

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：82110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710255

研究課題名(和文) 心筋症関連トロポニン変異体を含む細いフィラメントのサブナノスケール病理診断

研究課題名(英文) Structure and dynamics measurements of thin filaments containing cardiomyopathy-causing mutant of troponin

研究代表者

松尾 龍人 (MATSUO, Tatsuhito)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター・研究員

研究者番号：60623907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円、(間接経費) 570,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心筋トロポニンの構造・ダイナミクスが、トロポニン分子内の心筋症病因変異によってどのような影響を受けるのかを解析した。まず、大腸菌発現系を用いて、野生型及び変異型(TnTのK247R変異)ヒト心筋トロポニンを精製した。これらの溶液試料に対して中性子散乱実験を行った結果、心筋症発症の原因となる変異導入によって、分子全体の柔らかさが約2倍になることが明らかとなった。また、ウシ心臓から精製した細いフィラメントのX線小角散乱実験を行い、トロポニンへのカルシウム結合に伴う構造変化を検出した。現在、変異トロポニンを組み込んだ細いフィラメントのX線小角散乱データの取得に取り組んでいる。

研究成果の概要(英文)：The effect of the cardiomyopathy-causing mutation in human cardiac troponin on its structure and dynamics was investigated. Troponin complex containing wild-type TnT2 or K247R mutant of TnT2 were reconstituted. Neutron scattering experiments on these solution samples have shown that the mutation causes the troponin molecule to be softer than the wild-type. The structural change of the native thin filament purified from a bovine heart upon calcium binding to TnC was detected by small-angle x-ray scattering (SAXS) experiments. The experiments to measure the structural change of the thin filament caused by the mutation of troponin are under way.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：トロポニン 中性子 X線 心筋症

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋や心筋の収縮は、筋細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化によって調節されている。この収縮調節機構は、アクチン、トロポニン (TnC, TnI, TnT の 3 つのサブユニットから構成される) 及びトロポミオシン (Tm) から成る細いフィラメントが担っている。TnC に  $Ca^{2+}$  が結合すると、これが引き金となって細いフィラメントに構造変化が起こり ( $Ca^{2+}$  活性化)、収縮へと繋がるのである。収縮調節機構の解明は生物学上の中核的問題の 1 つであるが、未だ全容解明には至っていない。これは特に、分子構造に基づく知見が不足していたためである。また、トロポニンの遺伝的変異が肥大型心筋症等の心臓疾患に繋がることが知られており、遺伝性心疾患発症の分子機構を解明するためにも収縮調節機構を分子構造に基づいて理解することが必要不可欠である。このような状況の中、トロポニンの結晶構造が近年明らかにされたことで、漸く収縮調節機構に対して分子構造に基づく解釈が可能となる時代に入った。

肥大型心筋症と呼ばれる心臓疾患は、突然死や心不全を合併する恐れのある重篤な難治性疾患であり、その約半数は心筋タンパク質の遺伝的変異に起因する。トロポニン分子内の点変異もこの内の 1 つであり、数多くの点変異が見出されている。これらの点変異は例えば、トロポニンの  $Ca^{2+}$  感受性の亢進や抑制といった機能異常を引き起こす。つまり、トロポニンの変異により細いフィラメントが担う収縮調節機構に異常が生じ、これが肥大型心筋症の発症に直結するのである。従って、トロポニンの変異によるトロポニン自身及び細いフィラメント全体の  $Ca^{2+}$  活性化に伴う構造変化やダイナミクス異常を明らかにすることは、心筋症発症の分子機構解明のみならず収縮調節機構の解明という点においても重要である。特に、TnC への  $Ca^{2+}$  結合による局所的な構造変化は IT アームと呼ばれる領域を通してトロポミオシンへ伝達されるため、トロポニンの変異の中でも IT アーム内部に生じる変異 (TnT の K247R 変異体) がトロポニンや細いフィラメント全体に及ぼす構造・ダイナミクス異常を明らかにすることが、情報伝達経路を含めた調節機構の全容を解明する上でも重要である。

## 2. 研究の目的

上記の背景に鑑み、本研究ではまず、トロポニン分子内の TnT K247R 変異によって生じるトロポニンのダイナミクス異常を中性子散乱によって明らかにした。そして、蛋白質単体から超分子複合体へと階層を上げ、トロポニン変異による細いフィラメント全体の構造変化の異常を検出するための基盤情報として、ウシ心臓から精製した正常な細いフィラメントのカルシウム有無条件下におけ

る構造変化を、X 線小角散乱法を用いて解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 中性子散乱実験

大腸菌発現系を用いて、Tn サブユニットを発現・精製した。TnT2 に関しては、野生型及び K247R 変異型を用いた。野生型及び変異型 TnT2 を含む Tn 複合体を再構成し、溶液試料を調製した。この溶液試料を用いて、280K - 292K の温度範囲において中性子非弾性散乱実験を行った。

### (2) X 線小角散乱 (SAXS) 実験

屠殺直後のウシ心臓を入手し、細いフィラメントを精製した。10mg/ml 濃度の溶液試料を用いて、SPRing-8 BL45XU において X 線小角散乱実験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 中性子散乱実験

測定した散乱スペクトルには、蛋白質分子を構成する原子に由来する平均自乗変位及び分子全体の拡散係数の両者の寄与が含まれている。そこで、動的光散乱 (DLS) 装置を用いて、中性子実験で用いたものと同じ組成の溶液中における Tn の並進拡散係数を決定した (図 1)。

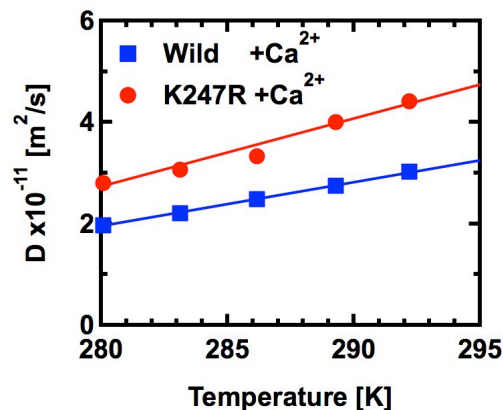


図 1. DLS 測定による並進拡散係数

この値を基に、各温度における中性子散乱スペクトルから平均自乗変位を導出した。平均自乗変異の温度依存性 (図 2) から、分子の柔らかさの指標となる「見かけのバネ定数」を導出することができる。野生型と変異型トロポニンについてこの物理量を計算したところ、野生型 0.07 N/m, 変異型 0.03 N/m であった。これは、分子内に変異が導入されることで、分子全体の柔らかさが約 2 倍に増大することを示唆している。

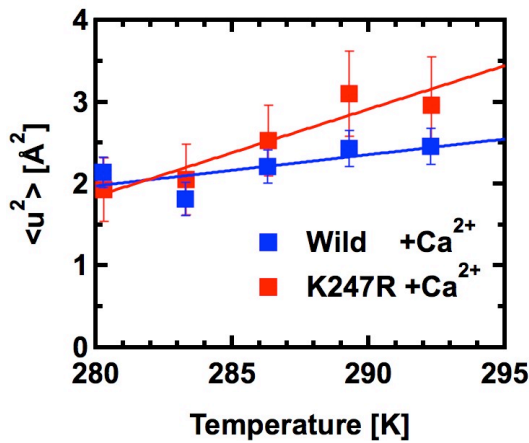


図 2. 平均自乗変位の温度依存性

(2) X 線小角散乱実験

カルシウム有無条件下で測定した細いフィラメントの SAXS 曲線を、原点散乱強度で規格化後に比較したものが下の図 3 である。

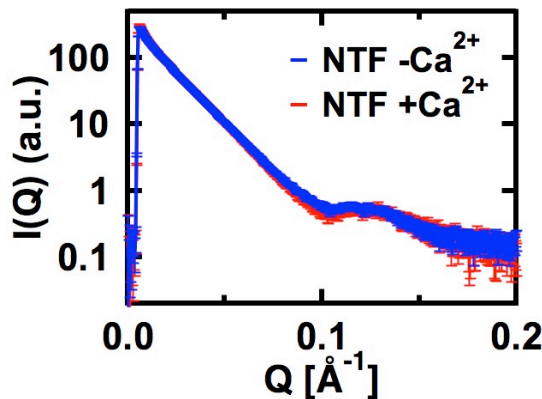


図 3. カルシウム有無の条件下における SAXS 曲線の比較

逆空間座標  $Q=0.06$  付近から  $Q=0.12$  にかけて、カルシウム有の条件では散乱強度プロファイルがカルシウム無の条件下と異なっていることが分かる。実際に、この 2 つの差分をとったプロファイルが図 4 である。トロポニンへのカルシウム結合に伴うこの強度変化は、細いフィラメントの構造変化を反映している。繊維回折パターンでは、細いフィラメント由来の第 1 層線、第 2 層線がそれぞれ  $S=1/360 \text{\AA}^{-1}$ ,  $1/180 \text{\AA}^{-1}$  の位置 ( $S=Q/2\pi$ ) に現れる。トロポニンへのカルシウム結合に伴い、第 1 層線強度が減少、第 2 層線強度が増大することがよく知られている。この強度変化は、トロポニンへのカルシウム結合に伴って、トロポミオシンがアクチンフィラメントの周辺を回転することによって生じると説明されており、筋収縮調節の立体障害説の根拠となっている。第 1 層線強度が現れる逆空間領域を円環平均すると、 $Q=0.06 \text{\AA}^{-1}$  となる。これは、図 4 における強度減少のピークにおける  $Q$  の値とほぼ一致する。従って、今回の実験

で検出した強度減少は、主にトロポミオシンの動きによるものだと考えられる。このトロポミオシンの動きが、アクチン・ミオシンによる力発生プロセスを直接調節していると考えられているため、トロポニンの変異によって  $Q=0.06 \text{\AA}^{-1}$  付近の散乱強度がどのように変化するかを調べるのが、肥大型心筋症発症の分子メカニズムをより一層理解するために必須である。この実験は、現在進行中である。

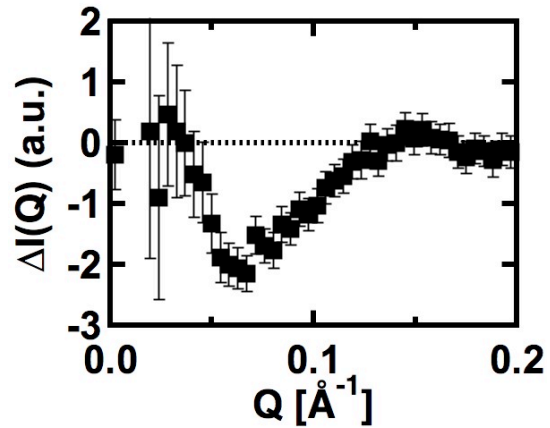


図 4. カルシウム有無条件下の SAXS 曲線差分

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)

Matsuo, T., Francesca, N., Plazanet M., Zaccai, G., Fujiwara, S. Dynamics of cardiomyopathy-causing mutant of troponin measured by neutron scattering. Journal of the Physical Society of Japan, 査読有, 82, 2013 SA0201-SA0205, DOI: 10.7566/jpsjs.82sa.sa020

[学会発表] (計 2 件)

① Matsuo, T., Oda, T., Arata, T., Fujiwara, S. Characterization of the structural and dynamic properties of hydration water around F-actin detected by neutron and X-ray scattering. Biophysical Society of Japan 51th annual meeting. (2013.10.30, Kyoto)

② Matsuo T., Francesca, N., Plazanet M., Zaccai, G., Fujiwara, S. Dynamics of cardiomyopathy-causing mutant of troponin measured by neutron scattering. 10<sup>th</sup> international conference on quasielastic neutron scattering and 5<sup>th</sup> workshop on inelastic neutron spectrometers. (2012.10.2, Nikko)

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 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

松尾 龍人 (MATSUO, Tatsuhito)  
日本原子力研究開発機構・原子力科学研究  
部門・量子ビーム応用研究センター・研究  
員  
研究者番号： 60623907

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：