



Title	Calcium dependent conformational change of troponin I regulatory region on muscle thin filament as revealed by ESR
Author(s)	相原, 朋樹
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46432
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	あい 相 原 とも 朋 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 20044 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	Calcium dependent conformational change of troponin I regulatory region on muscle thin filament as revealed by ESR (筋肉細い線維上におけるトロポニン I 制御領域のカルシウム依存的構造変化の ESR 解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小倉 明彦 (副査) 教 授 金澤 浩 教 授 徳永 史生 助教授 荒田 敏昭 助教授 大岡 宏造

論 文 内 容 の 要 旨

はじめに 細いフィラメントはアクチン重合体であり、調節タンパクとしてトロポミオシン (Tm) とトロポニン (Tn) の単位がアクチン 7 つ置きに存在する。トロポニンは Ca^{2+} 結合サイトを持つ TnC、アクトミオシン活性の阻害に関与する TnI、Tm との結合サイトを持つ TnT から構成される。TnC への Ca^{2+} の結合・解離が起点となり、TnI、TnT、Tm と構造変化が連鎖することで、筋収縮制御が行われる。近年、トロポニンは X 線結晶解析や NMR 解析などから構造が部分的に解明されつつあるが、実際の溶液中や細いフィラメント上ではどのような構造変化を起こすかが解明すべき重要課題となっている。とくに TnI 制御領域は、TnC N-lobe への Ca^{2+} 結合/解離に伴って大きく構造状態を変化させる事が予測される。本研究では TnI C 末端側に存在する制御領域に注目し、電子スピン共鳴 (ESR) を用いて、トロポニン複合体での Ca^{2+} に伴う変化、および、さらに細いフィラメントを再構成させた状態での変化を調べた。

一部 TnI C 末端側に存在する制御領域中の Cys133 に部位特異的にスピンラベル剤を導入して、その側鎖運動性を ESR により測定した。この部位に特異的にスピンラベルしたトロポニンを用い、溶液中 (TnC-I-T のみ)、細いフィラメント再構成系 (+Tm+Actin) において $\pm\text{Ca}$ での測定を行い、それをもとにドメインの構造状態を予測した。その結果 3 つの状態が存在することが解った。(1)+ Ca^{2+} 状態で TnI133 領域は、回転相関時間: $\tau=4.8$ ns 程のヘリックス様構造であることが予測され、TnI 制御領域が TnC N-lobe と相互作用している状態と考えられる。一方、- Ca^{2+} 状態では、(2)溶液中での Tn 単体では、 $\tau=1.9$ ns 程のループ様の運動性を示し、この領域が完全にフリーな状態にあると考えられ、(3)逆に、細いフィラメント上では $\tau=45$ ns 近くのより抑えられた運動性を示し、(2)でフリーだった制御領域が Actin と強く相互作用している状態と考えられる。

二部 TnI 制御領域と TnC N-lobe 内 (システインを置換したミュータント) のシステイン残基間距離情報を求めるため、ダブルラベルサンプルの Spin-Spin 相互作用を計測する実験を行った。TnI 制御領域が TnC N-lobe 内で

のように相互作用するのか、より具体的に解れると思われる。サンプル調製は、スピンラベルしたニワトリ変異 TnC (Cys44, 61) と、部位特異的にスピンラベルして単離した TnI とを混合し、TnC*I*T 複合体を再構成させた。Pulsed-ESR 装置 (~ 50 Å 測定可) を用いた ELDOR (electron double resonance) 測定を行った結果、 $\pm \text{Ca}^{2+}$ で変化が見られた。 $+\text{Ca}^{2+}$ 状態ではそれぞれ、20–40 Å の距離を示し、再構成系でも同様だった。一方、 $-\text{Ca}^{2+}$ 状態では長く分布の広い結果を示した。再構成でも測定したが、同じ様な結果だった。このことから、TnI 制御領域が TnC N-lobe から物理的に解離することが分かった。TnC-I-T 複合体のみの場合、TnI 制御領域がフレキシブルに揺らいでいると考えられる。一方、細いフィラメント再構成系においては、Cys133 がアクチンと直接相互作用し TnC の方がフレキシブルに揺らいでいるか、制御領域がアクチンだけでなく TnC 等の他のタンパクとも相互作用していると考えられる。

まとめ 骨格筋収縮の制御機構を知るため、電子スピン共鳴法 (ESR) を用いた TnI 制御領域の側鎖運動性の計測、また、TnI 制御領域と TnC N-lobe とのダブルラベルスピン間距離計測を行った。その結果 TnI 制御領域は、 $+\text{Ca}^{2+}$ 状態で TnC N-lobe と結合し、 $-\text{Ca}^{2+}$ 状態ではアクチンと強く相互作用する事がわかった。この Ca^{2+} 依存的な変化が骨格筋収縮のスイッチだと思われる。

論文審査の結果の要旨

相原君は、骨格筋収縮の制御機構を知るため、まず、細いフィラメント上でのトロポニン (Tn) 複合体の Ca 依存的な構造変化を、電子スピン共鳴法 (ESR) で解析した。ウサギ骨格筋 TnI の制御領域とされる Cys133 をスピン標識し、当該部位の可動性を計測したところ、 $+\text{Ca}$ 条件では TnC の N-lobe との結合が、 $-\text{Ca}$ 条件では actin との結合が示唆された。次に、TnI に加えて TnC の N-lobe をスピン標識し、TnI 制御領域と TnC の N-lobe との間の距離をパルス ESR 法で解析した。その結果、その距離が Ca 依存的に変化する (>5 nm の解離を示す成分が出現–消失する) ことを見出し、先の示唆を裏付けた。

相原君の解析結果は、TnI が果たす筋収縮スイッチの実体を示すものとして、また結晶解析のデータと生化学の知見とを整合させるものとして、筋収縮機構の研究において重要な位置を占めるものであり、学位論文として価値あるものと認める。