

が変化し (図 4 A, B), 内部に埋もれていた疎水性残基が露出することが明らかにされた⁹⁾。C末側ドメインは筋細胞内で常にカルシウムあるいはマグネシウムイオンを結合し、構造的な役割を担うと考えられている。

1970年代後半からポリペプチド断片を用い、TnI 上のアクチン相互作用を阻害する作用を示す領域が検索された。その結果、分子中央部の10 アミノ酸からなる領域が「阻害領域 (inhibitory region)」として同定された (図 4 C)¹⁰⁾。1990年代後半には阻害領域のC末端側の領域がカルシウムイオン濃度に依存して、TnC, N末ドメインの疎水性領域と相互作用する可能性が示され⁹⁾、阻害領域の機能をスイッチングするモデルが提案された (図

4 D, E)¹⁰⁾。しかし、TnCとTnIの細胞内カルシウムイオン濃度に応じた相互作用の変化が、いかにアクチン相互作用に結びつくのかは依然不明であった。

II. トロポニンの中核部分の結晶構造

結晶化が困難なため、トロポニン複合体全体の立体構造は長らく不明であったが、様々な工夫を取り入れることで中核部分 (心筋特異的なTnIのPKAリン酸化ドメインおよびTnTのトロポミオン結合ドメインTnT1を除いた部分)の結晶構造が解明された (図 5)¹¹⁾。カルシウムイオン存在下で結晶が得られたので、筋の収縮時に対応する構造となっている。トロポニンの中核部分はほとんどの部分が α ヘリックスで構成されている。中核部分は構造的にさらに2つの部分 (サブドメイン)、「ITアーム」と「調節頭部」に分けることができる。「ITアーム」はTnTとTnIが α ヘリックス構造を取りつつ、互いに超らせんを形成した構造 (α ヘリカルコイルドコイル構造)を中心部分に持つ約80Åの細長いサブドメインである。前述の予測のと

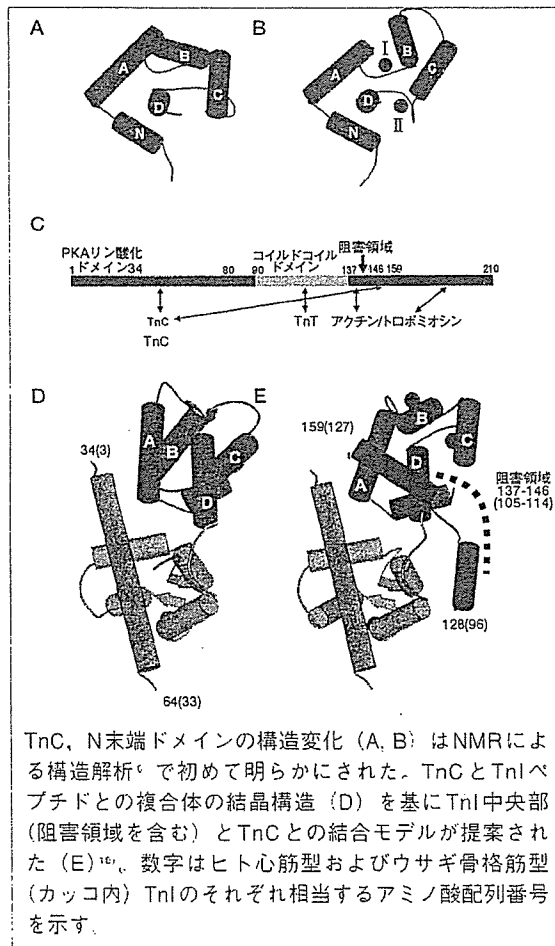


図4 TnC Nドメインの構造変化 (A, B) とTnIの機能部位 (C) およびTnC, TnI間の相互作用 (D, E)

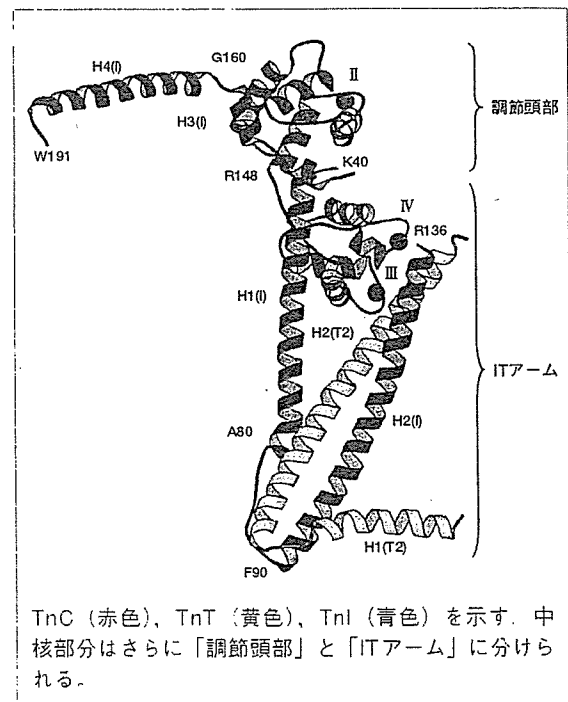


図5 トロポニン中核部分の結晶構造

おり、結合サイトIIにカルシウムイオンが結合し、EF-handが開いた構造を取ることでTnIの両親媒性 α ヘリックスと疎水的な相互作用をし、「調節頭部」形成していた(図6)。スイッチ機構の中核となる分子認識の詳細が明らかになったわけである。今回の結晶構造解析では合計4分子のトロポニン中

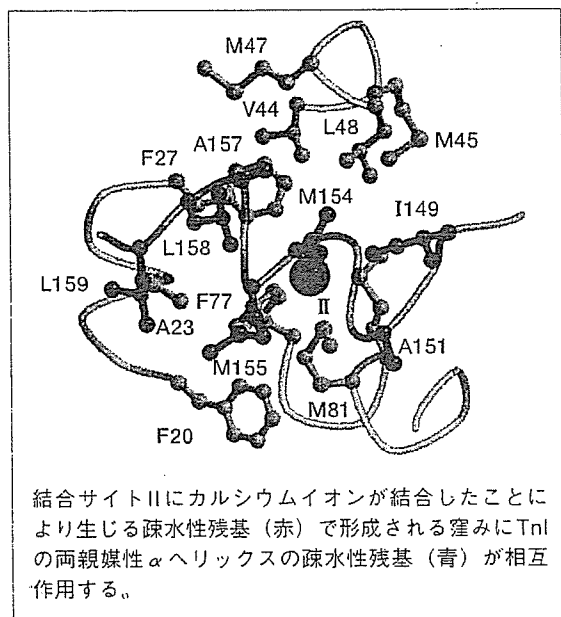


図6 調節頭部でのTnGとTnIの相互作用

核部分の分子構造が独立に決定された。興味深いことに4分子は非常によく似た構造をしているが、2つのサブドメイン間の相対位置関係がすべて異なっている(図7)。また、ポリペプチド鎖の各末端部をよく見ると、それらはいろいろな向きを取り、その先の構造は明らかでない。すなわち、トロポニンは複数のサブドメインがリンカーで結びつけられた柔軟な分子構造を持つことが明らかになった。

III. 筋収縮調節のしくみ

トロポニンは主にTnTを介してトロポミオシンに結合すると考えられ、特にTnTのN末部(TnT1)およびC末部(C-TnT)が結合に関与し、「ITアーム」自体はトロポミオシンと強い相互作用はしないと考えられている。TnT1およびC-TnTについては依然構造は不明であるが、「ITアーム」部のそれぞれ末端に位置し、筋の収縮・弛緩の状態に関わらずトロポミオシンに結合すると考えられることから、これらが約60Å隔てて結合する「橋渡し構造」が示唆された(図8)。TnIの「阻害領域」からC末端部がアクチン相互作用の阻害に重要であることが確かめられ^{9,12}、われわれはこの領域を「調節領域」と名づけた。調節領域は先に述べたス

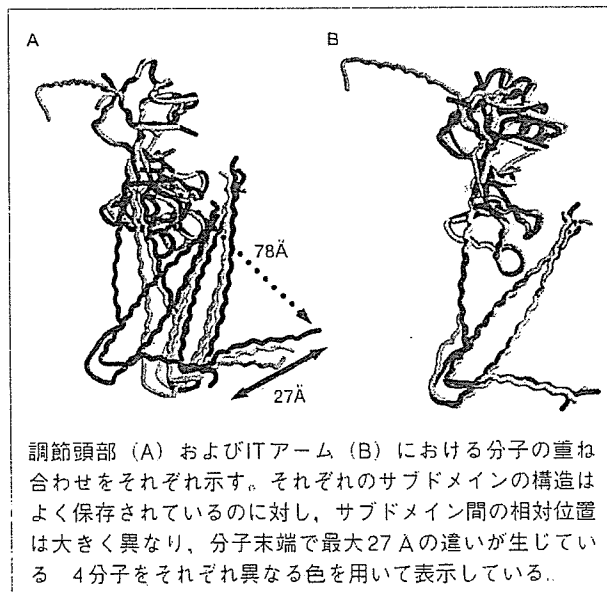


図7 トロポニン4分子の構造比較

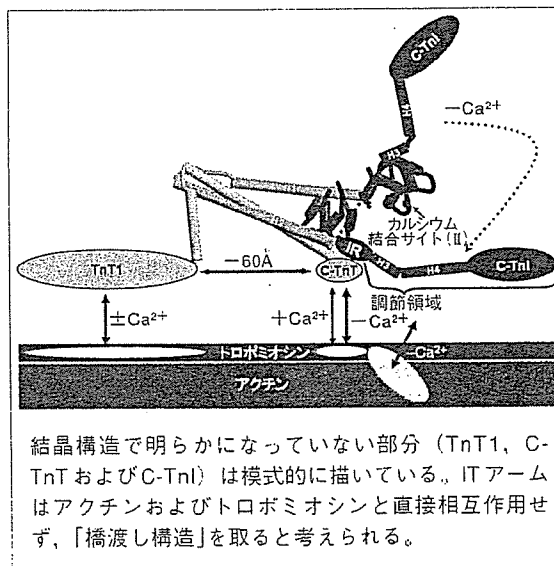


図8 トロポニンとアクチンおよびトロポミオシンとの相互作用の模式図

イッチ機構により筋の弛緩状態（結合サイトIIにカルシウムイオンが結合しない状態）では調節頭部より離れ、アクチン・トロポミオシンと強く結合し、逆に収縮時（結合サイトIIにカルシウムイオンの結合した状態）にはアクチン・トロポミオシンから遊離し今回の結晶構造のように調節頭部に結合すると考えられる。

結晶構造からさらに興味深いことが示唆された。TnIの調節領域とC-TnTは「ITアーム」のコイルドコイルを形成する α -ヘリックスのそれぞれC末端側のすぐ下流に位置する。C-TnTの近傍で調節領域の

アクチン・トロポミオシンへの結合・解離が行われることから、コイルドコイルの末端部で構造変化が生じることが予測できる。われわれはコイルドコイルのC末端部をピボットとして「ITアーム」の微小な回転運動が生じ、この情報が「ITアーム」を介しTnT1に伝わるのではないかと考えている。実際、TnT1部を切除すると筋の活性化が減少することが知られ、調節頭部へのカルシウム結合の情報が何らかの方法でTnT1部に伝わることを示唆されている。トロポミオシンは分子のN末端とC末端がつながった線維としてアクチン線維上に存在する。「ITアーム」の動きによりトロポミオシン分子にゆがみを生じると、弦をつまんで捻るときのようにトロポミオシン線維にかかる張力の変化となって現れるだろう。このような軸方向に情報を伝えるメカニズムは線維状分子の調節機構として理にかなっているように思われる。

われわれは上記2つのメカニズム、「調節領域」のアクチンへの結合・解離、「ITアーム」に誘起されるトロポミオシンの構造変化、によりトロポニンがトロポミオシン分子のアクチン線維上での動きやすさ、あるいは柔らかさを変えることが筋収縮調節機構の本質ではないかと考えている。この考えは1970年代に筋線維のX線線維回折像を基に提唱され、現在でも広く引用される「立体障害仮説 (Steric Blocking Theory)」とは大きく異なる。「立体障害仮説」ではアクチン線維においてトロポミオシン分子がカルシウム濃度依存的に方位角方向に位置を変えることでミオシンとの相互作用を立体障害的に阻害するというものであるが、いまだこの仮説は実証されていない。

トロポミオシンがいかにモーター分子ミオシンとアクチンとの相互作用を制御するかについては依然不明である。興味深いことに、「細い線維」はカルシウムイオン濃度の増加により柔軟性を増し、ミオシン頭部の結合によりさらに柔軟性が

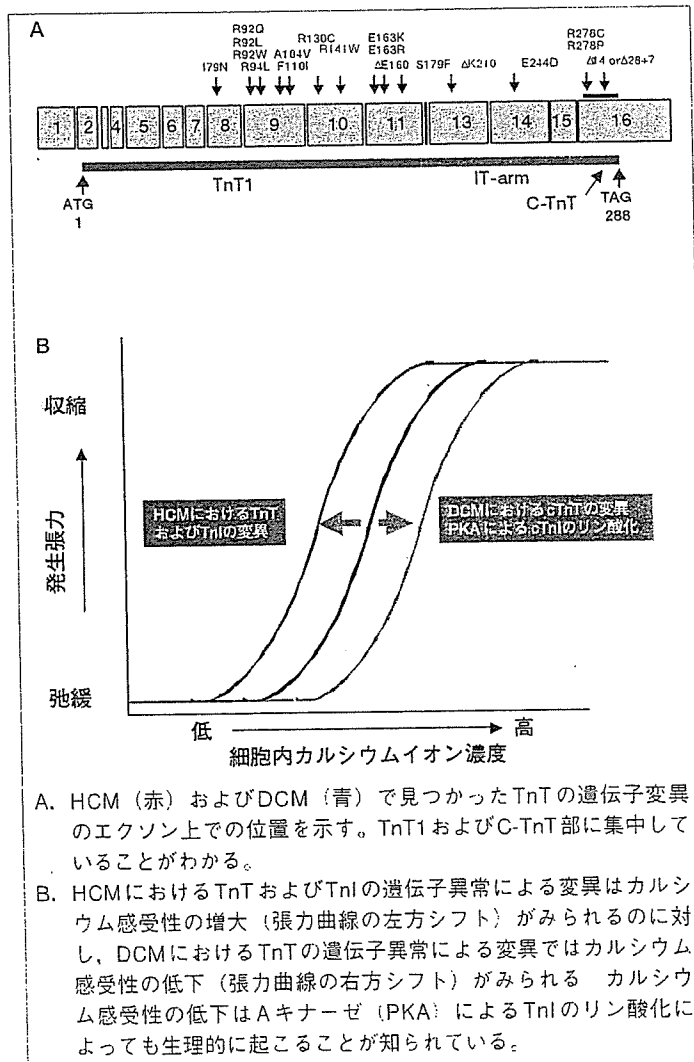


図9 突発性心筋症で見つかったTnTの遺伝子異常 (A) とカルシウム-張力曲線の変化 (B)

増すとの報告もある¹⁴⁾。細い線維の柔軟性に調節機構のみならず、張力発生機構を解く鍵がある可能性が示唆され、今後検証すべき重要な課題と思われる。

IV. 心筋症とトロポニン遺伝子異常

肥大型心筋症 (hypertrophic cardiomyopathy : HCM) は心室の肥大と拡張障害を主徴とし、若年者の突然死の主原因となっている難病である。近年、原因遺伝子の解析が進み、ミオシンやトロポニンなど現在までに10種の心筋タンパク質遺伝子の異常が報告され¹⁵⁾、興味深いことにそれらのいずれにも変異があっても同じHCM病態を呈することがわかっている。発生頻度的にはミオシンβ重鎖の異常が半数程度存在し、ついでTnTの異常が15~20%程度であると推定されている。一方、TnTの210番目のリジン残基の欠損 (Δ210)、あるいは141番目のアルギニン残基のトリプトファン残基への置換 (R141W) が拡張型心筋症 (dilated cardiomyopathy : DCM) における遺伝子異常として見つかった^{16,17)}。DCMは心室の拡大と収縮障害を主徴とし、青壮年の難治性心不全の主原因となっており、心臓移植対象患者の多くを占める。これら突発性心筋症で見つかったTnTにおける遺伝子異常の分子内での分布をみてみると、トロポミオシン結合領域 (TnT1およびC-TnT) に数多く存在している反面、ITアームを構成する部分には少ないことがわかる (図9A)。これらの遺伝子変異を組換えDNA技術により導入し、大腸菌発現タンパク質として調製することが可能である。先に触れたトロポニン各成分の交換法により変異トロポニン分子をスキンドファイバーに組み込み発生張力を調べる研究が広く行われ、これらの研究の結果から興味深いことが明らかになってきた。

報告されているHCMのTnT変異タンパク質を組み入れたスキンドファイバーでは、ほとんどの場合カルシウム感受性の増加が確認され¹⁸⁾、逆にDCMのTnT変異タンパク質ではカルシウム感受性の低下が確認されている¹⁸⁾ (図9B)。TnIにおけるHCM変異も同様なカルシウム感受性の増加がみられる¹⁹⁾ことから、カルシウム感受性の変化が突発

性心筋症の発症と深く関わっている可能性が示唆されている。心筋における生理的なカルシウム収縮は「カルシウム—張力曲線」を最大張力まで辿るのではなく、最大張力の高々50%以下の範囲で行われているとされる。HCMの特徴的症状である収縮増加と弛緩不全 (拡張障害) がどちらもカルシウム感受性の増加によりカルシウム—張力曲線がわずかに左方シフトすることで説明することができ、カルシウム感受性の増加がHCMにつながる最初の機能変化であることを強く示唆する。HCMで見つかったTnTの変異の1つ (F101I) は臨床的予後が例外的に良いとされるが、この変異ではカルシウム感受性の増大がみられない代わりに最大発生張力の増大が報告され¹⁷⁾、同様な最大発生張力の変化はDCMにおけるTnTの変異 (Δ210およびR141W) についても報告されている²⁰⁾。

TnCの第二結合部位へのカルシウム感受性の変化がTnTやTnIの変異で誘導されるメカニズムは依然不明であり、発症機構の解明にはかなり遠いように思われるのが現状ではあるが、いずれにおいても細い線維を構成する他のタンパク質 (トロポミオシンあるいはアクチン) との相互作用部位に変異が集中していることは興味深い事実である。発症機構の解明とは別に、タンパク質間相互作用部位での変異が離れたところに存在するカルシウム結合部位の親和性に影響を与えるという知見は、今後TnCを直接の標的としない新たなカルシウム感受性変動薬 (カルシウムセンシタイザーなど) の開発の糸口となる可能性を秘め興味深い。また、カルシウム感受性に変化を与えずに最大発生張力のみを高めるメカニズムが解明できると、細胞内カルシウム濃度そのものには影響を与えない新しい型の強心剤開発に有益な知見を与えるであろう。

おわりに

本稿では著者らが最近明らかにしたヒト心筋トロポニン中核部分の結晶構造と、その構造から推測される筋収縮メカニズム、突発性心筋症で見つかったトロポニン遺伝子の異常について紹介した。ポストゲノムとしてタンパク質研究が脚光を浴びる昨今であるが、トロポニンは生化学、生理学お

よび構造生物学といった基礎情報が最も蓄積されたタンパク質の代表例である。一方、紹介したような心筋症の原因遺伝子産物としても注目され、現在複数の研究グループが遺伝子改変疾患モデル動物を用いた病態解析を進めており、研究の進展が著しい。今後、分子レベル、組織レベルおよび個体レベルの研究が相互に結びつくことで、筋収縮調節のメカニズムの理解がさらに進むのみならず、心筋症の病因の解明と特効薬の開発にも期待が持たれる。また、急性心筋梗塞の診断マーカーとして現在、心筋TnTおよびTnIの検出が行われているが、立体構造情報を基にして合理的に、より検出感度の高い抗体を調製することができれば心筋損傷の早期診断に役立つのではないかと考えられる。

謝辞

本稿で紹介したヒト心筋トロポニン中核部分の結晶構造解析は主として理化学研究所播磨研究所構造生物化学研究室において、同研究室研究員、山下敦子博士、前田佳代博士ならびに前田雄一郎主任研究員との共同研究として行われたものであり、共同研究者の方々に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Ebashi S, Endo M : Prog Biophys Mol Biol 18, 123-183, 1968.
- 2) Ohtsuki I, Maruyama K, Ebashi S, et al : Adv Protein Chem 38, 1-67, 1986.
- 3) Hatakenaka M, Ohtsuki I : Eur J Biochem 205, 985-993, 1992.
- 4) Sundaralingam M, et al : Science 227, 945-948, 1985.
- 5) Herzberg O, James MN : Nature 313, 653-659, 1985.

- 6) Gagne SM, Tsuda S, et al : Nat Struct Biol 2, 784-789, 1995.
- 7) Syska H, Wilkinson JM, et al : Biochem J 153, 375-387, 1976.
- 8) Talbot JA, Hodges RS : J Biol Chem 256, 2798-2802, 1981.
- 9) Takeda S, Kobayashi T, et al : Eur J Biochem 246, 611-617, 1997.
- 10) Vassilyev DG, Takeda S, et al : Proc Natl Acad Sci USA 95, 4847-4852, 1998.
- 11) Takeda S, Yamashita A, et al : Nature 424, 35-41, 2003.
- 12) Farah CS, Reinach FC : FASEB J 9, 755-767, 1995.
- 13) Squire JM, Morris EP : FASEB J 12, 761-771, 1998.
- 14) Yanagida T, Nakase M, et al : Nature 307, 58-60, 1984.
- 15) Fatkin D, Graham RM : Physiol Rev 82, 945-980, 2002.
- 16) Li D, et al : Circulation 104, 2188-2193, 2001.
- 17) Yanaga F, Morimoto S, et al : J Biol Chem 274, 8806-8812, 1999.
- 18) Morimoto S, et al : Proc Natl Acad Sci USA 99, 913-918, 2002.
- 19) Takahashi-Yanaga F, et al : J Mol Cell Cardiol 33, 2095-2107, 2001.
- 20) Venkatraman G, Harada K, et al : J Biol Chem, 2003.

著者プロフィール

武田 壮一 :

1991年 名古屋大学理学部生物学科卒業

1996年 名古屋大学大学院理学研究科生物学専攻 博士課程満期修了

松下電器産業(株) 国際研究所・リサーチアシスタント

1997年 博士(理学)取得(名古屋大学)

松下電器産業(株) 国際研究所・リサーチアソシエート(ポスドク)

1998年 科学技術振興事業団さきがけ研究21 研究員

2000年 理化学研究所・構造生物化学研究室 研究員

2003年 国立循環器病センター研究所・心臓生理部 室長

現在に至る

研究テーマ：筋収縮調節機構の分子レベルでの解明、循環器疾患に関わるタンパク質の構造解析と医学への応用

トロポニンの結晶構造と筋収縮調節機構

1. はじめに

1960年代に江橋節郎らによって筋収縮弛緩のカルシウム調節機構が発見され、同時にその中心となるカルシウム受容タンパク質、トロポニンが発見された¹⁾。これは生体内のカルシウムイオンで制御されているメカニズムの最初の例であり、我が国が世界に誇る重要な研究成果であった。筋肉はアクチン、ミオシン間の相互作用によりATP加水分解エネルギーを利用して張力を発生するが、その張力発生機構、カルシウム調節機構の詳細については依然不明な点が多い。筋細胞中では、複数の構成タンパク質が規則的な立体配置を形成し機能ユニットである2種類の繊維、「細い繊維」および「太い繊維」を形成している。張力発生とその調節機構の理解のためにはアクチンおよび制御タンパク質からなる「細い繊維」の高分解能の立体構造を知ることが不可欠となる。しかし繊維状高分子複合体を高分解能で解析することは難しく、「細い繊維」全体の詳細な構造を捉えることは未だ困難な問題である。本稿では著者らが最近明らかにしたトロポニン・コアドメインの結晶構造とそこから推測される制御機構について紹介すると共に、筋収縮制御機構の解明に今後どのような研究が必要であるかについて議論したい。

2. 「細い繊維」の構造とカルシウム調節

「細い繊維」はアクチン、トロポニン、トロポミオシンが7対1対1で結合し、これらが繰り返し構造を保ちマイクロメーター長に重合したタンパク質線形超分子複合体である(図1)。トロポニンは三つのポリペプチド、TnT、TnIおよびTnCで構成され、それぞれ「トロポミオシン結合」、「アクチン相互作用阻害」および「カルシウム結合」

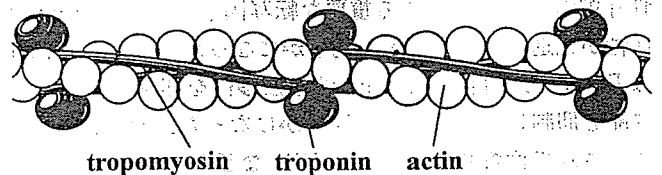


図1 筋肉「細い繊維」の模式図

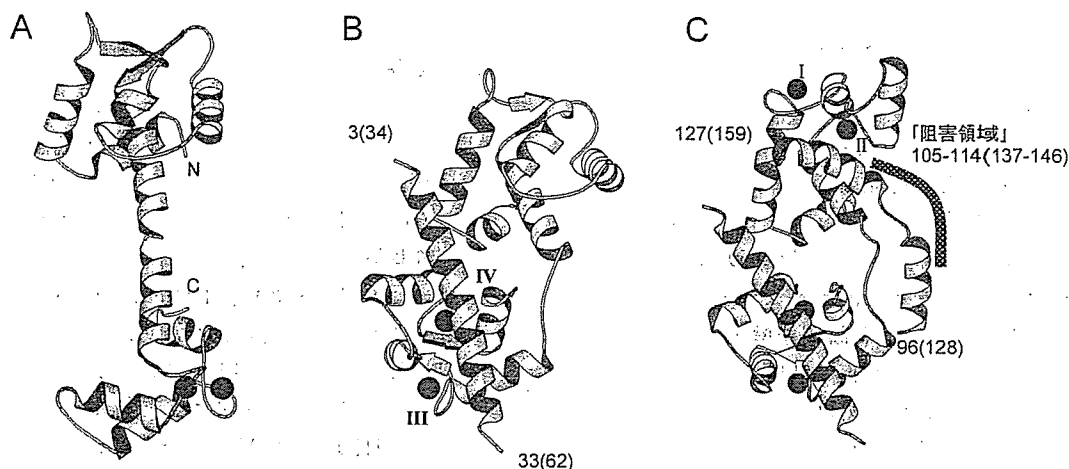


図2 TnC単独(A)およびTnC/TnI₁₋₄₇複合体(B)の結晶構造とTnC/TnI₁₋₄₇複合体の結晶構造より提案されたTnC/TnI₁₋₄₇/TnI₉₆₋₁₂₇複合体のモデル(C)
数字はウサギ骨格筋TnIおよびヒト心筋TnI(括弧内)のアミノ酸配列を示し、ギリシャ文字はカルシウム結合サイトを示す。

の機能を主に分担する^{2,3)}。トロポミオシンは全長約40 nmがほぼ α ヘリカル・コイルドコイル構造を持ち、アクチンらせんに沿って存在する。

TnCはそれぞれ2組のEF-handモチーフから成るN末端およびC末端ドメインで構成され、単体ではカルモジュリン様のダンベル構造を持つことが知られている⁴⁾(図2A)。また、それぞれのドメインのカルシウムイオンに対する親和性の違いからN末端ドメインが制御機構に働いていることが示唆されてきた。1990年代半ば以降、NMRおよびX線結晶構造解析によりTnCのN末端ドメインのカルシウムイオンの結合に応答した構造変化が捉えられ、EF-handを形成するヘリックス間角度の変化とそれに伴う疎水性領域の露出が確かめられた⁵⁾。TnTおよびTnIについては長らく立体構造情報が得られていなかった。5年前、我々はTnCとTnIのN末端ペプチドとの複合体(TnC/TnI₁₋₄₇)のX線結晶構造解析に成功した⁶⁾(図2B)。TnIのN末端部は両親媒性の α ヘリックスを形成し、TnCのCドメイン疎水領域と結合することが明らかになった(第1 TnC結合領域)。この結晶構造と機能解析を基に、アクチン結合に関わるとされるTnIの「阻害領域(inhibitory region)」のC末端側に位置する両親媒性領域(第2 TnC結合領域)がカルシウム濃度依存的にTnC・N末端ドメイン疎水領域に結合するモデル(図2C)を提案した。このモデルは後にNMR⁷⁾および三量体の構造解析(後述)で裏付けられた。1970年代後半からの研究でTnIの中央部の10アミノ酸残基(ウサギ骨格筋型

TnI₁₀₅₋₁₁₄、ヒト心筋型TnI₁₃₇₋₁₄₆)から成る領域、「阻害領域」が単体のペプチドとしてもアクトミオシン相互作用を阻害する活性があることがわかり、制御機構の中心を担う領域として注目を集めてきた^{8,9)}。「阻害領域」を構成する半数のアミノ酸が塩基性であり、その配列は種を超えて非常に良く保存されており、この領域がアクチンに結合することによりミオシンとの相互作用を直接阻害するとの仮説も提案されている。しかし、「阻害領域」がどのようにアクトミオシン相互作用を阻害するか明らかではなかった。第2 TnC結合領域はこの「阻害領域」のC末端側下流に存在し、TnC・N末端ドメインへのカルシウム結合状態に応じて結合・解離を行うと考えられる。すなわち、第2 TnC結合領域は「阻害領域」の構造変化を誘起する「スイッチ」として機能していることが示唆された⁶⁾。

さて、「細い繊維」を構成するタンパク質の存在量比を述べたが、ミオシンの相互作用相手であるアクチンに対し、制御タンパク質トロポニン、トロポミオシンはモル比で1/7と少ない。TnC・N末端ドメインへのカルシウムイオンの結合、それに誘起されるTnI第2 TnC結合領域のTnCへの結合は筋収縮の「スイッチ」として重要であるのは間違いないが、どのようにアクチン・ミオシン間の相互作用を調節しているか依然不明のままである。TnC、TnI間の相互作用の変化はTnTを介してトロポミオシン、アクチンに伝播されると考えられ、メカニズムの解明にはTnT/TnC/TnI三量体の構造解明が望まれた。

3. トロポニン・コアドメインの結晶構造

3-1. 結晶化

筋肉 600 g (ウサギ 2羽より得られる量) より約 1 g の精製トロポニンを得ることが可能である。しかし、筋肉より調製したトロポニンは多くのアイソフォームを含み結晶化には適さない。実際著者らもウサギ骨格筋およびウシ心筋より精製したトロポニンを用い、アイソフォームを生じる主な原因である TnT の N 末端領域を酵素的に取り除くなど工夫して結晶化を試みたが良好な結果を得ることが出来なかった。詳しい方法等についてはここでは省くが、著者らが構造解析を成功させる上で有効であった点について以下に簡単に触れる。

まず、我々はウサギ骨格筋、ニワトリ骨格筋およびヒト心筋由来の 3 種の cDNA を得て大量発現系を構築し、結晶化を試みた。この内ウサギおよびヒト由来のものについて結晶を得ることに成功し、ヒト由来のものについて構造決定に至った (ウサギ由来のものについては分解能が 8 Å 程度と十分でなかった)。このように多種の試料を同時スクリーニングすることは新規の構造を得る上で有効と考えられる。結晶化標品の調製について次のような工夫を行った。三つのサブユニットはあえて共発現せず、それぞれ純度の高い標品を得られる工夫を取り入れた。また、酸化し易いシステイン残基はアラニンあるいはセリン残基へ置換 (TnC について 2 箇所、TnI について 2 箇所 (それぞれヒト心筋型の場合)) した。さらに安定な構造を取らないと考えられる分子末端部¹⁰⁾ の系統的な切除 (TnT の N 末端、TnI の N 末端および C 末端、等の変異の導入を行った。例えば TnT については全長分子としてインクルージョンボディに発現させ、精製後 CNBr 消化によりメチオニン残基の位置で切断し、さらに精製し、コア領域を形成する TnT2 断片 (T2) を得た。偶然適当な位置にメチオニン残基があることから行ったのだが、このような化学切断法はリフォールディングが可能なペプチド断片を純度良く得るのに効率よく、同様な手法は以前の TnC/TnI₁₋₄₇ 複合体の構造解析 (この場合はシステイン残基の化学切断法により TnI₁₋₄₇ 断片を得た) においても有効であった⁹⁾。個別に発現精製した各サブユニットを 6 M グアニジン塩酸中で混合し、イオン強度を徐々に下げてリフォールドさせ、等モル比の複合体をイオン交換カラムで分離し結晶化標品とした。様々な結晶化試料を調製しスクリーニングを行った結果、ヒト心筋由来の 2 種類の複合体、Tn46K および Tn52K について結晶を得て、それぞれ 2.6 Å および 3.3 Å

分解能で構造解析を行った¹¹⁾。

3-2. 結晶構造

コアドメイン Tn52K はトロポニン分子全体から TnT のトロポミオシン結合に関与する N 末端領域 (TnT1) および TnI の心筋特異的な配列を含む N 末端部を切除したものである (Tn46K はさらに TnI の C 末端部 57 アミノ酸残基を切除している)。コアドメインはほぼ α ヘリックスで構成される (図 3A)。Tn46K、Tn52K いずれの結晶もカルシウム存在下で得られたため、その構造はカルシウム飽和型 (筋の収縮時に相当する) であり、今回用いたトロポニンがヒト心筋型であるため、カルシウムイオンは結合サイト II、III および IV に結合していた (心筋型では結合サイト I の EF-hand は機能しないことが知られている)。したがって、前述のモデル (図 2C) のように TnI 上の二つの TnC 結合領域は両親媒性 α ヘリックスを形成し、TnC の各ドメインに形成される疎水領域と相互作用していた。特徴的なことは T2 と TnI はそれぞれのみで球状ドメインを形成せず、トロポニンは 3 本のポリペプチド鎖が存在して始めて安定な構造を取りうることが明らかになった。特に T2 と TnI のそれぞれ 45 アミノ酸残基 (H2(I) および H2(T2)) は α ヘリカル・コイルドコイルを形成し、それぞれの heptad-repeat での疎水性アミノ酸が種を超えて良く保存されていることからこの構造がトロポニンの機能に重要な役割を果たしていることが示唆された。TnC の C 末端ドメインは TnI の両親媒性領域 (第 1 TnC 結合領域) と結合する一方、結合サイト III、およびサイト IV のカルシウム結合ループ部の外側でコイルドコイルと相互作用し、長さ約 80 Å の細長いサブドメイン、「IT アーム (IT-arm)」を形成する。TnC の N 末端ドメインは TnI の第 2 TnC 結合領域 H3(I) と共にもうひとつのサブドメイン、「調節頭部 (regulatory head)」を形成する。今回の構造解析ではそれぞれの結晶 (Tn46K および Tn52K) の非対称単位にそれぞれ 2 分子含まれていたことから、計 4 分子の構造を独立に決定することが出来た。興味深いことに 4 分子の構造を比較すると二つのサブドメインそれぞれの構造は良く保存されているのに対し、サブドメイン間の位置関係が大きく異なることが明らかになった (図 3B)。さらに、TnC の N 末端および C 末端ドメイン間の位置関係については、これまで報告されている結晶構造と大きく異なること、各サブドメイン間の接触が少なく相互作用に関与するアミノ酸残基が保存されていないこと、両サブドメイン間を結ぶ TnC の D/E リンカー部の電子密度が不鮮明であること、等から結晶中でのサブドメイン間の相対位置

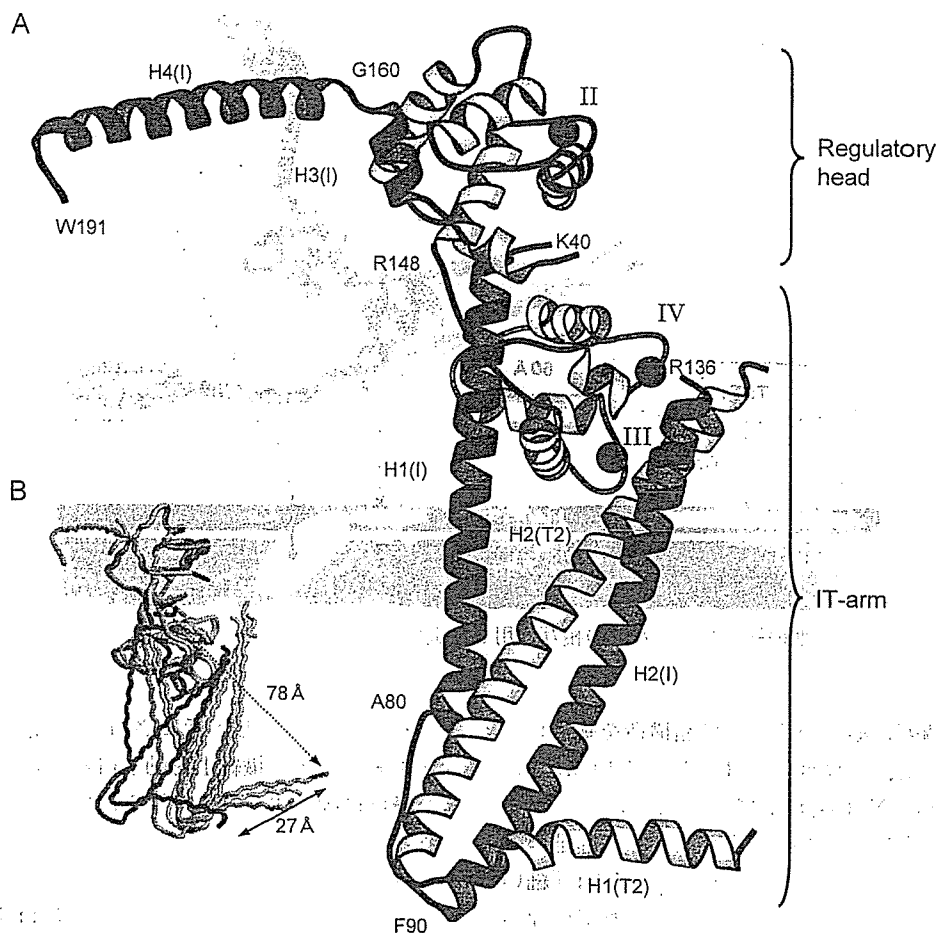


図3 トロポニン・コアダメインの結晶構造

Tn52Kのリボンモデル(A)と4分子を「調節頭部」で重ね合わせた図(B)。TnIおよびT2の各 α ヘリックス、TnIの各セグメント末端のアミノ酸残基、およびカルシウム結合サイト(II, III, IV)を示す。4分子でサブドメイン間の位置関係が最大20度異なり、その結果分子末端部では約27Åのずれを生じている。

は結晶格子の影響を強く受けていることが示唆された。言い換えると、サブドメイン間の連結は非常に柔軟であり、柔軟な連結部を持つサブドメイン構成がトロポニンの特徴であり後述のように機能発現に重要な働きをしているものと考えられた。

今回Tn46KおよびTn52Kの二つの複合体の構造解析を行ったが、それぞれ非対称単位に存在する分子全体の12.5%および19.4%に相当する部分の電子密度が不明瞭なためモデルに組み込むことが出来なかった。「阻害領域」はちょうどH2(I)とH3(I)の間に相当するが、4分子の全てで明瞭な電子密度が見られず、またH2(I)とH3(I)の間の距離よりペプチド鎖が伸びていて安定な構造を取ってい

ないことが判明した。「阻害領域」は筋の弛緩時にアクチン(あるいはアクチン;トロポミオシンの両者)と直接結合すると考えられる。今回の結晶構造はカルシウム飽和型であり収縮時に対応する。収縮時にはカルシウムイオンが結合サイトIIに結合し、H3(I)がTnCに結合し、その結果「阻害領域」が伸びた構造に変化するのであろう。「阻害領域」と共に弛緩時のアクチン/トロポミオシン結合に関与すると考えられるH4(I)は、カルシウム飽和型構造では分子内の他の部分と相互作用せず突き出した構造を取っていた。

4. 収縮調節機構

結合サイトIIへのカルシウム結合の有無がどのように

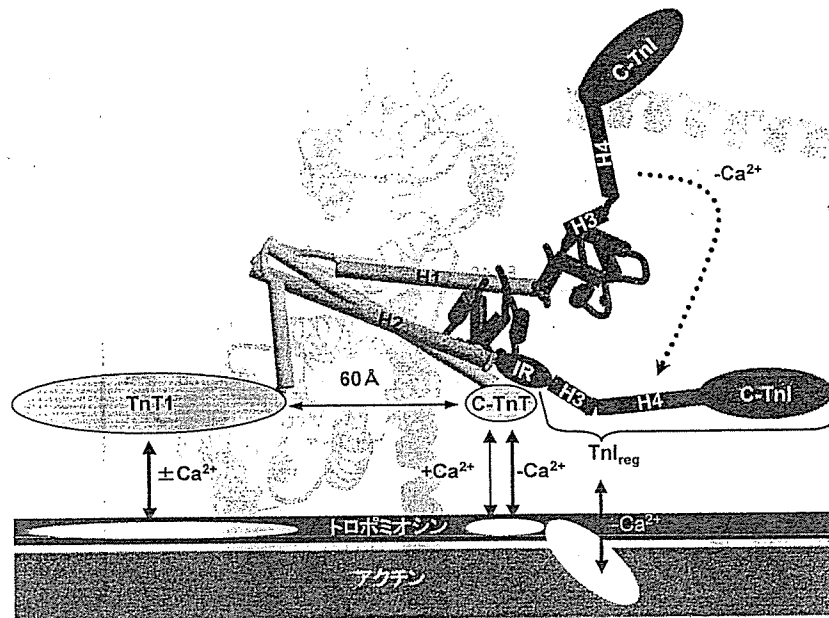


図4 他の筋タンパク質との相互作用と構造変化の模式図

筋の収縮・弛緩の調節に結びつくか、結晶構造を基にして以下のように考察した。トロポニンとは主としてIT-armの両端に存在するT2のN末端およびC末端部のトロポミオシン結合領域(TnT1およびC-TnT)を介して「細い繊維」に結合していると考えられる²⁾。IT-arm自体は「細い繊維」の他のタンパク質との相互作用が報告されていないため、TnT1およびC-TnTのトロポミオシン結合を約60 Å隔てて「橋渡し」する構造が示唆された(図4)。TnT1およびC-TnTのトロポミオシンへの結合はカルシウムイオン濃度の変化をあまり受けないと考えられている。コイルドコイルを形成するもう一方のTnIはC末端側で「阻害領域」に繋がる。これまでの研究により、「阻害領域」だけではアクチン・トロポミオシンの阻害活性は不十分であり、「阻害領域」よりC末端側全体(調節領域TnI_{reg}と著者等は呼んでいる)が完全な阻害作用に必要であることが示されている^{9,10)}。また、その阻害作用はTnI_{reg}がアクチン・トロポミオシンと強く結合するため生じていると考えられている。TnI_{reg}の結合はカルシウムイオン濃度に依存し、高カルシウムイオン時(結合サイトIIにカルシウムが結合した状態)にはアクチン・トロポミオシンより外れる。すなわち、前述のスイッチ機構によりTnI_{reg}のアクチン・トロポミオシンへの結合・解離が制御されると考えられている。アクチン繊維とトロポミオシンの間の結合はそれほど強くなく、アクチン繊維上でトロポミオシンは複数の位

置を取り得ることが示唆されている¹²⁾。弛緩時にTnI_{reg}が本来アクチン繊維上を動き得るトロポミオシンをアクチン繊維に固定することで阻害活性を発揮していると考えられる。

さらに興味深いことは三つのアクチン・トロポミオシン結合領域、TnI_{reg}とC-TnTおよびTnT1の位置関係である。このうちTnI_{reg}とC-TnTはIT-armを形成するαヘリカル・コイルドコイルのC末端側に位置する。「スイッチ」機構によりTnI_{reg}の結合・解離が起こるが、C-TnTと近傍に位置するため、コイルドコイル末端周辺に構造変化が生じることが予測される。すなわち、TnI_{reg}の動きに伴いコイルドコイルのC末端部(すなわち、C-TnTおよびTnI_{reg}の付け根)を「ピボット」としてIT-armとトロポミオシンの相対位置が変化するのはないか、というのが我々の予測である。IT-arm部は約60 Å隔ててトロポミオシン分子上を「橋渡し」する2点結合と3点結合の転移は「橋渡し」構造によりトロポミオシン分子の構造変化を引き起こすのではないか。実際、TnT1部の欠如により高濃度カルシウム時のアクチン・トロポミオシンATPaseの活性化が起こらなくなること¹⁰⁾等が知られ、結合サイトIIへのカルシウム結合の情報がTnT1部を介して伝わることを示唆されている。トロポミオシンは分子の間のN末端とC末端の重合により繋がった繊維としてアクチン繊維上に存在する。IT-armを介した構造変化はトロポミオシン分子

の繊維軸方向の「張り具合」を変えるのではない。すなわち、弦をつまんで捻るとピンと張るように。

我々は上記二つのメカニズム、 TnI_{reg} の結合・解離、IT-armに誘起されるトロポミオシンの構造変化、によりトロポニンがトロポミオシン分子のアクチン繊維上での動きやすさあるいは柔らかさを変えることが調節機構の本質ではないかと考える。トロポミオシンの変化がいかにアクチン分子の相互作用を制御するかについては依然不明である。興味深いことに、「細い繊維」は外液のカルシウムイオン濃度の増加により柔軟性を増し、さらにミオシン頭部(S1)の添加により柔軟性が増すと報告¹³⁾があり、繊維全体の柔軟性に調節機構のみならず、張力発生機構を解く鍵があるのではないかと考えている。

5. おわりに

1970年代に筋繊維のX線繊維回折像を基に筋収縮の「立体障害仮説 (steric blocking theory)」が提唱され、現在でも広く引用されている¹⁴⁾。この仮説ではアクチン繊維上においてトロポミオシン分子がカルシウム濃度依存的に方位角方向に位置を変えることでミオシンとの相互作用を立体障害的に阻害するというものである。しかし、系統的なFRET (fluorescence resonance energy transfer)の実験からはカルシウム濃度変化に対応したトロポミオシン分子の動きは観察されていない¹⁵⁾。トロポミオシンの動きを支持するとされるX線繊維回折強度および電子顕微鏡像の変化についても、その解釈はトロポニンとトロポミオシンの質量分布がアクチンらせん対称性に完全に従っている、つまり一組のトロポニンとトロポミオシンの質量が7個のアクチンに沿って平均的に分布する、との誤った仮定に基づいている。そのような方法で検出出来ない局所的な構造変化が収縮制御機構の本質を担っているのではないだろうか。単粒子解析の手法を取り入れた (らせん対称を仮定しない) 電子顕微鏡像の解析により「細い繊維」の局所的な変化を捉えようという研究が進められている¹⁶⁾。一方、著者らはこの問題の解明に向けて現在トロポニン・トロポミオシン複合体のX線結晶構造解析を進めている。

本稿で紹介した研究は主として理化学研究所播磨研究所、構造生物化学研究室において行われたもので、同研究室研究員山下敦子博士ならび前田佳代博士との共同研究であり、科学技術振興事業団さきがけ研究21「形とはたらき」および文部科学省科学技術振興調整費の助成を受けたものである。

- 1) Ebashi, S., Endo, M., & Otsuki, I. (1969) *Q. Rev. Biophys.* 2, 351-384
- 2) Ohtsuki, I., Maruyama, K., & Ebashi, S. (1986) *Adv. Protein Chem.* 38, 1-67
- 3) Zot, A.S. & Potter, J.D. (1987) *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 16, 535-559
- 4) Herzberg, O. & James, M.N. (1985) *Nature* 313, 653-659
- 5) Slupsky, C.M. & Sykes, B.D. (1995) *Biochemistry* 34, 15953-15964
- 6) Vassilyev, D.G., Takeda, S., Wakatsuki, S., Maeda, K., & Maeda, Y. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4847-4852
- 7) Li, M.X., Spyropoulos, L., & Sykes, B.D. (1999) *Biochemistry* 38, 8289-8298
- 8) Syska, H., Wilkinson, J.M., Grand, R.J., & Perry, S.V. (1976) *Biochem. J.* 153, 375-387
- 9) Farah, C.S. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 5230-5240
- 10) Takeda, S., Kobayashi, T., Taniguchi, H., Hayashi, H., & Maeda, Y. (1997) *Eur. J. Biochem.* 246, 611-617
- 11) Takeda, S., Yamashita, A., Maeda, K., & Maeda, Y. (2003) *Nature* 424, 35-41
- 12) Holmes, K.C. (1995) *Biophys. J.* 68, 2S-5S; discussion 6S-7S
- 13) Yanagida, T., Nakase, M., Nishiyama, K., & Oosawa, F. (1984) *Nature* 307, 58-60
- 14) Squire, J.M. & Morris, E.P. (1998) *Faseb. J.* 12, 761-771
- 15) Hai, H., Sano, K., Maeda, K., Maeda, Y., & Miki, M. (2002) *J. Biochem. (Tokyo)* 131, 407-418
- 16) Narita, A., Yasunaga, T., Ishikawa, T., Mayanagi, K., & Wakabayashi, T. (2001) *J. Mol. Biol.* 308, 241-261

武田 壮一¹, 前田 雄一郎²

(¹国立循環器病センター研究所心臓生理部;
²理化学研究所播磨研究所構造生物化学研究室)

Crystal structure of the core domain of troponin and the mechanism of muscle regulation
Soichi Takeda¹ and Yuichiro Maeda² (¹Department of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1, Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan; ²Laboratory for Structural Biochemistry, Riken Harima Institute at SPring-8, 1-1-1 Kouto, Mikaduki-cho, Sayo, Hyogo 679-5148, Japan)

ヒト心筋トロポニンの結晶構造

国立循環器病センター研究所
 武田 壮一
 理化学研究所 播磨研究所
 前田 雄一郎

Abstract

Troponin (Tn) plays key roles in the Ca^{2+} regulation of skeletal and cardiac muscle contraction. It consists of three subunits (TnT, TnC and TnI), and, together with tropomyosin (Tm), is located on the actin filament. We have solved crystal structures of the core domains (relative molecular mass of 46kDa and 52kDa) of human cardiac Tn in the Ca^{2+} -saturated form. The structures reveal that the core domain is further divided into structurally distinct sub-domains that are connected by flexible linkers, making the entire molecule highly flexible. The α -helical coiled-coil formed between TnT and TnI is integrated in a rigid and asymmetric structure (about 80Å long), the IT-arm, which bridges putative Tm-anchoring regions. The structures of Tn ternary complex imply that the Ca^{2+} -binding to the regulatory site of TnC removes the C-terminal portion of TnI from actin/Tm, thereby alters the flexibility of Tn/Tm on the actin filament.

1. はじめに

骨格筋と心筋は横紋構造を持ち、2種類の繊維、「太い繊維」と「細い繊維」が互いに滑りあうことで張力を発生する。「太い繊維」はモータータンパク質ミオシンからなり、ATPの加水分解エネルギーを力学エネルギーに変換する機構を持つ。「細い繊維」はアクチンおよび調節タンパク質であるトロポニン、トロポミオシンからなり、それらが7対1対1のモル比で結合し、らせん状の繰り返し構造によりタンパク質線形超分子複合体を形成している（図1）。1960年代に江橋節郎らによって筋収縮弛緩の

カルシウム調節機構が発見され、同時にその中心となるタンパク質、トロポニンが発見された^[1]。江橋らの研究は生体内で働くカルシウムイオンの役割をはじめて示したものであり、医学・生物学の進展に大きな影響を及ぼした。トロポニンは3つのポリペプチド、TnT、TnIおよびTnCで構成され、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」の役割を主に分担する^[2]。トロポミオシンは分子のほぼ全長約40nmが α ヘリカルコイルドコイルからなり、アクチンらせんに沿って存在する。筋細胞内のカルシウム濃度が上昇するとTnCによって感知され、TnI、TnTおよびトロポミオシンを介し「細い繊維」全体の構造変化を引き起こし、ミオシンを活性化し筋肉は収縮する。TnCはカルシウム結合モチーフであるEF-handを4つ持ち、それぞれ2つずつが球状ドメインを形成し、ダンベル構造を持つ^[3,4]（図2）。これらの球状ドメインの内、分子のN末端側のドメインへのカルシウムイオンの結合・解離が筋収縮弛緩の調節に直接関与すると考えられているが、そのメカニズムの詳細は明らかでない。本研究では筋収縮調節の分子メカニズムを明らかにするため、トロポニンのコアドメインのX線結晶構造解析を行なった。本稿では結晶構造から得られた新たな知見を解説すると共に、原著論文で詳しく触れなかった研究過程での工夫点についても触れることにする。

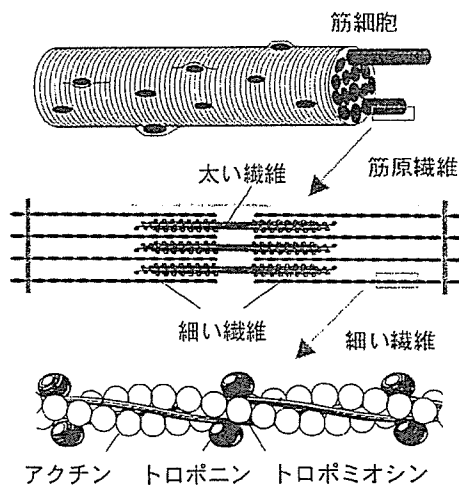


図1 筋肉の模式図

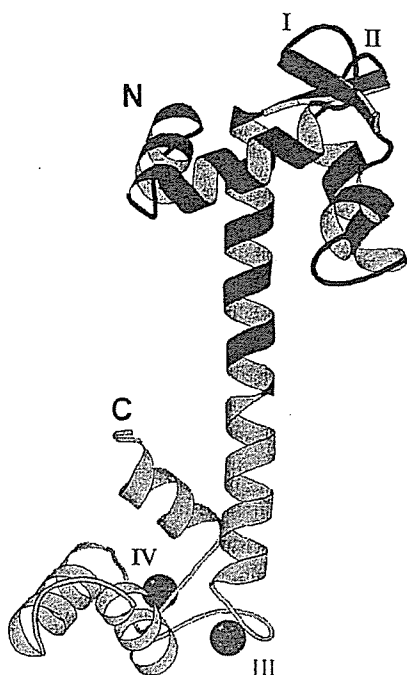


図2 TnC単独の結晶構造

2. トロポニンの結晶化

トロポニンは筋肉より比較的簡単に大量に得ることが出来、例えば材料としてウサギを用いた場合、2日間の作業で約1gのタンパク質標品を得ることが出来る。しかし、筋肉より調製したトロポニンには多くのアイソフォームが存在し、これが結晶化の妨げとなっていた。我々はヒト心筋、ウサギ骨格筋およびニワトリ骨格筋cDNAより大腸菌による大量発現系を構築し、結晶化試料を調製した。これらの内、ヒト心筋型とウサギ骨格筋型については結晶化に成功し、今回ヒト心筋型について構造決定に至った(ウサギ骨格筋型は分解能が8Å程度と十分でなかった)。このように異なる種の試料を用意してスクリーニングすることは良質の結晶を得るための有効な手段である。また、3つのサブユニットはあえて共発現せず、それぞれ高純度の標品が得られるよう工夫を行なった。酸化しやすいシステイン残基のアラニンあるいはセリン残基への置換(ヒト心筋型ではTnC、TnIについてそれぞれ2箇所ずつ)、リンカー部あるいは不安定と考えられる部分^[5]の系統的な切除(TnTのN末側、TnIのN末端およびC末端)等の変異の導入である。また、TnTについては全長分子としてインクルージョンボディに発現させ、精製

後CNBr切断によりC末側断片を得て結晶化に用いているが、酵素分解でなく化学切断法を用いることで高純度の試料を得ることに成功した。この方法はシステイン残基の化学切断^[6]と共にリフォールディングが可能なタンパク質断片を得る方法として有効であろう。個別に発現精製した各サブユニットを6M Guanidinium塩酸中で混合し、徐々にイオン強度を下げることでリフォールドさせ、等モル比で結合した複合体をイオン交換カラムで分離し、結晶化標品とした。様々な複合体試料を調製し、結晶化条件のスクリーニングを行なった結果、ヒト心筋型Tn複合体、コアドメインTn46K(分子量約46キログルトン)およびTn52K(分子量約52キログルトン)について結晶を得て、構造解析を行なった。

3. 構造解析

結晶を得たが、構造解析を行なう上で大きな障害があった。Tn46KおよびTn52Kはいずれも単斜晶系($P2_1$)で、非常に良く似た格子を持つが、共に単斜晶系が得られる確率が極めて低い。光学顕微鏡での結晶の観察とX線の回折像から、結晶中で**b**軸(2_1 らせん軸)の反転が高頻度で起こっていることが判明した(図3)。単斜晶系であるため完全な双晶ではなく、**b**軸を共有した複数の部分結晶の集合体ということである。例えば図3Bのような結晶からは特定の反射点を共有した2つ(またはそれ以上)の結晶由来の重なった回折像が観察される。この兆候が見られる結晶ではいかに領域を限ってX線を当ててもデータを収集することは不可能であった。話は前後するが、構造解析の結果から非対称単位に存在する2分子の非結晶学的二回対称(NCS)軸が結晶の**b**軸および**c**軸とほぼ直交して存在することが

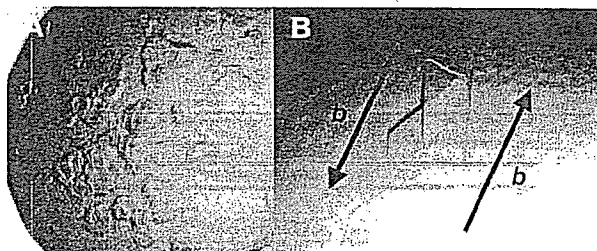


図3 ヒト心筋トロポニン(Tn46K)の結晶。多くの場合、複数の結晶の集合体として成長しデータ収集には使えない(A)。結晶の外形と結晶の**b**軸(2_1 らせん軸)の関係(B)。この場合、**b**軸の反転した2つの結晶の集合体として成長している。

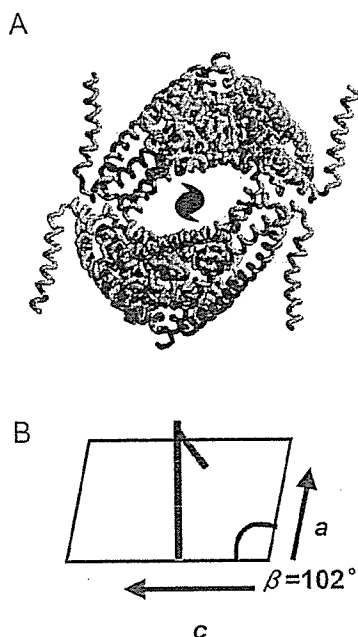


図4 b軸(2₁らせん軸)から見た分子のパッキング(A)と結晶格子およびNCS軸の関係(B)。結晶の2₁らせんで関係付けられる分子を同じ色で示す。分子のパッキングからa軸方向への結晶成長の誤り(水色分子が来るべき所に橙色分子の形状で積層する。当然その逆も同時に起こる)がb軸を反転させる原因と考えられる。

判明している(図4)。トロポニン分子は2つのサブドメインから成るが、これらが柔軟なリンカー構造で結び付けられているため、NCSの関係にある2分子はサブドメイン間の関係が若干異なる(後述)。この差異が原因となり約100度のベータ角を生じるのだが、結晶成長過程でのa軸方向の積み方の誤りがb軸を反転させた部分を生むようである。結晶化母液にグリセロールを加えるなどして単結晶が得られる確立を高めたが、数百のハンギングドロップか

ら最終的にデータ測定の出来るものが1~2個得られる、という非常に厳しい状況であった。何とかTn46Kの単結晶を得てBL44B2にて2.8Å分解能のNativeデータを得て構造解析に着手したのだが、分子置換法(既知のTnCおよびTnIの部分構造を用いた)による位相決定は出来なかった。そこで次のように2通りの方法でMAD法に用いる結晶を準備し解析を行なった。まず、ソーキングによる重原子検索を行なった。単結晶が得られにくい、ということから有色の重原子溶液で結晶が染まるかという点に着目しスクリーニングを行ない、塩化オスミウム置換体を得た。最終的にはBL45XU-PXで得た3.3Å分解能のオスミウムMADデータから解釈できる電子密度図を得ることが出来、分子モデルの構築を開始した。一方で、トロポニンの4つのEF-handには様々な2価および3価の陽イオンが結合する点に着目した。TnC単体の結晶はCd、Hgおよびランタノイド等によるMIRにより構造解析されたが^[3,4]、残念ながらTn46Kの結晶ではソーキング法ではこれらの重原子は入らない、もしくは結晶を劣化させることが判明した。そこで、試料調製時からカルシウムイオンのかわりにストロンチウムイオンを結合させて結晶を調製しBL44B2を利用し2.8Å分解能のMADデータを得た。異常分散差パターン図からはカルシウム結合サイトに結合したストロンチウムイオンのシグナルが検出された(図5)。結果的にはストロンチウムのMADデータからはオスミウム置換体のものよりも良い位相情報を得ることが出来た。ストロンチウムはランタノイドほどタンパク質を凝縮させず、K殻吸収端波長も0.77Å(16keV)程度とSPring-8の各ビームラインで比較的データの取りやすい領域にあり、また得られる異常分散シグナルもセレンと同程度である。EF-hand型カルシウム結合モチーフを持つタンパク質には試料調製時か

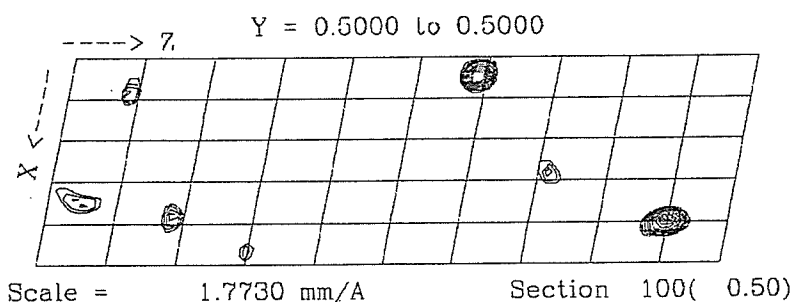


図5 ストロンチウム置換体結晶より得たPeak波長での異常分散差パターン図。

ら結合させることが出来、その試料の扱いが容易という点で非常に有効である。最終的にはBL41XUにてTn46KおよびTn52Kそれぞれ2.6Åおよび3.3Å分解能のNativeデータを得て、Tn52KについてはTn46Kをモデルとした分子置換法で解き、それぞれ構造精密化を行なった^[7]。

4. トロポニン・コアダメインの結晶構造

コアダメインTn52Kはトロポニン分子全体よりTnTのトロポミオシン結合に関わるN末端部(TnT1)とTnIの心筋特異的なN末端配列を切除したものであり、Tn46KはこれからさらにTnIのC末端部57アミノ酸残基を切除したものである。結晶はカルシウムイオン存在下で得られたので、今回の構造は筋の収縮時に相当する。コアダメインは長いαヘリックスより成るサブドメインIT-armと調節に直接関わるカルシウム結合サイトIIを含むサブドメイン、調節頭部(Regulatory head)で構成される(図6)。IT-armはTnTとTnIの各45アミノ酸残基からなるαヘリカルコイルドコイルを含む約80Åの長さの細長い構造体である。調節頭部は結合サイトIIにカルシウムイオンを結合することで生じたTnCの疎水性領域にTnIの両親媒性αヘリックスH3(I)が結合したものであり(図7)、この構造とこれまでの知見^[5,6,8]からH3(I)とTnCの結合の変化がカルシウムイオン濃度に応じたスイッチとして機能することが示唆された。

が示唆される。即ち、結合サイトIIからカルシウムイオンが遊離すると、H3(I)がTnCから離れ、TnIのC末端部の構造変化が誘起されると考えられる(後述)。TnCのN末およびC末ドメインはそれぞれ調節頭部およびIT-armの一部を構成し、TnC単体の構造(図2)では連続したαヘリックスであったD/Eリンカー部が解け、既知のTnC^[3,6]とは異なるドメイン間の位置関係を取っていた。さらに、先に少し触れたようにTn46KおよびTn52Kからそれぞれ2分子、計4分子の構造を決定したが、4分子全てでサブドメイン間の位置関係が異なっていた(図8)。これはサブドメイン間のリンカーが柔軟な構造であるため、結晶格子によりサブドメイン間の位置関係が決定されているものと考えられる。一方、それぞれのサブドメインの構造は変わらないことから、それぞれのサブドメインがユニットとして機能することが示唆された。

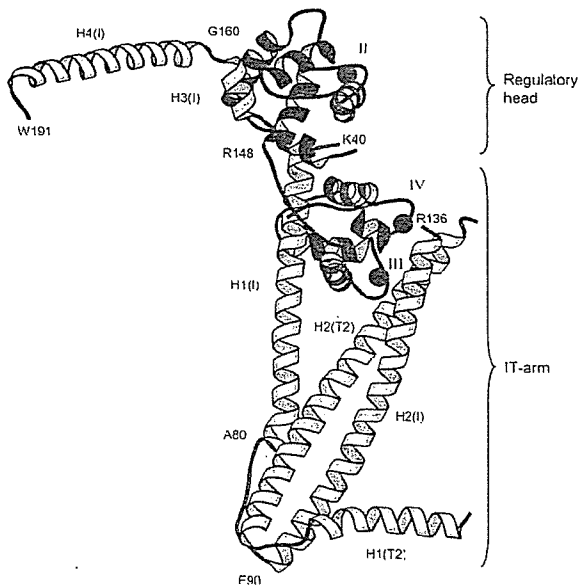


図6 Tn52Kのリボンモデル
TnT(黄色)、TnI(水色)、TnC(赤色)

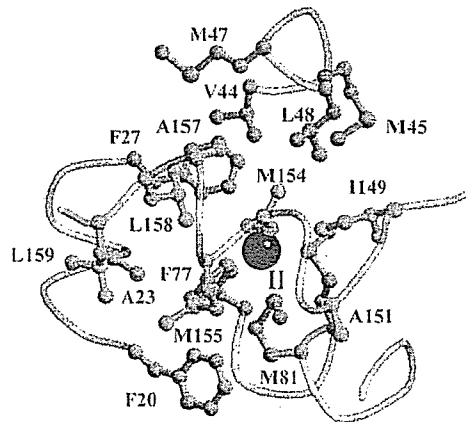


図7 調節頭部でのTnC(ピンク)とTnI(水色)の相互作用

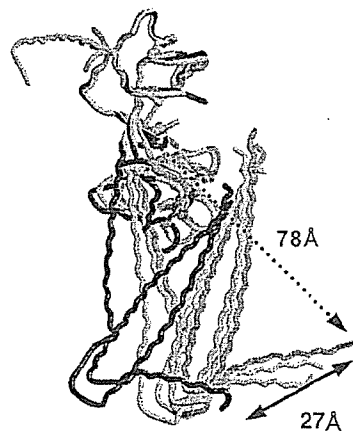


図8 構造決定した4分子の重ね合わせ

5. 筋収縮調節のしくみ

最初に述べたようにトロポニンには主にTnTを介してトロポミオシンに結合するが、特にTnTのN末端 (TnT1) およびC末端 (C-TnT) が結合に関与し、IT-arm自体はトロポミオシンと強い相互作用はしないと考えられている。TnT1およびC-TnTは共に今回の結晶構造に含まれないが、IT-arm部のそれぞれ末端に位置することから約60Å隔てて結合する「橋渡し構造」が示唆された (図9)。TnT1とC-TnTは筋の収縮・弛緩の状態に関わらずトロポミオシンに結合すると考えられる。調節頭部はIT-armの橋渡し構造により、筋繊維に繋ぎ止められ、カルシウムイオン濃度に応じて調節領域のスイッチングを行なうと考えられる。TnIの分子中央部 (心筋型では137~146残基) にある「阻害領域 (Inhibitory region)」からC末端部にかけてアクトミオシン相互作用の阻害に重要であることが確かめられ^[5,9]、我々はこの領域を「調節領域 (TnI_{reg})」と名づけた。今回の解析ではこの阻害領域とC末端部 (192~210残基) の電子密度は不明瞭でありモデルに組んでいない。調節領域は先に述べたスイッチ機構により筋の弛緩状態 (結合サイトIIにカルシウムイオンが結合しない状態) では調節頭部より離れ、アクチン・トロポミオシンと結合し、逆に収縮時 (カルシウムイオンの結合した状態) にはアクチン・トロポミオシンから遊離し今回の結晶構造のようにTnCに結合すると考えられる。弛緩時に調節領域がトロポミオシンをアクチンに強く結合させることがミオ

シンの結合を阻害するのに重要と考えられるが、結晶構造からさらに興味深いことが示唆された。TnIの調節領域とC-TnTはコイルドコイルを形成するαヘリックスのそれぞれC末端側のすぐ下流に位置する。C-TnTの近傍で調節領域のアクチン・トロポミオシンへの結合・解離が行なわれることから、このコイルドコイルのC末端領域で構造変化が生じることが予測できる。我々はコイルドコイルのC末端部をピボットとしてIT-armの微小な回転運動が生じ、この情報がIT-armを介しTnT1に伝わるのではないかと考えている。実際、TnT1部を切除すると筋の活性化が減少することが知られ、調節頭部へのカルシウム結合の情報が何らかの方法でTnT1部に伝わることを示唆されている。トロポミオシンは分子のN末端とC末端が繋がった繊維としてアクチン繊維上に存在する。IT-armの動きによりトロポミオシン分子にゆがみを生じると、弦をつまんで捻る時のようにトロポミオシン繊維にかかる張力の変化となって表れるだろう。このような軸方向に情報が伝わるメカニズムは繊維状分子の調節機構として理にかなっているように思われ、今後検証すべき重要な課題と我々は考える。

6. 今後の展望

1970年代に筋繊維のX線繊維回折像を基に筋収縮調節機構を説明するモデルとして「立体障害仮説 (Steric Blocking Theory)」が提唱され、広く引用されている^[10]。この仮説ではアクチン繊維上においてトロポミオシン分子がカルシウム濃度依存的に方位角方向に位置を変えることでミオシンとの相互作用を立体障害的に阻害するというものであるが、未だこの仮説を実証するデータは得られていない。トロポミオシンの動きを支持するとされるX線繊維回折強度および電子顕微鏡像の変化についても、その解釈はトロポニンとトロポミオシンの質量分布がアクチンらせん対称性に完全に従っている、つまり一組のトロポニンとトロポミオシンの質量が7個のアクチンに沿って平均的に分布する、との誤った仮定に基づいている。今回トロポニンコアドメインの結晶構造が明らかになり、らせん対称を仮定した方法で検出できない局所的な構造変化の重要性が浮き彫りにされた。著者らは現在トロポニン・トロポミオ

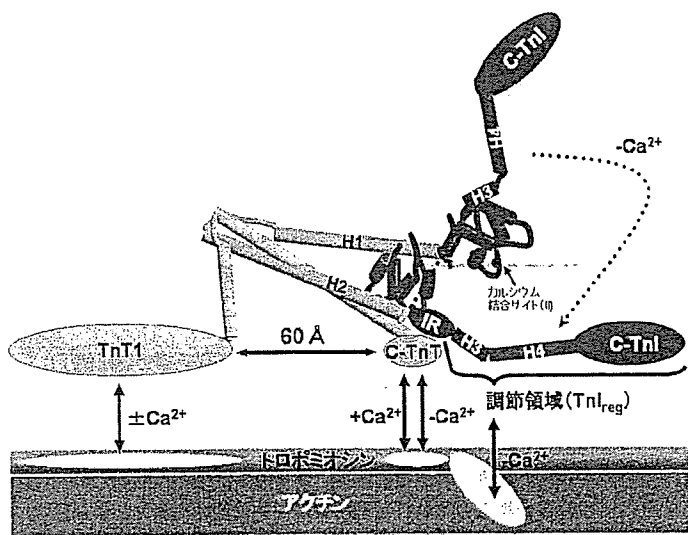


図9 トロポニンとトロポミオシンおよびアクチンとの相互作用

シン複合体のX線結晶構造解析を進めているが、これによりトロポニンへのカルシウム結合によって誘起されるトロポミオシンの構造変化が捉えられることを期待している。

7. おわりに

我々の研究グループがこのプロジェクトを始めてから実に13年間の年月が過ぎ去っている。現在タンパク3000プロジェクトが進行中であるが、膜タンパク質をはじめ構造決定に至るのが非常に困難な標的タンパク質も多く存在し、それらは押し並べて生理的に重要であるものが多い。幸い、著者の一人は本研究の非常に重要な時期にさきがけ研究21の研究支援を受けることが出来、それを大きな励みに今回の結果に結びつけることが出来た。このような困難な課題に取り組む若手研究者を支援する助成プログラムが今後ますます充実することを望みたい。

本稿で紹介した研究は主として理化学研究所播磨研究所、構造生物化学研究室において行なわれたもので、同研究室研究員山下敦子博士ならび前田佳代博士との共同研究であり、科学技術振興事業団さきがけ研究21「形とはたらき」および文部科学省科学技術振興調整費の助成を受けたものである。

参考文献

- [1] S. Ebashi, M. Endo and I. Otsuki : Control of muscle contraction. *Q Rev Biophys* **2** (1969) 351-84.
- [2] I. Ohtsuki, K. Maruyama and S. Ebashi : Regulatory and cytoskeletal proteins of vertebrate skeletal muscle. *Adv Protein Chem* **38** (1986) 1-67.
- [3] O. Herzberg and M. N. James : Structure of the calcium regulatory muscle protein troponin-C at 2.8 Å resolution. *Nature* **313** (1985) 653-9.
- [4] M. Sundaralingam et al. : Molecular structure of troponin C from chicken skeletal muscle at 3-angstrom resolution. *Science* **227** (1985) 945-8.
- [5] S. Takeda, T. Kobayashi, H. Taniguchi, H. Hayashi, and Y. Maeda : Structural and functional domains of the troponin complex revealed by limited digestion. *Eur J Biochem* **246** (1997) 611-7.
- [6] D. G. Vassilyev, S. Takeda, S. Wakatsuki, K. Maeda and Y. Maeda : Crystal structure of troponin C in complex with troponin I fragment at 2.3-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (1998) 4847-52.

- [7] S. Takeda, A. Yamashita, K. Maeda and Y. Maeda : Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca²⁺-saturated form. *Nature* **424** (2003) 35-41.
- [8] M. X. Li, L. Spyropoulos and B. D. Sykes : Binding of cardiac troponin-I147-163 induces a structural opening in human cardiac troponin-C. *Biochemistry* **38** (1999) 8289-98.
- [9] C. S. Farah and F. C. Reinach : The troponin complex and regulation of muscle contraction. *Faseb J* **9** (1995) 755-67.
- [10] J. M. Squire and E. P. Morris : A new look at thin filament regulation in vertebrate skeletal muscle. *Faseb J* **12** (1998) 761-71.



武田 壯一 TAKEDA Soichi
国立循環器病センター研究所
心臓生理部
〒565-8565
大阪府吹田市藤白台5-7-1
TEL : 06-6833-5012(内)2530
FAX : 06-6835-5416
e-mail : stakeda@ri.ncvc.go.jp

略歴 :

- 1991年 名古屋大学理学部生物学科卒業
1996年 名古屋大学大学院理学研究科生物学専攻 博士課程修了
1996年 松下電器産業(株)国際研究所 リサーチアシエント
1997年 博士(理学)取得
1998年 科学技術振興事業団さきがけ研究21研究員
2000年 理化学研究所 構造生物化学研究室 研究員
2003年 国立循環器病センター研究所 心臓生理部 室長



前田 雄一郎 MAEDA Yuichiro
理化学研究所 播磨研究所
構造生物化学研究室
〒679-5148
兵庫県佐用郡三日月町光都1-1-1
TEL : 0791-58-2822
FAX : 0791-58-2836
e-mail : ymaeda@spring8.or.jp

略歴 :

- 1972年 東京大学理学部物理学科卒業
1977年 名古屋大学理学研究科分子生物学専攻博士課程修了
1978年 理学博士
1979~1984年 Max Planck 医科学研究所(ハイデルベルグ)博士研究員
1984~1993年 EMBL ハンブルグ支所、筋収縮研究G、グループ・リーダー
1993~1999年 松下電器中央研究所国際研究所所長兼グループ長
1998年~現在 理化学研究所構造生物化学研究室主任研究員

ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITOR ELICITS MUSCARINIC RECEPTOR-MEDIATED CHOLINERGIC TRANSMISSION IN THE RAT ADRENAL MEDULLA

Tsuyoshi Akiyama, Toji Yamazaki, and Hidezo Mori*

1. INTRODUCTION

Both nicotinic and muscarinic receptors exist in the adrenal gland and their receptor agonists evoke catecholamine (CA) release from adrenal gland. The CA release induced by nerve stimulation is, however, predominantly suppressed by nicotinic antagonists and resistant to muscarinic antagonists.^{1, 2} From these findings, it has been suggested that nicotinic receptors are primarily concentrated in the synaptic regions, with muscarinic receptors primarily localized on the extra-synaptic regions of chromaffin cells. We are interested in whether the differential anatomical localization can entirely explain the predominance of nicotinic receptors in cholinergic synaptic transmission and what conditions are relevant to muscarinic receptor-mediated synaptic transmission. We focused on the function of acetylcholinesterase (AChE), and hypothesized that the inhibition of AChE expanded the regions involved in cholinergic transmission to the extra-synaptic regions. To verify this hypothesis, we applied the microdialysis technique to the adrenal gland of anesthetized rats and investigated the influence of AChE inhibitor on cholinergic transmission in the adrenal gland.

2. MICRODIALYSIS TECHNIQUE

We made a transverse type dialysis probe.^{3, 4} The length of the exposed dialysis fiber was 3 mm (50,000 MW cutoff). The dialysis probe was implanted in the medulla of the left adrenal gland of anesthetized rats. Using a microinjection pump, we perfused a dialysis probe with Ringer's solution or Ringer's solution containing pharmacological agents at 10 μ l/min. We chose a sampling period of 1 min. Dialysate epinephrine (Epi)

* Tsuyoshi Akiyama, Toji Yamazaki, and Hidezo Mori, Department of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute, Fujishiro-dai 5-7-1, Suita, Osaka, 565-8565 Japan.

and norepinephrine (NE) concentrations were measured as indexes of Epi and NE release from adrenal gland by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. The left splanchnic nerve was transected in all protocols. In protocols requiring splanchnic nerve stimulation, electrodes were applied to the distal end of the nerve, which was then stimulated with a digital stimulator. We started the protocols after basal dialysate Epi and NE concentrations had reached steady levels. All pharmacological agents tested in the protocols were locally administered by perfusion through the dialysis probe.

We used two types of cholinergic stimulation to evoke CA release: exogenous acetylcholine (ACh) by local administration of ACh and endogenous ACh by electrical stimulation of nerves. Exogenous ACh acts on the cholinergic receptors in both synaptic and extra-synaptic regions. Endogenous ACh acts predominantly on the cholinergic receptors within synaptic regions. To compare the two types of stimulation, we chose an almost equipotent stimulation so that the CA responses were identical between these stimulations. Dialysate Epi and NE levels rapidly increased by 1 min-nerve stimulation or 1 min-local administration of ACh, and declined immediately after ceasing stimulation or administration. Dialysate Epi levels were almost identical between local administration of ACh (1 mM, 1 min) and nerve stimulation (4Hz, 1 min). But dialysate NE levels induced by nerve stimulation were about three fourths of those induced by local administration of ACh. Furthermore, the increase in dialysate CA concentration correlated with the frequency of nerve stimulation from 2 to 20 Hz when we electrically stimulated the left splanchnic nerve consecutively at different frequencies: 2, 4, 10, 20, and 40 Hz for 1 min.

3. CONTRIBUTION OF NICOTINIC AND MUSCARINIC RECEPTORS

We observed the peak of CA release during the local administration of ACh (1 mM, 1 min) or the electrical stimulation of splanchnic nerve (2 or 4 Hz, 1min). We locally administered the nicotinic antagonist, hexamethonium (1 mM), or the muscarinic antagonist, atropine (10 μ M), and investigated the influence on this peak of CA release.

3.1. Exogenous ACh-induced CA Release

Hexamethonium significantly suppressed the release of both Epi and NE induced by local administration of ACh. Atropine did not affect NE release, but significantly suppressed Epi release. There was a differential contribution of nicotinic and muscarinic receptors between NE and Epi release from rat adrenal gland. Exogenous ACh evokes nicotinic receptor-mediated Epi and NE release and muscarinic receptor-mediated Epi release.

3.2. Endogenous ACh-induced CA Release

Hexamethonium significantly suppressed the release of both Epi and NE induced by nerve stimulation at 4 Hz, whereas atropine did not affect the Epi or NE release. Epi and NE release induced by nerve stimulation at 2 Hz was almost one-half of that induced by stimulation at 4 Hz. But the manner of suppression by hexamethonium or atropine was identical between the 2 frequencies of nerve stimulation. Nerve stimulation predominantly evokes nicotinic receptor-mediated Epi and NE release.

In the rat adrenal gland, NE release induced by either exogenous or endogenous ACh is mediated through nicotinic receptors but not muscarinic receptors. Muscarinic receptors may be nearly absent on the NE-storing chromaffin cells. Epi release induced by endogenous ACh is predominantly mediated through nicotinic receptors, but Epi release induced by exogenous ACh is mediated through both nicotinic and muscarinic receptors. Muscarinic receptors localize on the extra-synaptic regions of the Epi-storing chromaffin cells. Exogenous ACh acts on both synaptic and extra-synaptic regions of chromaffin cells. On the other hand, endogenous ACh mainly acts on synaptic regions. Therefore, exogenous ACh evokes Epi release through extra-synaptic muscarinic receptors of Epi-storing chromaffin cells, while endogenous ACh does not.

4. EFFECT OF ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITOR

In the *in vivo* state, AChE rapidly decomposes exogenous and endogenous ACh. AChE restricts the diffusion of released ACh from the synaptic region to the extra-synaptic region. Thus, the inhibition of AChE could not only elevate tissue ACh concentration but also extend the site of action of ACh. We investigated the role of AChE in cholinergic transmission induced by exogenous and endogenous ACh. We locally administrated neostigmine (10 μ M) or eserine (100 μ M) through the dialysis probe.

4.1. Exogenous ACh-induced CA Release

Neostigmine did not affect the basal CA release, but significantly enhanced the exogenous ACh-induced CA release. The CA responses induced by ACh of 10 μ M in the presence of neostigmine were almost identical with those induced by ACh of 1 mM in the absence of neostigmine. In the presence of neostigmine, hexamethonium significantly suppressed the Epi and NE release. Atropine did not affect the NE release but significantly suppressed the Epi release. Thus neostigmine enhanced the exogenous ACh-induced Epi and NE release, but did not affect the manner of suppression by hexamethonium or atropine. These data suggest that the inhibition of AChE did not affect the qualitative contribution of nicotinic and muscarinic receptors in exogenous ACh-induced CA release.

4.2. Endogenous ACh-induced CA Release

Neostigmine significantly enhanced the nerve stimulation-induced CA release. The CA responses induced by stimulation at 2 Hz in the presence of neostigmine were almost identical with that induced by stimulation at 4 Hz in the absence of neostigmine. In the presence of neostigmine, hexamethonium significantly suppressed Epi and NE release. Atropine did not affect NE release but significantly suppressed Epi release. Another AChE inhibitor, eserine also enhanced the nerve stimulation-induced CA release. This enhancement was less than that induced by neostigmine. But the manner of suppression by hexamethonium or atropine was identical with that in the presence of neostigmine. In the presence of AChE inhibitors, the contribution of nicotinic and muscarinic receptors in the endogenous ACh-induced CA release was identical with that in the exogenous ACh-