

研究課題別研究評価

1. 研究課題名：横紋筋収縮調節タンパク質複合体の構造解析

2. 研究者名：武田壮一

3. 研究のねらい：

筋肉の収縮はカルシウムイオンにより調節され、トロポニン、トロポミオシンがその機能の鍵を担う。これらのタンパク質複合体がどのように働くか、分子構造から理解しようというのが本研究のねらいである。X線結晶解析法を主な研究手法とし、アミノ酸側鎖が認識できる3分解能以上の構造解析を目指した。研究のポイントは構造解析に適した結晶を得るための試料調製に置いた。機能ドメインの抽出、大腸菌による発現・精製系の確立、効率的な結晶化スクリーニング、放射光(SPring-8)を利用した回折実験、構造解析を進めた。

4. 研究結果及び自己評価：

- (1) 調節ドメイン (TnT2/TnC/TnI) の結晶化と構造解析：トロポニンの活性中心となる部分である。ヒト心筋調節ドメインの結晶を得て 2.6 分解能での構造解析に成功した。トロポニン三量体としては世界で最初の結晶構造であり、サブユニット間相互作用の詳細を明らかにした。
- (2) トロポミオシン結合ドメインの結晶化と構造解析 (TnT1)：上記(1)の調節ドメインをトロポミオシンに結びつける役割を担うドメインである。3 - 4 分解能の主鎖のトレースが期待できるデータを得ることに成功した。今後、重原子置換体を得て構造解析を進め、(1)の構造と合わせトロポニンの全体構造を明らかにしたい。
- (3) トロポミオシン C 末端フラグメント (Tm162) の結晶化と構造解析：トロポニンが結合すると考えられている部分を抽出した断片で、1.7 分解能のデータを得ることに成功した。現在位相の改良を進めており、今後モデル構築に進む予定。
- (4) Tn/Tm 複合体 (TnT/TnC/TnI/Tm162) の結晶化と構造解析：上記(1) - (3)の全てを含む機能を理解する上で最も重要な複合体である。+および - カルシウムの 2 状態の結晶を得ることに成功した。
- カルシウムの結晶について 4.2 分解能までの回折データを得ることに成功し、現在分子置換法による解析と重原子置換体の調製を進めている。

本研究では X 線結晶構造解析法を主な手法としたため、研究期間の大半は結晶を得るための準備に費やした。したがって研究課題のほとんどは中途であるが、それぞれ今後の展開が期待できる程度には進めることが出来たと考えている。(1)は従来の生化学的な解析等による相互作用部位のマッピングに比べ飛躍的に多くの情報を提供し、今後トロポニンを研究する上での一つの基準となる構造モデルが提案できると考えている。また、構造的なドメインと考えられていた中にフレキシブルな領域が存在し、そのサブドメインが収縮制御過程において構造変化する可能性が示唆された。この結果は単離された状態では必ずしも生理的な構造を保持しているとは限らず、筋繊維中での構造および機能を知るための研究の重要性を再認識させるものである。(2)についてはこれまで構造的な知見がほとんど得られていなかったこと、(3)は既知の 7 分解能の結晶構造から飛躍的に分解能を改善できる可能性があることから、今後新しい知見が得られることが十分期待される。(4)は本研究の到達目標への足がかりといえる成果である。トロポニン、トロポミオシンはヘリックス含量が非常に高く、4-5 程度の分解能データから主鎖のモデル構築が出来る可能性が十分高い。また、同時に進めている上記(1)(3)の結果はこの複合体のモデル構築を容易にするのみならず、相互評価を行う上でも重要であろう。その意味で、複数の試料の構造解析を同時並行的に進めた本研究の戦略の有効性が示されると思う。今後は+および - カルシウムの状態に対応した構造変化を主鎖構造レベルで明らかにし、電子顕微鏡あるいは X 線繊維回折のデータと合わせ、細い繊維のモデル構築へと展開し、収縮制御機構

の理解を目指したい。

5. 領域総括の見解

蛋白質の機能を理解するには、立体構造が出発点となる。ところがそのためには、結晶にしなければならない。それがむずかしい。筋肉蛋白質は結晶化し難いものが多い。本研究ではその点が難点であったが、トロポニン・サブユニットのいろいろな部分を遺伝子操作技術によって取得し、見事、結晶化に成功した。その結果、カルシウム制御にあずかる三つのサブユニットの活性部位の解明ができ、その機能が理解されつつある。これは世界的に見て最初である。3年間の集中的なトライアル・エラーが成功に導いたわけで、さきがけ研究の存在理由を示すことになった。

6. 主な論文等

(論文)

S. Takeda, A. Yamashita, K. Maeda & Y. Maeda “Crystal structure of the regulatory domain of human cardiac troponin complex ” (投稿準備中、さきがけ研究を代表する成果となる予定)

(国際会議招待講演)

S. Takeda, A. Yamashita, K. Maeda & Y. Maeda “Crystal structure of troponin ternary complex” International Workshop “ Actin Filament; From structure to mechanism ” 16-18 Nov. 2001 at SPring-8
他、国内学会 6 件