



筋収縮調節タンパク質の心筋症関連変異が 細いフィラメントの構造に及ぼす影響

藤原悟¹、松尾龍人¹、加藤一徳²、杉本泰伸³

1 日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門、2 あいちシンクロトロン光センター、3 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

2013年12月6日 10時00分 – 18時30分 (2シフト) , BL8S

2014年3月11日 10時00分 – 18時30分 (2シフト) , BL8S

2014年3月12日 10時00分 – 18時30分 (2シフト) , BL8S

2. 概要

心筋の収縮調節を担う細いフィラメントについて、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。

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Ca²⁺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SR 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し、露光時間10秒 × 20サイクル、温度20度、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(Fig. 1 左図)、断面慣性半径 R_c を各濃度について求めた(Fig. 1 右図)。いずれの試料も、 R_c の濃度依存性は見られなかった。濃度ゼロ外挿した断面慣性半径は、NTF: 34.5 ± 0.2 (-Ca), 34.8 ± 0.6 (+Ca), WTF: 32.4 ± 0.1 (-Ca), 32.5 ± 0.4 (+Ca), RTF: 33.7 ± 0.3 (-Ca), 33.9 ± 0.2 (+Ca) であった (単位は Å)。

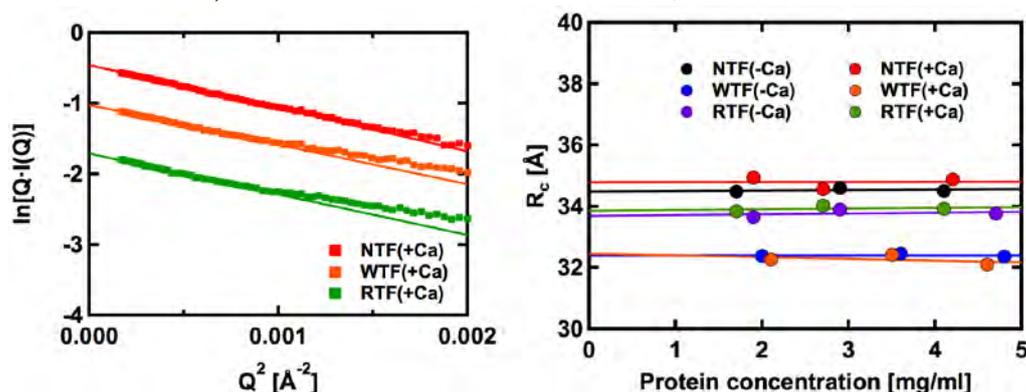


Fig.1 (左) ギニエプロット (右) 断面慣性半径の濃度依存性

細いフィラメント内でトロポニン_T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。

6. 今後の課題

今回の実験では、ギニエ領域を含む low-Q 領域の解析を行った。今後は、変異による細いフィラメントの構造変化を詳細に調べるために、high-Q 領域の散乱曲線を観測し、構造解析を行いたい。

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.