

## 論文審査の結果の要旨

氏名 村上 健次

本論文は4章からなり、第1章は序論、第2章は実験材料と方法、第3章は結果、第4章は考察について述べられている。

脊椎動物の骨格筋及び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により制御される。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、トロポニンはさらに、トロポミオシン結合サブユニットである TnT、カルシウム結合サブユニットである TnC、アクトミオシン ATPase 阻害サブユニットである TnI という3つのタンパク質サブユニットから構成されている。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てアクトミオシン ATPase 活性を阻害する。このことから、筋収縮の制御メカニズムを理解する上で、カルシウムイオン濃度に依存したトロポニンの構造変化、特に TnI のアクチン結合領域の構造変化が非常に重要であると考えられた。

そこで、細いフィラメントのクライオ電子顕微鏡構造解析により、トロポニンの構造変化が調べられた。その結果、カルシウム解離条件では、トロポニンアームと名付けられたトロポニンのアクチン結合領域がトロポニン本体から分岐していることがわかった。一方、カルシウム結合条件では、トロポニン本体から分岐したトロポニンアームは観察されず、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結論された。しかし、電子顕微鏡の構造解析の空間分解能は限られているため、構造変化の詳細は不明のままである。一方、X線構造解析により、カルシウム結合型トロポニン T<sub>2</sub>CI 複合体の3次元構造が解かれた。しかし、原子のディスオーダーのため、アクチン結合領域の構造は決定できなかった。恐らく、このディスオーダーはアクチン結合領域のフレキシビリティが非常に高いためであると考えられる。

以上のような研究背景の下に、本論文では NMR 分光法を用いて、カルシウムイオン濃度に依存したトロポニンの構造変化を原子レベルの分解能で明らかにする研究が行なわれている。トロポニン T<sub>2</sub>CI 複合体中の TnI を安定同位体で標識し、NMR 分光法によりその構造の決定が行なわれた。T<sub>2</sub>CI 複合体の分子量は 52 K で、NMR 分光法で構造解析できるタンパク質の分子量の限界を超えている。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）に由来するピークが明瞭に観察された。これは、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、C 端領域が高い運動性を有しているためと考えられる。さらに、NOESY スペクトルの解析により、TnI の C 端領域の立体構造が決定された。その結果、C 端領域の中にはドメイン (V143-S182) が存在していること、カルシウムイオン濃度を変えてもドメイン構造の大きな変化がないことなどが明らかにされた。また、カルシウムイオン濃度に依存した化学シフトの変化が調べられ、大きな変化が TnI の C 端領域構造の片側に集中していることが示された。これらの結果と細いフィラメントのクライオ電子顕微鏡解析の結果を合わせ、論文提出者は TnI の C 端領域は立体構造を保ったままで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と考えた。そこで、NMR 分光法により得られた TnI の C 端領域構造を、カルシウム解離条件で得られた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することが行なわれ、TnI の C 端領域がトロポニンアーム領域によくフィットすることが示された。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、その電荷分布がアクチンの C 端領域などの電荷分布と相補的であることがわかり、トロポニンアームのアクチンへの結合に静電相互作用が大きく寄与していることが示唆された。

本論文の研究で得られた以上の結果により、筋収縮の制御メカニズムにとって非常に重要な TnI とアクチンの相互作用について、原子レベルでの初めての知見が得られたと言える。

なお、本論文は湯本史明、田之倉優、大木進野、若林健之との共同研究であるが、論文提出者が主体となってトロポニン複合体タンパク質の調製、その活性などの生化学的測定、NMR データの解析と構造決定、電子顕微鏡密度マップへのフィッティング解析及び得られた結果の考察を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。