

論文内容の要旨

論文題目 トロポニン三者複合体の NMR 分光法による構造解析
(The structural analysis of the troponin ternary complex by NMR spectroscopy)

氏名 村上 健次

脊椎動物骨格筋, 心筋における筋収縮は, 細いフィラメントのカルシウムによる構造変化で制御されている。脊椎動物骨格筋, 心筋において, 細いフィラメントはアクチン, トロポミオシン, トロポニンから構成される。トロポニンは TnT (トロポミオシン結合サブユニット), TnC (カルシウム結合サブユニット), TnI (アクトミオシン ATPase 阻害サブユニット) の 3 つのサブユニットから構成される三者複合体タンパク質である。TnI はカルシウム結合条件ではアクチンに結合しないが, カルシウム解離条件ではアクチンに結合し, アクトミオシン ATPase を阻害する。それゆえ筋収縮の制御メカニズムを理解するためには, TnI のアクチン結合領域の構造は非常に重要である。細いフィラメントのクライオ電子顕微鏡構造解析において, カルシウム解離条件ではトロポニン本体からアクチン結合領域が分岐しているのが観察された。この分岐している領域は 'トロポニンアーム' と名付けられた。そしてカルシウム結合条件では 'トロポニンアーム' が観察されなかったことから, 'トロポニンアーム' はトロポニン本体にドッキングしていると考えられた。しかし電子顕微鏡の構造解析では分解能が限られているため, 詳細な構造を得ることはできなかった。一方, カルシウム結合型トロポニン T₂CI 複合体の結晶が解かれたが, 原子のディスオーダーによってアクチン結合領域は観察されなかった。このディスオーダーはおそらくアクチン結合領域のフレキシビリティが原因であると考えられた。この博士論文では, トロポニン T₂CI 複合体 (分子量 52 K) 中における TnI を安定同位体標識し, NMR 分光法によって構造解析した。現在の NMR 分光法において, 分子量 52K のタンパク質は構造解析できる分子量限界を超えている。しかし TnI 中のアクチン結合領域である C 端領域 (トリ骨格筋 K131-S182) に由来するピークを観察することができた。NMR による解析から, C 端領域は

トロポニン本体と C 端領域の間に存在するヒンジ領域のディスオーダーによって高い運動性をもたらされていると考えられた。さらに NOESY スペクトルの解析から, TnI の C 端領域の立体構造を決定したところ, C 端領域の中にはドメイン (V143-S182) が存在していることがわかった。TnI の C 端領域構造内には, カルシウムによる大きな内部構造変化はなかったが, カルシウムによる化学シフト変化が TnI の C 端領域構造の片側に観察された。電子顕微鏡解析の結果を考慮すると, TnI の C 端領域は立体構造を保ったままカルシウム依存的にトロポニンの中で位置を変えていることが示唆された。さらに得られた TnI の C 端領域構造をカルシウム解離型細いフィラメントのクライオ電子顕微鏡構造解析密度マップにフィッティングしたところ, TnI の C 端領域はトロポニンアーム領域とぴったりであった。TnI の C 端領域構造は電荷分布に特徴的な偏りを持っているが, フィッティングの結果, その電荷分布はアクチンの C 端領域などの電荷分布と相補的であることがわかった。これによって, 筋収縮の制御メカニズムには非常に重要な TnI とアクチンの相互作用について原子レベルでの知見を得ることができた。