

論文の内容の要旨

論文題目 Ca^{2+} -induced switching of troponin and tropomyosin on actin filaments as revealed by electron cryo-microscopy
(細いフィラメント上でのトロポニンとトロポミオシンのカルシウムによるスイッチング)

氏名 成田 哲博

筋肉の細いフィラメントはアクチンのフィラメントに、アクチン14分子ごとに2分子のトロポミオシンと、2分子のトロポニンがついてできている。筋肉は、筋小胞体からの Ca^{2+} の放出によって収縮する。トロポミオシンとトロポニンが、その Ca^{2+} によって直接の制御を受け、アクチン・ミオシン系に伝達する。アクチンとミオシンの相互作用は、 Ca^{2+} がいないときに阻害され、 Ca^{2+} があるときに促進される。このカルシウム制御のあり方を探るには、トロポミオシンやトロポニンを含めた細いフィラメントの3次元構造を解くことが必要不可欠である。この三次元構造を解く方法として、いままでは電子顕微鏡写真からの **helical reconstruction** (らせん対称性を仮定し、らせん対称性を利用した三次元再構成法) が多く用いられて来た。しかし Ca^{2+} と結合、解離し、カルシウム制御のトリガーであるトロポニンは、前述のようにアクチン14分子に2分子の割合でしか結合していない。トロポミオシンのようにアクチン7分子に結合できるような長い構造をもっているわけでもない。従って、トロポニンはアクチンのらせん対称性には従わず、**helical reconstruction** でその構造を解くことは不可能である。そのため、カルシウムによるトロポニン-トロポミオシンの細いフィラメント内の構造変化の実態について議論が絶えなかった。

そこで私たちは、**helical reconstruction** と異なる逆投影法を用いた新しい画像処理法を開発し、細いフィラメントに適用してトロポニンの可視化を行った。逆投影法はX線CTなどで用いられている技術で、三次元物体の様々な投影方向からの投影方向がわかった二次元投影を集めることによって、もとの三次元構造を計算する方法である。これをトロポニン、トロポミオシンを含む細いフィラメントに適用するには、1番目にフィラメントの軸周りの投影方向を決めること、2番目にトロポニン、トロポミオシンのフィラメント軸方向の位置を判別することが必要である。今回私たちは、この二つの条件を満たすために二段階にわけて画像処理を行った。

まず、最初にアクチン分子ごとに平均化した像を三次元再構成した。この三次元再構成にも逆投影法を用いるが、結果の像は helical reconstruction によって得られる像と基本的には変わらない。この像には、アクチン分子ごとに平均化されたトロポニン、トロポミオシンの質量を含む。これを平均化モデルと呼ぶ。この平均化モデルを作るときに、電子顕微鏡写真上の細いフィラメントの投影方向が決定される。次に、この像からアクチン二分子分だけトロポニン+トロポミオシンの成分を残した像を作成する (figure 1)。この像をトロポニンモデルと呼ぶことにする。このトロポニンモデルを用いて、電子顕微鏡写真上のトロポニンの位置を決定する。その情報をもとに逆投影法で三次元再構成し、その結果を新たなトロポニンモデルとして、再び電子顕微鏡写真上のトロポニン位置を決める。これを収束するまで繰り返し、細いフィラメント上のトロポニンの構造を解く。これによって、35 Åと低分解能ながら、はじめてトロポニンを含んだ細いフィラメントの構造を解くことができた。

実際に解かれた全体構造を figure 2 に示す。トロポニンヘッド周辺の拡大図を figure 3 に示す。トロポニンヘッドは、カルシウムが有る状態ではアクチンの inner domain の正面に、アクチン表面からやや離れた形で存在する。一方カルシウムが無い状態ではトロポニンヘッドはアクチン分子の前面全体にへばりつくように存在する。またカルシウムが無い状態では、アクチンの N 端から C 端にかけてアクチン成分ではない質量が細長く伸びており、これは troponin I の C 端側の部分であると考えられる。また、トロポニンとトロポミオシンの質量のアクチンに対する位置が、トロポニンヘッドの上下で異なることがわかった (figure 4)。これらのことと従来のような研究結果から、カルシウムによる細いフィラメントの構造変化のモデルを構築することができた。

まず、カルシウムが有る状態では、トロポニンヘッドはトロポミオシンともアクチンとも強く結合しない。トロポミオシン-トロポニンは、主にトロポミオシンによってアクチンと結合し、アクチンの inner domain の正面に存在する。カルシウムが無い状態ではトロポニン I の C 末端側とアクチンの N 末端から C 末端にかけての領域が結合し、トロポニンヘッドが troponin I に引っ張られてアクチンの outer domain 側に移動する。それに伴い、トロポニン尾部 (troponin T1) も outer domain 側に移動し、トロポニンヘッドとトロポニン尾部に結合しているトロポミオシンを引っ張る (figure 5)。

細いフィラメントの中のトロポニンが可視化できたことによってはじめて構築できたこのモデルは、今までの多くの研究結果のかなりの部分を説明できる。今回の結果によって、細いフィラメントのカルシウム制御に対する理解を大幅に深めることができたと考えている。

Figure 1 (右図): トロポニンを可視化するためのモデル。まず、最初にアクチン分子ごとに平均化した像を三次元再構成した (a)。この像には、アクチン分子ごとに平均化されたトロポニン、トロポミオシンを含む。次に、この像からアクチン二分子分だけトロポニン、トロポミオシンの成分を残した像を作成した (b)。矢印が残したところを示している。これを初期モデルとして、細いフィラメントの電子顕微鏡写真上のトロポニンの位置を決定していった。

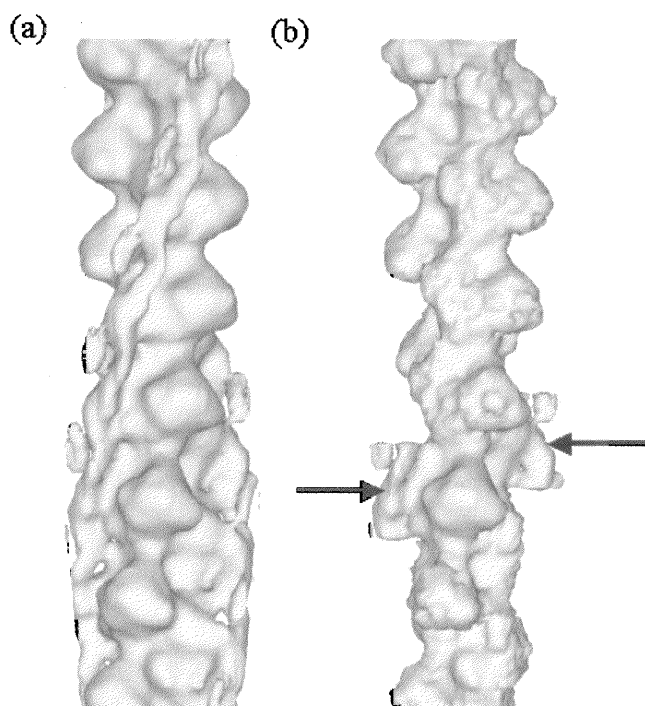


Figure 2 (右図): 解かれた細いフィラメントの構造。トロポニンヘッド (TnI+TnC+TnT2) の部分を矢印で示した。(a, b, c) がカルシウムが有る状態。(d, e, f) がカルシウムが無い状態。(a, d) が全体の構造。(b, e) がアクチンの成分を除いたもので、トロポニン+トロポミオシンに相当。(c, f) は、(b, e) の中でとくに有意性が高い部分である。トロポニンヘッドの周辺は高い有意性をもっており、良く決まっている。

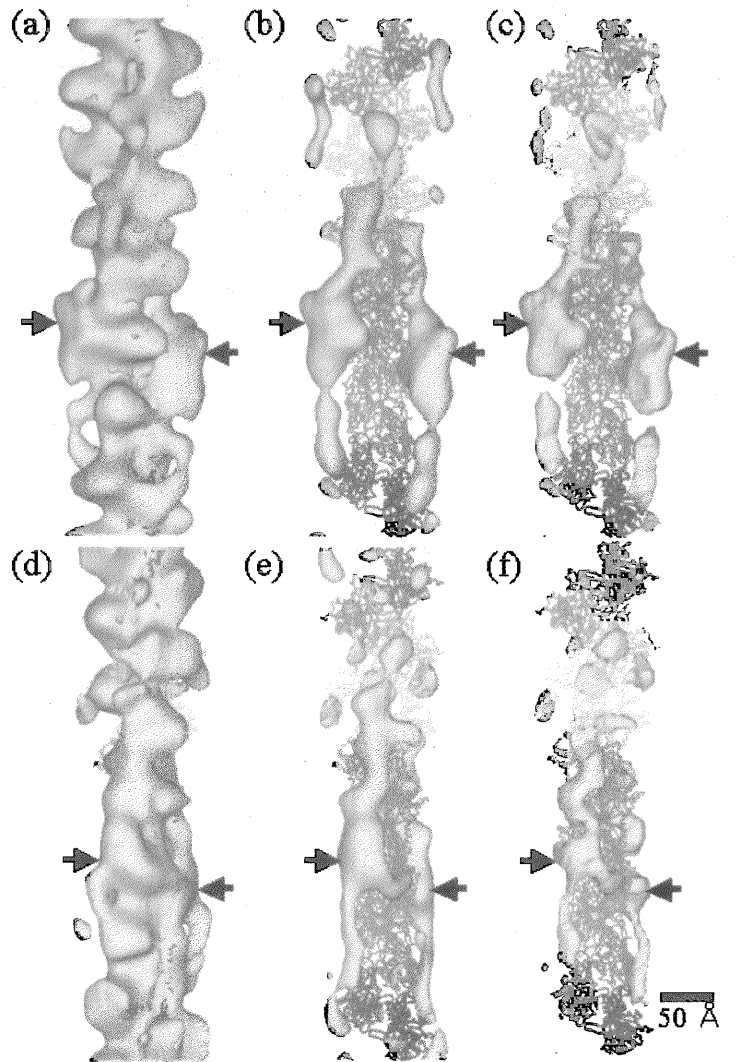
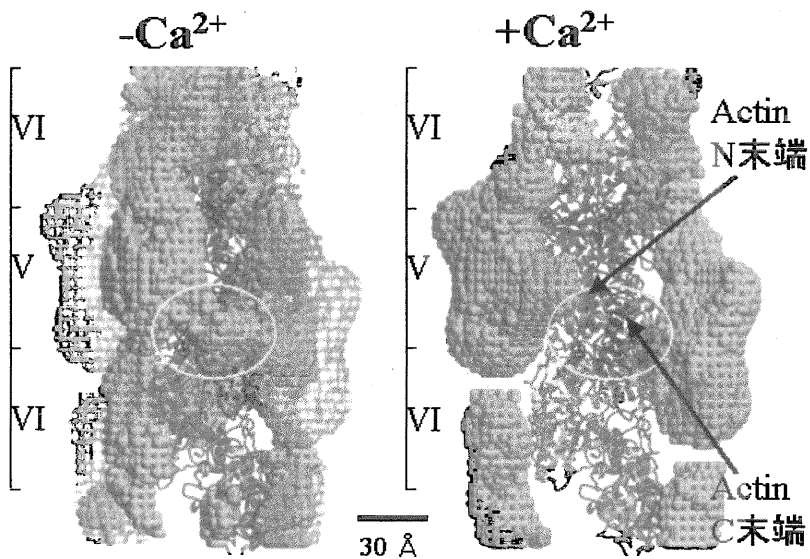


Figure 3 (下図): figure 2c, f のトロポニンヘッド周辺の拡大図。トロポニンヘッドは、カルシウムが有る状態ではアクチンの inner domain の正面に、アクチン表面からやや離れた形で存在する。一方カルシウムが無い状態ではトロポニンヘッドはアクチン分子の前面全体にへばりつくように存在する。また、低カルシウム濃度のときには、block V (troponin head) のアクチンの N 末端から C 末端にかけて、アクチンを抱き込むような質量が伸びる (円内)。これはカルシウム有り状態には存在しない。



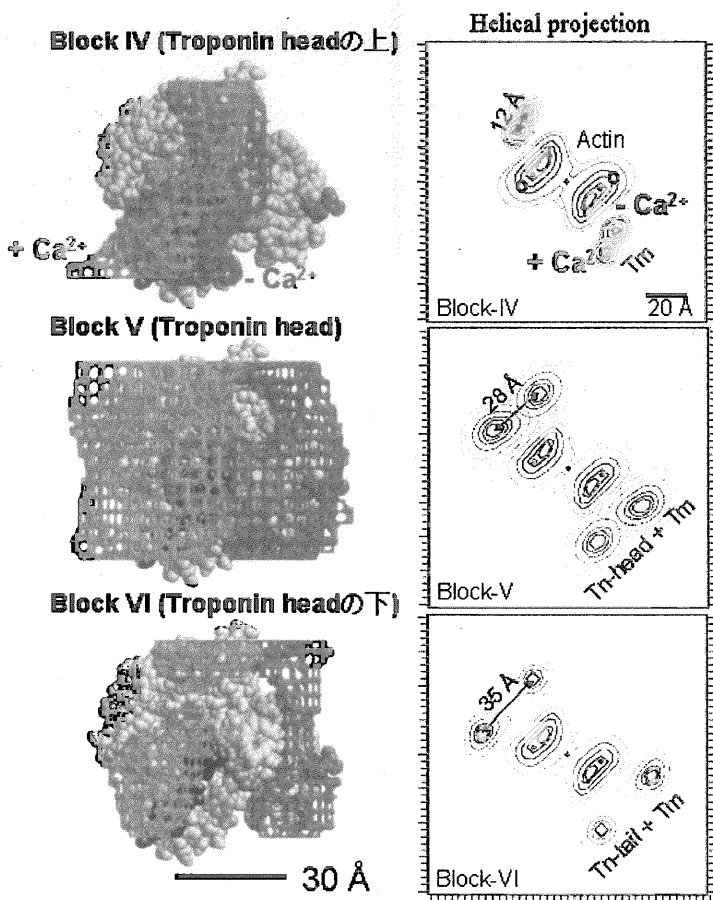


Figure 4 (左図): Troponin + tropomyosin の位置は、troponin head の上下で異なる。カルシウムがある状態 (オレンジ) では、常に inner domain の前にある。カルシウムが無い状態 (水色) では、troponin head の上ではほとんど位置が変わらないが、troponin head, troponin head の下となるにつれて、outer domain 側に移動する。

Figure 5 (右図): 低カルシウム濃度では、troponin I の C 末端側がアクチンの N 末端から C 末端にかけての領域に結合する。それに伴う troponin, tropomyosin の構造変化によって、block VI, VII の tropomyosin + troponin の質量は outer domain 側に引きずられる。troponin head が主に存在する場所のアクチンモノマーを block V と定義した。

