

平成21年4月20日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570152

研究課題名（和文）分子スイッチ・トロポニン-トロポミオシンの動的構造解析

研究課題名（英文） Study of the dynamic structure of the troponin-tropomyosin complex

研究代表者

三木 正雄

福井大学・工学研究科・教授

研究者番号 30242580

研究成果の概要：トロポミオシンやトロポニン複合体(TnC, TnI, TnT)の遺伝子操作により、おのおの、シングルシステイン残基をもつ変異体を作り出して、そのシステイン残基それぞれに蛍光色素をラベルして、蛍光測定を行うことにより、トロポミオシン-トロポニン、トロポミオシン-アクチン、トロポニン-トロポミオシンの相互作用について明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理

キーワード：タンパク質・核酸の構造・動態・機能

1. 研究開始当初の背景

筋収縮は細胞内カルシウム濃度により制御されており、カルシウム受容タンパク質トロポニンがトロポミオシンと協同してアクチンとミオシンの相互作用を制御している。この制御メカニズムについては未だ明らかではない。アクチンやトロポミオシン、及びトロポニン分子の球状領域であるコアダメインの結晶構造は明らかになっているが、これらタンパク質がどのようにアセンブルしているかについては明らかではない。

2. 研究の目的

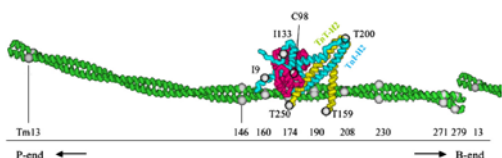
骨格筋の細いフィラメント上に結合して分子スイッチとして機能しているトロポニン-トロポミオシンがカルシウム濃度変化にどのように対応して構造変化を起こしてその情報をアクチンフィラメントに伝えていくのかを明らかにすることを主目的とする。その為に、トロポニン-トロポミオシンの動的構造解析を、蛍光測定法や示差走査熱量測定等の物理化学的測定によって進めていく。

3. 研究の方法

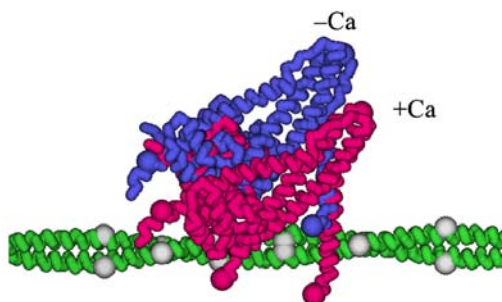
トロポニン-トロポミオシンのアクチンフィラメント上の構造変化を調べる蛍光測定には、ラベルを特異的な部位（特定アミノ酸残基）に導入する。この為に遺伝子操作により、タンパク質の特定部位にシングルシステイン残基をもつ変異トロポニンやトロポミオシンを調製する。また蛍光測定では、蛍光消光や蛍光エネルギー移動測定により、タンパク質の動的構造や、タンパク質の特定部位につけたラベル間の距離情報が得られ、これら測定法により、構造と機能との関連を明らかにしていく。

4. 研究成果

トロポニンサブユニットである TnC, TnI, TnT の特定アミノ酸残基をシングルシステインに変え、それぞれに蛍光エネルギー供与体を導入し、トロポミオシンの特定アミノ酸残基をシングルシステインに変え、そのそれぞれに蛍光エネルギー受容体を導入し、アクチンフィラメント上でのトロポニン上のラベルとトロポミオシン上のラベル間の蛍光エネルギー移動測定を行った。測定した蛍光エネルギー移動効率の値にもっともよく合致するトロポニンとトロポミオシンの配置を計算でもとめることにより、トロポニン-トロポミオシン複合体のアトミックモデルを作った。下図はカルシウム存在下（筋肉収縮活性化状態）でのトロポニン-トロポミオシン複合体のアトミックモデルを示す。



また、このモデルはカルシウムが存在する時と不在時（筋肉が弛緩状態）のトロポニン-トロポミオシン複合体の構造変化を示すことができた。下図にそれを示す。



これは従来の蛍光エネルギー移動測定とは違って、タンパク質高次構造解明の為に新しい手法を提供するものである。

この他、トロポミオシンの特定アミノ酸残基に導入した蛍光色素が、アクチンフィラメントやトロポニンと相互作用することで、溶液にたいしてのアクセシビリティがどのように変わるかを蛍光消光の実験により調べ、筋収縮制御メカニズムとして広く受け入れられているトロポミオシン分子のアクチンフィラメント上での大きな位置変化を前提とした立体障害説とは矛盾する結果を得ている。これらは、現在論文にまとめているところである。

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3件）

(1) Fluorescence Resonance Energy Transfer between Residues on Troponin and Tropomyosin in the Reconstituted Thin Filament: Modeling the Troponin-Tropomyosin Complex
Kimura-Sakiyama, C., Ueno, Y., Wakabayashi, K., and Miki, M.
J. Mol. Biol. (2008) **376**, 80-91（査読有り）

(2) Conformational Changes in Reconstituted Skeletal Muscle Thin Filaments Observed By Fluorescence Spectroscopy
Miki, M.
Adv. Exp. Med. Biol. (2007) **592**, 111-123（査読有り）

(3) Fluorescence emission from PAMAM and PPI dendrimers
Wang, D., Imae, T., and Miki, M.
Journal of Colloid and Interface Science (2007) **306**, 222-227（査読有り）

〔学会発表〕（計5件）

(1) Applications of fluorescence resonance energy transfer to muscle proteins.
Miki, M.
The 7th KIAS-Soongsil Conference on protein structure and Function. Soongsil University, Seoul, Korea（招待講演）

(2) Study of the dynamic structure of the

tropomyosin molecule in
muscle thin filaments by fluorescence
quenching measurements.
Takahiro Saitoh, Yousuke Matsuda, and
Masao Miki

日本生物物理学会第45回年会
2007.12.22 パシフィコ横浜

(3) 筋肉細いフィラメント上のトロポミオ
シン-トロポニンの構造変化

Miki, M.

生体運動研究合同班会議

2008.1.7 仙台市戦災復興記念館 記念ホール

(4) FRET between Residues on Tropomyosin
and Actin in the Reconstituted Thin
Filament: Modeling the Actin-Tropomyosin
Complex

T. Saitoh, Y. Ueno, C. Kimura, and M. Miki

日本生物物理学会第46回年会

2008.12.4 福岡国際会議場

(5) 再構成細いフィラメント上でのアクチ
ン-トロポミオシン残基間の蛍光エネルギ
ー移動測定:アクチン-トロポミオシン複
合体モデル

三木正雄, 斎藤隆広, 飛田英孝, 上野豊, 木
邑智恵子

生体運動研究合同班会議

2009.1.10 東京大学数理科学研究科

[図書] (計1件)

(1) アクチンの構造と機能

三木正雄

生物物理学ハンドブック(石渡信一他編集)

朝倉書店 (査読有り)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 正雄 (MIKI MASAO)

福井大学大学院工学研究科・教授

研究者番号: 30242580

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し