決めることができた。これは画像十分な信号対雑音比をもつことを示し、実際に画像のフーリエ変換強度と計算上のコントラスト伝達関数の振幅の極大値、極小値の位置は良く対応していることを確認出来た。

ダブルフォーカス法を用いて、デフォーカス量が少ないためフィラメントを識別できない写真から高い信頼性でフィラメントを切り出すことが出来た。RELION2.1b を用いて、フィラメント像から約1万個のセグメントを単粒子像として切り出し、画像分類した。同一のクラスに分類された単粒子像の平均像の分解能は約 5 Å に達していることが分かった。これは、当初の目標を超えるものであるが、この解析に用いた画像は収集した全体画像の数パーセントであり、総ての画像を解析すれば、大型のアミノ酸残基を直接認識出来る分解能に達することが期待できる。

(7) アクチンを含むフィラメント像の三次元像の再構成： 前項で解析した単粒子像から得られた予備的三次元構造では、アクチンからなるフィラメント構造の他に、試料に加えたトロポミオシン・トロポニンによる密度をアクチンのものと区別して認識できた。この事により、試料の急速凍結の際に、トロポ

ミオシン・トロポニン複合体が結合して直径が太くても、それらの太いフィラメントは薄層から排除されていなかったことを、構造的に確認できたことになる。

単粒子の数が少ないため、二次元像の分解能に対応した三次元像の分解能はまだ達成できてはいない。本来、三次元像では、平均化の際により多くの平行移動と三次元的回転が可能であり、二次元像では平均化の際に平行移動と平面内回転しかできない。そこで、一般的には、単粒子像の数が十分あれば、三次元的分解能は二次元的分解能より優ることが期待できる。通常の個別の単粒子像では、凍結薄層内での粒子の向きに偏りがある場合があり、その場合は三次元的分解能が二次元的分解能よりも数段劣ってしまう。しかし、らせん対称性を保持したフィラメントのセグメントの場合は、凍結薄層内での向きが片寄ることは余りないので、収集した画像全体を解析すれば、分解能 5 Å を越える三次元像再構成が可能であることが十分期待できる。この計算には、二次元像分類、三次元像再構成、三次元像分類と、膨大な計算量が必要である。この事を克服しつつ、画像解析を進めている。

#### (8) 三次元再構成像と原子構造の比較：

若林らは、既にこのアクチン・トロポミオシン・トロポニンからなるフィラメントのトロポニンのモバイルドメイン部分の原子構造は NMR 分光法によって明らかとし

(Murakami et al. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 7200-7205 (2008)) トロポミオシン・トロポニン断片複合体の原子構造は X 線結晶解析によって既に決定しており

(Murakami et al.: *J. Mol. Biol.*, **352**, 178-201(2005)) またアクチンフィラメント構造の高分解能三次元像は大きいアミノ酸残基や主な  $\alpha$ -ヘリクスを識別できる分解能に達した構造を得ているので (Murakami et al. *Cell*, **143**, 275-287 (2010)) 今後得

られる高分解能でのアクチン・トロポミオシン・トロポニン三者複合体の高分解能三次元構造との比較は EOS ソフトウェア（前述）を用いて行い、横紋筋の収縮弛緩のカルシウムによる制御機構の解明を行いたい。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Wakabayashi, T. (2015) Mechanism of the calcium-regulation of muscle contraction. --- In pursuit of its structural basis --- *Proc. Jpn Acad., Ser. B*, **91**, 321-350. (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

五味 洵 由貴、上田 太郎、若林 健之、細胞性粘菌のアクチンのカルボキシ末端領域の二型性と Pro109 に導入した変異の関係（日本生物物理学会、2017）

五味 洵 由貴、上田 太郎、若林 健之、細胞性粘菌の Tyr143 変異アクチンのカルボキシ末端領域にある Phe352、Met355 と Trp356 の側鎖の二型性（日本生物物理学会、2016）

五味 洵 由貴、西山 雅祥、加藤 薫、上田 太郎、若林 健之、細胞性粘菌の高圧処理からの回復過程で糸状仮足突出が増加する（日本生物物理学会、2015）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

若林 健之 (WAKABAYASHI, Takeyuki)  
帝京大学・理工学部・教授  
研究者番号：90011717

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

五味 洵 由貴 (GOMIBUCHI, Yuki)  
帝京大学・理工学部・研究員