

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26750367

研究課題名(和文) 心筋症の分子機構解明に向けた変異トロポニン分子内の局所ダイナミクス計測

研究課題名(英文) Dynamics measurements of a cardiomyopathy-causing mutant of troponin

研究代表者

松尾 龍人 (MATSUO, Tatsuhito)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター・主任研究員(定常)

研究者番号：60623907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Caの結合・解離により心筋収縮を調節するトロポニン(Tn)の変異が家族性心筋症を引き起こすことは広く知られている。しかし、変異によってTnの分子特性にどのような異常が起こるのかこれまで不明であった。そこで本研究では、野生型及びK247R変異型Tnの中性子準弾性散乱実験を行い、変異によるピコ秒領域の分子内運動変化を調べた。その結果、Ca結合によって野生型と変異型は逆のダイナミクス変化を示し、+Ca状態では変異型構成原子の運動振幅が野生型より大きくなることが分かった。変異による機能異常が生じるのは+Ca状態であることから、変異体分子内運動の振幅増大が心筋症発症と関連していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, effects of a cardiomyopathy-causing mutation on the picosecond dynamics of human cardiac troponin core domain (Tn-CD, which consists of TnC, TnI, and TnT2) were investigated using quasielastic neutron scattering (QENS). QENS measurements were conducted on solution samples of Tn-CD containing either the wild-type (WT) or the K247R mutant (MT) of TnT2. It was found that in the -Ca state, the mutation decreases the residence time of local atomic motions, suggesting that the hydrogen bond network within the Tn-CD is disrupted. Upon Ca-binding, while the amplitudes of atomic motions in the WT tended to decrease, those of the MT was found to increase, indicating that the atoms of the MT can explore larger conformational space than those of the WT. Since the functional aberration caused by the K247R mutation is observed only in the +Ca state, these data suggest that the larger amplitudes of the MT are related to the pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy.

研究分野：生物物理学, 中性子散乱, X線散乱

キーワード：トロポニン 心筋症 ダイナミクス 中性子散乱 タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

トロポニン<sup>1</sup>は、細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度変化を利用して骨格筋や心筋の収縮を調節する蛋白質であり、TnC、TnI、TnT という3つのサブユニットから構成される(図1)。そして、トロポニンはアクチン及びトロポミオシン(Tm)と共に細いフィラメントという超分子複合体を形成している。TnCに $Ca^{2+}$ が結合すると、その情報がTnI、TnTからTm及びアクチンへ構造変化として伝達され、収縮へ繋がるのである。

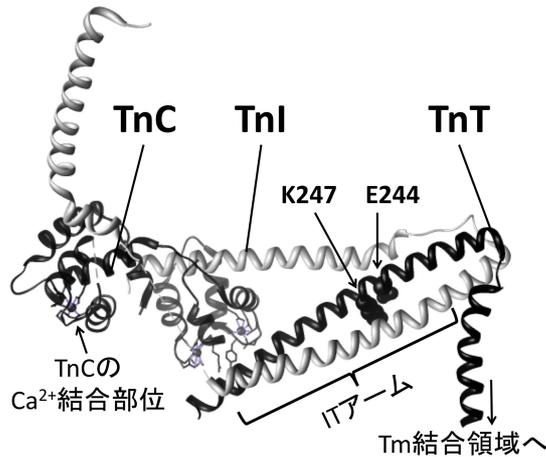


図1. トロポニンの構造

ところが、トロポニン分子内に点変異が起こると、上述の収縮調節機構に異常が生じ、肥大型心筋症等の家族性心筋症を引き起こすことが知られている。1990年代に心筋症原因となるトロポニン変異が発見されて以来、これまでに60を超えるトロポニン分子内の点変異が報告されており、変異の箇所に応じて、心筋の $Ca^{2+}$ 感受性変化や発生張力の増大といった機能異常が生じることが次々と明らかにされている(Harada&Morimoto, Jpn. J. Physiol. 54:307-318 (2004))。その一方、トロポニンの分子構造が不明であったために機能異常の分子メカニズム研究は困難であった。そのような中、2003年にヒト心筋トロポニンコアドメイン(Takeda et al., Nature 424:35-41 (2003); 図1のモデル)の結晶構造が解かれ、さらに計算機の性能向上と相まって、分子動力学計算による家族性心筋症発症機構の分子メカニズム研究が遂に始まった(例えば Manning et al., J. Mol. Biol. 421:54-66 (2012))。これらの研究では、幾つかのTnT1変異(TnTのTm結合領域を含む部分)を対象に分子動力学計算を行っており、コアドメインから遠く離れた部位の変異による局所変化が、分子の構造揺らぎを通して遠方まで伝達され、コアドメインに微細な構造変化を引き起こすことを明らかにしている。これは、トロポニン分子内の構造揺らぎが、変異による機能異常ひいては心筋症発症に中心的役割を果たすことを強く示唆している。

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(図1)を通して

Tmへ伝達されるため、心筋症発症機構の解明のみならず収縮調節機構の解明という観点から、トロポニン変異の中でもITアーム内部に生じる変異(TnTのK247R、E244D)に着目することが重要である。これらの変異は、 $Ca^{2+}$ 感受性を変化させずに発生張力を増大させるという機能異常を有する。蛋白質の構造揺らぎの時空間スケールは幅広い階層に及ぶが、ピコ秒領域でおこる原子運動(熱揺らぎ)は、より遅い時間領域で起こる大規模な構造変化の駆動力及び素過程としての役割を担う。従って、心筋症原因変異によるトロポニン分子のピコ秒領域ダイナミクスの変化を明らかにすることが、家族性心筋症発症の分子メカニズム解明において非常に重要である。本研究では、ITアーム内部に生じる変異の内、比較的最近になり発見されたK247R変異を研究対象とし、中性子準弾性散乱を用いてK247R変異によるトロポニンコアドメイン(Tn-CD)のピコ秒ダイナミクス変化を明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究では肥大型心筋症の原因となるTnTのK247R変異によって引き起こされるTn-CD分子内のダイナミクス(局所運動)異常を明らかにすることを目的とし、以下の手順で研究を遂行する。

- (1) 野生型及び変異型Tn-CDを、大腸菌発現系を用いて調製する。
- (2) (1)で調製した試料に対して、 $Ca^{2+}$ 有無の両条件における中性子非弾性散乱実験を行う。
- (3) 測定した一連のスペクトルの解析を通して、各状態における蛋白質ダイナミクス関連パラメータの抽出を行う。

以上の実験及び解析を通して得られる網羅的なダイナミクス情報を統合し、家族性肥大型心筋症の発症に繋がる変異がもたらすトロポニンの機能異常とダイナミクスの相関を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 試料調製

本研究では、野生型及びK247R変異型ヒト心筋Tn-CDの $Ca^{2+}$ 有無の両条件における重水溶液試料を用いた。Tn-CDの3つのサブユニットを、大腸菌発現系(BL21-DE3(pLys-S))を用いて個別に発現・精製した。その後、精製した3つのサブユニットを混合することでTn-CDを形成した。Tn-CDを凍結乾燥後、重水バッファー(50 mM HEPES (pD 8.0), 0.5 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 更に5 mM EGTA (- $Ca^{2+}$ 試料)または5 mM CaCl<sub>2</sub> (+ $Ca^{2+}$ 試料))を用いて21-23 mg/mlの蛋白質濃度に調製した。これらの溶液を、アルミ製2重円筒セル(試料部

分の厚み 1 mm)へ注入し、インジウムワイヤで密閉した。試料セルの気密性をチェックするため、デシケータにて 15 分間減圧し、減圧の前後でセル重量に変化が無いことを確認した。

### 3-2. 中性子準弾性散乱実験

中性子準弾性散乱実験は、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 MLF に設置されている背面散乱型分光器 BL02 DNA を用いて行った。エネルギー分解能 12  $\mu\text{eV}$  (55 ピコ秒より速い運動)、300K の温度において、各試料の露光時間を 18 時間として QENS スペクトル測定を行った。運動量と散乱中性子のエネルギー変化の関数として得られる 2 次元の QENS マップは、IGOR Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) 内で独自に作成したマクロを用いて Q 方向に分割し、各 Q におけるエネルギー方向の 1 次元スペクトルを得た。このスペクトルを、分子全体の重心運動を表すローレンツ関数 ( $(1/\tau) \times (Q)^2 / ((Q)^2 + \tau^2)$ )、但し  $\tau(Q)$  はローレンツ関数の半値幅、 $\tau$  は散乱中性子のエネルギー変化)と局所運動を表すローレンツ関数を含む式でフィッティングし、各ローレンツ関数の半値幅(それぞれ  $\tau_{\text{Global}}(Q)$  及び  $\tau_{\text{Local}}(Q)$ )を導出した。これらの Q 依存性から、重心運動や局所運動のダイナミクスパラメータを得ることができる。重心運動に関しては、見かけの拡散係数(分子の並進及び回転運動を含む)を、局所運動に関しては、原子の滞留時間、原子の運動振幅、そして現在のエネルギー分解能では観測できないほど遅く運動している原子の割合を導出した。以下では、変異による差が観測された局所運動(滞留時間と運動振幅)について記述する。

## 4. 研究成果

### 4-1. $-\text{Ca}^{2+}$ 状態において変異がもたらすダイナミクス変化

図 2 に QENS スペクトルのフィッティング例を示す。また、フィッティングから得られた、局所運動を反映するローレンツ関数の半値幅  $\tau_{\text{Local}}(Q)$  の  $Q^2$  依存性を図 3 に示す。

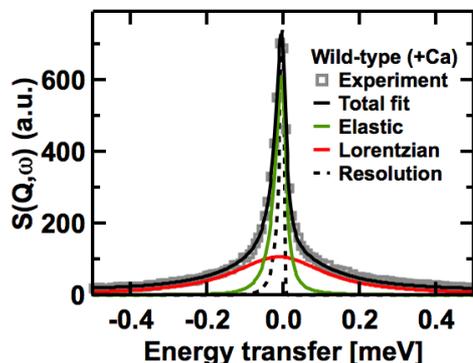


図 2. QENS スペクトルフィッティングの例 (Biochem. Biophys. Acta. 1865:1781-1789 (2017)より引用改変)

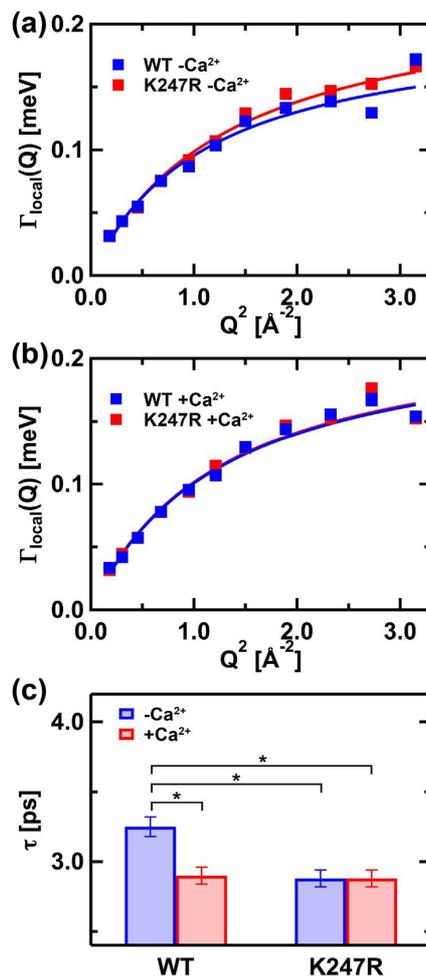


図 3. (a), (b)  $\tau_{\text{Local}}(Q)$  の  $Q^2$  依存性. (c) 滞留時間の比較. \*は  $p < 0.05$  を示す. (Biochem. Biophys. Acta. 1865:1781-1789 (2017)より引用)

$\tau_{\text{Local}}(Q)$  の  $Q^2$  依存性から導出した滞留時間を比較すると、 $-\text{Ca}^{2+}$  状態では変異によって有意に減少していた。つまり、変異体では原子が野生型よりもより頻繁にジャンプ運動をしていることを示している。Tn-CD の分子動力学計算によると、変異残基近傍の水素結合ネットワークが乱れることが分かっており (Matsumoto et al., BBRC, 2009) この水素結合の破壊による原子運動抑制解除が、滞留時間減少の原因であると解釈される。

一方、原子運動の振幅には変異による影響は見られなかった(図 4(a))。この結果は、野生型と変異型構成原子の運動空間に違いが無いことを示唆しており、 $-\text{Ca}^{2+}$  状態で機能異常が観測されないことと関連していると考えられる。

### 4-2. $\text{Ca}^{2+}$ 結合に伴うダイナミクス変化

野生型に  $\text{Ca}^{2+}$  が結合すると、滞留時間が有意に減少し、運動振幅も減少する傾向が見られた。TnC に  $\text{Ca}^{2+}$  が結合すると、TnI の一部が TnC に結合することが広く知られており、これが運動振幅の減少に関連していると解釈

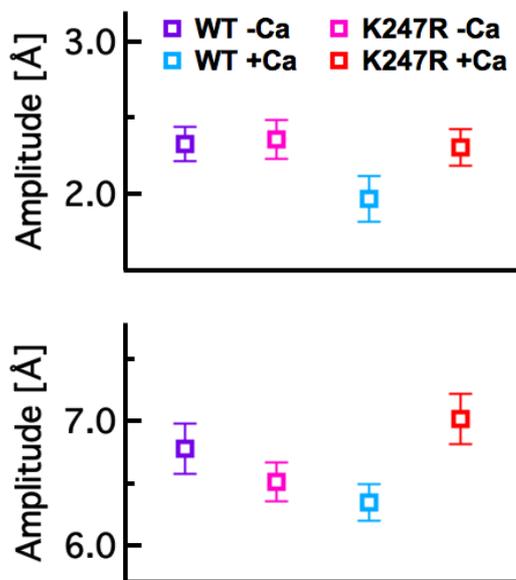


図 4. 原子運動の振幅．異なる振幅を持つ 2 種類の原子集団を仮定して解析した．(Biochem. Biophys. Acta. 1865:1781-1789 (2017)より引用改変)

される．また，H/D 交換質量分析法によると (Kowlessur et al., J. Biol. Chem. 287:42299-42311, 2012)，Ca<sup>2+</sup>結合により H/D 交換が促進される領域の水素原子数が，H/D 交換が抑制される領域の水素原子数よりも多い．従って，滞留時間の減少はこれらの変化を反映していると考えられる．また，Ca<sup>2+</sup>結合により H/D 交換が促進される領域は TnT2 の N 末端近傍領域を含むため，この領域の Ca<sup>2+</sup>結合による揺らぎ頻度の増大が，T<sub>m</sub> へ収縮制御信号を正常に伝達するのに必要だと考えられる．

一方，変異体では Ca<sup>2+</sup>結合に伴い，滞留時間は変化せずに運動振幅が増大した．変異体では -Ca<sup>2+</sup>状態において，野生型よりも滞留時間が減少しているため，このダイナミクス変化により Ca<sup>2+</sup>結合に対する応答性が変化する可能性が示唆される．そのために，Ca<sup>2+</sup>が結合した時に野生型とは異なり滞留時間が変化せず，さらに運動振幅は野生型とは逆の変化である増大を示す．

#### 4-3. 変異によるダイナミクス変化と機能異常

+Ca<sup>2+</sup>状態では，野生型と変異型の間に滞留時間の差は認められないが，野生型よりも変異体の方が，有意に運動振幅が大きくなっている．このことは，変異体構成原子の構造空間が，野生型よりも広いことを示唆している．我々は，野生型及び K247R 変異型 Tn-CD の X 線小角散乱より，変異によって TnT2 の N 末端領域が Tn-CD 分子重心へ近づき，コンパクトな構造を取ることを見出した (Matsuo et

al., Biophys. Physicobiol. 12:145-158, 2015)．変異体の原子運動振幅の増大は，この構造が大きく揺らいでおり不安定であることを示唆している．特に，TnT2 の N 末端領域は T<sub>m</sub> と直接相互作用する TnT1 との接続領域であるため，変異によるこのような構造・ダイナミクス変化は Tn-T<sub>m</sub> 相互作用を変調させ，収縮制御信号の伝達に異常をきたすと考えられる．機能異常が観測されるのは +Ca<sup>2+</sup>状態であるため，本研究で明らかとなった変異がもたらす原子運動振幅の増大が，機能異常ひいては心筋症発症と関連があると結論づけられる．

現在では，疾病関連蛋白質の原子構造に基づく創薬 (Structure-Based Drug Design: SBDD) が盛んに行われているが，本研究で明らかにした疾病原因変異による分子ダイナミクス異常を，正常に戻すことで疾患を治療するような低分子化合物を探索・合成することで，疾病関連蛋白質の分子内揺らぎに基づく全く新しい創薬プロセス (Dynamics-Based Drug Design: DBDD) を開拓することができると考えられる．

#### 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 7 件)

Matsuo, T., Tominaga, T., Kono, F., Shibata, K., Fujiwara, S. “Modulation of the picosecond dynamics of troponin by the cardiomyopathy-causing mutation K247R of troponin T observed by quasielastic neutron scattering” Biochim. Biophys. Acta. 1865:1781-1789 (2017). 査読有り

Fujiwara, S., Chatake, T., Matsuo, T., Kono, F., Tominaga, T., Shibata, K., Sato-Tomita, A., Shibarayama, N. “Ligation-dependent picosecond dynamics in human hemoglobin as revealed by quasielastic neutron scattering” J. Phys. Chem. B. 121:8069-8077 (2017) 査読有り

Matsuo, T., Arata, T., Oda, T., Nakajima, K., Ohira-Kawamura, S., Kikuchi, T., Fujiwara, S. “Difference in the hydration water mobility around F-actin and myosin subfragment-1 studied by quasielastic neutron scattering” Biochem. Biophys. Rep. 6:220-225 (2016) 査読有り

Fujiwara, S., Araki, K., Matsuo, T., Yagi, H., Yamada, T., Shibata, K., Mochizuki, H. “Dynamical behavior of human  $\alpha$ -synuclein studied by quasielastic neutron scattering” PLoS ONE 11(4):e0151447 (2016) 査読有り

松尾龍人, 藤原悟 “蛋白質水和水の多様性-中性子・X線散乱による水和構造・ダイナミクス解析-” 日本中性子科学会誌『波紋』26:130-134 (2016) 査読有り

Matsuo, T., Takeda, S., Oda, T., Fujiwara, S. Biophys. Physicobiol. “Structures of the troponin core domain containing the cardiomyopathy-causing mutants studied by small-angle x-ray scattering” 12:145-158 (2015) 査読有り

Matsuo, T., Arata, T., Oda, T., Nakajima, K., Ohira-Kawamura, S., Kikuchi, T., Fujiwara, S. “Internal dynamics of F-actin and myosin subfragment-1 studied by quasielastic neutron scattering” Biochem. Biophys. Res. Commun. 459:493-497 (2015) 査読有り

〔学会発表〕(計5件; 招待講演のみ記入)

**松尾龍人**, 荒田敏昭, 小田俊郎, 中島健次, 河村聖子, 菊地龍弥, 藤原悟, “中性子準弾性散乱によるタンパク質と水和水のダイナミクス解析” DIRECTION2017 (2017)

Matsuo, T. “Picosecond dynamics of proteins and hydration water studied by quasi-elastic neutron scattering.” Neutron Biology for Next Generation (2017)

**松尾龍人**, 荒田敏昭, 小田俊郎, 中島健次, 河村聖子, 菊地龍弥, 藤原悟, “中性子準弾性散乱で観る筋収縮蛋白質と水和水のピコ秒ダイナミクス” 第6回量子ビームサイエンスフェスタ (2017)

Matsuo, T., Arata, T., Oda, T., Fujiwara, S. “Neutron scattering studies on the dynamics of F-actin, myosin subfragment-1, and their hydration water.” The 4<sup>th</sup> Awaji International Workshop on Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications. (2016)

Matsuo, T., Arata, T., Oda, T., Fujiwara, S. “Dynamics of F-actin, myosin subfragment-1 (S1), and their hydration water studied by quasielastic neutron scattering” Biophysical Society of Japan 53<sup>th</sup> annual meeting (2015)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松尾 龍人 (MATSUO, Tatsuhito)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター・主任研究員(定常)