

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月12日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21510236

研究課題名（和文） 心筋症関連トロポニン変異体の蛋白質病理学

研究課題名（英文） Protein pathology of cardiomyopathy-related mutants of troponin

研究代表者

藤原 悟 (FUJIWARA SATORU)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究主幹

研究者番号：10354888

研究成果の概要（和文）：遺伝性心筋症発症の原因となる筋収縮調節蛋白質トロポニン変異体およびトロポニン野生体の構造・ダイナミクス解析を行った。X線小角散乱およびX線結晶解析による構造解析の結果、変異の導入により、変異部位付近の局所的な水素結合ネットワークの破れが起こり、構造の不安定化を引き起こし、取り得る構造の分布が変化することが明らかとなった。さらに中性子非弾性散乱によるダイナミクス解析の結果、トロポニン変異体の方が、構造の揺らぎがより大きくなることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Structural and dynamics analysis has been carried out on the mutants of troponin, the regulatory protein of muscle contraction, that cause cardiomyopathy. The results of small-angle X-ray scattering and X-ray crystal structure analysis showed that introduction of the mutation causes disruption of the local hydrogen-bond network around the mutation region, which makes the structure unstable, and thereby changing the distribution of possible conformations. Furthermore, the results of the dynamics analysis by neutron inelastic scattering showed that the troponin mutant shows larger structural fluctuations than the wild-type troponin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：活性発現の分子機構、遺伝性心筋症、トロポニン、X線小角散乱、結晶解析、中性子非弾性散乱、量子ビーム

1. 研究開始当初の背景

筋収縮の Ca^{2+} 濃度による調節機構は、骨格筋、心筋においては細いフィラメント上に存在する3種類のサブユニット（TnC, TnI, TnT）からなる蛋白質複合体トロポニン及びトロポミオシン（Tm）が担っている。この

筋収縮調節機構の解明は、生物物理学上の大きな問題の一つであるが、未だ全容解明には至っていない。

心筋症は、重症の不整脈や心不全を引き起こす難治性疾患であるが、種々の心筋蛋白質の遺伝的変異がその原因となることが知ら

れている。特に、心筋症発症原因となるトロポニン各成分の様々な部位での変異については、その機能異常が解析されており、 Ca^{2+} 感受性の亢進、抑制、そして Ca^{2+} 感受性の変化なしに最大活性を増大させる、という3種類に分類できることが知られている。こうした機能異常の由来を解明することは、疾病発症機構のみならず筋収縮制御機構の解明の上で重要である。

多くの疾病原因トロポニン変異は、 Ca^{2+} 結合部位やTm/アクチン結合部位、そしてTm結合領域付近など Ca^{2+} 調節に直接関係した部位に起こるが、 Ca^{2+} 調節に直接は関係しないITアームと呼ばれるコイルドコイル構造中にも変異(TnTの244番目の変異(E244D)及び247番目の変異(K247R))が見つかっている。これらの変異は、 Ca^{2+} 感受性の変化なしの最大活性の増大という異常をもたらす。ITアームは、調節頭部とTnTのTm結合領域を繋ぐ領域であり、各領域間の情報伝達を担うと考えられるため、E244DやK247Rの変異による機能異常の由来を調べることにより、トロポニン各サブユニットの相互作用の実体、及びその疾病発症に関わる異常の解明につながることを期待される。

2. 研究の目的

本研究は、心筋症原因変異E244D(TnT)及びK247R(TnT)によるトロポニンの機能異常の由来を明らかにすることを目的とする。特に、TnTの1残基の違いが、トロポニンの全体構造にどのような影響を及ぼすか、また、トロポニンの構造揺らぎにどのような影響があるか、を調べることを通して、機能異常の由来を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、2種類のTnT変異体の影響を調べるために、TnT野生体を含むトロポニンコアドメイン、TnT変異体(E244DあるいはK247R)を含むトロポニンコアドメイン(以下、野生体、E244D、K247Rと呼ぶ)を再構成した。そして、そのそれぞれについて、X線小角散乱実験を行った。測定は Ca^{2+} の有無の条件下で行い、変異によるトロポニンコアドメインの全体構造の変化と共に(筋肉中では収縮開始の引き金となる)TnCへの Ca^{2+} の結合による構造変化を調べた。全体構造の解析は、散乱曲線のギニエ解析による慣性半径の導出とともに、結晶構造に基づくモデル計算により行った。

また、野生体、E244D、K247Rのそれぞれの結晶化に成功したため、それぞれのX線結晶構造解析を行った。結晶構造解析から、それぞれの原子モデルを導出した。

さらにトロポニンの構造揺らぎを調べるために、蛋白質のダイナミクスを直接測定することのできる中性子非弾性散乱実験を行った。特に、蛋白質の柔らかさの直接的な指標を与えることのできる中性子非干渉性弾性散乱(EINS)実験を行った。EINS実験により、蛋白質の平均自乗変位が導出される。さらに平均自乗変位の温度変化から、蛋白質の柔らかさの(定性的な)直接の指標となる「見かけのばね定数」を得ることができる。野生体、およびX線小角散乱実験から揺らぎが大きいと推測されたK247Rについて、281Kから292Kの範囲で3K毎にEINS測定を行い、それぞれの柔らかさを解析した。

4. 研究成果

X線小角散乱

野生体、E244D、K247Rそれぞれの散乱曲線を蛋白質濃度0.6~2.2 mg/mlの範囲で測定し、得られた散乱曲線のギニエ解析を行い、慣性半径を導出した。慣性半径の蛋白質濃度依存性から、蛋白質間相互作用をゼロに外挿(蛋白質濃度ゼロに外挿)した状態での慣性半径を導出した。図1に、 $\pm\text{Ca}^{2+}$ の状態での慣性半径の濃度依存性を示す。また、表1に、ゼロ外挿した慣性半径の値を示す。ギニエ解析によりあわせて得られる $I(0)$ 値から、これらの慣性半径はトロポニンコアドメイン1分子の慣性半径に対応すると考えてよい。

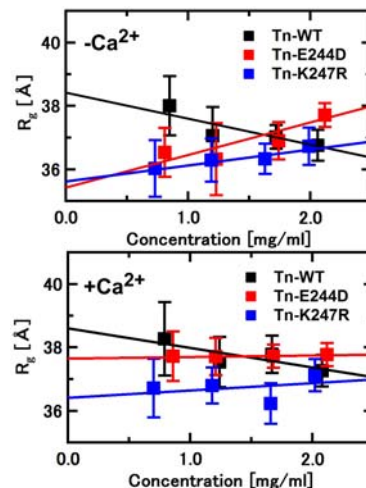


図1. トロポニンコアの慣性半径の蛋白質濃度依存性

表1. 慣性半径の相互作用ゼロへの外挿値

	- Ca^{2+}	+ Ca^{2+}
野生体	$38.6 \pm 1.4 \text{ \AA}$	$38.5 \pm 1.3 \text{ \AA}$
E244D	$37.7 \pm 1.0 \text{ \AA}$	$35.4 \pm 1.2 \text{ \AA}$
K247R	$36.4 \pm 1.1 \text{ \AA}$	$35.6 \pm 1.2 \text{ \AA}$

変異の導入により慣性半径が変化することが明らかとなった。これは変異により、トロポニンコアドメインの全体構造が変化することを示している。

この慣性半径の変化が、どのような構造変化に由来するかを明らかにするために、モデル計算による散乱曲線の解析を行った。最近、研究協力者の武田によって得られたトロポニンコアダメインの新たな結晶構造解析にもとづく原子モデルを出発点に、結晶解析では見えない領域をランダムループ構造で補填した構造を初期モデルとした。この構造中の 10 か所にピボット点を設定し、構造の回転を可能にするとともに、TnC の 2 つの領域間の距離の変化を可能にし、モデル構造を変化させて散乱曲線をフィットさせることにより、構造の探索を行った。構造の探索は遺伝的アルゴリズムを用いて行った。この探索により TnI と TnT により形成されるコイルドコイル構造および TnC の C 末端領域（この領域の構造は固いと考えられる）以外の領域の構造を変化させた構造探索が可能である（図 2 参照）。

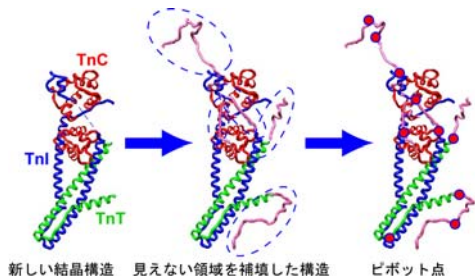


図 2. モデル計算の初期モデル

各状態（野生体、E244D、K247 のそれぞれについて Ca^{2+} の有無の状態）について 1000 回、計算を行い、とりうるべき構造の分布を得た。

解析の結果、まずトロポニンコアダメイン中の TnC は、歪んだ鉄アレイ型の構造をとる結晶中とは異なり、伸びた鉄アレイ型の構造をとること、 $+\text{Ca}^{2+}$ 状態では、 $-\text{Ca}^{2+}$ 状態よりもさらに伸びた構造をとることが明らかとなった。野生体、E244D、K247R のいずれも同様の結果が得られた。さらに TnC のコアダメイン内部の配向により 3 種類のコンフォメーション（図 3 の Model 1 Model 2

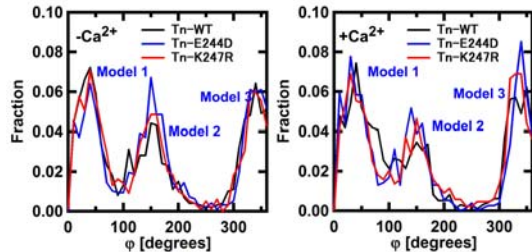


図 3. TnC の相対的配向を表わすパラメータの相対的ヒストグラム

さらに、野生体と変異体により、これら 3 種類のモデルの相対的な頻度が異なることが明らかとなった。これは、変異の導入によ

り、とりうる構造の分布が変化することを示唆している。

トロポニンコアダメイン全体の構造については、とりうる構造がかなりばらついていること、即ち構造の揺らぎが大きいことが明らかとなった。構造分布から、それぞれの状態の平均自乗偏差 (RMSD) を計算した結果、野生体と変異体で、その値が異なること、特に、 $+\text{Ca}^{2+}$ 状態で、変異体の RMSD が有意に大きくなることが明らかとなった（表 2）。

表 2. トロポニンコアダメイン全体の平均自乗偏差

	平均自乗偏差 (標準偏差) (Å)	
	$-\text{Ca}^{2+}$	$+\text{Ca}^{2+}$
野生体	35.8 (5.2)	32.2 (7.8)
E244D	35.6 (5.0)	34.8 (11.2)
K247R	36.2 (5.7)	35.2 (9.1)

※] は 95% 信頼区間で有意差のあることを示す。

さらに各領域の RMSD については、TnT の N 末端側が $+\text{Ca}^{2+}$ 状態において変異体の値が有意に大きくなることが示された。これは、変異の導入により、TnT の揺らぎが大きくなることを示唆している。また、TnT の平均位置を示すパラメータについても、野生体と変異体で有意な差があることが示された。

こうしたモデル計算による解析の結果、TnT の変異の導入によるトロポニンコアダメインの全体構造の変化は、特定の構造変化というよりは、とり得る構造の分布の変化およびゆらぎの大きさの変化によると結論された。これは、トロポニンの機能発現における蛋白質のゆらぎの重要性を示唆している。

これらの X 線小角散乱による成果は、現在、投稿準備中である。

X 線結晶構造解析

X 線小角散乱の解析から得られた構造の分布の変化がトロポニンコアダメイン内のような変化に由来するのかを調べるために、野生体、E244D および K247R の X 線結晶構造解析を行った。それぞれ分解能 2.0 Å、2.1 Å、2.4 Å での構造精密化が可能であった。図 4 は、得られたそれぞれの原子モデルを重ね合わせた図である。

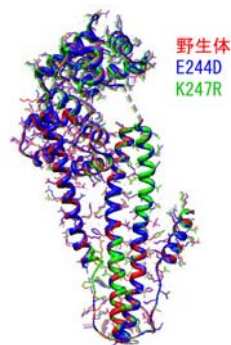


図 4. 野生体、E244D、K247R の原子モデル

全体の骨格構造は、いずれも非常によく似ていることが明らかとなった。側鎖の位置にも大きな違いは観測されない。野生体と変異体の違いがどこにあるかを明らかにするために、変異部位付近の水素結合ネットワークを調べた。図5は、それぞれの変異部位付近の構造を拡大したものである。野生体では、R79(TnI)から水和水を介してE244(TnT)、そしてK247(TnT)、E110(TnI)へとつながる水素結合ネットワークが、変異体においては途切れていること、特にE244Dにおいては、構造の揺らぎが大きいために残基R79(TnI)自体が見えないことが明らかとなった。

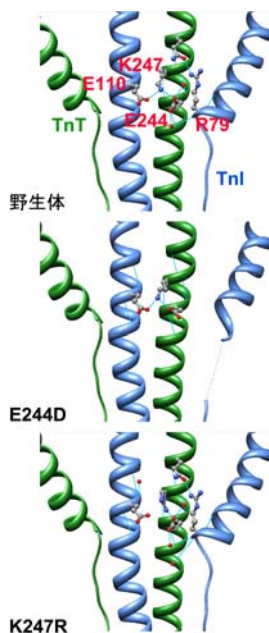


図5. 変異部位付近の水素結合ネットワーク

結晶中の分子間力による制限が加わる結晶構造においては野生体と変異体で全体の骨格構造に違いがほとんど見られない一方で、X線小角散乱により、分子間力による制限のない溶液中において構造分布の違いが観測されたことは、変異体による柔らかさや揺らぎの変化を示唆している。変異導入による変異部位付近の局所的な水素結合ネットワークの破れが構造の不安定化を引き起こし、全体的な構造分布の変化を引き起こすと考えられる。

これらの結晶構造解析の結果も、現在、投稿準備中である。

中性子非弾性散乱

X線小角散乱およびX線結晶構造解析により、トロポニンコアダメインにおける構造の柔らかさや揺らぎの重要性が示唆された。そこで、変異の導入によりトロポニンコアダメインの構造揺らぎに実際に変化が起こるかどうかを調べた。そのために中性子非弾性散乱法の一つである中性子非干渉性弾性散乱

(EINS) 実験を行った。X線小角散乱実験から、揺らぎの変化が大きいと予想される+Ca²⁺状態におけるK247Rと野生体の測定を行った。

280 Kから292 Kの範囲で、3 KごとにEINSスペクトルを測定し、そのスペクトルから各温度における平均自乗変位を導出した。図6に平均自乗変位(<u²>)の温度依存性を示す。

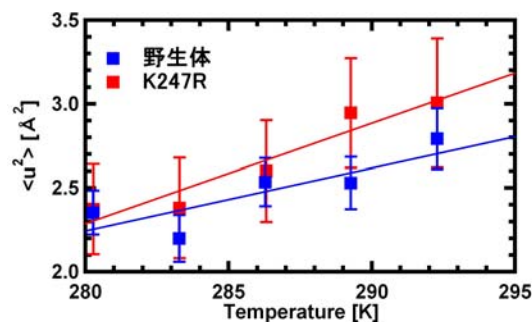


図6. 平均自乗変位の温度依存性

<u²>の温度変化の直線近似の傾きから、蛋白質の柔らかさの直接の指標となる「見かけのバネ定数」が導出される。野生体とK247Rの見かけのバネ定数は、それぞれ0.074 ± 0.032 N/m および0.046 ± 0.026 N/mと見積もられた。「見かけのバネ定数」は、蛋白質の柔らかさに反比例するので、これらの値は、K247Rの方が柔らかいことを示している。これは変異の導入により構造が不安定化したために構造の揺らぎが大きくなることを示唆しており、X線小角散乱およびX線結晶解析の結果と一致している。これらの結果は、同時に蛋白質の構造揺らぎの測定に中性子非弾性散乱が有効であることを示しており、中性子科学の観点からも重要な成果である。この成果についても現在、投稿準備中である。

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0件)

現在、投稿準備中である。

〔学会発表〕(計5件)

- ① 藤原悟「準弾性中性子散乱による生体高分子のダイナミクス解析」(招待講演) 第5回ソフトマター研究会、2012年3月28日、研究社英語センター(東京)
- ② 藤原悟「Structures and Dynamics of Cardiomyopathy-Causing Mutants of Troponin」(招待講演) International workshop “from Structure to Dynamics: for Our Understanding of Protein-Protein Interactions”, 2012年3月18日、北琵琶湖ホテルグラツィエ

(長浜)

- ③ 藤原悟「X線小角散乱による心筋症関連トロポニン変異体の構造研究」2012年生体運動研究合同班会議、2012年1月6日、筑波大学(つくば)
- ④ 藤原悟、松尾龍人、松本富美子、小田俊郎、武田荘一「Structural changes of troponin by cardiomyopathy-causing mutations」第49回日本生物物理学会年会、2011年9月18日、兵庫県立大学(姫路)
- ⑤ 藤原悟、米澤康滋、松本富美子、小田俊郎、武田荘一「Structural analysis of troponin mutants causing cardiomyopathy by small-angle X-ray scattering」第48回日本生物物理学会年会、2010年9月22日、東北大学(仙台)

[その他]

ホームページ等

<http://nsrc.jaea.go.jp/groups/dynamics.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 悟 (FUJIWARA SATORU)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究主幹
研究者番号：10354888

(2) 研究分担者

小田 俊郎 (ODA TOSHIRO)

理化学研究所・構造生理学研究グループ
X線構造解析チーム・チームリーダー
研究者番号：20321739

(3) 連携研究者

松本 富美子 (MATSUMOTO FUMIKO)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・任期付研究員
研究者番号：80321818

中川 洋 (NAKAGAWA HIROSHI)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究員
研究者番号：20379598

(4) 研究協力者

松尾 龍人 (MATSUO TATSUHITO)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・博士研究員
研究者番号：80321818

武田 荘一 (TAKEDA SOICHI)

国立循環器病研究センター・心臓生理機能部・室長
研究者番号：80332279