

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24510313

研究課題名(和文) 蛋白質ダイナミクスから探る筋収縮調節機構

研究課題名(英文) The regulatory mechanism of muscle contraction studied in terms of protein dynamics

研究代表者

藤原 悟 (Fujiwara, Satoru)

国立研究開発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・研究主幹

研究者番号：10354888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：筋収縮は、筋肉細胞中のCa²⁺濃度により調節されているが、骨格筋、心筋では、その調節は、筋肉の「細いフィラメント」上の調節蛋白質が行っている。筋収縮調節における蛋白質ダイナミクスの役割を調べるため、Ca²⁺の有無の条件下での細いフィラメントの中性子非弾性散乱実験を行った。その結果、Ca²⁺の有無により細いフィラメントの柔らかさが変化することが明らかとなった。これらは、筋収縮調節における細いフィラメントのダイナミクスの制御の重要性を示唆している。さらに、調節蛋白質の心筋症関連変異体を含む細いフィラメントのX線小角散乱実験を行い、変異による細いフィラメントの構造変化を検出した。

研究成果の概要(英文)：Muscle contraction is regulated by Ca²⁺ concentration in muscle cells. This regulatory mechanism in skeletal and cardiac muscles lies in the regulatory proteins in "thin filaments" in muscle. In order to investigate the role of protein dynamics in the regulatory mechanism of muscle contraction, we carried out neutron scattering experiments on the thin filaments in the presence and absence of Ca²⁺. It was shown that as a function of Ca²⁺ concentration, flexibility of the thin filaments changes. This suggests that regulation of the dynamics of the thin filaments is important in the regulatory system of muscle contraction. Furthermore, small-angle X-ray scattering experiments on the thin filaments containing the cardiomyopathy-causing mutants of the regulatory proteins were carried out, and the structural changes of the thin filaments caused by the mutation were detected.

研究分野：生物物理学

キーワード：筋収縮調節 蛋白質ダイナミクス 中性子散乱 小角散乱

1. 研究開始当初の背景

筋収縮は、筋肉の「太いフィラメント」の主要成分である蛋白質ミオシンと「細いフィラメント」の蛋白質アクチンとの相互作用で起こる。筋収縮は Ca^{2+} 濃度により調節されるが、骨格筋・心筋では、その調節は、細いフィラメントの蛋白質トロポニン (Tn) 及びトロポミオシン (Tm) が担っている。低 Ca^{2+} 濃度状態において細いフィラメントはアクチン ミオシン相互作用が起らない状態にある。 Ca^{2+} 濃度上昇により、 Ca^{2+} が Tn (の成分の一つ TnC) に結合し、Tn-Tm の一連の構造変化を引き起こすことにより、アクチン ミオシン相互作用が可能な状態へと変化する。さらに、この状態の細いフィラメントにミオシン頭部が結合することにより、完全な活性化状態となる。筋収縮調節の分子機構は、細いフィラメント中の Tm の位置の違いにより、状態の違いが起こるとする「立体障害仮説」のように、細いフィラメントの構造変化という観点から説明されてきた。そのため、それぞれの状態での細いフィラメントの構造を明らかにすることが筋収縮調節機構解明の上での中心的な課題となり、様々な研究が行われてきた。しかしながら、未だ筋収縮調節の分子機構の全容解明には至っていない。

一方、アクチンは、らせん状重合体 (F-アクチン) を形成し、筋収縮のみならず細胞運動に関係した様々な機能を発現する。その機能多様性には F-アクチンの柔らかさが重要であるといわれている。その柔らかさによってはじめて様々なアクチン結合蛋白質との相互作用が可能となるからである。実際、F-アクチンは、構造状態の違いや、結合蛋白質により、異なった柔らかさを持つことが知られている。細いフィラメントは、F-アクチンの周りに Tm が巻き付き、さらに Tn が規則的に配置されているという構造をとるので、筋収縮調節機構は、Tn-Tm 系による F-アクチンの柔らかさの調節機構であるとみなすことができる。さらに、Tn 自身も構造の乱れた領域を持つことが知られており、その乱れた領域のゆらぎを利用して Tn がアクチンや Tm の相互作用部位を探するという Tn-アクチンや Tn-Tm 相互作用の Fly-casting モデルが提唱されている。このように蛋白質自身の柔らかさやゆらぎが、筋収縮調節機構において重要な役割を果たしている可能性がある。

蛋白質の柔らかさは、その運動特性 (ダイナミクス) に由来する。したがって、筋収縮調節機構の真の理解のためには、種々の状態における細いフィラメントの構造

という「静的」な構造を明らかにするのみではなく、それぞれの状態において「動的」な蛋白質ダイナミクスの特徴づけを行い、ダイナミクスと構造の相関を明らかにしなければならない。

2. 研究の目的

本研究は、蛋白質ダイナミクスという動的な視点から細いフィラメントを捉え、そのダイナミクス - 構造相関から筋収縮調節におけるダイナミクスの役割を明らかにし、筋収縮調節機構解明に資することを目的とする。そのため、蛋白質ダイナミクスの直接測定が可能な唯一の方法である中性子非弾性散乱法を用いて、骨格筋・心筋において筋収縮調節を担う細いフィラメントのダイナミクス測定を行う。そして細いフィラメントの種々の状態に対応するダイナミクスの特徴づけを行い、細いフィラメントの構造 - ダイナミクス相関を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

蛋白質ダイナミクスは、ピコ秒領域のアミノ酸側鎖やポリペプチド鎖の熱揺動からナノ～マイクロ秒領域のドメイン運動、そしてミリ秒領域の蛋白質全体の構造変化と、幅広い時空間領域にわたる階層性を持つ。本研究では、その素過程であるピコ秒領域の熱揺動に注目する。この熱揺動の存在により初めて蛋白質の構造変化ひいては機能発現が可能となること、そして、この熱揺動の振幅から蛋白質の柔らかさの直接の指標を得ることができることの故に、ピコ秒領域の熱揺動の解析は重要である。中性子非弾性散乱は、ピコ秒領域の熱揺動の直接測定が可能な唯一の方法である。(以下、このピコ秒領域の熱揺動をダイナミクスと呼ぶ。) 我々は、この中性子非弾性散乱法を用いて、細いフィラメントのダイナミクス測定を行った。

具体的には、ウシ心筋より単離精製した細いフィラメントを用いて、筋収縮が抑制されている低 Ca^{2+} 濃度状態、及び抑制が解除されアクチンとミオシンの相互作用が可能となる高 Ca^{2+} 濃度状態のそれぞれについて中性子非弾性散乱実験を行った。さらに比較の基準として調節蛋白質のない F-アクチンについても中性子非弾性散乱実験を行った。実験は、茨城県東海村の大強度陽子加速器施設 J-PARC の物質・生命科学実験施設に設置されているダイナミクス解析装置 (DNA) を用いて行った。

4. 研究成果

図1にDNAにより測定された中性子非弾性散乱スペクトルの例を示す。

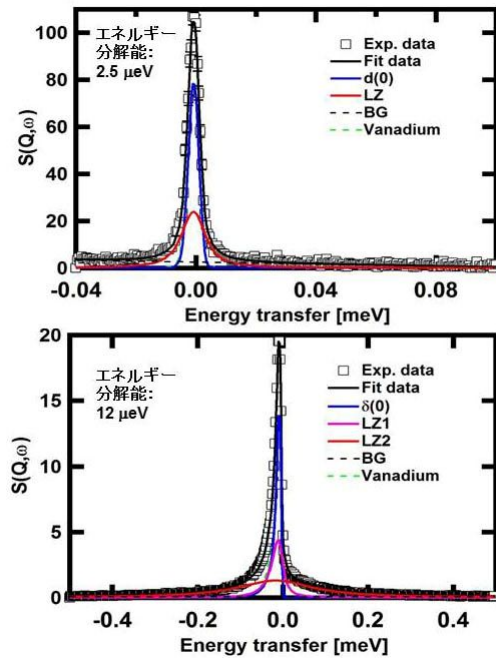


図1. 中性子非弾性散乱スペクトルの例。低 Ca^{2+} 濃度状態の細いフィラメントの 280 K におけるスペクトル。異なった2つのエネルギー分解能における測定を示す。

測定は、異なった2つのエネルギー分解能 (2.5 μeV 及び 12 μeV) において行った。異なったエネルギー分解能は異なった運動の時間領域 (それぞれ約 500 ピコ秒、約 110 ピコ秒) に対応する。これらのスペクトルを统一的に解析することで、100 ピコ秒~サブナノ秒領域の細いフィラメントのダイナミクスについての情報を得ることができる。

こうしたスペクトルに基づき、まず、細いフィラメント及び F-アクチンの平均自乗変位の温度依存性を調べた。図2に、その結果を示す。

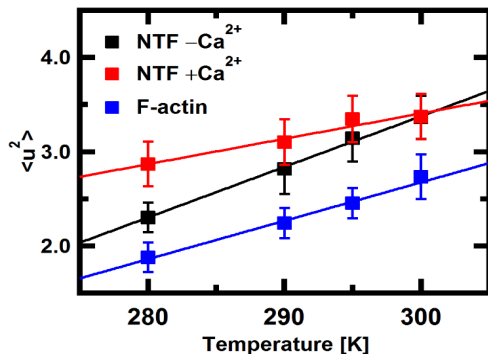


図2. 平均自乗変位の温度依存性。低 Ca^{2+} 濃度状態及び高 Ca^{2+} 濃度状態の細いフィラメント及び F-アクチン (それぞれ NTF-Ca^{2+} , NTF+Ca^{2+} , F-actin) の平均自乗変位 ($\langle u^2 \rangle$) の温度依存性を示す。

図2のデータ点の直線近似の傾きより、そ

れぞれの蛋白質系の柔らかさの指標である「実効的ばね定数」が得られる。低 Ca^{2+} 濃度状態及び高 Ca^{2+} 濃度状態の細いフィラメント及び F-アクチンの「実効的ばね定数」は、それぞれ、 $0.062 \pm 0.017 \text{ N/m}$ 、 $0.112 \pm 0.056 \text{ N/m}$ 、 $0.089 \pm 0.034 \text{ N/m}$ となった。これは、低 Ca^{2+} 濃度状態の細いフィラメントが最も柔らかく、次に F-アクチン、高 Ca^{2+} 濃度状態の細いフィラメントの順となることを示している。

さらに、これらの蛋白質系の運動の詳細を調べるために、図1に示したようなスペクトルをローレンツ関数 ($= (1/\pi) * \Gamma / (\Gamma^2 + \omega^2)$ 但し、 Γ はローレンツ関数の幅、 ω はエネルギー移動を表す) の和で近似する現象論的方程式による解析を行った。この解析は、運動全体を、蛋白質系を構成する水素原子の個々の運動の平均として記述するものであり、 Γ の変化等から運動に関するパラメータを得ることができる。

図3は、 Γ の変化から導出した運動の滞留時間のアレニウスプロットである。滞留時間の違いから、運動の速さは、低 Ca^{2+} 濃度状態の細いフィラメントと高 Ca^{2+} 濃度状態の細いフィラメントが同程度で F-アクチンが遅くなることが明らかとなった。

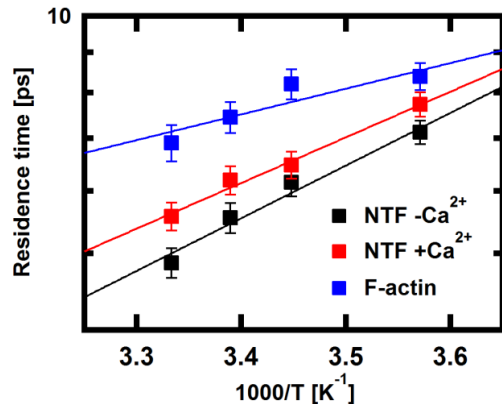


図3. 滞留時間のアレニウスプロット (滞留時間 vs. $1/(\text{温度})$)

さらに運動の振幅を調べるために、散乱スペクトルの強度の解析を行った結果、(1) これらの蛋白質系は、振幅の異なる2種類の運動を行う原子及び運動が遅いために見かけ上止まって見える原子からなること、(2) F-アクチンは、止まって見える原子の割合が大きいこと、(3) 低 Ca^{2+} 濃度状態の細いフィラメントにおいて、振幅の大きい運動をする原子の割合が大きいこと、(4) それぞれの蛋白質系の運動の違いは、運動の振幅の違いではなく、それぞれの運動を行う原子の割合の違いによることが明らかとなった。

以上、述べてきた結果をまとめると、低 Ca^{2+} 濃度状態の細いフィラメントの方が、高 Ca^{2+} 濃度状態の細いフィラメントよりも、運動の振幅が大きく、より柔らかいことを示している。さらに F-アクチンとの比較から、運動の大きい領域は、 T_n 及び T_m であることが示唆

された。この結果は、筋収縮調節の分子機構理解の上で重要な情報である。本成果は現在、論文投稿準備中である。

細いフィラメント中で運動の激しい領域を特定するためには、蛋白質を重水素化し、それらを用いた再構成フィラメントの中性子非弾性散乱測定を行い、重水素化されていない領域のみのダイナミクスの解析を行う必要がある。そのために、Tn および Tm の重水素化を行い、再構成フィラメントを調製した。しかしながら、研究期間中の J-PARC の事故や度重なる不具合のために運転停止が長期間続いたために、残念ながら、重水素化蛋白質含む再構成フィラメントの中性子非弾性散乱実験は実施できなかった。(この実験については 2016 年度以降、課題申請が再開されてから実施予定である。)

中性子非弾性散乱実験が実施不可能であった期間、上述の解析に加えて、Tn の心筋症関連変異体を用いた再構成フィラメントを用いて、X 線小角散乱実験を行い、Tn 変異体が細いフィラメント全体の構造に及ぼす影響を調べた。本来、心筋症関連変異体を用いた測定は研究計画には入っていなかったが、本研究後に、心筋症関連変異体を用いた研究を実施する予定だったので、その準備として適当な実験である。

野生型 Tn を含む再構成した細いフィラメント及び心筋症関連 Tn 変異体を含む再構成した細いフィラメントのそれぞれについて、低 Ca^{2+} 濃度状態及び高 Ca^{2+} 濃度状態において X 線小角散乱実験を行った。実験はあいち SR 光センターの小角散乱ビームライン (BL8S3) を用いて行った。断面のギニエ解析により、それぞれの状態における細いフィラメントの太さの解析を行った結果、心筋症関連変異体を含む細いフィラメントの方が太くなることが明らかとなった。これは、変異体の方が、Tn と Tm あるいはアクチンとの相互作用が弱いために、Tn の存在位置に異常があることを示唆しており、この異常が機能異常と関係していることを示唆している。本結果は、心筋症関連 Tn 変異体の機能異常の理解の上で重要である(論文投稿準備中)。これらの変異体を用いたダイナミクス解析への今後の研究展開が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

(2 編、投稿準備中)

〔学会発表〕(計 5 件)

「筋収縮調節機構と関連した筋肉の細いフィラメントのダイナミクス変化」
藤原悟、松尾龍人、山田武、柴田薫、
日本中性子科学会第 15 回年会、和光市民文化センター(埼玉県和光市) 2015 年 12 月 10 日~2015 年 12 月 12 日

“A view of the regulatory mechanism of muscle contraction from protein dynamics: a neutron scattering study of muscle thin filaments,” S. Fujiwara, T. Matsuo, T. Yamada, and K. Shibata, 第 53 回日本生物物理学会年会、金沢大学(石川県金沢市) 2015 年 9 月 13 日~2015 年 9 月 15 日

“Dynamical Behavior of Proteins Observed by Neutron Scattering –Quasielastic Neutron Scattering Study of Muscle Thin Filaments–,” S. Fujiwara, T. Matsuo, T. Yamada, and K. Shibata, *The 3rd Awaji international workshop on electron spin science and technology: Biological and materials science oriented applications (AWEST2015)*, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市), 14 June 2015 ~ 16 June 2015. (招待講演)

“Protein dynamics studied by neutron scattering.” S. Fujiwara, *Australia-Japan neutron science workshop: Sharing science with neutrons*, Sydney, Australia, 05 Nov. 2013 ~ 06 Nov. 2013. (招待講演)

“Changes in the dynamics of the muscle thin filament observed by neutron scattering,” S. Fujiwara, T. Matsuo, T. Yamada, N. Takahashi, K. Kamazawa, Y. Kawakita, and K. Shibata, 第 51 回日本生物物理学会年会、国立京都国際会館(京都府京都市) 2013 年 10 月 28 日~2013 年 10 月 30 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 悟 (FUJIWARA, Satoru)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究所・量子ビーム応用研究センター・研究主幹

研究者番号: 10354888

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

松尾 龍人 (MATSUO, Tatsuhito)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究所・量子ビーム応用研究センター・研究員

研究者番号: 60623907