

論文の内容の要旨

論文題目 Structural and functional studies of the molecular mechanism of troponin-causing cardiomyopathy: The studies of human cardiac and scallop adductor troponins
トロポニン原因心筋症の分子機構における構造機能研究：ヒト心筋および貝類閉殻筋トロポニンの研究

氏名 湯本 史明

1. 拘束型心筋症原因トロポニンIの機能と構造

脊椎動物の骨格筋や心筋などの横紋筋の収縮は、トロポニン(Tn)への Ca^{2+} の結合・解離によって制御されている。Tn は、 Ca^{2+} 結合成分であるトロポニンC(TnC)、アクトミオシン ATPase 活性を抑制する成分であるトロポニンI (TnI)、トロポミオシン (Tm) に結合し、Tn をアクチン-トロポミオシンフィラメントに会合させるトロポニンT(TnT) の3つのポリペプチドによって構成されている。江橋らによるトロポニン発見以来、約40年が経過した今も多くの機能解析、構造解析が進められてきた。特に、最近のヒト心筋 Tn コアドメインの結晶構造解析は、Tn の機能を理解する上で、多くの情報を与えた。しかしながら、Tn による筋収縮制御機構を明らかにする上で、重要な TnI のN端、C端領域の構造情報は不十分なものであり、より詳細なメカニズムの解明が待たれている。

近年、遺伝子解析によって TnI, TnT の変異が肥大型(Hypertrophic cardiomyopathy, HCM)あるいは拡張型心筋症(Dilated cardiomyopathy, DCM)に関係することが示されてきた。心筋症は、心室壁の肥厚によって十分な弛緩が困難になる肥大型心筋症と心室拡大により収縮不全を引き起こす拡張型心筋症とに大きく分類されるが、Tn の変異部位の違いにより、両方の型の心筋症につながるということは大変興味深い。大槻・森本らは、スキンドファイバーを用いた Tn 変異体の機能解析によって、HCM 原因 Tn 変異は、

Tn の Ca^{2+} 感受性の増大に、また、DCM 原因 Tn 変異は、Tn の Ca^{2+} 感受性の減弱につながることを示してきており、現在、この Ca^{2+} 感受性の変化が、心筋症を引き起こす初期因子であると考えられている。

このような状況の中、遺伝子解析から TnI の 6 つの変異 (L144Q, R145W, A171T, K178E, G190D, R192H) が拘束型心筋症 (Restrictive cardiomyopathy, RCM) という拡張不全を引き起こす心筋症の原因となることが示された。これらの変異部位のアミノ酸残基は、脊椎動物の骨格筋、心筋 TnI で保存されており、重要な機能を担っていると考えられる。また、L144Q, R145W は TnI の抑制領域中に、A171T, K178E はアクチン-Tm 結合領域の直前とその中に、D190G, R192H は C 末端領域と、それぞれが機能単位として考えられている領域中に存在することから、変異はこれらの機能に影響を与えることが予想される (図 1)。また、変異体の機能を明らかにすることによって、これらの機能領域が担う役割もより詳しく明らかにできるものと期待できる。

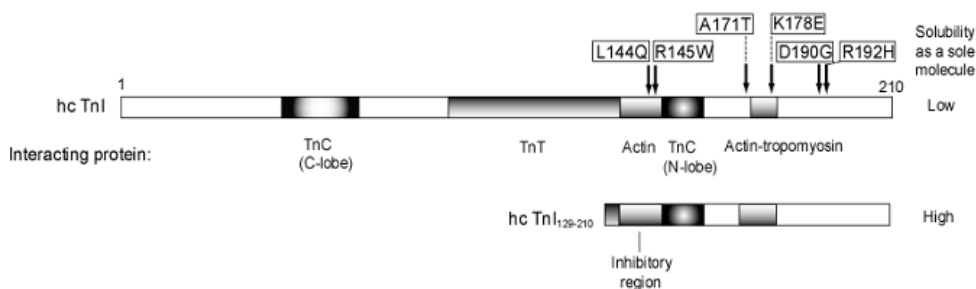


図 1. HcTnI および hcTnI₁₂₉₋₂₁₀ のドメイン構造と機能単位. RCM の変異部位を矢印にて示す.

そこで、私は、これらの 6 つの TnI 遺伝子変異による Tn の機能と構造の変化について解析した。機能解析では、大腸菌による大量生産系によって調製したリコンビナント TnI を用い、再構成スキンドファイバーの Ca^{2+} 感受性、再構成アクトミオシン ATP アーゼ活性の Ca^{2+} 感受性に対する変異の影響を調べた。その結果、両解析系で、ともに各種変異体は程度の差はあるものの Ca^{2+} 感受性の増強作用を示した。また、6 つの変異体は、スキンドファイバーの系では $\text{K178E} > \text{R192H} \approx \text{R145W} > \text{L144Q} \approx \text{A171T} > \text{D190G}$ の順に Ca^{2+} 感受性増強作用を示し (図 2)、ATP アーゼ活性の系では $\text{K178E} > \text{R192H} \approx \text{R145W} \approx \text{L144Q} > \text{A171T} \approx \text{D190G}$ の順に Ca^{2+} 感受性の増強作用を示し、別の手法間で良く似た結果であった。また、これらの変化量は、HCM で観察されていたものよりも極めて大きなものであった。RCM は、HCM と比較して重篤なものであり、これらの Ca^{2+} 感受性増強作用の大きさと予後の悪さとは関連があるかもしれない。

また、最も大きな Ca^{2+} 感受性増強作用を示した K178E の性質をより詳細に調べるために、C 末端領域ペプチド (TnI₁₂₉₋₂₁₀) を調製した (図 1)。TnI は単独では生理的条件下で会合することが知られているが、TnI₁₂₉₋₂₁₀ は抑制領域から C 末端領域までを含み、生理的条件下で十分に溶解し、C 末端領域の機能解析に使うことができる。このペプチドを

用い、ミオシン B の ATP アーゼ活性に対する抑制能と TnC 添加時の中和作用に対する変異の影響を調べたところ、 IC_{50} 値が、野生型の 227 ± 7 nM に対して K178E 変異は 543 ± 8 nM と大きく、また、TnC 添加による中和作用では、野生型の 957 ± 23 nM に対して、K178E 型の 600 ± 56 nM と小さくなっている。これらの結果から、K178E 変異は、TnI のアクチン-Tm への親和性を減弱させ、その結果として、抑制が弱く、TnC による中和がしやすい（脱抑制しやすい）ということにつながっていると考えられる。これらの影響が全体として、スキンドファイバー、ATP アーゼ活性を指標とした解析において、 Ca^{2+} 感受性の増大として現れたものを言える。

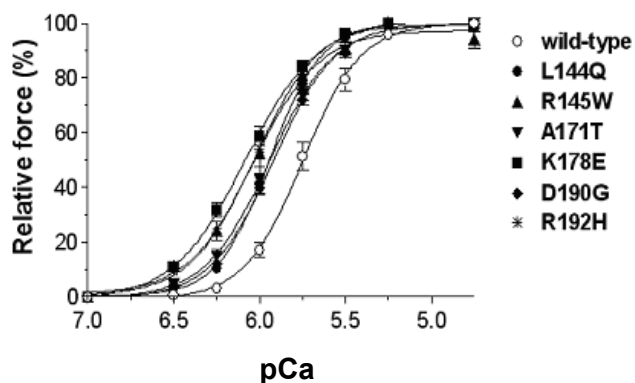


図 2. RCM 関連 Tn 変異体によるスキンドファイバーにおける pCa-張力曲線.

また、TnI₁₂₉₋₂₁₀ を用い、CD および NMR により、K178E 変異の構造に対する影響を調べた。CD 解析から野生型、K178E の間で、2 次構造はほとんど変わらないことがわかった。安定同位体標識 TnI₁₂₉₋₂₁₀ を用いた NMR 解析から、K178E 変異は、K178 近傍の数アミノ酸残基の間でのみという局所的な構造変化を引き起こすことがわかった（図 3）。これらの解析から、K178E 変異は局所的な小さい構造変化を引き起こし、大きな Ca^{2+} 感受性の増強作用を与えることが明らかとなった。

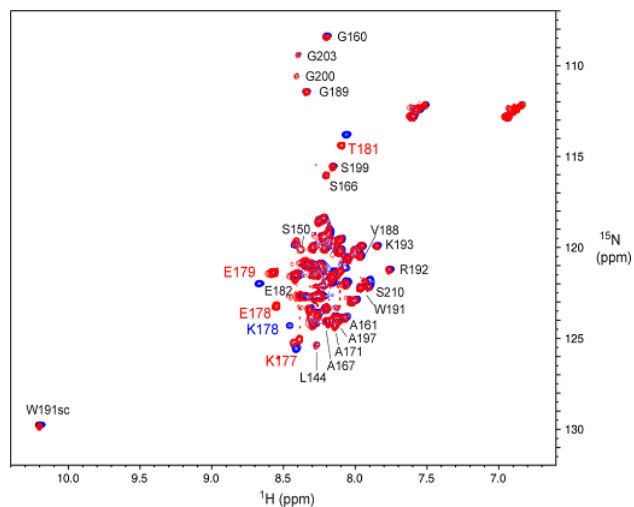


図 3. 野生型および K178E TnI₁₂₉₋₂₁₀ ペプチドの ^{15}N - 1H HSQC スペクトル

以上のことから、このような大きな Ca^{2+} 感受性の増強作用を相殺する低分子性化合物を見出すことができれば、心筋症治療のための候補化合物あるいはリード化合物となり得るだろう。

2. アカザラガイ閉殻筋 TnC における金属イオン配位構造および立体構造解析

肥大型心筋症においては、TnT の遺伝子変異体について、大槻・森本らによるスキンドファイバー解析の結果、ほとんどが Ca^{2+} 感受性の増強作用を示した中、 Ca^{2+} 感受性には影響を与えずに最大 Ca^{2+} 張力を上昇させたものが 2 例観られている。これは偶然にも、以前から観察されていた貝類閉殻筋由来 Tn による Ca^{2+} 依存性のアクトミオシン ATP アーゼ活性の調節機構と同じ変化である。したがって、貝類トロポニンによる Ca^{2+} 制御機構を明らかにすることは、比較生物学的な価値があるばかりでなく、心筋症につながる Ca^{2+} 調節機構の変化について知見が得られると期待できる。また、貝類 Tn は、1 分子当たりたった 1 つしか Ca^{2+} を結合せず、さらに結合部位も C 端側のローブに存在するという珍しい特徴をもっていることから、 Ca^{2+} 制御機構を理解する上でも非常に興味深い。

大腸菌を用いた大量調製系によって得たりコンビナントアカザラガイ TnC を用い、FT-IR による Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 配位構造を解析した。その結果、Asp131、Asp133 が Mg^{2+} に対して擬ブリッジングモードで相互作用し、また、 Ca^{2+} に対しては、さらに Glu142 が二座配位にて相互作用していることがわかった。この Glu142 を Gln に置換すると、この対応するバンドの消失から 2 座配位では相互作用できないが、擬ブリッジングモードで相互作用していることが考えられた。

さらに、TnC C 端ローブへの Ca^{2+} 結合による制御機構を明らかにするために、TnC の C 端ローブへの Ca^{2+} 結合による制御機構を明らかにするために、NMR による立体構造解析を行った。TnC C ローブは、脊椎動物骨格筋速筋由来 TnI では N 端領域に相当する TnI₁₂₉₋₁₈₃ と Ca^{2+} 結合の有無にかかわらず相互作用して安定化することがわかり、この複合体を用いて溶液構造解析を行った。¹⁵N および ¹³C/¹⁵N 標識 TnC C ローブ-非標識 TnI₁₂₉₋₁₈₃ 複合体を調製し、一連の多核多次元 NMR 測定を行った。距離および角度制限情報を収集し、DYANA1.4 による構造解析を行った。TnC C ローブは、EF ハンド型タンパク質としては、2 つの EF ハンドモチーフ共に開いたコンフォメーションをとっていた。一般に、TnC は Ca^{2+} 非結合時の閉じた構造から、 Ca^{2+} 結合時に開いた構造にコンフォメーション変化を起こし、この変化によって、疎水性パッチが開き、ここに TnI の第二 TnC 結合領域が結合することで、TnI によるアクトミオシン ATP アーゼ活性の障害を解除すると考えられている。ゲルろ過実験から、アカザラガイ TnC は Ca^{2+} 結合に伴い、よりコンパクトなコンフォメーションをとることがわかっており、これらの結果を考え合わせると、アカザラガイ TnC の C 端ローブは Ca^{2+} 結合に伴い、開いたコンフォメーションに変化し、これが活性制御の引き金になっていると考えられる。