

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 湯本 史明

本論文は、横紋筋の収縮制御タンパク質であるトロポニンを対象として、1) 拘束型心筋症原因トロポニン I の機能と構造の解析、ならびに、2) アカザラガイ閉殻筋トロポニン C における金属イオン配位構造および立体構造解析を行ったものであり、4 章からなる。

第一章では、横紋筋の収縮制御に関する歴史的背景や分子メカニズムについて述べるとともに、本論文の主な解析手法である多核多次元 NMR の歴史や現状について述べている。

第二章では、心筋症関連トロポニンの解析において、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がトロポニン I の 6 つの変異 (L144Q, R145W, A171T, K178E, G190D, R192H) によって引き起こされている事実を基に、分子レベルでの機能と構造の変化について詳細を議論している。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組換えトロポニン I 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。両解析系とともに、各種変異体は程度の差があるものの Ca^{2+} 感受性の増強作用が観察されることを示した。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、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、両手法間で同じ傾向の変動を観察した。また、これらの変化量は、肥大型心筋症(Hypertrophic Cardiomyopathy, HCM)で観察されていたものよりも極めて大きなものであることを示し、RCM の予後の悪さとこれらの Ca^{2+} 感受性増強作用の大きさとが関係することを指摘した。また、最も大きな Ca^{2+} 感受性増強作用を示した K178E 変異体の性質をより詳細に調べるために、これら 6 種の変異部位を全て含む C 端領域ペプチド(TnI₁₂₉₋₂₁₀)を調製し、トロポニン I 全長では不溶性のために困難であった構造解析を実現できるように工夫している。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トロポニン C 添加による中和作用に対する変異の影響を調べ、K178E 変異は、トロポニン I のアクチン-トロポミオシンへの親和性を減弱させ、その結果、抑制作用が弱くなり、TnC による中和作用が得られ易いことにつながっていることを明らかにした。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と結論づけている。また、TnI₁₂₉₋₂₁₀ を用い、CD および NMR により、K178E 変異の構造に対

する影響を調べており、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を示した。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のみで局所的な構造変化を引き起こすことを明らかにした。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、アミノ酸置換による分子表面の性質変化と相まって、大きな Ca²⁺感受性の増強作用を与えていると結論づけた。

第三章では、貝類トロポニンにおいて、トロポニン C と Mg²⁺あるいは Ca²⁺イオンとの相互作用メカニズムを明らかにし、さらに、トロポニン C の C 端ローブの立体構造を決定することで、構造機能相関について詳細に議論している。大腸菌を用いた大量調製系によって得られた組換えアカザラガイトロポニン C を用い、FTIR による Mg²⁺、Ca²⁺ 配位構造を解析し、Asp131、Asp133 が Mg²⁺に対して擬ブリッジングモードで相互作用し、また、Ca²⁺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を示した。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を見出した。さらに、トロポニン C の C 端ローブへの Ca²⁺結合による制御機構を明らかにするために、NMR による立体構造を解析した。トロポニン C の C 端ローブは、脊椎動物骨格筋速筋由来トロポニン I では N 端領域に相当するトロポニン I ペプチド(TnI₁₂₉₋₁₈₃)と Ca²⁺結合の有無にかかわらず相互作用することによって安定化することを明らかにし、この複合体を用いて溶液構造解析を実現化させるという工夫をしている。¹⁵N および ¹³C/¹⁵N 標識トロポニン C の C 端ローブと非標識 TnI₁₂₉₋₁₈₃ との複合体を調製し、一連の多核多次元 NMR スペクトルを測定し、距離および角度制限情報から、溶液構造を決定した。トロポニン C の C 端ローブは、EF ハンド型タンパク質としては、2 つの EF ハンドモチーフが共に開いたコンフォメーションをとっていたことから、アカザラガイトロポニン C の C 端ローブは、Ca²⁺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結論している。

第四章では、全体を通じたディスカッションを行い、トロポニン研究の成果と意義について述べている。

以上、本論文は、拘束型心筋症を引き起こすトロポニン変異が、局所的な構造変化によるタンパク質表面の性質変化を引き起こし、重大な Ca²⁺感受性増強作用、すなわち大きな機能変化を誘起することを示したものである。また、貝類トロポニンの溶液構造解析から、トロポニン C の活性化機構について重要な知見を得ており、これらは、学術上の価値のみならず、将来的な心筋症治療法の開発に向けて、基礎研究として貢献し得るものである。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値があるものと認めた。