

学 位 論 文 題 名

 ^1H -NMR Study of Rabbit Skeletal Muscle Troponin C(^1H -NMR によるウサギ骨格筋トロポニン C の研究)

学位論文内容の要旨

筋肉の収縮はトロポニンというタンパク質によって制御されている。トロポニンはトロポニン C、トロポニン I、トロポニン T の 3 つのサブユニットから構成されている。トロポニン C は Mg^{2+} イオンや Ca^{2+} イオンを結合する。トロポニン I は筋肉収縮を妨げる働きをする。トロポニン T はトロポニン C とトロポニン I を結び付ける。弛緩状態の筋肉細胞内では、トロポニン C は Mg^{2+} イオンを結合している。神経伝達系からの命令があると、筋肉細胞内の Ca^{2+} イオン濃度が急激に上がる。このときトロポニン C は Mg^{2+} を離し、代わりに Ca^{2+} を結合する。トロポニン C の Mg^{2+} 結合状態から Ca^{2+} 結合状態への構造変化が、トロポニン I の収縮阻害を解除する。これが筋収縮発生の機構であると考えられている。1985年に、トロポニン C は N 側の球状ドメインと C 側の球状ドメインが α ヘリックスで結ばれた「垂鈴型構造」をしていることが明らかにされた。本研究の目的は、 Mg^{2+} や Ca^{2+} の結合に伴いトロポニン C の構造と性質がどのように変化し、その変化がトロポニン I にどのように伝わるかを明らかにすることである。この目的のために用いた実験手法は、近年飛躍的に発展した 1 次元と 2 次元の ^1H -NMR 分光法である。

本論文は 5 章より構成されている。

第 1 章では、トロポニン C の生理的役割や他の分光学的手法により既に明らかにされている事柄を記述している。また、トロポニン C と良く似たアミノ酸配列を持つ他の Ca^{2+} -結合タンパク質 (例: カルモデュリン) との比較についても記述している。

第 2 章では、 Ca^{2+} 結合状態、 Mg^{2+} 結合状態、および Ca^{2+} 、 Mg^{2+} イオンを結合していない (アポ) 状態のトロポニン C の構造について記述している。これらの構造と、既

に明らかにされているアポ状態と Ca^{2+} 結合状態のカルモデュリンの構造との比較を行っている。2次元NMRのバルスシーケンスに新たな水消しパルスを加えることで、トロポニンCの高分解能NOESYスペクトルを得た。この章で明らかにされた主な点は以下の通りである。

- 1) アポトロポニンCのC側ドメインには高次構造が形成されていない。一方、N側ドメインには、疎水性領域と逆平行 β シートが形成されている。
- 2) Ca^{2+} 結合型トロポニンCのC側ドメインとN側ドメインに、疎水性領域と逆平行 β シートが形成されている。N側ドメインの疎水性領域と逆平行 β シートの構造は揺らいでいる。
- 3) Hg^{2+} 結合型トロポニンCのC側ドメインとN側ドメインの両方に、疎水性領域と逆平行 β シートが形成されている。このN側ドメインの疎水性領域は、アポトロポニンCのN側ドメインの疎水性領域と同じ構造をしている。

第3章では、トロポニンCの Ca^{2+} 結合と Hg^{2+} 結合に関する性質と特徴が記述されている。アポトロポニンCに対して Ca^{2+} イオンや Hg^{2+} イオンを徐々に加えていったときに、トロポニンCの ^1H -NMRスペクトルがどのように変化するかを調べた。この章で明らかにされた主な点は以下の通りである。

- 1) トロポニンCのC側ドメインの2つの Ca^{2+} 結合部位は、N側ドメインの2つの Ca^{2+} 結合部位よりも強く Ca^{2+} イオンを結合する。
- 2) C側ドメインの2つの Ca^{2+} 結合部位のうちどちらか一方に Ca^{2+} が結合することにより、C側ドメインの構造変化が起こる。
- 3) N側ドメインの2つの Ca^{2+} 結合部位のうちどちらか一方に Ca^{2+} が結合することにより、N側ドメインの構造変化が起こる。
- 4) Ca^{2+} 結合に伴うC側ドメインの構造変化の速さは $10\text{--}20\text{s}^{-1}$ 以下、N側ドメインの構造変化の速さは 600s^{-1} 以上と見積られる。
- 5) トロポニンCの4つの Ca^{2+} 結合部位は、 Hg^{2+} 結合部位でもある。これらの Hg^{2+} 結合の強さは、 $1 \times 10^3 \text{M}^{-1} \sim 1 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ と見積られる。
- 6) Hg^{2+} 結合に伴うC側ドメインの構造変化の速さは $20\text{--}30\text{s}^{-1}$ 以下、N側ドメインの構造変化の速さは 1000s^{-1} 以上と見積られる。

第4章では、トロポニンCと、トロポニンIのトロポニンC結合部位(96-116番目)

に相当する合成ペプチド（CN4と略）との相互作用が調べられている。 Ca^{2+} 結合状態と Hg^{2+} 結合状態のトロポニンCにそれぞれCN4を加え、それぞれについてトロポニンCの1次元と2次元の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの変化を調べた。この章で明らかにされた主な点は以下の通りである。

- 1) Ca^{2+} 結合型トロポニンCでは、C側ドメインとN側ドメインの両方がCN4と相互作用する。この相互作用に伴いN側ドメインの構造は安定化する。
- 2) Hg^{2+} 結合型トロポニンCでは、C側ドメインだけがCN4と結合する。C側ドメインとN側ドメインの構造の安定性はこの相互作用により変わらない。
- 3) Ca^{2+} 結合型トロポニンCとCN4の相互作用の強さは $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ と見積られる。これに比べて Hg^{2+} 結合型トロポニンCとCN4の相互作用の強さは $0.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ と、10倍程度小さい。

第5章では、第1章から第4章までの結果をもとに、 Hg^{2+} と Ca^{2+} の結合に依存したトロポニンCとトロポニンIの相互作用について考察をしている。さらに、この相互作用によって実際の筋肉収縮がどのように調節されているかという考察が試みられている。

付録では、トロポニンCがジスルフィド結合を作り自己会合をすること、それがこれまでのトロポニンCに対する研究結果を不明瞭にしていたことを記述している。さらに、トロポニンCに対する還元剤の添加が、この自己会合を防ぐことを証明している。

本研究から、 Hg^{2+} や Ca^{2+} の結合に伴うトロポニンCの構造変化は、C側ドメインとN側ドメインでそれぞれ異なっていることが明らかになった。トロポニンCとトロポニンIの相互作用の変化は、N側ドメインの構造変化によりもたらされることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 引 地 邦 男
副 査 教 授 戸 倉 清 一
副 査 教 授 盛 田 フ ミ
副 査 助 教 授 田 中 勲

学 位 論 文 題 名

¹H-NMR Study of Rabbit Skeletal Muscle Troponin C

(¹H-NMRによるウサギ骨格筋トロポニンCの研究)

トロポニンとは筋収縮にかかわる蛋白質である。トロポニンはトロポニンC、トロポニンI、トロポニンTの3つのサブユニットから構成されている。トロポニンCはMg²⁺イオンやCa²⁺イオンを結合して筋収縮を制御する。トロポニンIは筋肉収縮を妨げる働きをする。1970年代にトロポニンCがトロポニンIの筋収縮阻害作用を解除することが示唆された。NMR分光法を用いたトロポニンCの研究は1977年に英国の研究者らにより始められた。しかし、トロポニンCのNMRスペクトルは極めて複雑なため、十分な研究がなされていない。学位申請者はトロポニンCの自己会合を防ぐことにより、詳しい研究が可能であることをみだし、2次元NMRの手法を応用することでトロポニンCの詳細な構造解析を行うことに成功した。論文では、トロポニンCの筋肉弛緩状態(Mg²⁺結合状態)と筋肉収縮状態(Ca²⁺結合状態)での構造と性質の違いを明らかにしている。更に、その違いがトロポニンIにどのように伝わるかを調べている。

論文は5章より構成されている。第1章では、これまでのトロポニンCについての研究を概観し、Mg²⁺やCa²⁺を結合したトロポニンCについての構造解析の重要性を指摘している。

第2章では、Ca²⁺結合状態、Mg²⁺結合状態、およびCa²⁺、Mg²⁺を結合していない(ア

ポ) 状態のトロポニン C の構造について記述している。ここで明らかにされた点は以下の通りである。1) アポトロポニン C の C 側ドメインには高次構造が形成されていない。一方、N 側ドメインには、疎水性領域と逆平行 β シートが形成されている。2) Ca^{2+} 結合型トロポニン C の C 側ドメインと N 側ドメインに、疎水性領域と逆平行 β シートが形成されている。N 側ドメインの疎水性領域と逆平行 β シートの構造は揺らいでいる。3) Mg^{2+} 結合型トロポニン C の C 側ドメインと N 側ドメインの両方に、疎水性領域と逆平行 β シートが形成されている。この N 側ドメインの疎水性領域は、アポトロポニン C の N 側ドメインの疎水性領域と同じ構造をしている。

第 3 章では、トロポニン C の Ca^{2+} 結合と Mg^{2+} 結合に関する性質と特徴が記述されている。以下の点が明らかにされた。1) トロポニン C の C 側ドメインの 2 つの Ca^{2+} 結合部位は、N 側ドメインの 2 つの Ca^{2+} 結合部位よりも強く Ca^{2+} イオンを結合する。2) C 側あるいは N 側ドメインの 2 つの Ca^{2+} 結合部位のうちどちらか一方に Ca^{2+} が結合することにより、各々のドメインに構造変化が起こる。3) トロポニン C の 4 つの Ca^{2+} 結合部位は、 Mg^{2+} 結合部位でもある。

第 4 章では、トロポニン C と、トロポニン I のトロポニン C 結合部位 (96-116 番目) に相当する合成ペプチド (CN 4 と略) との相互作用が調べられている。以下の事柄が明らかにされた。1) Ca^{2+} 結合型トロポニン C では、C 側ドメインと N 側ドメインの両方が CN 4 と相互作用する。この相互作用に伴い N 側ドメインの構造は安定化する。2) Mg^{2+} 結合型トロポニン C では、C 側ドメインだけが CN 4 と結合する。C 側ドメインと N 側ドメインの構造の安定性はこの相互作用により変わらない。3) Ca^{2+} 結合型トロポニン C と CN 4 の相互作用の強さは $1.1 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ と見積られる。 Mg^{2+} 結合型トロポニン C と CN 4 の相互作用の強さは $0.9 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ で、 Ca^{2+} 結合型トロポニン C より 1 桁小さい。

第 5 章では、第 1 章から第 4 章までの結果をもとに、 Mg^{2+} と Ca^{2+} の結合に依存したトロポニン C とトロポニン I の相互作用について考察をしている。

本論文は、トロポニン C とトロポニン I の相互作用の変化が Mg^{2+} と Ca^{2+} の結合に伴うトロポニン C の N 側ドメインの構造変化によりもたらされることを初めて明らかにしたもので、今後の研究に指針を与えるものとして高く評価される。

参考論文はいずれも本論文に関係深いものである。審査員一同は申請者が博士 (理学) の学位を得る十分な資格があると認めた。