

実験番号：201401016 04049 06072



# 筋収縮調節タンパク質の心筋症関連変異における 細いフィラメントの構造

松尾龍人<sup>1</sup>、藤原悟<sup>1</sup>、加藤一徳<sup>2</sup>、杉本泰伸<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門、<sup>2</sup> あいちシンクロトロン光センター、<sup>3</sup> 名古屋大学シンクロトロン光研究センター

## 1. 測定実施日

2014年5月29日 10時00分 – 18時00分 (2シフト) 、BL8S3

2014年5月30日 10時00分 – 18時00分 (2シフト) 、BL8S3

2014年10月28日 10時00分 – 18時00分 (2シフト) 、BL8S3

2014年10月29日 10時00分 – 18時00分 (2シフト) 、BL8S3

2015年3月19日 10時00分 – 18時00分 (2シフト) 、BL8S3

## 2. 概要

「細いフィラメント」は、心筋の収縮調節を担う超分子複合体であり、アクチンフィラメントにトロポニン及びトロポミオシンが結合した状態で存在する。本課題では、野生型及び肥大型心筋症の原因となる変異を持つトロポニンを組み込んだ再構成細いフィラメントの X 線小角散乱実験を行い、変異導入による慣性半径の変化を調べた。その結果、トロポニン変異によって、断面慣性半径が約 1 Å 増大することが分かった。さらに、変異による構造変化を反映する散乱曲線プロファイル自体の変化も  $Q < 0.1 \text{ \AA}^{-1}$  の領域で観測された。

## 3. 背景と研究目的

心筋の収縮は、細いフィラメント上の蛋白質トロポニンの  $\text{Ca}^{2+}$  結合・解離によって調節されている。トロポニンは TnC、TnI、TnT の 3 つのサブユニットから構成され、これらサブユニットの様々な点変異が肥大型心筋症等の家族性疾患を引き起こすことが報告されている [1]。本研究では、TnT の K247R 変異が細いフィラメント全体の構造に及ぼす影響を明らかにするため、野生型及び変異型トロポニンを含む細いフィラメントの X 線小角散乱実験を行った。

#### 4. 実験内容

屠殺直後のウシ心臓から、細いフィラメント(以下、NTF)を抽出した。大腸菌発現系を用いて精製した野生型及びK247R変異型ヒト心筋由来トロポニンを、前述のウシ心筋由来細いフィラメントに組み込んだ(以下、野生型トロポニンを含む細いフィラメントをWTF、変異型をRTFと省略する) [2]。あいちシンクロトロン光センターBL8S3 ビームラインにおいて、これらの溶液試料(±Ca 両状態)のX線小角散乱パターンを測定を、波長 1.5 Å、カメラ長約 2200 mm の条件で、露光時間 10 秒 × 20 サイクル、温度 20 °C、濃度 2、3、4 mg/ml のシリーズで行った。

#### 5. 結果および考察

測定した 2 次元の散乱パターンを円環平均し、1 次元の散乱曲線を得た。細いフィラメントは繊維状であるため、断面ギニエ解析を行い、断面慣性半径  $R_c$  を各濃度について求めた(Fig. 1 左図)。濃度ゼロ外挿した断面慣性半径は、NTF:  $35.3 \pm 0.5$  (-Ca)、 $35.2 \pm 0.5$  (+Ca)、WTF:  $31.9 \pm 0.7$  (-Ca)、 $32.4 \pm 0.7$  (+Ca)、RTF:  $33.4 \pm 0.7$  (-Ca)、 $33.3 \pm 0.6$  (+Ca) であった (単位は Å)。

また、試料濃度で規格化した原点散乱強度の濃度依存性を Fig.1 右図に示した。この物理量は、試料の単位長さ当たりの分子量に比例する。NTF と WTF 及び RTF の間で値が異なるが、これはトロポニンを組み替えた細いフィラメント中のトロポニン量が 100%ではないことを反映している[2]。WTF と RTF 間には差がみられないため、ヒト心筋トロポニンは両試料とも同程度の効率で組み込まれていると考えられる。

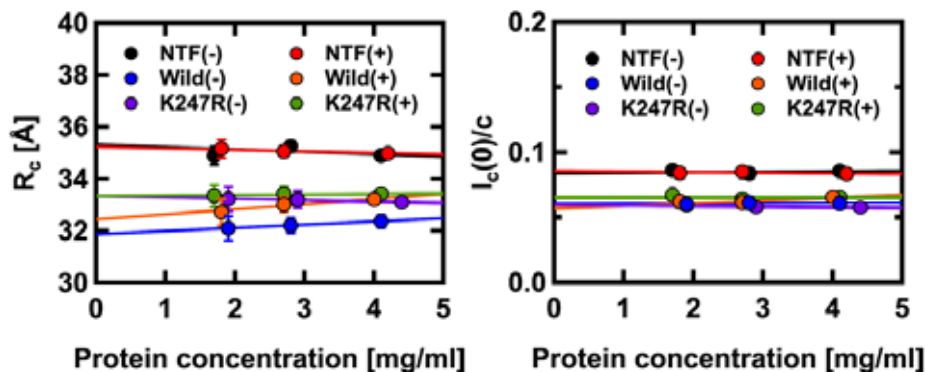


Fig.1 (左) 断面慣性半径 (右)原点散乱強度の濃度依存性

細いフィラメント内でトロポニン<sub>1</sub>は **TnT** を介してトロポミオシン(**Tm**)に結合している。**Tm** はヒト心筋とウシ心筋においてアミノ酸の相同性は **99%**であるが、ヒト心筋 **TnT** は残基数がウシ心筋よりも **14** 多く、さらにアミノ酸相同性は **86%**である。この違いが **TnT-Tm** 間相互作用様式やトロポニンの配置に影響し、**NTF** と **WTF** 及び **RTF** 間の  $R_c$  の違いに繋がると考えられる。また、トロポニンの変異導入による変化は、 $R_c$  の約 **1 Å** の増加であった。いずれの試料も、**Ca** の有無による  $R_c$  の変化は観測されなかった。これは、変異の有無に関わらず、**Ca** による細いフィラメントの構造変化が、動径方向の質量分布に影響しない変化(トロポミオシンの回転等)であることを示唆している。

測定した散乱曲線を **Ca** の有無で比較をすると、 $0.04 \text{ \AA}^{-1} < Q < 0.1 \text{ \AA}^{-1}$  の範囲の強度が変化していることが分かる(Fig. 2 左図)。この領域の積分強度を取り、**-Ca** 状態から**+Ca** 状態の積分値を差し引くと、Fig. 2 右図に示すように変異体の方が変化量が大きい。この領域は、細いフィラメントの繊維回折パターンにおいて第1層線の極大値が観測される領域に相当する(この領域には、トロポニン由来の3次反射も寄与するが、その強度は第1層線の5%程度であり、無視できるほど小さい)。第1層線領域は、トロポニンへの **Ca** 結合によりトロポミオシンが構造変化することで、その積分強度が減少することが知られている。従って、変異体における積分強度の変化量の増大は、トロポミオシンの構造変化の規模が野生型よりも大きいことを示唆している。著者らは、トロポニンの **K247R** 変異が、トロポニン分子全体の揺らぎを増大させることを見出しており[3]、揺らぎの増大によるトロポニン-トロポミオシン相互作用の変調が、トロポミオシンの構造変化に影響すると考えられる。この構造変化に関するさらに正確な情報を得るためには、本課題で測定した  $Q$  領域よりも **high-Q** 側の散乱曲線を解析する必要がある。

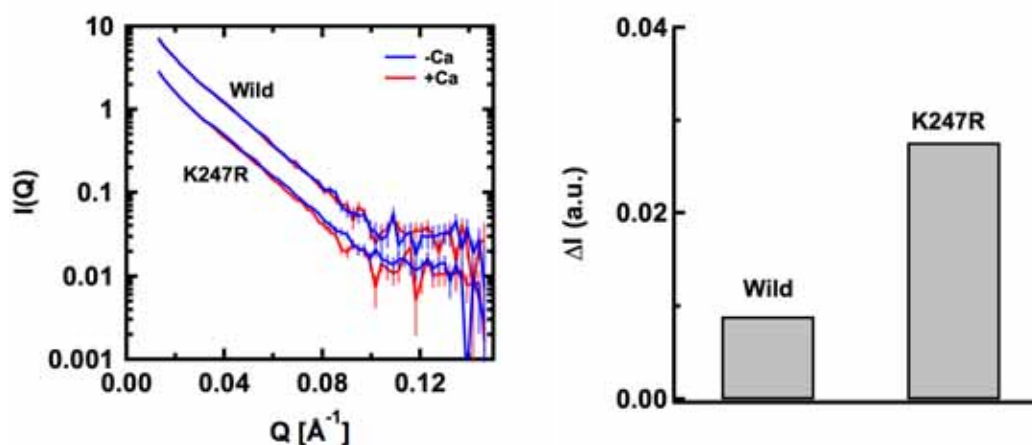


Fig.2 (左) 測定された散乱曲線 (右)  $0.04 \text{ \AA}^{-1} < Q < 0.1 \text{ \AA}^{-1}$  の積分強度の **Ca** による変化 (**-Ca** 状態から**+Ca** 状態の散乱曲線を引いた)

## 6. 今後の課題

本課題では、ギニエ領域を含む **low-Q** 領域( $Q < 0.15 \text{ \AA}^{-1}$ )の解析を行った。次のステップとして、変異による細いフィラメントの構造変化をより詳細に調べるために、**high-Q** 領域の散乱曲線を測定し構造解析を行う予定である。

## 7. 参考文献

- [1] K. Harada, S. Morimoto, Inherited cardiomyopathies as a troponin disease, *Jpn J Physiol* 54 (2004) 307-318.
- [2] F. Matsumoto, S. Deshimaru, T. Oda, S. Fujiwara, Reconstitution of the muscle thin filament from recombinant troponin components and the native thin filaments, *Anal. Biochem.* 399 (2010) 299-301.
- [3] T. Matsuo, F. Natali, M. Plazanet, G. Zaccai, S. Fujiwara, Dynamics of cardiomyopathy-causing mutant of troponin measured by neutron scattering, *J. Phys. Soc. Jpn.* 82 (2013) SA0201-SA0205.