

## 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5月15日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570162

研究課題名（和文）蛍光エネルギー移動測定による骨格筋の細いフィラメントのアトミックモデル構築

研究課題名（英文）Construction of an atomic model of the skeletal muscle thin filament by FRET measurements

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

研究成果の概要（和文）：筋肉の細いフィラメント成分であるアクチン、トロポミオシン、トロポニンのそれぞれ特異的な部位に蛍光エネルギードナー分子とエネルギーアクセプター分子をラベルした。それらドナー・アクセプター間の蛍光エネルギー移動効率を求めた。一方、アクチン、トロポミオシン、トロポニンの結晶構造からの原子座標を用いて、これら成分を、あらゆる配置をとらせて、座標計算から距離を求め、この距離から計算でもとめる蛍光エネルギー移動効率を求めて、実測値と比べ、もっとも実測値にあう配置を求めることにより、アクチン、トロポミオシン、トロポニンのアトミックモデルを構築した。

研究成果の概要（英文）：Striated muscle thin filament is composed of actin, tropomyosin (Tm), and troponin (Tn). The fluorescence resonance energy (FRET) donor probe was labeled at the specific sites on tropomyosin or troponin, and the energy acceptor probes were labeled at the specific sites on actin. From these donor and acceptor pairs, FRET efficiencies were determined. Using the atomic coordinates of F-actin, Tm, and Tn, we searched all possible arrangements for Tn and Tm on F-actin to calculate FRET efficiency for each donor-acceptor pair in each arrangement. By minimizing the squared sum of deviations for the calculated FRET efficiencies from the observed efficiencies, we determined the location of Tm and Tn on F-actin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

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と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。1970年代に、筋繊維のX線小角散乱の実験データから、筋肉の弛緩状態では、トロポミオシンがアクチン上のミオシン相互作用部位を立体障害し、カルシウムが

トロポニンに結合すると、トロポミオシンはアクチン上の位置を大きく変えることにより、ミオシン相互作用部位の障害が無くなり、アクチンとミオシンが相互作用して、筋収縮が生じると推察された立体障害モデルが現在でも広く受け入れられている。しかし、生化学的実験データの幾つかは、この立体障害説と矛盾しており、また、蛍光エネルギー移動測定でトロポミオシンのアクチン上の位置変化を調べると、カルシウムの有無による位置変化はみられなかった。収縮制御のメカニズム解明には、細いフィラメントの詳細な構造の解明が待たれている。

## 2. 研究の目的

筋肉の細いフィラメントは、アクチン、トロポミオシン、トロポニンからなる。筋収縮制御メカニズムの解明は、細いフィラメントの詳細構造を知る必要がある。構成成分の結晶構造は報告されているが、それら構成成分がどのように集合し、活性化において、どのように構造変化するのかについては不明である。本プロジェクトにおいては各構成成分の特異位置に導入したラベル間の蛍光エネルギー移動効率を求め、そのデータを基に骨格筋の細いフィラメントのアトミックモデルをつくり、筋収縮制御のメカニズムを明らかにしていく。

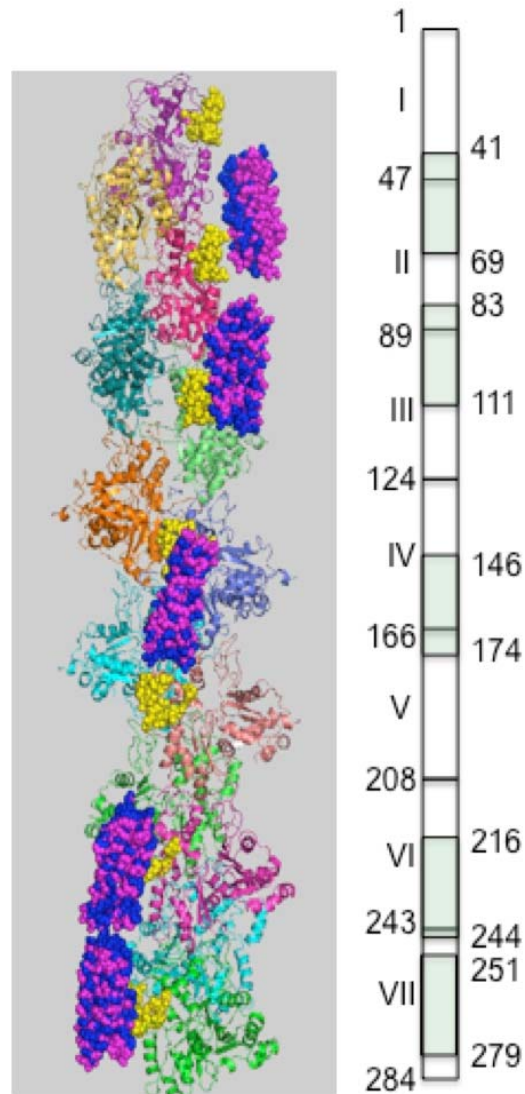
## 3. 研究の方法

トロポニン複合体 (TnC, TnI, & TnT) やトロポミオシンの特異的な部位 (特定アミノ酸残基) に蛍光エネルギードナー分子の IAEDANS (システイン残基の SH 基に特異的に結合する蛍光色素) をラベルする為に、遺伝子操作により、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サブユニットやトロポミオシンを調製する。一方、アクチン分子の Cys-374, Gln-41 および ADP 結合部位に、それぞれエネルギーアクセプター分子の DABMI, FLC, TNP-ADP をラベルする。それぞれ一組のドナー分子とアクセプター分子を取り込んだ F-actin-Tm-Tn 複合体で、カルシウムイオン存在下と不在下での蛍光エネルギー移動効率を測定する。一方、アクチン、トロポミオシン、トロポニンの結晶構造からの原子座標を用いて、これら成分を、あらゆる配置をとらせて、座標計算から距離を求め、この距離から計算でもとめる蛍光エネルギー移動効率を求めて、実測値と比べ、もっとも実測値にあう配置を求めることにより、アクチン、トロポミオシン、トロポニンのアトミックモデルを構築する。

## 4. 研究成果

(1) トロポミオシンのアミノ酸配列で 41-69, 83-111, 146-174, 216-244, 252-279

の領域にそれぞれ 5 つのシングルシステインをもつトロポミオシン変異体を使い、アクチンのラベルとの間の FRET 測定を行い、実験値と最もよく合致する配置を求め、トロポミオシンのこれら領域とアクチンとの複合体のアトミックモデルを作製した。



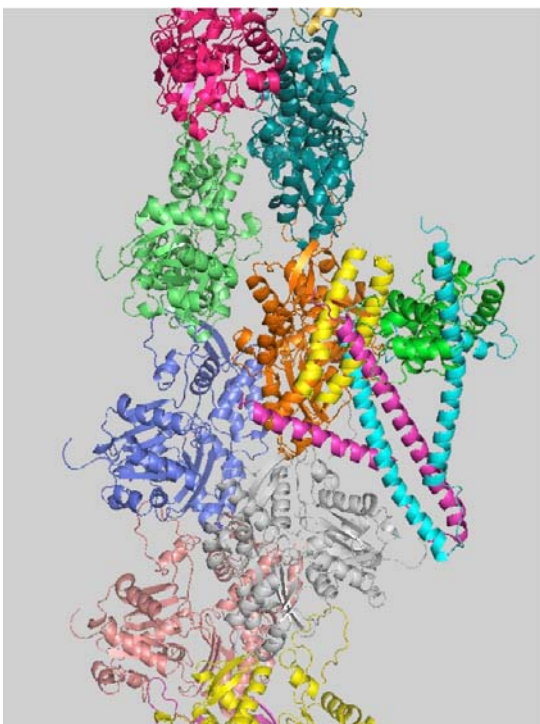
図のマジエンタ色はカルシウムイオン存在下の、青色は不在下のトロポミオシン (41-69, 83-111, 146-174, 216-244, and 251-279) を示す。アクチンフィラメント上の黄色球は、Flaherty 等によってトロポミオシン結合部位と示唆されたアミノ酸配列 217-236 の部分を示す。

(2) トロポニンコアドメインの結晶構造に含まれる残基の位置にシングルシステインをもつ 17 個の変異体 TnC, TnI, TnT を調製した。これらシングルシステインをもつトロポニン複合体を使い、アクチンのラベルとの間の FRET 測定を行い、実験値と最も良く合うトロポニンコアドメインのアクチンフィ

ラメント上の最適配置を得ることにより、トロポニンコアドメインとアクチンとの複合体のアトミックモデルを作製した。



図のマゼンタ色はカルシウムイオン存在下の、青色は不在下のトロポニンコアドメインを示す。



(3) カルシウムイオン存在下での (1) と (2) のモデルを統合してアクチン-トロポミオシン-トロポニンコアドメインからなるアトミックモデルを作った。

図の黄色リボンモデルはトロポミオシン (167-195)、トロポニンコアドメインの緑色は TnC を、赤色は TnT を、水色は TnI を示す。

(1) (2) (3) を通して、カルシウムの結合解離により、トロポニン-トロポミオシン複合体がアクチンフィラメント上でどのような構造変化をするのかについてのアトミックレベルでの 3次元像を得ることにより、筋収縮制御メカニズム解明に向けての大きな前進が得られた。

#### 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 4 件)

1. A Three-Dimensional FRET Analysis to Construct an Atomic Model of the Actin-Tropomyosin-Troponin Core Domain Complex on a Muscle Thin Filament  
Miki, M., Makimura, S., Sugahara, Y., Yamada, R., Bunya, M., Saitoh, T., & Tobita, H.  
*J. Mol. Biol.* (2012) **420**, 40-55. June (査読有)
2. A Three-Dimensional FRET Analysis to Construct an Atomic Model of the Actin-Tropomyosin Complex on a Reconstituted Thin Filament.  
M. Miki, S. Makimura, T. Saitoh, M. Bunya, Y. Sugahara, Y. Ueno, C. Kimura-Sakiyama & H. Tobita  
*J. Mol. Biol.* (2011) **414**, 765-782. (査読有)
3. Interaction sites of tropomyosin in muscle thin filament as identified by site-directed spin-labeling.  
K. Ueda, C. Kimura-Sakiyama, T. Aihara, M. Miki & T. Arata  
*Biophys. J.* (2011) **100**, 2432-2439. May (査読有)
4. Switch action of Troponin on Muscle Thin Filament as Revealed by Spin Labeling and Pulsed EPR  
T. Aihara, M. Nakamura, S. Ueki, H. Hara, M. Miki, and T. Arata  
*J. Biol. Chem.* (2010) **285**, n014, 10671-10677. April 2 (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. A Three-Dimensional FRET Analysis to Construct an Atomic Model of the Actin-Tropomyosin-Troponin Core Domain Complex on a Muscle Thin

Filament  
Masao Miki  
International Workshop “from  
Structure to Dynamics: for Our  
Understanding of Protein-Protein  
Interactions”  
2012. 3. 18. 北ビワコホテルグラツィエ  
(長浜)

2. A Three-Dimensional FRET Analysis to Locate the Troponin Core Domain on a Reconstituted Thin Filament  
三木正雄、牧村敏史、菅原康之、山田隆太、文屋正志、飛田英孝  
生体運動研究合同班会議  
2012. 1. 6. 筑波大学
3. 三次元 FRET 解析による F アクチン-トロポニンコアドメイン複合体のアトミックモデル構築  
三木正雄、牧村敏史、菅原康之、山田隆太、文屋正志、飛田英孝  
日本生物物理学会第 49 回年会  
2011. 9. 18 兵庫県立大学 姫路
4. 三次元 FRET 解析による F アクチン-トロポミオシン複合体のアトミックモデル構築  
三木正雄、牧村敏史、文屋正志、齊藤隆弘、菅原康之、飛田英孝  
生体運動研究合同班会議  
2011. 1. 7 大阪市大
5. FRET between probes on Actin and Tropomyosin in the Reconstituted Thin Filament for Constructing an Atomic Model of the FA-Tm Complex  
牧村敏史、文屋正志、齊藤隆弘、菅原康之、飛田英孝、三木正雄  
日本生物物理学会第 48 回年会  
2010. 9. 20 東北大学
6. Three-Dimensional FRET Analysis for Constructing an Atomic Model of the Muscle Thin Filament.  
三木正雄、飛田英孝、齋藤隆広、牧村敏史、文屋正志  
生体運動研究合同班会議  
2010. 1. 10 東京大学
7. FRET between Residues on Actin and the N-terminal region (83-111) of Tropomyosin in the Reconstituted Thin Filament.  
M. Bunya, S. Makimura, H. Tobita, and M. Miki  
日本生物物理学会第 47 回年会

2009. 11. 1 徳島文理大学

〔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 0 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：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