

インが“柔軟な”部分で連結され全体として柔軟に動くことができることを示唆する。

とくに、「IT アーム」の中核は TnI と TnT の間に形成された α ヘリックスのコイルドコイルであり、注目に値する。この構造は2本のポリペプチド間に多くの相互作用(疎水性および水素結合)が存在するので“固い”ため、「IT アーム」に剛性を与えていると考えている。

4. 結合したカルシウムイオンの役割

心筋 Tn には「調節頭部」に1つ(骨格筋 Tn では2つ)、「IT アーム」に2つの Ca^{2+} 結合部位がある。前者(結合部位 II)への Ca^{2+} の結合・解離が筋収縮・弛緩のスイッチとして機能しているのに対し、後者(結合部位 III および結合部位 IV)は筋細胞中で Ca^{2+} ないしは Mg^{2+} を結合し^{*1}、分子の安定化にかかわっていると考えられていた(次節を参照)。今回得た構造により、結合部位 II への Ca^{2+} 結合が TnI と TnC 間の疎水性結合をスイッチする仕組みが解明された。また結合部位 III および IV へのイオン結合が3つのポリペプチド鎖を強く結びつける役割を

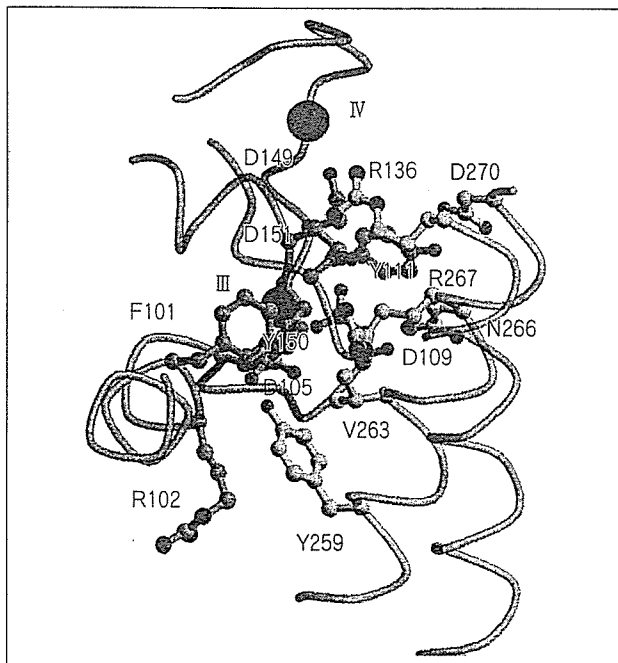


図5 結合したカルシウムイオンの役割
 Ca^{2+} (黒丸)が結合した TnC の結合部位(III)および(IV)は「IT アーム」中で TnC(茶)、TnI(空色)、TnT(黄)を束ねる役割を担う。(文献5より許可を得て転載)

担っていることが明らかになった(図5)。これらの Ca^{2+} 結合部位を形成するループは、一方では Ca^{2+} と配位結合しながら、他方では TnI-TnT 間に形成された α ヘリックスのコイルドコイルと結合している。

5. トロポニン分子内の構造変化

Tn はカルシウム受容蛋白質である。それゆえ Ca^{2+} の結合・解離に伴う構造変化を知ることが、Tn の結晶構造研究の最大の関心事である。今回解明した結晶構造と先行研究の結果を総合すると、①Tn 分子内部の大きな構造変化についてはその大筋が解明されたと思われる。また、②Tn から Tm/アクチンに伝搬する信号の実体については筆者らは仮説を提案したが、その証明は今後に残された課題である。

Ca^{2+} 結合による Tn 分子内の構造変化については1998年の筆者らの Tn 分子の部分(TnI のN末端側47残基と TnC の全体)の結晶構造が出発点となった⁷⁾。

(1) TnC は互いによく似た2つの球状部(N末端側、C末端側)が中央の1本の α ヘリックスで連結されている。N末端側球状部の Ca^{2+} 結合部位(骨格筋ではIとII、心筋ではIIのみ)は、 Ca^{2+} のみを結合し、解離定数は $10^{-6} M$ 程度である。つまりI、IIはカルシウム調節に使われていると考えられる。他方、C末端側球状部分の Ca^{2+} 結合部位(骨格筋、心筋ともIIIとIV)は Ca^{2+} および Mg^{2+} を結合し、その結合はI、IIより強い。

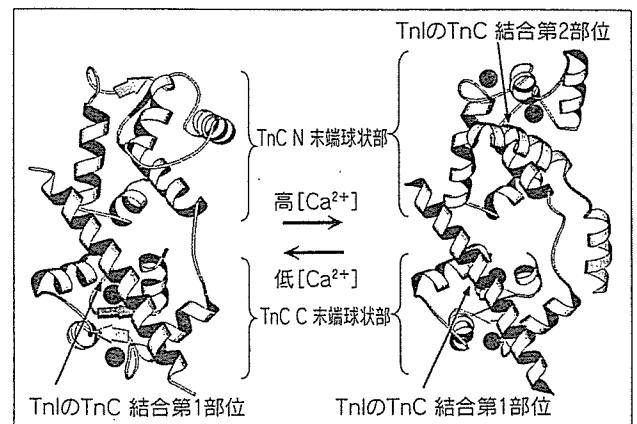


図6 TnC と TnI の2対の相互作用部位
 低 $[Ca^{2+}]$ 状態では TnI の TnC 結合第1部位のみが TnC の C末端側球状部に結合し、高 $[Ca^{2+}]$ 状態ではそれに加えて第2部位が TnC の N末端側球状部に結合する(文献7参照)

*1 筋細胞中でイオン結合部位 III, IV に結合しているイオン種についての直接の測定はない。間接的な証拠から Ca^{2+} と Mg^{2+} の双方が結合しているとされている。その比は細胞内イオン組成その他に依存する⁸⁾。

(2) 当時すでに TnC と TnI の結合部位はそれぞれの側に 2カ所ずつあることがわかっていた⁹⁾が、2対2の対応関係も、また結合部位の詳細も不明であった。

(3) 1998年の結晶構造は2対のうちの1対の結合の構造の詳細を明らかにした。Ca²⁺結合部位Ⅲ、ⅣへのCa²⁺の結合によりTnCのC末端側球状部が開き、内部に隠れていた疎水性ポケットが表面に露出し、そこにTnI上のTnC結合第1部位(N末端側)が両親媒性 α ヘリックスを形成して結合する(図6左)。

(4) 先行研究より、(TnCのN末端側球状部の)Ca²⁺結合部位Ⅰ、ⅡにCa²⁺が結合すると、(上述のC末端側球状部と)同様に球状部が開き、内部に隠れた疎水性ポケットが表面に露出することがわかっていた¹⁰⁾。しかし、そこに何が結合するかは不明であった。

(5) (3)の結合構造の詳細を基に、(4)のパートナーが両親媒性ヘリックスを形成するTnIのC末端側部分[TnC結合第2部位、後述のH3(I)]であることを推測して提案した(図6右)。

(6) 以上より、TnCの2つの球状部の役割分担が明らかになった。C末端側球状部は弛緩状態・収縮状態によらず構造が開いており、それを介してTnIに結合している。つまりTnCをトロポニン分子内につなぎ止める構造保持の機能をもつ。それに対し、TnCのN末端側球状部は細胞内Ca²⁺濃度が上昇した収縮状態でのみ構造

が開き、TnIのTnC結合第2部位を結合する。つまりCa²⁺濃度上昇をTnCからTnI-TnTへ伝える信号そのものである、と結論された。

さて、今回の結晶構造はカルシウム結合型であり、TnCのN末端側球状部にH3(I)が結合した構造を示した。この構造は両者からの側鎖の接触の詳細に至るまで、1998年に筆者らが推測したとおりであった。今回の構造では、同時に3つのポリペプチドの相互配置が解明された。これらを総合して、分子内構造変化の大筋は以下のものであると筆者らは提案している(図7)。

(1) TnIのポリペプチド鎖上、H3(I)のすぐ上流には、阻害領域(IR)があり、この部分は弛緩状態(低[Ca²⁺]状態)でアクチンに結合していると考えられる^{11,12)}。この部分のアクチンへの結合が、直接アクチンフィラメントの状態を大きく規定していると思われる。

(2) TnIのポリペプチド鎖上、H3(I)の下流のヘリクス4[H4(I)]、およびC末端部分(C-TnI)も低[Ca²⁺]状態ではTm/アクチンに結合していると考えられる¹³⁾。つまり、低[Ca²⁺]状態では、TnIのIRよりC末端側の部分(TnIの調節領域とよぶことにする)が、Tm/アクチンに結合している。しかもこの部分はTm/アクチン上でコンパクトな構造をとると考えてよい間接的な証拠がある。以上、(1)と(2)の構造は低[Ca²⁺]状態でのアクトミオシン相互作用の阻害作用に対応すると考えられる。

(3) 高[Ca²⁺]状態では、TnI調節領域にあるH3(I)がTnCのN末端球状部に引きつけられるために、TnI調節領域はTm/アクチンより解離し、全体としてコンパクトな状態から伸びた状態に移行すると考えられる。実際、今回の構造では、揺動のためがIRの構造は電子密度分布上に確認することはできなかったが、その部分の結晶内での長さから判断すると伸びた構造をとっているに違いない。以上、(3)への構造の遷移は、阻害作用の解除に対応すると考えられる。

以上でCa²⁺結合がTn分子

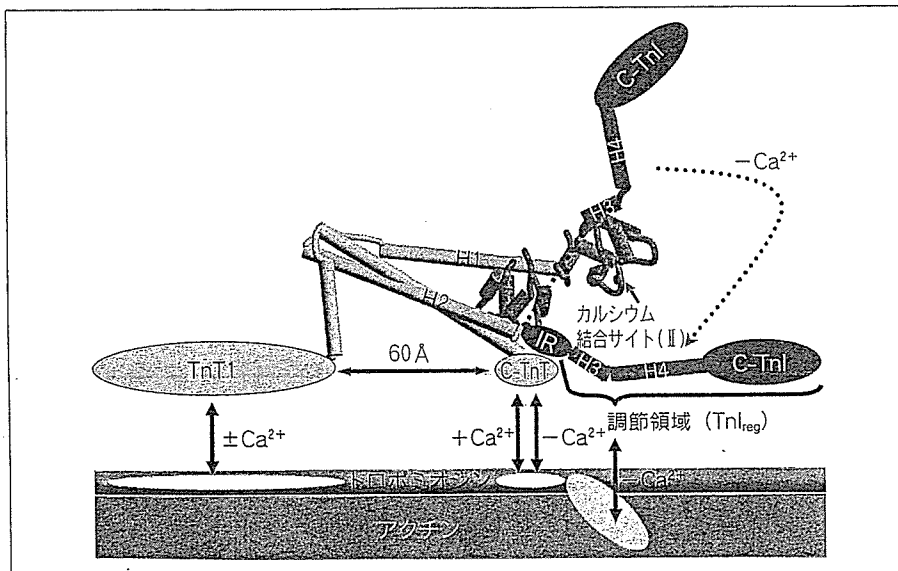


図7 カルシウムイオンの結合・解離に伴うトロポニンの構造変化と他の筋蛋白質との相互作用の推測図
(文献5より許可を得て転載)

内にひき起こす構造変化の大筋は明らかになったと考えられる。今後、これらの構造変化、とくに TnI の調節領域の構造変化を実際に捉えることが課題となる。構造変化の内容としては、結合相手を代えること、ポリペプチド鎖の折りたたみ状態が変わること、そしてアクチンフィラメント上での位置が変わること、を含むことになる。

6. トロポニンからトロポミオシン・アクチンへの信号

以上で述べた Tn 分子内部の構造変化が Tm/アクチンへどのように伝搬するか、その信号の実体についてはまだ不明である。それは今回の結晶構造には Tm との結合部のほとんどが含まれていないこと、Ca²⁺非結合型の構造が不明であること、などによる。しかし、筆者らは次のような根拠を基に Tn 分子の内部の構造変化は Tm 分子の歪みを変化させるのではないかとの仮説を提唱している。

- (1) 低 [Ca²⁺] 濃度では Tn が Tm に結合するのは次の 3 領域である。第 1 は TnT₁ の部分。これは今回の結晶には最初から含まれていない。第 2 は TnT の C 末端部分 (C-TnT)。この部分は今回の結晶に含まれていたが結晶中にははっきりした電子密度分布が得られなかった (揺動しているのであろう)。第 3 はすでに述べた TnI の調節領域。
- (2) 高 [Ca²⁺] 濃度では、上記 3 領域のうち第 1 と第 2 の領域は結合したままであるが、第 3 の領域は解離する (上述)。こうして 3 点結合が 2 点結合となる。
- (3) 第 1 と第 2 の領域の間は約 60 Å 離れており、その間は α ヘリックスのコイルドコイルを中核とする IT アームが橋桁のように渡っている。そして IT アーム自体は Tm/アクチンと相互作用しない。
- (4) Tn-Tm の第 2 の結合部 (C-TnT) は、一方で大きく構造変化する TnI の調節領域と、他方で IT アームの中核であるコイルドコイルと (構造上) 隣接する。よって、TnI の調節領域の構造変化は、第 2 の結合部 (C-TnT) の周りの回転 (および捻れ) としてはたらき、それは IT アームの回転 (および捻れ) をひき起こし、さらに第 1 の結合部 (TnT₁) を介して Tm を歪める力として伝達されることが考えられる。

7. どうして長い年月がかかったのか

本研究は開始してから 13 年の年月が経過した。最近

の蛋白質 X 線結晶解析の技術的進歩 (遺伝子工学的技術、シンクロトン放射 X 線源の性能向上、計算機の処理能力とアルゴリズムの改良) の結果、一般的には蛋白質複合体の結晶構造解析にこのような長い年月がかかることはまれである。本研究に長期間を要したのは次のような理由があった。

- (1) Tn は骨格筋や心筋などの臓器から簡単にグラム単位の標品が得られるが、それは多くのアイソフォームの混合物であって化学的に均一でないため結晶を生じない (アイソフォーム存在の生理的意義は全面的には解明されていない)。その結果、ポリペプチド 3 種について大腸菌の発現系を確立する必要があった。本研究を開始した 1990 年当時は自分たちでそれらの cDNA を得ることから始める必要があった。また、結晶化が困難であることがわかっていたので、ヒト心筋、ウサギ骨格筋、ニワトリ骨格筋の 3 種についてそれぞれポリペプチド 3 種 (合計 9 種) の蛋白質の大量発現系をすべて構築し、多種の試料の結晶化条件検索を同時並行的に実行した。その結果、ヒト心筋 Tn のみから解析可能な結晶が得られた。
 - (2) すでに述べたように、Tn には Tm/アクチンに結合する領域が複数ある。結晶をつくるにはこれらの領域を切除する必要があるが、切除しすぎると機能に重要な部分の構造がわからない。それゆえ、結晶構造が未知の段階で分子のドメイン構造とその機能分担を大雑把に理解する作業が不可欠であった¹³⁾。
 - (3) その他、各発現ポリペプチド鎖の質量分析による品質管理の徹底、ポリペプチドの化学的切断法の適用¹⁴⁾、X 線回折強度収集における双晶の問題の解決¹⁵⁾ など、新しい技術の導入を含めて多くの問題を解決する必要があった。
- 13 年の間、根気が続いた理由は 2 つある。第 1 に、カルシウム調節のメカニズムの理解のためには Tn の結晶構造を知らなくては前に進めない、そのためには 7~8 年の歳月をかけてもよいと考えた。第 2 に、1998 年に部分の結晶構造 (I-5. 参照) が解明された意義は大きかった。どんな小さな構造でも複数のポリペプチド間の相互作用の構造は驚くほど多くの知見をもたらすことを教えられた。

II. 遺伝性心筋症をひき起こすトロポニンの変異とそれに起因する機能異常

カルシウム調節のメカニズムを解明するためには、カルシウム調節についての生理学の知見がとても重要である。生理学は構造を見る眼を与えてくれる。この節では遺伝性心疾患の病理の解析をはじめとした筆者(大槻, 森本)らの最近の成果を紹介し、カルシウム調節の機能面での理解がいかに深化してきたかをまとめたい。

1. 機能異常の3つの型

最近の医学の進歩によって、肥大型心筋症(HCM)¹⁶⁾、拡張型心筋症(DCM)^{17,18)}、拘束型心筋症(RCM)¹⁹⁾などの心筋症(心臓の病気)の原因がTnの遺伝的変異であることがわかってきた*2。このうち、肥大型心筋症は若年性突然死の原因となる。また、拡張型心筋症は心臓移植を必要とする疾病のうちで最も患者数の多い心疾患となっている(表1)。

筆者らは、それら変異Tnによる機能異常を系統的に調べた^{20,21)}。驚くべきことに、20あまりの単一残基の変異のそれぞれが明確な機能異常をひき起こし、しかもそれらがたった3つの型に収斂する(図8b)。I型はカルシウム感受性の亢進、II型はその抑制、III型はカルシウム濃度によらない張力の増大である。

心筋細胞が生じる張力の大きさは細胞内 $[Ca^{2+}]$ による。張力 $[Ca^{2+}]$ のグラフ(図8b, c)からわかるように、心筋の弛緩・収縮に伴って細胞内 $[Ca^{2+}]$ は、張力にしてほぼゼロから発生可能な張力の半分程度の間

表1 遺伝性心疾患の機能異常

遺伝性心疾患	機能変調	症状
肥大型心筋症(HCM)のほとんど	Ca ²⁺ 感受性亢進(I型)	若年性突然死に至ることあり
2例	張力増大(III型)	良好な予後
拡張型心筋症(DCM)	Ca ²⁺ 感受性抑制(II型)	心臓移植の第1原因疾患
拘束型心筋症(RCM)	?	

を行き来する。肥大型心筋症では2例を除いて、このグラフが左に平行移動をする、つまりより低い $[Ca^{2+}]$ でより大きな張力を出す(カルシウム感受性の亢進)²²⁾。拡張型心筋症では、このグラフが右に平行移動する、つまりより高い $[Ca^{2+}]$ ではじめて一定の張力を出す(カルシウム感受性の抑制)²³⁾。最後に、肥大型心筋症の2例では、張力 $[Ca^{2+}]$ のグラフは左右に移動するのではなく、縦軸方向に一樣に拡大する、つまり、どの $[Ca^{2+}]$ でも一樣に発生張力が大きくなった²⁴⁾。このタイプの肥大型心筋症患者の予後は良い、と報告されている^{16,25)}。

この一連の研究で明確な機能異常を示すことができたのは、すべて自前で開発した高精度の実験法によるところが大きい。TnTを使っての変異TnTないしは変異

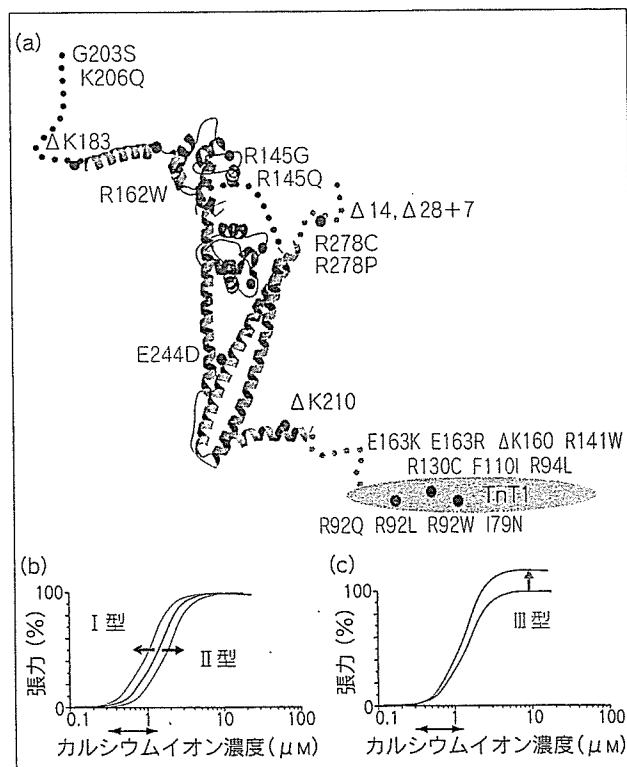


図8 遺伝性心疾患の原因変異と機能異常
(a)遺伝性心筋症をひき起こすTnの変異の結晶構造の上での位置。(b, c)変異Tnによる張力 $[Ca^{2+}]$ 関係の異常は3タイプに収斂する。変異個所と機能異常型の対応関係は色分けで示す。

*2 肥大型心筋症では症例の70%程度が、拡張型心筋症の場合は症例の20~30%程度が筋蛋白質(アクチン, ミオシン, Tm, Tnなど)の遺伝的変異に起因するといわれている。Tnの変異に起因するものはさらにその一部であるが、Tn以外の筋蛋白質の変異であっても、調節機能に異常があると考えられる。というのも、Tnは調節の中心蛋白質であるが、Tnだけが調節機能を担うわけではない。アクチンフィラメント複合体全体が一体になって調節を担うし、またミオシンとの相互作用がアクチンフィラメント複合体の調節機能に影響を及ぼすと考えられるからである。

TnIの交換導入法と精度の高い張力測定法^{26,27)}である。遺伝性心疾患の解析は世界中の多くの研究室で取り組まれてきたが、より精度の低い方法しかもっていなかった研究室からはまとまった知見は得られなかった。筆者らの得た知見は今では多くの研究者に受け入れられている^{28,29)}。

2. カルシウム調節機能を構成する2要素メカニズム

この結果は、カルシウム調節という機能はさらに2つの要素メカニズムに分解できることを示す。第1は、Tnによる張力の抑制と、 Ca^{2+} による抑制の除去(抑制・脱抑制)による部分である。この部分の異常がI型とII型の機能異常となったのであろう。第2は、最大張力がTnによって増大する活性化の部分であって、III型の異常はこの活性化がさらに亢進したものであろう。

筆者らはグリセリン処理ウサギ骨格筋が発生する張力のうち、抑制・脱抑制による部分が75%を占め、活性化による部分が25%を占めることを示している²⁷⁾(図9)。実験ではグリセリン筋に存在する本来のTn分子(TnC-TnI-TnT)を外から与えたTnTで置き換えていき、置換の程度に応じた張力- $[Ca^{2+}]$ 関係を測定する。TnをTnTで置換したアクチンフィラメント複合体は機能的にはTm/アクチン複合体と同等とみなすことがわかっている。このようにして、Tn/Tm/アクチン複合

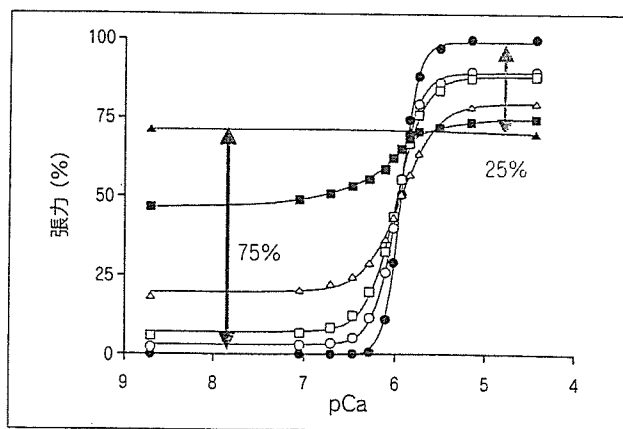


図9 骨格筋の発生張力におよぼすトロポニンの影響
グリセリン筋が発生する張力の $[Ca^{2+}]$ 依存性を、Tn除去する前(●)と完全にTnを除去したあと(▲)、およびその途中経過(その他の点)で計測。この実験ではグリセリン筋中のTnを外から加えたTnTで置換するが、これはTnを除去するのと同じ効果をもつ。(文献²⁷より許可を得て転載)

体とTm/アクチン複合体の機能を比較することができた。

江橋らは当初、カルシウム調節における抑制・脱抑制の重要性を強調したが、活性化も重要であることがわかる。

3. ホタテ貝横紋筋の活性化機構

カルシウム調節における活性化の意義は、ホタテ貝横紋筋においてさらに鮮明に示された。

筆者らは、北海道大学の西田、尾島らと共同でホタテ貝(アカザラ)横紋筋におけるトロポニンの役割を調べた³⁰⁾。ホタテ貝は、アクチンフィラメント複合体が担う「アクチン連関調節系」とは別に、ミオシンに結合するミオシン軽鎖(LC)がカルシウム受容体としてはたらく「ミオシン連関調節系」をもっている。Andrew Szent-Gyorgyiらはホタテ貝横紋筋で「ミオシン連関調節系」を発見したとき、「アクチン連関調節系」の存在を否定したために、長い間ホタテ貝横紋筋は「ミオシン連関調節系」のみによって調節されていると信じられてきた。しかし、ホタテ貝横紋筋にも「アクチン連関調節系」が存在する。ただ、その役割は不明であった。

ホタテ貝の筋原繊維からミオシン調節軽鎖(RLC)^{*3}とTnCの双方を除去してはじめてATP加水分解活性は $[Ca^{2+}]$ に依存しなくなるので、「ミオシン連関調節系」と「アクチン連関調節系」の双方が機能していることがわかる。ミオシン調節軽鎖あるいはTnCのみを戻す実験から、「ミオシン連関調節系」はおもに「抑制・脱抑制」を担い、「アクチン連関調節系」はおもに「活性化」を担っていることがわかる(図10)。この実験は15℃というこの生物の適温下で行なうことが重要であった。従来の実験(25℃)ではTnの役割は明確ではない。このように、下等生物のTnは「活性化」に特化しているといえる。Tnが担うカルシウム調節で「活性化」が重要であることは、このような形でも明確になってきた。

4. 遺伝性心疾患をひき起こすトロポニン変異の意義

さて、遺伝性心疾患の解析の意義はもちろんその疾患を治療する方針を確立することにあるが、それ以外にも心筋の生理学の理解を深めるという意義がある。それ

*3 ホタテ貝横紋筋ミオシンでは Ca^{2+} は必須軽鎖(ELC)に結合するが調節軽鎖(RLC)を除去することによってこの結合能は失われる。

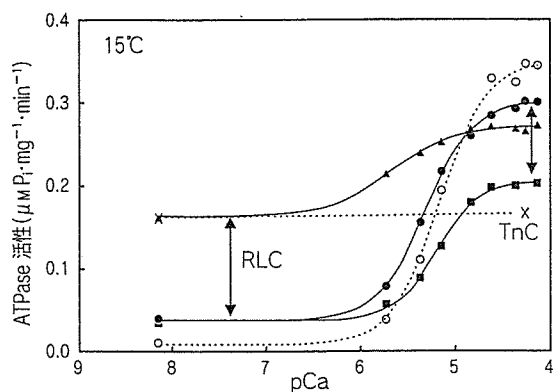


図 10 ホタテ貝横紋筋の調節
処理前(○), ミオシン軽鎖(RLC)とTnCの双方を抽出後(X), TnCのみを戻したあと(▲), RLCのみを戻したあと(■), 双方を戻したあと(●). (文献 21, 30 より許可を得て転載)

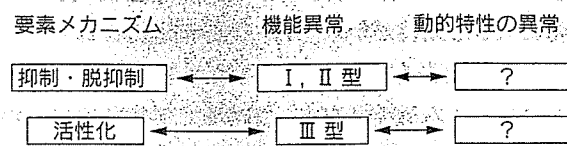
は、遺伝性心疾患をひき起こす変異は、調節機能に異常のある変異に(ほぼ)限られるからである。というのも、一般に遺伝性心疾患の患者は成人してから発症するから、問題の変異は個体の発生を脅かすような(たとえばTnがまったくの機能不全というような)重大な変異ではない。もし人為的に変異Tnを調製するとなると、そのなかから調節機能に異常を示す変異のみを選択する大規模な作業が必要になる。

しかし、一般に遺伝病の原因変異を突き止めることは比較的簡単にできるが、明確な機能異常を測定できる例はほとんどない。まして、変異に伴う蛋白質分子の物性の変化などは小さすぎて有意な差として測定することは不可能と考えられてきた。しかし、ここで示したTn変異では機能異常が明確に測定されている。このことは、分子の物性や動態の異常も測定できる可能性があることを示している。

興味深いことに、Tnの変異箇所は、ITアームなど構造が固い部分には少なく、結晶構造中で揺動していると考えられる部分や、Tmとの結合部位(TnT₁など)に集中している。しかも、特定の機能異常をひき起こす変異は特定の位置に集中しているわけではなく、散在している(図8a)。つまり、筆者らはまだ変異の位置と機能異常を関係づける“眼”をもたない。機能異常はTn分子上の特定の位置に関するのではなく、むしろ特定の運動様式の障害に対応すると考えられる。

もし機能異常がTn分子の特定の運動様式の障害(異常)に対応するなら、それを動的特性の異常として実際に観測することができないか。たとえばⅢ型の機能異常

($[Ca^{2+}]$ によらない張力増大)は活性化という要素メカニズムの亢進と考えられる。もしⅢ型に特徴的な動的特性の異常を検出できれば、活性化に対応する分子の運動を同定することができる。



5. 遺伝性心疾患の動物モデル

前節で、遺伝性心疾患をひき起こす変異は、調節機能に異常のある変異に(ほぼ)限られる、と述べた。しかし、この点を実証することを含め、遺伝性疾患の発症メカニズムを理解するには、当該の変異遺伝子を組み込んだ動物モデルを作出する必要がある。

筆者らは最近、肥大型心筋症をひき起こす心筋TnTの変異ヒト遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスの作出に成功し、現在その解析を進めている。トランスジェニックマウスより作製した心筋線維束の収縮は $[Ca^{2+}]$ に対して高い感受性を示し、肥大型心筋症をひき起こすTnT遺伝子変異が心筋収縮のカルシウム感受性を亢進させていることが個体レベルで確認された³¹⁾。生きた個体での心臓超音波機能解析および摘出心臓ポンプ機能解析により、トランスジェニックマウスの心臓は若いころには正常あるいはむしろ正常より高い機能を示すが、年齢とともに心拍量低下と心筋繊維化がみられるようになることが明らかになった。肥大型心筋症において、心筋収縮カルシウム感受性の亢進というトロポニンによる調節機能の変化が、個体レベルでこのように時間をかけて心機能を変化させていくメカニズムを明らかにすることが今後の課題である。

6. 創薬の基本戦略への提案

最後に、この解析結果が心不全(心筋梗塞など)の治療薬の開発戦略に大きな影響を与えていることを指摘したい。

心筋梗塞など心不全の患者には、残存する心筋からより大きな収縮力をひき出すために強心薬を投与する。ジギタリスに代表される従来の強心薬はすべて、細胞内 $[Ca^{2+}]$ を上昇させることで強心作用を発揮する。その

ため、細胞内カルシウム過負荷による副作用、すなわち致死的な不整脈や心筋細胞障害を起こしやすいという欠点をもっていた。そこで、ジギタリスに代わる新しい心不全治療薬として、細胞内 $[Ca^{2+}]$ を上昇させるのではなく、Tnに作用してカルシウム感受性を亢進させる薬物に大きな期待がかけられ、開発が進められてきた。しかし、肥大型心筋症の研究結果から予測されるように、カルシウム感受性を亢進させると突然死の危険があることがわかってきた。そのような副作用を伴わずに心筋の発生張力を大きくするには、 $[Ca^{2+}]$ によらずに張力を増大させる効果をもつ薬物が有望であろう。なぜなら、このような機能の変化はⅢ型の機能異常として遺伝性肥大型心筋症の2例で観察されており、これらの症例では予後はよい。もしⅢ型と同等な異常をきたす薬剤を開発することができれば副作用の少ない強心薬を開発することができよう。Ⅲ型に対応する分子の運動様式異常を知ることができれば、この開発作業はさらに進捗すると期待される。

III. カルシウム調節のメカニズム

I節ではカルシウム調節の構造研究の最近の重要な成果(Tnのコアドメインの原子座標解明)を紹介し、II節では機能研究の重要な進展(抑制・脱抑制と活性化の2要素メカニズムへの分解)を報告した。これらの成果によってカルシウム調節のメカニズムを理解するために必

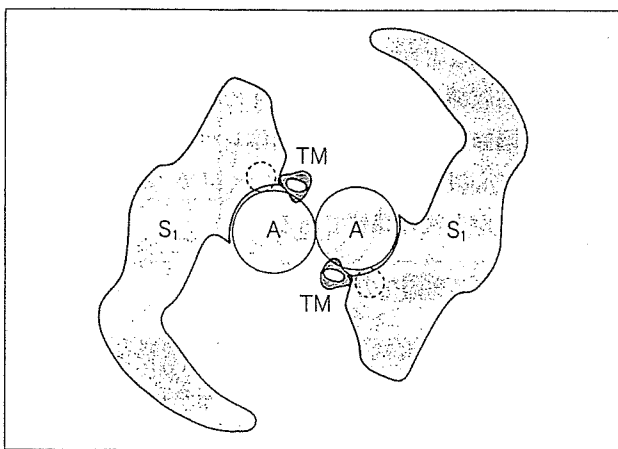


図11 トロポミオシンの「立体障害」説
アクチンフィラメント複合体の断面の模式図。アクチン(A)上でTm(TM)が移動することによってミオシン頭部(S₁)とアクチンの相互作用を立体障害的に阻害するとしている。(文献32より許可を得て転載)

要な材料が揃ってきたといえる。しかし、原子座標からメカニズムの解明に至る道筋はまだ見えない。ここではまずメカニズムについての既存の説を検討し、次にメカニズムを解明するために今後取り組むべき研究課題について筆者(前田・武田)らの意見を述べる。

1. 「立体障害説」の検討

カルシウム調節のメカニズムについて、筆者らはTmの柔らかさの変化が重要ではないかとの提案をしているが、これは既存の説とまったく異なる。まず広く教科書にまで紹介されている既存の説を検討する。

A. 「立体障害説」の根拠

1973年にH. E. Huxley³²⁾, J. Haselgrove³³⁾, およびD. A. Parry & J. Squire³⁴⁾がそれぞれ独立に、TnがTmをアクチン分子上を動かして立体障害的にミオシンとの相互作用を調節するという「カルシウム調節の立体障害説」(図11)を提案した。この仮説が大きな説得力をもったのは次の2つの理由がある。

(1)この仮説が提案されたのは江橋らのアクチンフィラメント複合体の分子模型が提案されてから間もない時期であった。この分子模型でTmが継ぎ目のない滑らかな連続らせんとしてすべてのアクチン分子と同等な位置関係にあるとの暗黙の示唆が(分子模型の提案者、江橋らの意図をこえて)、Huxleyらの説を支持するように考えられた。

(2)筋からのX線回折強度の変化(収縮時にアクチンらせん由来の第2層線の強度が第3層線より強くなる)は、アクチンフィラメント複合体の構造が(低分解能で見たときに)収縮時に、2本らせんより4本らせんに近い構造になることを示しており、これは「立体障害説」を直接支持すると考えられた。同じような回折強度の変化はアクチンフィラメント複合体の電子顕微鏡写真の光回折(および計算機によるフーリエ変換)でもカルシウム結合型と非結合型の間に観測される。

B. 「立体障害説」の困難

筆者らは「立体障害説」には次のような問題があり、少なくともそのままの形では成り立たないと考えている。

(1)上述したアクチンフィラメント複合体からの回折強度の変化は事実であるが、これをTm分子のアクチンフィラメント上での位置の変化として解釈するには無理がある。この解釈では第1に、Tmは連続かつ滑らかな

らせんを形成しすべてのアクチン分子と同等な位置関係にあると仮定しているが、この仮定が正しいとは確認されていない。第2に、Tnの分子がアクチンフィラメント上に385Åの周期で存在し、アクチンの分子配置のらせん対称性から外れていることを無視している。つまり、Huxleyらの解釈ではTn/Tmの複合質量があたかも江橋らの分子模型のTmのような連続らせんを形成していると仮定している。これは、とくにTn分子の構造およびTnとTmの位置関係に大きな変化が生じた場合に、それらの変化をすべてTmの位置の変化として解釈する結果となる。

(2)三木らは蛍光共鳴エネルギー遷移法(FRET)を用いて、アクチン上と、Tm上のそれぞれ特定の位置に結合した2蛍光標識間の距離を計測したが、Tm上のどこに標識をつけても、この距離は $[Ca^{2+}]$ によって変化しなかった。つまりアクチンフィラメント上でのTmの大きな位置の移動は観測されていない³⁵⁾。

(3)そもそもHuxleyらの「立体障害説」では、Tnによってアクチン-ミオシン間の相互作用が抑制され、 Ca^{2+} によってその抑制が解除されることを説明する。これは当時、江橋らがカルシウム調節でのTn/Tmの役割はアクトミオシンの作用の抑制であり、 Ca^{2+} の役割はその抑制の解除であると強調していたことに対応する。しかし、その後の研究によって、カルシウム調節では抑制・脱抑制だけではなく、アクトミオシン作用の活性化も無視できないことがわかってきた(II節)。「立体障害説」は活性化を説明することができない。

2. 今後の課題

筆者らはカルシウム調節のメカニズムを解明するために、次のような研究を展開する必要があると考えている。

A. トロポニン分子内の構造変化の実証

まずTn分子内の構造変化を実際に測定して、本稿で大筋を説明した構造変化を実証する必要がある。第1はTnIの調節領域の大きな構造変化を確認することである。すでに三木らはFRETを用いて、アクチン上でTnIのC末端領域(ウサギ骨格筋のCys133)がカルシウム結合でアクチンから離れる方向に動くことを報告してい

る³⁶⁾。第2にITアームの動きを検証する必要がある。筆者らはITアームの動きにより2つのTnTの領域(TnT1およびC-TnT)間の相対位置の変化を予測したが、FRETによりこれらの部分がアクチンとの位置関係を変化させることが明らかにされている³⁷⁾。他方、TnCのN末端球状部を構成する個々のヘリックスの(アクチンフィラメント軸の方向に対する)角度を計測した報告³⁸⁾があるが、これは多くの知見をもたらさないであろう。というのは、上述したように調節頭部とITアームの間の連結は柔らかく、TnCのN末端球状部がITアームに対して(それゆえ大雑把にはアクチンフィラメント軸に対して)どのような角度にあるかは受動的に決まると考えられるからである。

B. 大きな複合体の構造解析

Tn分子からTm/アクチンへ伝搬する信号の実体を知るには、まずTn/Tm複合体の結晶構造を知って、Tn-Tm間の結合の詳細を解明する必要がある。武田らはすでにTn/Tm複合体の結晶を複数得ているが、結晶の質に問題があるため、現在結晶の改良に取り組んでいる³⁹⁾。さらにTn/Tm/アクチンの構造を15~20Å分解能で知ることによって、複合体上でのTmらせんのおおよその形とTn/Tmの構造変化の概略を知る必要がある。このためには電子顕微鏡写真をらせん対称の仮定なしで解析する必要があり、それは単粒子解析法を用いるのが最適であろう。成田らは自らがすでに開発した方法⁴⁰⁾を使って、現在この課題に取り組んでいる*4。さらにTn/Tm/アクチンからなるミニフィラメントを調製してその結晶構造解析を実行することが次の課題である。

C. アクチンフィラメント上のトロポミオシン

アクチンフィラメント上でのTmについて、どのようにアクチンに結合しているか、どの程度の柔らかさがあるのか、ほとんどわかっていない。この点はカルシウム調節メカニズムの理解にとって重要と思われる。

K. C. HolmesらはTm/アクチン複合体の配向ゾルのX線繊維回折強度を解析した⁴¹⁾。この結果によると、①Tmらせんの中心は平均してアクチンフィラメント軸から39Åの距離にあり、アクチン分子表面から半ば浮いている、つまりTm表面の大きな側鎖のみが直接アクチンと接触できる距離と考えられる。Tm分子は前後の

*4 成田・若林らは単粒子解析法を用いて再構成アクチンフィラメント複合体のクライオ電子顕微鏡写真の解析を行ない、 Ca^{2+} 結合によってTm分子のC末端半分のみがアクチン上で動く結論した⁴⁰⁾。しかしその後、FRET法で測定してもそのような位置変化は観測されなかった⁴⁵⁾。現在、この問題を解明するために、成田哲博らは試料と解析法の両面で単粒子法の改良を進めている。

Tm分子と連結して連続らせんをつくっているが、アクチン重合体とは強固に結合していないことを示唆する。

②Tmとアクチン表面の電位分布を考慮すると、Tmらせんはアクチン表面に対し特定の位置に、しかも特定の方位角にあるときのみ安定である。つまり何らかの理由で両者の表面電位分布が変化した場合、Tmの位置も方位角も大きく変化する可能性がある。筆者らはこれらの見解に無批判にくみするものではないが、この解析は現在のところTm/アクチンの構造解析としては最もしっかりした研究である以上無視することはできない。この研究を自分たちで追試することと、これらの結果を検証する実験を考案する必要がある。Tmの全長の結晶構造を解明することも、その基礎として重要である。

■ D. アクチンフィラメント複合体の物理的特性

それと同時に、アクチンフィラメント複合体の物理的特性、とくに動的特性の全体を理解する必要がある。1970年代の前半に大澤・藤目・石渡らは準弾性光散乱法を適用して、アクチンフィラメント複合体の曲がりやすさ(柔軟かさ)が $[Ca^{2+}]$ によって変化すると報告した⁴²⁾。これはカルシウム調節という機能はアクチンフィラメント複合体の動的特性の変化が原因であろうとの先駆的で意義深い指摘であったが、機能との関係を十分掘り下げて提示するには至らなかった。

筆者らは原子座標と動的特性を結びつけることのできる方法としてNMR法に注目したい。一般的にアクチンフィラメント複合体のように大きな複合体からNMRの信号を測定することは困難と考えられている。しかし、 Mg^{2+} 存在下で重合させたアクチン重合体からはNMR信号が記録され、N末端近辺の残基由来と同定されている⁴³⁾。Tn分子内のサブドメインの連結部は、結晶中で明確な電子密度分布を認められなかった(I節)。これらの部分はアクチンフィラメント上でも揺動しているか、複数の状態の間を揺らいでいると考えられる。これら部分からNMR信号を観測し、それからアクチンフィラメント複合体の動的特性を解明することが期待される。

■ E. アクチンフィラメントの運動様式

アクチンフィラメント全体の動的性質を理解しようとするとき、次のような視点が有効と思われる。Tn/Tmはアクチン重合体が本来もっている多様な運動様式から特定の様式のみを選択するとの役割を担っているのではないだろうか。

アクチンという蛋白質は筋収縮の研究から発見され

た。しかしながら、現在では、すべての細胞に存在し、多くの重要な細胞機能にアクチンが関係していることがはっきりしてきた。たとえば、膜の局部への特定のイオンチャンネルの集合と離散は生理的に重要であるが、この動きはアクチンフィラメントによる。このようにアクチンは細胞内の蛋白質分子や装置の配置と移動の全般を担っているゼネラリストであるようだ。そして従来の筋の研究や細胞骨格の研究では、アクチン重合体は“固く”“静的な”フィラメント構造と理解されていたが、細胞内でのアクチン重合体はきわめてダイナミックであり、たとえば「アクチン・ダイナミクス」という重合・脱重合で駆動される分子運動はよく解析されている⁴⁴⁾。

アクチン重合体は単一の分子(アクチン単量体)からなる比較的簡単な構造をもつ複合体であるが、その簡単さゆえか、構造が多くの運動様式で“動く”ことができるようだ。そして、多くの異なった機能に対応して多くのアクチン結合蛋白質が存在するが、個々の結合蛋白質はアクチン重合体に新たな動きを付加するのではなく、アクチン重合体が固有にもっている多数の運動様式から特定の運動様式を選択するのではないか?

カルシウム調節を理解するためには、①カルシウム調節という機能がアクチン重合体に担われる多くの機能のひとつであること、②Tn/Tmが多くのアクチン結合蛋白質のひとつであること、そして③アクチンフィラメント複合体に観測される分子の運動様式はたぶんアクチン重合体が固有にもつ多くの運動様式のひとつであること、を理解することが重要となろう。

文 献

- 1) 丸山工作: 蛋白質 核酸 酵素, 48, 857-866, 1287-1295 (2003)
- 2) 大槻警男(退官記念講演): 福岡医誌, 91, 223-238 (2000)
- 3) Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., Ogawa, H.: *Nature*, 405, 647-655 (2000); 豊島 近・中迫雅由・野村博美・小川治夫: 蛋白質 核酸 酵素, 46, 1374-1380 (2001)
- 4) Toyoshima, C., Nomura, H.: *Nature*, 418, 605-611 (2002)
- 5) Takeda, S., Yamashita, A., Maeda, K., Maéda, Y.: *Nature*, 424, 35-41 (2003)
- 6) Herzberg, O., James, M. N.: *J. Mol. Biol.*, 203, 761-779 (1988); Satyshur, K. A., Rao, S. T., Pyzalska, D., Drendel, W., Greaser, M., Sundaralingam, M.: *J. Biol. Chem.*, 263, 1628-1647 (1988)
- 7) Vassilyev, D. G., Takeda, S., Wakatsuki, S., Maeda, K., Maéda, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 4847-4852 (1998)

- 8) Holroyde, M. J., Robertson, S. P., Johnson, J. D., Solaro, R. J., Potter, J. D. : *J. Biol. Chem.*, 255, 11688-11693(1980) ; Harada, K., Arana, C., Potter, J. D. : *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 33, 593-596(2001)
- 9) Farah, C. S., Reinach, F. C. : *FASEB J.*, 9, 755-767(1995)
- 10) Gagne, S. M., Tsuda, S., Li, M. X., Smillie, L. B., Sykes, B. D. : *Nature Struct. Biol.*, 2, 784-789(1995)
- 11) Syska, H., Wilkinson, J. M., Grand R. J., Perry S. V. : *Biochem. J.*, 153, 375-387(1976)
- 12) Talbot, J. A., Hodges, R. S. : *J. Biol. Chem.*, 256, 12374-12378(1981)
- 13) Takeda, S., Kobayashi, T., Taniguchi, H., Hayashi, H., Maéda, Y. : *Eur. J. Biochem.*, 246, 611-617(1997)
- 14) 武田壮一・前田雄一郎 : 生化学, 印刷中(2003)
- 15) 武田壮一・前田雄一郎 : SPring-8利用者情報, 印刷中(2003)
- 16) Watkins, H., McKenna, W. J., Thierfelder, L., Suk, H. J., Anan, R., O'Donoghue, A., Spirito, P., Matsumori, A., Moravec, C. S., Seidman, J.G., Seidman, C. E. : *N. Engl. J. Med.*, 332, 1058-1064(1995)
- 17) Kamisago, M., Sharma, S. D., DePalma, S. R., Solomon, S., Sharma, P., McDonough, B., Smoot, L., Mullen, M. P., Woolf, P. K., Wigle, E. D., Seidman, J. G., Seidman, C. E. : *N. Engl. J. Med.*, 343, 1688-1696(2000)
- 18) Li, D., Czernuszewicz, G. Z., Gonzalez, O., Tapscott, T., Karibe, A., Durand, J. B., Brugada, R., Hill, R., Gregoritch, J. M., Anderson, J. L., Quinones, M., Bachinski, L. L., Roberts, R. : *Circulation*, 104, 2188-2193(2001)
- 19) Mogensen, J., Kubo, T., Duque, M., Uribe, W., Shaw, A., Murphy, R., Gimeno, J. R., Elliott, P., McKenna, W. J. : *J. Clin. Invest.*, 111, 209-216(2003)
- 20) 大槻馨男 : 日本薬理学雑誌, 118, 147-158(2001)
- 21) Ohtsuki, I., Morimoto, S., Takahashi-Yanaga, F. : in Molecular and cellular aspects of muscle contraction (ed. Sugi, H., Pollack, G.), in press, Kluwer/Plenum, N. Y. (2003)
- 22) Morimoto, S., Yanaga, F., Minakami, R., Ohtsuki, I. : *Am. J. Physiol.*, 275, C200-C207(1998) ; Nakaura, H., Morimoto, S., Yanaga, F., Nakata, M., Nishi, H., Imaizumi, T., Ohtsuki, I. : *Am. J. Physiol.*, 46, C225-C232(1999) ; Morimoto, S., Nakaura, H., Yanaga, F., Ohtsuki, I. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261, 79-82(1999) ; Harada, K., Takahashi-Yanaga, F., Minakami, R., Morimoto, S., Ohtsuki, I. : *J. Biochem.*, 127, 263-268(2000) ; Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S., Harada, K., Minakami, R., Shiraishi, F., Ohta, M., Lu, Q-W., Sasaguri, T., Ohtsuki, I. : *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 33, 2095-2107(2001)
- 23) Morimoto, S., Lu, Q-W., Harada, K., Takahashi-Yanaga, F., Minakami, R., Ohta, M., Sasaguri, M., Ohtsuki, I. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99, 913-918(2002) ; Robinson, P., Mirza, M., Knott, A., Abdulrazzak, H., Willott, R., Marston, S., Watkins, H., Redwood, C. : *J. Biol. Chem.*, 277, 40710-40716(2002)
- 24) Yanaga, F., Morimoto, S., Ohtsuki, I. : *J. Biol. Chem.*, 274, 8806-8812(1999)
- 25) Anan, R., Shono, H., Kisanuki, A., Arima, S., Nakao, S., Tanaka, H. : *Circulation*, 98, 391-397(1998)
- 26) Shiraishi, F., Kambara, M., Ohtsuki, I. : *J. Biochem.*, 111, 61-65(1992)
- 27) Hatakenaka, M., Ohtsuki, I. : *Eur. J. Biochem.*, 205, 985-999(1992)
- 28) Hernandez, O. M., Housmans, P. R., Potter, J. D. : *J. Appl. Physiol.*, 90, 1125-1136(2001)
- 29) Fatkin, D., Graham, R. M. : *Physiol. Rev.*, 82, 945-980(2002)
- 30) Shiraishi, F., Morimoto, S., Nishita, K., Ojima, T., Ohtsuki, I. : *J. Biochem.*, 126, 1020-1024(1999)
- 31) Ohta, M., Du, C-K., Oka, N., Miyazaki, H., Takaoka, Y., Suzuki, M., Lu, Q-W., Minakami, R., Imaizumi, T., Sasaguri, T., Ohtsuki, I., Yamamura, K., Morimoto, S. : *J. Pharmacol. Sci.*, 91(supple. 1), 104(2003)
- 32) Huxley, H. E. : *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 37, 361-376(1973)
- 33) Haselgrove, J. C. : *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 37, 341-352(1973)
- 34) Parry, D. A., Squire, J. M. : *J. Mol. Biol.*, 75, 33-55(1973)
- 35) Miki, M., Miura, T., Saon, K. I., Kimura, H., Kondo, H., Ishida, H., Maéda, Y. : *J. Biochem.*, 123, 1104-1111(1998) ; Tao, T., Lamkin, M., Lehrer, S. S. : *Biochemistry*, 22, 3-59(1983)
- 36) Miki, M., Kobayashi, T., Kimura, H., Hagiwara, A., Hai, H., Maéda, Y. : *J. Biochem.*, 123, 324-331(1998)
- 37) Kimura, C., Maeda, K., Maeda, Y., Miki, M. : *J. Biochem.*, 132, 93-102(2002)
- 38) Ferguson, R. E., Sun, Y. B., Mercier, P., Brack, A. S., Sykes, B. D., Corrie, J. E., Trentham, D. R., Irving, M. : *Mol. Cell.*, 11, 865-874(2003)
- 39) 武田壮一・山下敦子・前田雄一郎 : 生物物理, 41, S36(2001)
- 40) Narita, A., Yasunaga, T., Ishikawa, T., Mayanagi, K., Wakabayashi, T. : *J. Mol. Biol.*, 308, 241-261(2001) ; 若林健之 : 蛋白質 核酸 酵素, 47, 553-567(2002)
- 41) Lorenz, M., Poole, K. J., Popp, D., Rosenbaum, G., Holmes, K. C. : *J. Mol. Biol.*, 246, 108-119(1995)
- 42) Oosawa, F., Fujime, S., Ishiwata, S., Mihashi, K. : *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 37, 277-285(1973)
- 43) Heintz, D., Kany, H., Kalbitzer, H. R. : *Biochemistry*, 35, 12686-12693(1996)
- 44) Pantaloni, D., Le Clairche, C., Carlier, M. F. : *Science*, 292, 1502-1506(2001)
- 45) 三木正雄・海 宏・佐伯喜美子・志鷹裕司・佐野健一・前田雄一郎・若林健之 : 生物物理, 43, S121(2003)

前田雄一郎

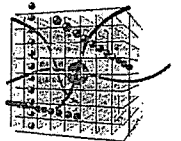
略歴 : 1972年 東京大学理学部物理学科卒業, 1978年 名古屋大学理学博士(分子生物学専攻). マックスプランク研究所博士研究員を経て, 1984年より欧州分子生物学研究所グループリーダー, 1993年より松下電器産業国際研究所所長, 1998年より理化学研究所播磨研究所主任研究員. 研究テーマ : アクチンフィラメントの構造と動態.



ずり応力センサー分子としての PECAM-1

Michitaka Masuda © 増田道隆

国立循環器病センター研究所循環器形態部



Summary

血管内皮細胞に発現している細胞接着分子 PECAM-1 (CD 31) は、細胞間接着部位に集積し、細胞外ドメイン間の結合により内皮細胞をつないでいる分子である。PECAM-1 の細胞内ドメインには 2 つのチロシンリン酸化部位があり、内皮細胞に機械的刺激 (メカニカルストレス) を加えるとリン酸化が起こる。リン酸化により SHP 2 や Gab 1 といった細胞内シグナル伝達分子が細胞間接着部位に集積し、ERK キナーゼの活性化が引き起こされる。ずり応力による ERK の活性化には PECAM-1 と SHP 2 が必須であり、さらに、磁気ビーズを用いて PECAM-1 を直接引っ張ると、PECAM-1 のリン酸化と ERK の活性化が起きる。これらの結果は PECAM-1 がずり応力センサーとして機能していることを示唆する。

Key words

- 血管内皮細胞
- ずり応力
- PECAM-1
- チロシンリン酸化
- ERK

はじめに

血管壁を構成する細胞には、血液の流れにより 2 つの力が加わっている。ひとつは流れの摩擦力であるずり応力 (シアストレス) で、血管の内面を覆う血管内皮細胞に、流れの方向に平行な力として作用している。もうひとつは血管内外の圧力差によって血管壁が円周方向に引き伸ばされる力である。これらの 2 つの力の大きさは心拍動に伴い周期的に変化している。内皮細胞と平滑筋細胞はそれぞれ、ずり応力が働く方向と伸展力が働く方向に配向する性質を持っており、このことが血管壁の構造や血管系の構築、すなわち血管のリモデリングに深く関わっている。血液を体のすみずみに過不足なく行き渡らせることは循環系の根本的存在意義であり、自律神経系による調節とともに、局所における血管緊張の自律的調節が重要な役割を果たしている。内皮細胞は流れの強さに応じて NO などの血管作動因子を放出し、血管平滑筋細胞の収縮・弛緩を調節し局所的調節の主役を担っている。循環系を構成する細胞にとって力学的環境要因は大切な外的情報のひとつであり、この情報をどのように感知し、どのような応答プログラムが準備されているのかを明らかに

することは重要な課題である。

20年余りの研究により、内皮細胞がさまざまな機械刺激にどんな応答をするのかは、細胞内情報伝達の仕組みを含めかなり明らかになってきている¹⁾。しかし、センシングに関してはまだよくわかっていない。その理由は実に単純であり、機械刺激が特異的でないことにある。機械刺激を負荷された細胞では細胞全体にわたって影響が及び、複数のセンシング機構とその下流の情報伝達経路が一斉に活性化されることが容易に想像される。多くの実験はそれらの総和を現象として観察している可能性が高い。さらに当然のことながら、センシングは細胞の力学的構築のされ方により大きく変化する。同じ細胞が培養条件の違いで全く異なった応答をすることになる。本稿で紹介する研究でもPECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1)からのシグナルを、おそらくインテグリンからのシグナルと分離するための工夫をしている。さらに、化学刺激のように、リガンドと受容体の特異的結合から受容体分子を絞り込む手段も使えない。したがって、機械刺激受容チャネルのような例外はあるものの、センシングの分子機構全体が解明されなければ、どの分子がセンサーとして機能しているかを特定することができない。このような状況では、とにかく機械刺激に起因すると思われる情報伝達分子の活性化をリストアップして、その信号経路がどの程度機械刺激の応答に貢献しているかを検討するとともに、経路を逆行することでセンシング分子の候補を探し出すのが妥当な方法であると思われる。PECAM-1の研究もそのような研究の一例としてご検討願えれば幸いである。

PECAM-1のチロシンリン酸化と細胞内情報伝達

われわれは、生理的な強さのずり応力や浸透圧ショックにより、30秒以内という早い時間経過でチロシンリン酸化される細胞膜の糖蛋白質を見出し²⁾、PECAM-1であることを明らかにした³⁾。血小板の凝

集時にPECAM-1のチロシンリン酸化が起こることが報告されており、これらの実験の共通点を考えると、PECAM-1のチロシンリン酸化の増大は細胞変形に依存して起こることが推定された。

PECAM-1はイムノグロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子であり、細胞間接着部位に集積して主にホモフィリックな結合により細胞間をつないでいる⁴⁾。この分子は内皮細胞、血小板に高発現しており、また単球、好中球、T細胞などでも発現がある。分子構造は6個のイムノグロブリン様ループからなる細胞外領域、1つの膜貫通領域、それに118アミノ酸残基(ヒト)からなる細胞内領域で構成されている(図1)。細胞内領域にある2ヶ所のチロシン残基Y663、Y686を含む領域は、いわゆるITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) またはBTAM (bisphosphoryl tyrosine-based activation motif) と呼ばれるモチーフとなっている。このモチーフは、SH2ドメインを2つ持つ蛋白質チロシン脱リン酸化酵素SHP1とSHP2が結合し、活性化を受ける場所であることが知られている。SH2ドメインはリン酸化チロシンに結合するドメインであり、PECAM-1のこれら2つのチロシンはリン酸化されることが確かめられている。われわれは、内皮細胞を機械刺激すると、PECAM-1がSHP2とチロシンリン酸化依存的に結合し、PECAM-1は内皮細胞におけるSHP2の主要な結合相手であることを明らかにした⁵⁾。また、リン酸化Y686はSrcファミリーキナーゼのSH2ドメインが結合する認識配列にあり、実際に結合することを*in vitro*で確認した。一方、結合部位は未定であるが、PI3キナーゼ⁶⁾や β -、 γ -カテニン⁷⁾なども相互作用することが報告されている。これらのことは、PECAM-1が細胞接着・細胞骨格分子としてのみならず情報伝達分子としても機能することを示唆しており、少なくともその作用の一部が、チロシンリン酸化によりコントロールされている可能性を示している。

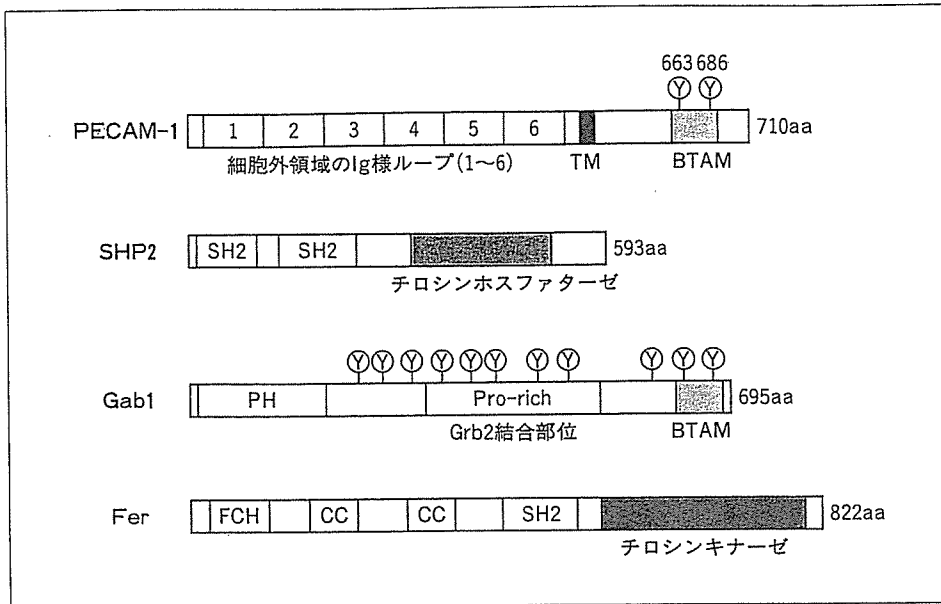


図1. 流れ刺激のシグナル伝達に関わる分子

PECAM-1はI型の膜蛋白質で膜貫通ドメイン(TM)を1つ持つ。細胞外領域は6個のイムノグロブリン(Ig)様ループからなり、ループ1, 2がPECAM-1同士の間を担っている。カドヘリン同様、シス2量体がトランスに結合しているとされる。細胞内領域にはSHP2が結合するBTAM(bisphosphoryl tyrosine-based activation motif)がある。アミノ酸残基数はシグナルペプチドが切断された成熟分子のもの。

SHP2はSH2ドメインを2つ持つ非受容体型チロシン脱リン酸化酵素で、この2つのSH2ドメインを使ってBTAMの2つのリン酸化チロシンを認識・結合する。PECAM-1との結合では、アミノ酸配列の特徴から、SHP2のN端側のSH2ドメインがリン酸化Y663に、C端側がリン酸化Y686に結合すると考えられる。SHP2はNoonan症候群の原因遺伝子のひとつとして知られている。また、*Helicobacter pylori*が注入するCagAはSHP2に結合し活性化するため、細胞増殖作用があることが指摘されている¹⁴⁾。

Gab1はIRS(insulin receptor substrate)などと同様ドッキング蛋白質と呼ばれる分子であり、細胞膜と結合するPHドメイン、Grb2のSH3ドメインと結合するプロリンリッチドメイン(Pro-rich)やBTAMを持つ。チロシン残基のうち、N端側の6個はPI3キナーゼのp85制御サブユニットのSH2ドメインと結合するモチーフに、中央の3個はアダプター蛋白質Crkが結合するモチーフにある。

Ferは非受容体型チロシンキナーゼで、N端側から自己会合や微小管との結合などの機能が示唆されているFCHドメイン、コイルドコイルドメイン(CC)、SH2ドメイン、キナーゼドメインの構造である。Srcなどに存在するC末端の活性を抑制するチロシンリン酸化部位がなく、活性制御についてはほとんどわかっていない。

ERKの活性化とPECAM-1

SHP2はEGF受容体などの増殖因子受容体の下流でMAPキナーゼ(ERK1/2, 2つのアイソフォームp42/p44がある)をポジティブに制御していることが知られている。流れ刺激によってERKの活性化が引き起こされることが、多くの研究室で確認されていることもあり、われわれは機械刺激によって引き起こされるERKの活性化に、PECAM-1とSHP2の関与があるのかどうか調べた⁸⁾。PECAM-1のチロシンリン酸化が起こる条件である流れ刺激(15 dyne/cm²)

や、高浸透圧刺激(300 mM ショ糖の添加)で刺激後10分をピークとした一過性のERKの活性化が起こった。アンチセンスオリゴ法によりPECAM-1の発現を抑制し、高浸透圧刺激を加えるとERKの活性化は抑制されたが、やはり高浸透圧刺激で活性化されるp38 MAPキナーゼの活性化は抑制されず、PECAM-1の関与がERKの活性化経路に特異的であることが示唆された(図2A)。

もうひとつの証拠は、機械刺激によるERKの活性化に対して、PECAM-1の細胞質領域がドミナントネガティブ効果を持つことである。内皮細胞にHA-

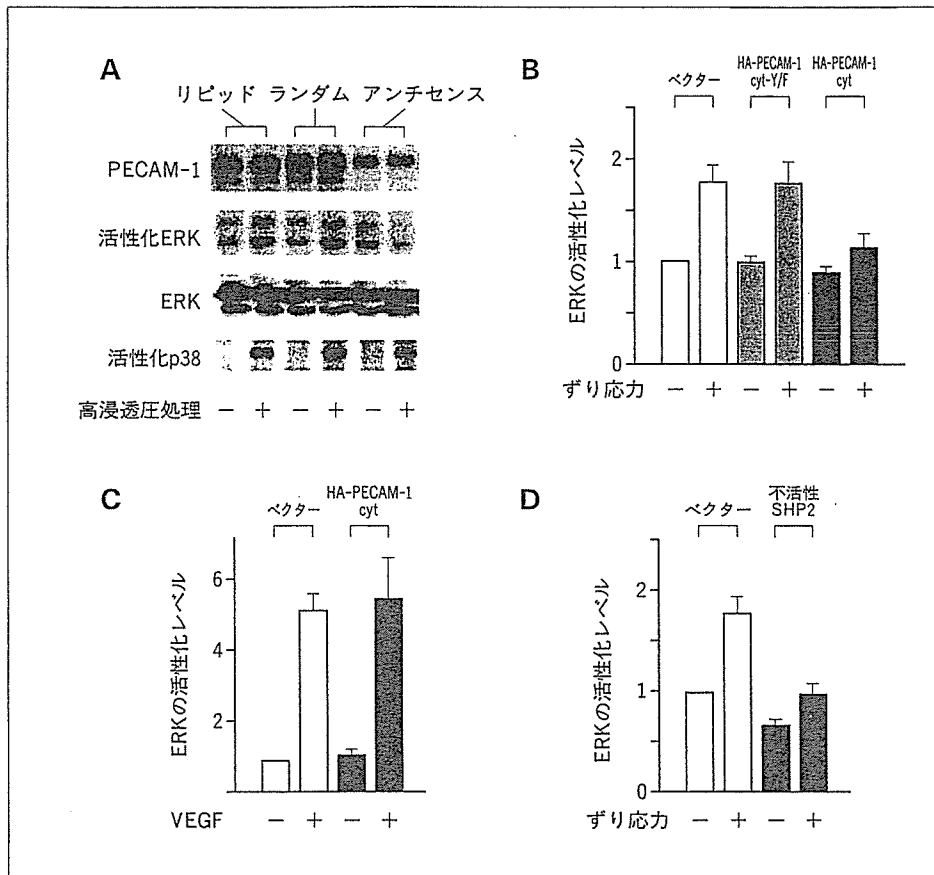


図2. 流れ刺激によるERK活性化にはPECAM-1とSHP2が関与する

A: PECAM-1の発現抑制の効果。内皮細胞をPECAM-1のアンチセンス-S-オリゴ、スクランブルしたS-オリゴ(ランダム)および導入剤のみ(リピッド)で処理し、PECAM-1の発現を抑制した。10分間の高浸透圧処理(300 mM ショ糖)によるERKとp38 MAPキナーゼの活性化レベルを、それぞれの活性化体に対する抗体を用いウェスタンブロットで検出した。PECAM-1とERKの発現レベルも同様に、抗PECAM-1抗体、抗ERK抗体で検出した。図2のすべての実験は、コンフルエントな単層を形成しているウシ動脈由来内皮細胞を用いている。

B: PECAM-1細胞質領域のドミナントネガティブ効果。HAタグを付けたPECAM-1の細胞内領域(PECAM-1 cyt)を発現している細胞(黒棒)、2ヵ所(686 Y, 663 Y)のチロシン残基をフェニルアラニン残基に変異したPECAM-1 cyt(PECAM-1 cyt-Y/F)を発現している細胞(灰色)、およびベクターのみのコントロール(白抜き)に10分間の流れ刺激(15 dyne/cm²)を負荷した。流れ刺激なしは0.4 dyne/cm²である。ERKの活性化はFLAGタグを付けたERK2を共発現させ、免疫沈降の抗活性化ERK抗体で検出した。データは示していないが、抗FLAG抗体および抗HA抗体を用いて、FLAG-ERKとHA-PECAM-1 cytの発現量に差がないことを確認している(C, Dも同様)。

HA-PECAM-1 cyt-Y/F: 変異(PECAM-1)細胞質ドメイン, HA-PECAM-1 cyt: 野生型(PECAM-1)細胞質ドメイン。

C: HA-PECAM-1 cytがVEGF刺激(50 ng/mL, 10分)によるERK活性化に影響しないことを示す。

D: 不活性SHP2のドミナントネガティブ効果。活性中心のシステインをセリンに変異し、酵素活性をなくしたHAタグSHP2を発現した細胞(黒棒)とベクターのみのコントロール細胞(白抜き)を用い、Bと同じ流れ負荷を行った。データは示していないが、野生型のSHP2を導入すると強いERKの活性化が起こり、刺激依存性があるかどうかはわからなかった。

PECAM-1 cyt(HAタグを付加したPECAM-1の細胞質ドメイン)とFLAG-ERK2(FLAGタグを付加したERK2)を共発現して10分間の流れ刺激を負荷し、それぞれのタグに対する抗体で免疫沈降した。その結

果、流れ刺激によるERK2の活性化は、HA-PECAM-1 cytを発現させた内皮細胞で約70%の阻害を受けた(図2B)。この阻害効果は、上述のBTAMに含まれる2つのチロシン残基(Y663と

Y 686)をリン酸化されないフェニルアラニン残基に変異した HA-PECAM-1 cyt-Y/F を用いた場合には観察されなかった。このことは、これらのチロシンが PECAM-1 の情報伝達に重要であることを示唆している。VEGF による ERK 2 の活性化は影響されなかったことから(図 2 C), 少なくとも受容体型チロシンキナーゼから ERK 活性化への古典的経路(SHP 2 が関与しない)に作用しているのではないと考えられる。HA-PECAM-1 cyt は細胞質に拡散して存在し、内在性の PECAM-1 や α -, β -カテニンなどの分布に影響しないので、HA-PECAM-1 cyt により細胞間接着や細胞骨格が破壊された結果とは考え難い。PECAM-1 に結合し ERK の活性化に必要な分子が、リン酸化される HA-PECAM-1 cyt によって細胞間接着部位から引き離されることが、ドミナントネガティブ効果の原因と考えられた。

ドミナントネガティブ効果のターゲットとして、まず SHP 2 が挙げられる。SHP 2 が ERK 活性化に必要であるかを、酵素活性を持たない SHP 2 の大量発現で調べた。活性中心のシステインをセリンで置換した SHP 2-C/S は、流れ刺激による ERK 活性化を強く阻害した(図 2 D)。予想どおり PECAM-1 の下流には SHP 2 があるようである。SHP 2 がどのように ERK を活性化しているのかはまだよくわかっていないが、SHP 2 が結合する情報伝達分子の中で Gab 1 (Grb 2-associated binder 1)の関与が示唆されている(図 1)。Gab 1 は Grb 2 や SHP 2 のほか、PI 3 キナーゼや Crk などとも相互作用し、アポトーシスの阻害や MAP キナーゼのひとつである JNK の活性化にも関わり、受容体型チロシンキナーゼやサイトカイン受容体の下流でシグナルの増幅・統合・分離など多様な働きをしていると考えられている⁹⁾。

SHP 2 と Gab 1 は、内皮細胞中では細胞質に拡散して存在している。流れ刺激により内在性の SHP 2 や Gab 1 の分布が変化するかどうかを特異抗体による免疫染色で調べたところ、どちらも PECAM-1 が局在する細胞間接着部位に濃縮されるようになること

がわかった⁹⁾。アンチセンスオリゴ法により PECAM-1 の発現を抑制すると、両者の細胞間接着部位への移行は起こらなくなる。さらに、GFP(green fluorescent protein)でラベルされた SHP 2 の酵素活性がない変異体(SHP 2-C/S)を内皮細胞に発現させると、刺激の有無にかかわらず常に細胞間接着部位に局在し、実際に PECAM-1 と結合していることが明らかになった。正常な SHP 2 でも、酵素活性を阻害するバナジン酸で 30 分ほど処理すると、刺激のない状態で細胞間接着部位に濃縮されるようになる。これらの結果から、流れ刺激による ERK の活性化の少なくとも一部は、PECAM-1 のチロシンリン酸化と SHP 2 の活性化を介するシグナル伝達によるものであり、Gab 1 も関わっている可能性がある結論した。PECAM-1 は SHP 2 で脱リン酸化されること、酵素活性のない SHP 2 が常に PECAM-1 に結合していることなどから、PECAM-1 のチロシンリン酸化、SHP 2 の結合と脱リン酸化、そして SHP 2 の離脱というサイクルが回っており、常に低レベルの情報発信がなされているのではないかと考えている。流れ刺激はこのサイクルを活性化し、有意な情報を伝えるのではないだろうか。どのようなメカニズムで Gab 1 が細胞間接着部位に移行し、このサイクルにどのように関わっているのかを明らかにするのは今後の課題である。

引っ張り力にตอบสนองする PECAM-1

内皮細胞には PECAM-1 のチロシンリン酸化を介した流れ刺激のシグナル伝達機構があることはほぼ確実といえるが、PECAM-1 の役割はどのようなものであろうか。シグナル増幅器として機能しているのか、あるいはセンサーの構成要素となっているのだろうか。この疑問に明確に答えることは容易ではないが、われわれは PECAM-1 に直接外力を加えることで回答に接近しようとしている。そもそものきっかけになった実験は、われわれにとって危機的なものであった。普通、培養内皮細胞は敷石状の単層になったものを使用

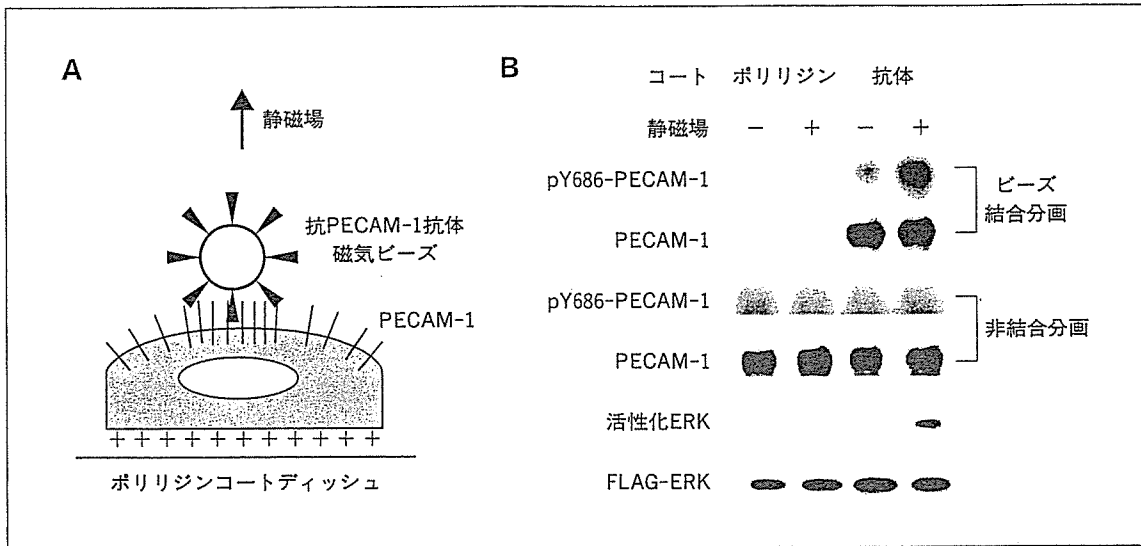


図3. PECAM-1分子に力を加えるとPECAM-1のリン酸化とERK活性化が起きる

A: 実験の模式図。ウシ内皮細胞を無血清条件でポリリジンコートディッシュ上に低密度で接着させ、1時間後にPECAM-1の細胞外領域を認識する抗体の結合した磁気ビーズを付着させ、20分置いたのちに強力な静磁場を10分間作用させた。ビーズの周囲にはPECAM-1が集積するが、ピンキュリンやカドヘリンの集積は起こらない。また、静磁場をかけた時、ビーズの接着している細胞表面には計算上50 dyne/cm²の力が加わっている。

B: 細胞を可溶化し、ビーズ結合分画と非結合分画をとり、それぞれのPECAM-1の量とチロシンリン酸化レベルをウェスタンブロットで検出した。pY 686-PECAM-1はY 686チロシンリン酸化ペプチドを抗原として作製した抗体による検出で、PECAM-1のリン酸化レベルを示す。細胞はあらかじめFLAG-ERKを発現させてあり、図2同様にERKの活性化を調べた。コントロールとしてポリリジン結合ビーズを用いた。

する。生体内の内皮層のモデルとして考えるからである。試しに隙間だらけの培養内皮を使って同じような実験をしてみたところ、PECAM-1のチロシンリン酸化はほとんど起こらないのにERKの活性化がみられた。アンチセンスオリゴ法でPECAM-1発現を抑制してもERKの活性化には影響がなく、このような条件ではPECAM-1を介さない流れ刺激応答があることがわかった。おそらく他の研究グループから報告されているインテグリンを介したシグナル伝達と考えられる¹⁰⁾。その後の研究で、PECAM-1が働くためにはしっかりと細胞間接着があること、さらにはPECAM-1がエンゲージしていることが必須であることが明らかになってきた。逆に、そのような条件ではPECAM-1非依存性のERK活性化は無視できる程度になっているのである。また、以前からPECAM-1のチロシンリン酸化はアクチン細胞骨格

を破壊すると強く抑制されることがわかってきた¹¹⁾。これらのことは、PECAM-1がセンサーの役割を果たしていることを示唆するものと考えられた。

そこで、PECAM-1分子を直接引っ張ることを試みた(図3)。ホモフィリックな結合を担っているループ1, 2に対する特異抗体を作製し、磁気ビーズ表面に結合した。内皮細胞を低密度でポリリジン処理した表面に接着させ、インテグリンが機能できない状態を作るとともに、細胞間接着部でPECAM-1が互いに結合しないようにした。こうするとインテグリンやPECAM-1は細胞表面全体に拡散して分布するようになり、確かに高浸透圧処理をしてもERKの活性化は起こらない。このような内皮細胞に抗体ビーズを付着させると、PECAM-1はビーズの周囲に集積する。ビーズを強力な静磁場で引っ張ると、ビーズに結合しているPECAM-1はチロシンリン酸化し、ERKの活

性化が起きた⁹⁾。抗体の代わりにポリリジンを共有結合させたビーズを用いると、ビーズは細胞膜に接着し、磁場をかけると細胞膜を引っ張るのにもかかわらず、PECAM-1 のリン酸化も ERK の活性化も検出できない。もちろんポリリジンビーズには PECAM-1 は結合しない。この結果は、細胞膜の変形が PECAM-1 を引っ張るように働いた時のみ PECAM-1 を介した ERK の活性化が起こることを示し、PECAM-1 がセンサーあるいはセンサー複合体の構成要素となっていることを示唆する。

流れセンシングの分子メカニズム

流れのセンシングに特殊化した細胞として、内耳の有毛細胞がよく知られている。流れの力学作用によってステレオシリアと呼ばれる細胞表面の突起列が傾き、突起の間にずれが起こる。それぞれの突起の先端は隣の突起と糸状構造で結ばれており、この糸の先に細胞

膜の機械刺激受容チャネルが結合していると考えられている。突起間のずれは糸に働く張力を変化させ、チャネルが開き、Ca²⁺の流入が起こり、細胞が興奮する¹²⁾。内皮細胞の表面には特殊な突起構造はないが、流れの力学作用を検出するためには結局のところ、ずり応力により直接、あるいは細胞変形を介して間接的に、ある分子がコンフォメーション変化を起こし、それが細胞内の化学的情報に転換されているはずだということになる。つまり、センシングのメカニズムを明らかにするという事は、力学的作用でコンフォメーション変化を起こす分子あるいは分子集合体を特定し、その変化が化学的情報に転換される仕組みを明らかにすることに他ならない。

こうした視点から、これまで紹介した実験結果を最も単純に説明するモデルが図4である。PECAM-1 は外側で相手側の PECAM-1 と結合し、細胞内では何らかの分子を介してアクチン線維と結合している。PECAM-1 の細胞質領域は折りたたまれており、

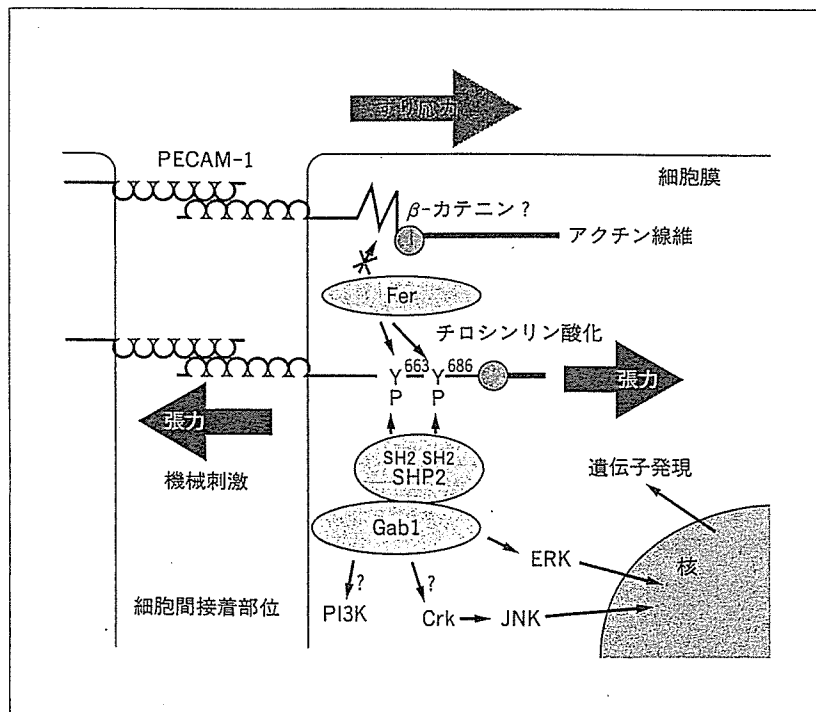


図4. PECAM-1によるずり応力センシングのモデル
PECAM-1は細胞間接着部位でホモフィリックな接着により相手側と結合している。無刺激時にはチロシンリン酸化を受けにくい状態であるが、ずり応力による細胞変形が分子を引っ張り、チロシンリン酸化されるコンフォメーションをとる。チロシンリン酸化酵素としてFerが、シグナル伝達分子としてSHP2とGab1が働く。

BTAMの2つのチロシン残基はリン酸化されにくい状態にある。細胞変形によりPECAM-1が引っ張られると、細胞質領域は開き、チロシンキナーゼがアクセス可能になり、シグナル伝達が始まる。実際には折りたたまれた状態と開いた状態が熱平衡にあり、この平衡がPECAM-1分子にかかる張力で変化するのであろう。PECAM-1の生理的チロシンリン酸化酵素が何であるのかは謎であったが、最近、Ferキナーゼがその有力候補であることを見出した。FerはFes/Fpsとともに特異なファミリーを成す非受容体形チロシンキナーゼであり¹³⁾、SH3ドメインを持たない代わりに、FCHドメインを持つ(図1)。Ferは活性化機構を含めてまだよくわかっていないキナーゼであり、流れセンシングにおけるFerの役割を明らかにする過程でこのモデルがさらに進化し、センシングの分子メカニズムを明らかにできることを期待したい。ここで紹介したわれわれの研究を含め、現時点で流れセンサーを明らかにした研究はないが、センサーを同定することにより内皮細胞の流れ応答を特異的に修飾する道が開かれ、粥状硬化や高血圧などの血管病変に対する新しい予防・治療法の開発につながることを希望している。

◎文 献

- 1) 増田道隆, 藤原敬己: シアストレス. 血管と内皮 9: 669-678, 1999
- 2) Harada N, Masuda M, Fujiwara K: Fluid flow and osmotic stress induced tyrosine phosphorylation of an endothelial cell 128 kDa surface glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 69-74, 1995
- 3) Osawa M, Masuda M, Harada N, et al: Tyrosine phosphorylation of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in mechanically stimulated vascular endothelial cells. *Eur J Cell Biol* 72: 229-237, 1997
- 4) Newman PJ: The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 99: 3-8, 1997
- 5) Masuda M, Osawa M, Shigematsu H, et al: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is a major SH-PTP2 binding protein in vascular endothelial cells. *FEBS Lett* 408: 331-336, 1997
- 6) Ilan N, Cheung L, Pinter E, Madri JA: Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), a scaffolding molecule for selected catenin family members whose binding is mediated by different tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 275: 21435-21443, 2000
- 7) Pellegatta F, Chierchia SL, Zocchi MR: Functional association of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and phosphoinositide 3-kinase in human neutrophils. *J Biol Chem* 273: 27768-27771, 1998
- 8) Osawa M, Masuda M, Kusano K, et al: Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule? *J Cell Biol* 158: 773-785, 2002
- 9) Liu Y, Rohrschneider LR: The gift of Gab. *FEBS Lett* 515: 1-7, 2002
- 10) Chen KD, Li YS, Kim M, et al: Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins and Shc. *J Biol Chem* 274: 18393-18400, 1999
- 11) Masuda M, Osawa M, Shigematsu N, et al: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) is involved in mechano-signal transduction in endothelial cells. *In: Cell volume regulation: the molecular mechanism and volume sensing machinery.* (Oda Y, ed) Elsevier Science Publishing Co. Inc., Amsterdam, 1998, pp23-33
- 12) Corey D: Sensory transduction in the ear. *J Cell Sci* 116: 1-3, 2003
- 13) Greer P: Closing in on the biological functions of Fps/Fes and Fer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 278-289, 2002
- 14) Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, et al: SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 295: 683-686, 2002

筋収縮・弛緩を調節する タンパク質トロポニンの結晶構造

武田 壮一

国立循環器病センター研究所心臓生理部 室長

横紋筋である骨格筋および心筋の収縮・弛緩はカルシウム結合タンパク質トロポニンによって調節される。調節の分子機構の詳細はこれまで不明であったが、ヒト心筋トロポニンの中核部分の結晶構造が明らかになったことで新たな局面を迎えた。骨格筋型、心筋型に共通したトロポニンの中核部分は独立した機能を持つ複数のサブドメインから構成され、互いが柔軟に連結されたユニークな分子構造を持つことで筋収縮・弛緩の制御を行っていることが明らかになった。分子構造を基にした心筋症の病因の解明、創薬に今後期待がかかる。

Key
Words

トロポニン, 筋収縮, カルシウムイオン, カルシウム結合タンパク質,
肥大型心筋症 (HCM), 拡張型心筋症 (DCM), 心筋梗塞マーカー, X線結晶構造解析

はじめに

骨格筋および心筋は「太い線維」と「細い線維」からなる横紋構造を持ち、2種類の線維間でのミクロな滑りがマクロな筋肉の収縮・弛緩の現象に結びつく(図1)。「太い線維」を構成するのがモータータンパク質ミオシンであり、ATPの加水分解のエネルギーを力学エネルギーに変換し滑りの駆動力を発揮する。一方、「細い線維」はアクチンと調節タンパク質であるトロポニンおよびトロポミオシンが7対1対1のモル比で結合したらせん構造を有し、収縮・弛緩の調節機能を分担する。筋の収縮は細胞内カルシウムイオン濃度により調節され、その要を担

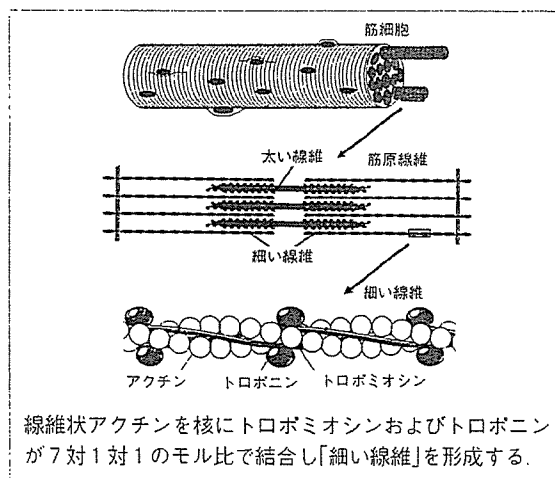


図1 筋「細い線維」の模式図

Soichi Takeda

Department of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute, Laboratory Chief

Crystal structure of the muscle regulatory protein Troponin

E-mail : stakeda@ri.ncvc.go.jp

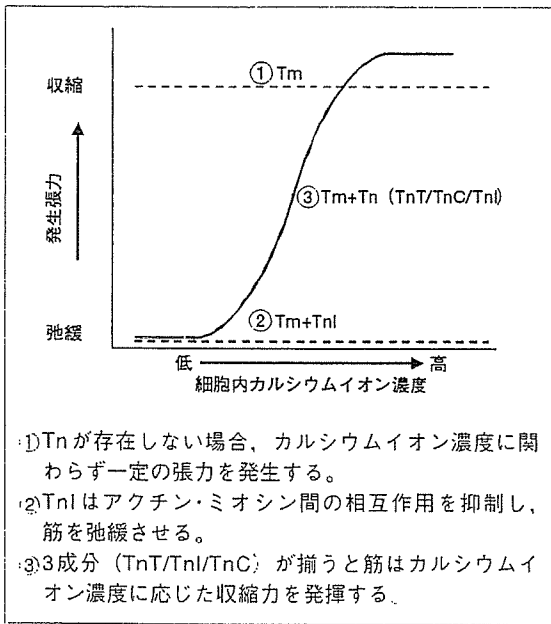


図2 カルシウム-張力曲線とトロポニン各成分の役割

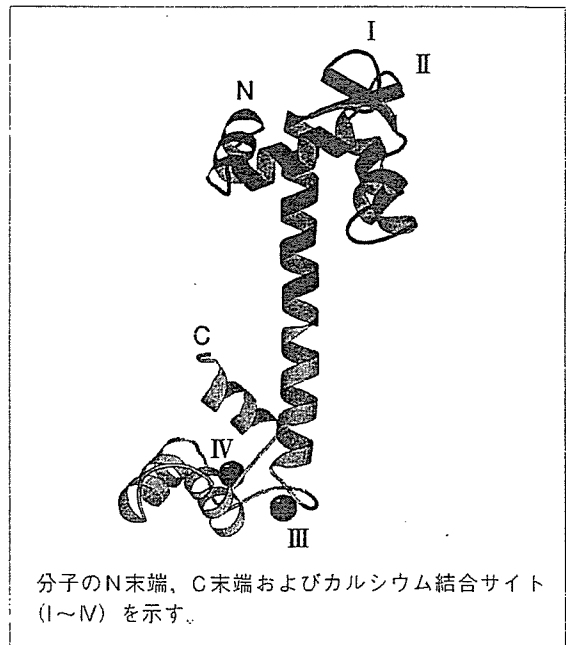


図3 TnC単独の結晶構造

タンパク質分子がカルシウム結合タンパク質トロポニンである。トロポニンと筋収縮のカルシウム調節機構はともに1960年代に江橋節郎博士らによって発見、確立された¹⁾。江橋らの一連の仕事は、その後のカルモジュリン、Cキナーゼなどの細胞内情報伝達に関わる重要なタンパク質の発見に波及し、医学・生物学研究を大きく前進させるきっかけとなった。

I. トロポニンによるカルシウム調節機構

トロポニンはTnT、TnlおよびTnCの3成分からなり、それぞれ「トロポミオシン結合」、「アクトミオシン相互作用阻害」および「カルシウム結合」の機能を主に分担し²⁾、その作用は以下のようにまとめることができる (図2)。

- ①Tnが存在しない場合 (細い線維がトロポミオシン、アクチンからなる場合) はカルシウムイオン濃度に関わらず一定の張力を発生する。
- ②Tnlを加えるとアクチン・ミオシン間の相互作用を抑制し、筋を弛緩させる。一方、TnCはTnlと結合し抑制作用を解除し、筋を収縮させる。
- ③3つの成分 (TnT/Tnl/TnC) が揃うと筋はカルシ

ウムイオン濃度に応じた収縮力を発揮する。これはTnCへのカルシウム結合状態がTnl、TnTおよびトロポミオシンを介してアクチンに伝わるためと考えられる。

このようなトロポニンの各成分の機能は除膜した筋線維 (スキンドファイバー) を用いて各成分を除いたり、再び加えたりすることで実験的に調べることができる³⁾。

TnCについては1980年代半ばに結晶構造が解明され^{4,5)}、ほぼ同じ時期に構造が報告されたカルモジュリンと非常によく似た亜鈴状の構造を取ることがわかった (図3)。TnCはN末およびC末側の2つの球状ドメインで構成され、それぞれが2組のEF-handカルシウム結合モチーフを持つ。2つの球状ドメインのうち、カルシウムイオンの親和性の違いからN末端側のEF-handが収縮調節に関わることがわかっている (実際には心筋TnCでは第一結合部位にはカルシウムイオンは結合せず、第二カルシウム結合部位が収縮制御に関わっていることが知られている)。1990年代半ばに、核磁気共鳴 (NMR) による構造解析で、N末ドメインへカルシウムイオンが結合するとEF-handを構成する α ヘリックス間の角度