

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23612005

研究課題名(和文) 分子動力学予測による心筋症発症機序を放射光回折で検証：分子内応力に伴う 螺旋の歪

研究課題名(英文) Structural study of cardiomyopathy-causing mutation revealed by X-ray diffraction and molecular dynamics

研究代表者

山口 真紀 (Yamaguchi, Maki)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：30271315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：変異トロポニンT導入心筋を用いたX線回折実験の結果から、E244D変異体では野生型と比べてサブユニットTからトロポミオシン/アクチンへの構造シグナルの伝達効率が過剰であることが張力増強の原因となると考えられた。一方、トロポニン分子の分子動力学計算の結果から、K247R変異トロポニンではサブユニットIとサブユニットT間の構造シグナル伝達異常により張力増強をもたらすと考えられた。以上より、これらの2つの変異はトロポニンのITアーム領域に隣接して存在するが、その病態発生の分子機序は両者で大きく異なることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The E244D- and K247R-troponin-T (TnT) mutants, which cause familial hypertrophic cardiomyopathy, have been shown to enhance calcium-dependent contraction on cardiac muscle. To clarify the mechanism of this enhancement, we performed molecular dynamics simulation of troponin molecule as well as X-ray diffraction experiments with cardiac muscle fibers to which wild-type/E244D/K247R mutant TnT had been introduced in the absence of troponin I (TnI). When E244D-TnT was introduced into the cardiac fibers, in intensity ratio of the equatorial reflection (1,1/1,0), which reflects amount of the interacting myosin to actin increased compared with those to which wild-type-TnT were introduced. On the other hand, molecular dynamics simulation revealed that interaction between TnT and TnI were changed in K247R-TnT mutants. These results indicate that in these two mutants, enhanced tension development would be induced by totally different mechanisms to trigger the hypertrophy of cardiac muscle.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：メカノバイオロジー

キーワード：心筋症 X線回折 分子動力学

1. 研究開始当初の背景

家族性肥大型心筋症の原因として重要なK247Rトロポニン変異体について外力の下での分子動力学シミュレーションを実施した結果、肥大の原因となる心筋細胞の張力増強の分子メカニズムが、K247R変異による局所的な静電結合の組み換えにより、カルシウムにより惹起されるトロポニンサブユニットの構造変化に対するトロポニンサブユニットの反応性が異常となることを根本原因とすることが示唆された。

2. 研究の目的

トロポニン分子内(特にサブユニットIからサブユニットT)での収縮シグナル伝達異常を検出できるトロポニン分子の分子動力学解析に加えて、トロポニン分子(特にサブユニットT)とトロポミオシン/アクチンへの収縮シグナル伝達異常の検出を目的とした変異トロポニンT導入心筋線維のX線回折実験を併せ行うことで、トロポニン変異によって惹き起こされる家族性心筋症の原因となる張力増強メカニズムを多角的に検証する。

3. 研究の方法

変異トロポニンT(K247R、E244D)導入筋での放射光回折実験と大規模分子動力学解析を併せ行い、各々の変異体で張力増強の基盤となる構造変化を探索した。

1) 変異トロポニンの作成

ヒト心筋トロポニンTのcDNAをヒト心筋mRNAからRT-PCRにより増幅し、クローニング(pBluescript SKT)ベクターに組み込んだ後に、オリゴヌクレオチドを用いてPCR法により変異を導入した。発現には低温発現ベクターと大腸菌(BL21)を用い、アフィニティークロマトグラフィにより精製した。

2) トロポニン入れ替え法による骨格筋細胞への変異トロポニン導入

Hatakenakaらの方法(Hatakenaka et al., Eur J Biochem. 205, 985-993, 1992)に基づき、大過剰の変異トロポニンTを含む人工細胞内液に心筋細胞を浸し、内因性のトロポニン(T・I・C複合体)を変異トロポニンTと置き換えることで、変異トロポニンT導入心筋を作成した。

3) 放射光施設(高エネルギー研究所およびSPring8)での回折実験

光学系の調整

標本の調整

変異トロポニンT導入心筋標本を放射光透過性のある石英ガラス(特注品)を利用した回折実験用セルの間に10本ほど並列に配置し、ペルチェ素子で温度管理をしながら溶

液を灌流した。

回折像の取得

He-Neレーザーで筋節長を確認後標本を回折装置にマウントし、弛緩または収縮状態の回折像をイメージングプレートに記録した(温度20℃、露出15秒)。

4) 回折像の解析

Visual Basic(ver.6)/MATLAB(ver.7.0.4)で作成した画像解析プログラムを使用して記録画像を加算し、トロポニン周期と強度、赤道反射強度(1, 1および1, 0反射)を測定した。

5) 分子動力学計算の追加

トロポニン分子内でのサブユニットIからサブユニットTへの信号伝達過程の異常を統計的に解析するために、E244D変異体とK247R変異体について大規模(各変異体と野生型について異なる初期速度で30例×2ナノ秒)分子動力学計算を行った。

6) 分子動力学解析と放射光回折実験の結果の照合

分子動力学計算の結果と放射光回折実験の結果を照合した。

4. 研究成果

1) 変異トロポニン導入心筋の放射光回折

野生型またはE244D/K247R変異トロポニンTを導入した心筋からトロポニン反射を明瞭に分離できる良好なX線回折像を得ることに成功した(図1;野生型についての一例)。トロポニンの構造を反映するトロポニン子午反射(矢印)の周期には野生型と変異型で差がみられなかった。これより、変異型トロポニンと野生型トロポニンでは細いフィラメント上でのトロポニンの結合位置に明らかな違いがないことがわかった。

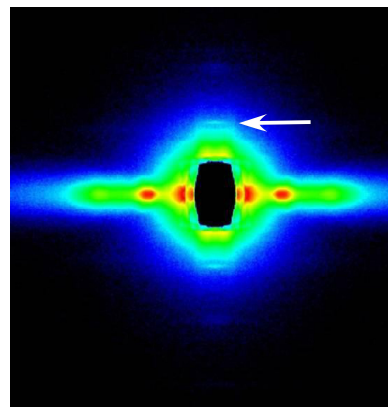


図1

一方トロポミオシン上でのトロポニンの立体構造を反映する子午線近傍でのトロポニン反射強度は、E 2 4 4 D変異トロポニンT導入心筋では、野生型と比較して収縮状態の強度差が増大する傾向が見られ、E 2 4 4 D変異トロポニンT導入心筋では収縮時のトロポミオシン上でのトロポニンの立体構造が野生型やK 2 4 7 R変異トロポニンT導入心筋と比べて変化していることが示唆された(図2)。

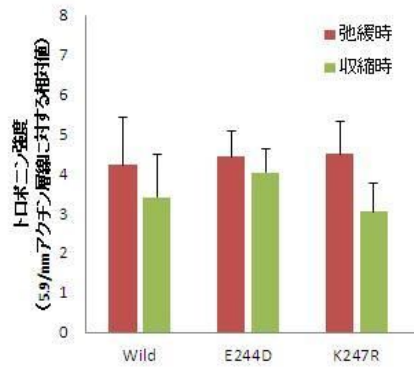


図2

また、ミオシン頭部とアクチンとの反応性を反映する赤道反射強度比(1, 1/1, 0)は、E 2 4 4 D変異トロポニンT導入心筋では弛緩状態で野生型に比較して増強していた。この結果から、E 2 4 4 D変異トロポニンT導入心筋では弛緩状態でトロポミオンが既に活性化状態となっており、ミオシン頭部のアクチンとの反応性が増していることが示唆された(図3)。

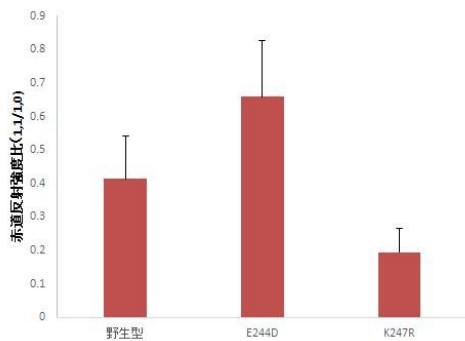


図3

2) 大規模分子動力学計算

K 2 4 7 R変異トロポニンとE 2 4 4 D変異トロポニンについての大規模分子動力学計算(それぞれの変異体と野生型について30例ずつ×2ナノ秒)を行い、サブユニットIに収縮時にかかると予測される弾性力を加えた場合のサブユニットTの構造歪を評価し、各変異型のトロポニン内部での相互作用の強さを評価した。変異型トロポニンの初期構造は野生型トロポニン複合体(ヒト心筋ト

ロポニン複合体 PDB ID: 1E1J)のサブユニットTのE 2 4 4とK 2 4 7をプログラムユニット“xleap”を用いてそれぞれD(グルタミン酸)とR(アルギニン)に置き換えたものを用いた(図4)。

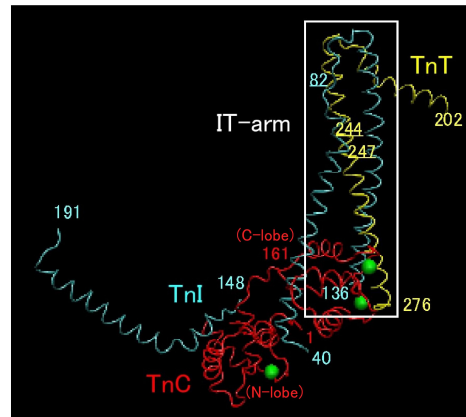


図4

これらの構造をもとに、収縮時にかかると予測される弾性力をサブユニットIの一端に添加すると、サブユニットTの構造が歪み、サブユニットT両端の距離が短縮した。(図5)。

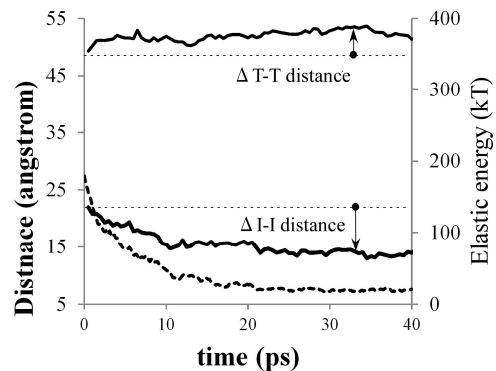


図5 トロポニンサブユニットIの一端にかけた力によって惹き起こされるサブユニットIとサブユニットTの歪。I-I distance; サブユニットI両端間距離の変化量, T-T distance; サブユニットT両端間距離の変化量)

サブユニットIからサブユニットTへの構造シグナルの伝達効率を統計的に評価するために、T-T distanceとI-I distanceの比を求め(= responsiveness index と定義)、比較した。

野生型トロポニンでは Responsiveness index はおよそ-0.1付近の値に収束し、サブユニットIの両端間距離が減少するにつれてサブユニットTの両端間距離は増加することがわかった。E 2 4 4 D変異体では野生型と比較して、値の平均値やばらつきともに有意な違いは認められなかった。一方K 2 4 7 R変異体では、値が大きく負の方向にばらついた(図6)。

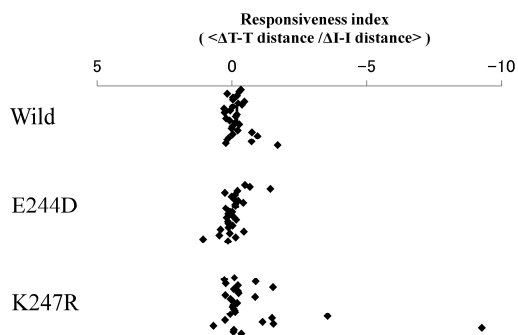


図 6

この結果から、K 2 4 7 R 変異トロポニンでは K 2 4 7 R 変異に起因する局所的な静電結合の組み換えによりサブユニット I からサブユニット T への構造信号伝達の不確実性が増し、平均として構造信号が増幅して伝達されることが大きな張力発生の原因となることが示唆された。

3) 実験結果と分子動力学結果の照合

変異トロポニン T 導入心筋を用いた X 線回折実験の結果から、E 2 4 4 D 変異体では野生型と比べてサブユニット T からトロポミオシン/アクチンへの構造伝達過程が過剰となることが張力増強の原因となると考えられた。一方、トロポニン分子の分子動力学計算の結果から、K 2 4 7 R 変異トロポニンではサブユニット I とサブユニット T 間の信号伝達異常により張力増強をもたらすと考えられた。以上より、これらの 2 つの変異はトロポニンの I T アーム領域に隣接して存在するが、その病態発生の分子機序は両者で大きく異なるらしいことが明らかになった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

山口真紀、木村雅子、竹森重、大野哲生、渡辺賢、湯本正寿、八木直人：肥大型心筋症の原因となる変異トロポニン導入筋の構造解析、第 28 回 PF シンポジウム、つくば、7 月、2011 年

Mechanical and structural characteristics of cardiac muscle fibers with tropoin-T mutant causing hypertrophic cardiomyopathy. Yamaguchi, M., Kimura M., Takemori S., Ohno T., Nakahara N., Yokomizo S., and Yagi N., J.Physiol Sci.,2013, 63, S122

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口真紀 (Maki Yamaguchi)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：30271315

(2) 研究分担者

竹森重 (Shigeru Takemori)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：20179675

大野哲生 (Tetsuo Ohno)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：30233224

木村雅子 (Masako Kimura)

女子栄養大学・栄養学部・准教授
研究者番号：30328314

(3) 連携研究者

秋山暢丈 (Nobutake Akiyama)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：00338865