トロポニンへのカルシウムイオンの結合

名古屋大学・理学部 飯田 莊 象*

脊椎動物の骨格筋の収縮、弛緩の制御はカルシウムイオンによってなされている。¹⁾このことについてはすでにいくつかの総説がある^{2), 3)}この特集でも述べられていると思われるので、ここではトロポニンのカルシウム結合と、それに伴う構造変化についてのみに話題をしぼる。トロポニンは三個の成分、すなわち、 Ca^{2+} を結合するトロポニンC (TN-C)、ミオシンとアクチンの相互作用を抑制するトロポニンI (TN-I)、及びトロポミオシンと結合するトロポニンT (TN-T) から成っている複合蛋白質である。^{4), 5), 6)}カルシウム結合によってもたらされたTN-Cの構造変化がどのようにTN-I, TN-T, 及びトロポミオシンやアクチンに伝わるかを調べることは、筋収縮の制御の機構の研究の中心テーマの一つである。またTN-Cの構造変化がTN-I, TN-Tに伝わるのと逆に、TN-IやTN-Tと結合することにより、TN-Cのカルシウム結合が影響を受け、トロポニンの筋収縮における役割をより精巧なものにしている可能性がある。そこでここでは、骨格筋のTN-Cのカルシウム結合と、それに及ぼすTN-I, TN-Tの影響について、及びTN-Cのカルシウム結合に伴う構造変化と、それがTN-IやTN-Tの構造にどのような変化を与えるかについて述べたい。

カルシウム結合は透析平衡法により測定されることが多いが、最近カルシウムイオンに感ずる電極(カルシウム電極)の進歩により、 10^{-7} M以下の濃度でも測定出来るようになった。従来のEGTA等のカルシウムキレート剤を用いて遊離カルシウム濃度を決める方法では、ある特定の条件(キレート剤の種類、pH等)を決めるとあまり広い範囲に亘って遊離カルシウム濃度を変えられず、またそのキレート剤の結合定数が測定されている条件でしか正確な実験は出来ない。更に蛋白質等のカルシウム結合を測定する場合には、この蛋白による Ca^{2+} の結合量を考慮しなければ正確

な遊離カルシウム濃度は求められないといった困難にぶつかる。この困難をさけるために蛋白量に比較して非常に多量のキレート剤を用いると、今度は直接測定出来るのは蛋白とキレート剤の両方に結合したカルシウム量を含むために、測定したい蛋白の結合量はキレート剤に結合した分を差引かねばならず、そのために大きな誤差ははいつてくることになる。透析平衡法の場合には、透析膜の内外で、キレート剤や遊離カルシウム濃度が本当に等しくなっているかといった問題もある。電極法によるとこれ等の困難が除け、pHメーターでpHを測定するのと同じ手軽さで遊離カルシウム濃度(正確には Ca^{2+} の活量)が測定できる。また筆者は試料の調製法を改良して、数mM HCl中で透析することにより、Ca-freeのTN-Cやトロポニンを得たので、キレート剤を用いずにカルシウム結合曲線を得ることが出来た。

1. TN-Cのカルシウム結合

兎の骨格筋のTN-Cのアミノ酸配列はCollins等によって決定された。^{7), 8)}三次構造はまだ分っていないが、魚肉に含まれるカルシウム結合蛋白質、パルプアルブミンはTN-Cと類似のアミノ酸配列をしていて、三次構造も決定され、カルシウム結合部位の構造も分っている。⁹⁾一次構造を比較して、TN-Cのカルシウム結合部位も一次構造の上で予想されている。^{7), 10)}更にTN-Cの三次構造も予想されている。¹¹⁾予想されたTN-Cのカルシウム結合部位は、パルプアルブミンのカルシウム結合部位の一つである「EF-hand」に対応する、二本のヘリックスにはさまれたループ上にある。TN-Cの一次構造上類似の構造が四回繰返されているのに対応して、このようなカルシウム結合部位が一次構造上四個順番にある訳である。

筆者によるTN-Cのカルシウム結合曲線は図1に示してある。³⁾ TN-Cの四個のカルシウム結合部位は、各々二個づつの高い結合定数を持った部位と、低い結合定数を持った部位に分けられる。 Mg^{2+} が存在すると高い結合定数を持った結合部位の結合定数は著しく

Calcium Binding of Troponin

*Shozo Iida (Department of Physics, Faculty of Science, Nagoya University)

図1. TN-Cの0.1 MKCl, 25°Cに於けるカルシウム結合.
(○): 20 mM Tris HCl (pH 8.1); (□): 20 mM
Tris HCl (pH 8.1), 2 mM MgCl₂; (●): 20 mM
MES (pH 5.60).

低下し、低い結合定数を持った部位はあまり Mg^{2+} の影響を受けない。これ等の結合部位が Ca^{2+} と拮抗的に Mg^{2+} を結合するものとして、 Mg^{2+} の結合定数を求めると高い結合定数を持った部位に対しては $3 \times 10^3 M^{-1}$ であり、低い結合定数を持った部位に対しては $3 \times 10^2 M^{-1}$ であった。TN-C のカルシウム結合は pH やイオン強度を変えても変わる (図1)。この場合には、 Mg^{2+} を加えた時と異なっており、高い結合定数を持った部位も低い結合定数を持った部位も同じように結合定数が変わる。pH が7から8.5まではカルシウム結合はほとんど同じであるが、pH 6.5以下では pH が下がると結合定数も低下して、pH 5.6では高い結合定数を持った部位も、低い結合定数を持った部位も結合定数が pH 8.1の時の $1/4.6$ に低下した。KCl 濃度を1 Mにした時にも両方の結合部位共に結合定数が低くなり、高い結合定数を持つ部位と低い結

合定数を持つ部位の結合定数はそれぞれ0.1 MKCl中の値の $1/4$ 及び $1/5.6$ になった。¹²⁾ TN-C の水素イオン濃度滴定の結果と比較して、この pH や KCl 濃度を変えた時のカルシウム結合定数の変化は、主に TN-C の表面電位の変化として説明できた。すなわち、pH が下がるにつれてイミダゾール基やカルボキシル基の解離がおさえられて、TN-C の全電荷が増加 (絶対値では減少) して、また KCl 濃度を増すと TN-C 表面の電荷を静電的に遮蔽して、表面電位が増加し Ca^{2+} の結合を抑制する訳である。

TN-C の高い結合定数を持った二個の部位によるカルシウム結合を Scatchard プロットにより調べるとカルシウム結合量が1モル Ca^{2+} /モル TN-C のところに山があるベル形をしていて、二つの部位によるカルシウム結合に強い相関があることを示している。すなわち、最初の一個が結合すると、次の結合に対する親和力が増し、二個の Ca^{2+} が同時に結合するようにみえる。低い結合定数を持つ部位の間にはこのような協同性は見い出せなかった。高い結合定数を持った部位の間の協同性は、pH や塩強度を変えても、また Mg^{2+} が存在しても変わらなかった。Potter と Gergely による TN-C のカルシウム結合の結果ではこのような協同性は見い出されなかったが、¹³⁾ 牛の心筋の TN-C のカルシウム結合の場合には、二個の結合部位の

*) ここでは $pCa = -\log a_{Ca}$ で定義した。 a_{Ca} は Ca^{2+} の活量であり、遊離 Ca^{2+} 濃度とは $a_{Ca} = \gamma_{Ca} [Ca]_{free}$ の関係があり、 γ_{Ca} は遊離 Ca^{2+} の活量係数で、イオン強度と温度の関数である。それ故イオン強度が大きければ Ca^{2+} 濃度を変えても γ_{Ca} は一定であり、例えば0.1 MKCl, 25°C の条件では $\gamma_{Ca} = 0.40$ となる。それ故通常用いられている $pCa = -\log [Ca]_{free}$ の値と較べて $-\log 0.40 = 0.40$ だけ大きい。

間に、骨格筋の TN-C の場合と全く同じ強い正の協同性があることが報告されている。¹⁴⁾

TN-C のマグネシウム結合は Potter と Gergely¹⁵⁾ によって測定され、TN-C は四個の Mg^{2+} を結合し、その結合定数は $2 \times 10^4 M^{-1}$ と報告された。¹³⁾ 四個の結合部位のうち二個は $0.2 mM CaCl_2$ 存在下でも Mg^{2+} を結合し、他の二個は結合しなかった。彼等のデータでは、低い結合定数を持った二個のカルシウム結合部位はマグネシウムの存在によって結合定数を変えなかったで、彼等はこれ等の部位はカルシウムのみを結合するので「Ca-Specific Site」と名づけ、高い結合定数を持つ部位はカルシウムもマグネシウムも結合するので、「Ca-Mg Site」と名づけ、マグネシウムのみを結合する二個の部位を「Mg-Specific Site」と名づけた。しかし筆者の測定では、図 1 にみられる如く、低い結合定数を持った部位もマグネシウムの存在で、そのカルシウム結合定数が低下し、マグネシウムが結合することを示している。小浜も同様の結果を得ている。¹⁵⁾ また $CaCl_2$ 存在下で $MgCl_2$ を加えた時の TN-C 溶液の pH 変化からはこのような Mg-Specific Site は見い出されなかった。

トロポニンの一次構造上、どのカルシウム結合部位が高い結合定数を持っているかについて、Shin 等はカルボキシル基を化学修飾して研究し、N 端側の二個の部位が低い定数を持った、C 端側の二個が高い結合定数を持った部位であることを示した。¹⁷⁾ また Leavis 等は TN-C を化学的または酵素的に種々の位置で切

断して、その断片のカルシウム結合能を調べて同じ結論を得た¹⁸⁾ (この特集の上野・大井の総説を参照)。チロシンの蛍光強度のカルシウム濃度依存性からも、Tyr-109 を含むカルシウム結合部位が高い結合定数を持つ部位の一つであることが示唆される。^{19), 20), 30)}

2 TN-C のカルシウム結合に及ぼす、TN-I と TN-T の影響

TN-C に TN-I が結合すると、TN-C のカルシウム結合は高い結合定数を持った部位も、低い結合定数を持つ部位も共に結合定数が増大する (図 2)。高い結合定数を持つ部位については、電極の感度の限界に近いので正確な結合定数は求められないが、 $10^8 M^{-1}$ 以上で、低い結合定数を持つ部位の結合定数は $1 \times 10^6 M^{-1}$ となり、TN-I が結合することにより約 10 倍増加した。

更に TN-T が結合したトロポニン (intact) では結合曲線が TN-C と全く異なり、高い結合定数を持つ部位と低い結合定数を持つ部位の区別がなくなった (図 2)。(トロポニンの最大カルシウム結合量が $5 mol Ca/mol TN$ になったのは蛋白濃度が正確に決められなかったためかも知れない。) TN-I-C に TN-T が結合することにより、高い結合定数を持つ結合部位の結合は弱まり、弱い結合定数を持つ部位の結合は強まった。更にこれ等四個の部位のカルシウム結合の間に強い相関があり、四個のカルシウムが同時に結合するように見える。トロポニンのカルシウム結合も Mg^{2+}

図2 TN-I-C及びトロポニンの $0.1 MKCl$, $20 mM TrisHCl$ (pH 8.1) におけるカルシウム結合。(●): TN-I-C; (○): トロポニン; (□) トロポニン, $1 mM MgCl_2$.

が存在することにより結合定数が減少する。PotterとGergelyは透析平衡法で、これと全く異なるデータを報告した¹³⁾ 彼等はトロポニンでもTN-Cと同じカルシウム結合曲線を得た。小浜のトロポニンをセファロースに結合させて測ったカルシウム結合の結果もTN-Cの結合曲線と同じであった¹⁶⁾ この実験結果の違いが何に由来するかは今のところ不明である。試料の調製法、測定法、解析法を細かく吟味して、結論を出さねばならないと思われる。

心筋のTN-Cはカルシウム結合部位が二個しかない¹⁶⁾ 骨格筋のカルシウム結合比較するのは興味深い。StullとBussは透析平衡法とゲルろ過法を用いて牛の心筋のトロポニンのカルシウム結合を測定し、二個のカルシウム結合部位の結合定数を $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (10 mM MgCl_2) 及び 4×10^7 (Mg 存在せず) と報告した²¹⁾ 小浜はニワトリの心筋のトロポニンの結合定数を $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (1.3 mM MgCl_2 存在下) と報告した¹⁶⁾ また小浜によると牛の心筋のトロポニンのカルシウム結合定数は $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ である¹⁵⁾ なおPotter等は牛の心筋のTN-Cのカルシウム結合を測定し、二個の部位に対して結合定数は $1.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Mg 存在せず), 及び $3.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (2 mM MgCl_2) であり、もしこれ等の部位が同等であると仮定したら、どちらか一方の部位にカルシウムが結合すると、他方の結合定数が最小30倍に増大することを報告した。¹⁴⁾

彼等は更に結合定数 $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ のCa-specific siteが1個存在することを報告した。¹⁴⁾

3 TN-Cのカルシウム結合に伴う構造変化

TN-Cはカルシウム結合に伴って非常に大きな構造変化を起こすことで注目された^{19), 22)} すなわち、円偏光二色性で二次構造の変化を測定すると、 $[\theta]_{222}$ の値が $-11,500$ から $-17,500$ に変わり(図3)また沈降定数 $s_{20, w}$ がカルシウム結合に伴って 1.65 s から 2.0 s に²³⁾ (また 0.9 s から 1.8 s ²⁴⁾) 変わった。この構造変化はチロシンやTN-Cに結合した螢光色素の螢光強度の変化^{19), 24), 25)} スピンラベル法^{25), 26)} NMR^{27), 28), 29)} によっても見い出されている。

この構造変化とカルシウム結合との関係を調べるために、カルシウムキレート剤を含まずにCa-freeにしたTN-Cに、 CaCl_2 を加えていって $[\theta]_{222}$ の変化を調べたのが図3である。TN-Cのカルシウム結合定数が大きいために、加えた Ca^{2+} はほとんど結合し加えた CaCl_2 量は4モル Ca^{2+} /モルTN-Cまでは近似的に結合した Ca^{2+} の量になる。 0.1 MKCl 中で $\text{pH } 7 \sim 8$ では、最初の2個 Ca^{2+} が結合することにより全体の2/3の変化が起こり、次の2個結合すると残りの1/3の変化が起こり、それ以上 Ca^{2+} を加えても、CDの変化はなかった。 Ca-free で数 mM のマグネシウムが存在すると、2個 Ca^{2+} を結合した値に等

図3 TN-Cの円偏光二色性の添加 CaCl_2 濃度に対する変化。全ての実験は 0.1 MKCl , 23°C で測定された。蛋白濃度は $57.2 \mu\text{M}$ であり、蛋白1モル当りの添加 CaCl_2 量を上の横軸に示してある。(○): 20 mM Tris HCl ($\text{pH } 8.1$), (●); 20 mM Tris HCl ($\text{pH } 8.1$), 1 mM MgCl_2 , (□); 20 mM MES ($\text{pH } 5.55$)。

しくなり、そこにカルシウムを加えると、加えた Ca^{+2} の量に比例して CD が変化した。(この時加えた Ca^{+2} の量でなく、1 図で求めたカルシウム結合曲線から結合した Ca^{2+} の量を求め、それに対して $[\theta]_{222}$ をプロットすると完全に直線になった。) pH を 5.6 に下げると $[\theta]_{222}$ はマグネシウムが存在しなくても Ca-free で pH 8.1 の時の Ca^{2+} 2 個結合した値になり、 CaCl_2 を加えるにしたがって減少する。4 個 Ca^{2+} を結合した TN-C の $[\theta]_{222}$ は、pH を変えても、マグネシウムを加えても、 KCl 濃度を変えても同じであった。 CaCl_2 を加えた時の pH 変化の解析から、最初の 2 個 Ca^{2+} を結合した時の大きな構造変化は TN-C が 46 個ものカルボキシル基を持っていて、それ等の間の静電的反発力により、 Ca-free の TN-C はコンパクトな構造をとることが出来ずに、膨張した構造をとっていて、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 H^+ が結合することにより、コンパクトな構造をとり、この構造変化が沈降係数や CD で見られた大きな構造変化である³⁰⁾ TN-I と TN-T が結合すればこの大きな構造変化はなくなり、沈降係数は Ca^{2+} の有無によらず一定となり、²³⁾ $[\theta]_{222}$ は 4 % 変わるだけになる。

螢光色素やスピラベルを TN-I、TN-T、TN-C に結合させて、トロポニンや TN-I-C、TN-T-C を再構成させて、TN-C にカルシウムを結合させた時に各成分がどのような構造変化を受けるか調べられた。^{23), 24), 26), 31), 32)} その結果、TN-I も TN-T もカルシウム結合によって構造変化を起こし、変化した遊離カルシウム濃度域から、高い結合部位にカルシウムが結合した時に TN-I や TN-T の構造変化が起るようにみえる。

4. おわりに

今まで TN-C とトロポニンのカルシウム結合について述べてきたが、トロポニンのカルシウム結合と筋張力の発生とはどのような関係があるかといった問題が残る。Endo はアフリカツメガエル骨格筋の名取の線維を用いて、Kitazawa は兎骨格筋及び心筋のグリセリン筋を用いて、等長張力の遊離カルシウム濃度依存性を測定して、張力曲線の立ち上りが非常に急峻であることを報告した。^{33), 34)} トロポニンのカルシウム結合と張力発生との関係は簡単にカルシウム結合曲線と張力曲線の比較だけから決められるものではないが、図 2 で示されたカルシウム結合曲線は、カルシウム結合と張力発生が直接関係していることを示唆している。この問題に対する答は、TN-C のカルシウム結合による構造変化が、TN-I や TN-T、更にトロポミオシン

やアクチンフィラメントにどのように伝わるかについてもっと定量的な研究、それに関連して、TN-C が 4 個のカルシウム結合部位を持っている意味をはっきりさせることにより与えられると思われる。心筋の TN-C は二個のカルシウム結合部位しか持たず、しかも張力曲線の立ち上りが骨格筋のそれと比較して緩いことから、心筋と骨格筋の比較研究はこの問題に対する鍵を与えてくれるかも知れない。

文 献

- 1) Ebashi, S. and Endo, M. (1968) *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 18, 123-183.
- 2) 遠藤 実 (1975) *生物物理*, 15, 19-30.
- 3) 丸山工作 (1976) *筋収縮の制御*, pp. 71-130. 岩波書店, 東京.
- 4) Greaser, M.L. and Gergely, J. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 4226-4233.
- 5) Ebashi, S., Wakabayashi, T., and Ebashi, F. (1971) *J. Biochem.* 69, 441-455.
- 6) Hartshorne, D.J. and Mueller, H. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 647-653.
- 7) Collins, J.H., Potter, J.D., Horn, M.J., Wilshire, G., and Jackman, N. (1973) *FEBS Lett.* 36, 268-272.
- 8) Collins, J.H., Greaser, M.L., Potter, J.D., and Horn, M.J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6356-6362.
- 9) Kretsinger, R.J. and Nockolds, C.E. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 3313-3326.
- 10) Weeds, A. and McLachlan, A. (1974) *Nature (London)* 252, 646-649.
- 11) Kretsinger, R.J. and Barry, C.D. (1975) *Biochim. Biophys. Acts* 405, 40-52.
- 12) Iida, S. (1978) *Sixth International Biophysics Congress VII*-37-(553).
- 13) Potter, J.D. and Gergely, J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4628-4633.
- 14) Potter, J.D., Jonson, J.D., Dedman, J.R., Schreiber, W.E., Mandel, F., Jackson, R.L. and Means, A.R. (1977) *Calcium-Binding Proteins and Calcium Function* (Wasserman, R.H., Corradino, R.A., Carafoli, E., Kretsinger, R.H., MacLennan, D.H. and Siegel, F.L., eds.) PP. 239-249.
- 15) 小浜一弘: 私信
- 16) 小浜一弘 (1978) *臨床科学* 14, 858-862.
- 17) Sin, I.L., Fernandes, R. and Mercola, D. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82, 1132-1139.
- 18) Leavis, P.C., Rosenfeld, S.S., Gergely, J., Grabarek, Z., and Drabikowski, W. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 5452-5459.
- 19) van Erd, J.P. and Kawasaki, Y. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 859-865.

- 20) Johnson, J.D. and Potter, J.D. (1978) J. Biol. Chem. 253, 3775-3777.
- 21) Stull, J.T. and Buss, J.E. (1978) J. Biol. Chem. 253, 5932-5938.
- 22) Murray, A.C. and Kay, C.M. (1972) Biochemistry 11, 2622-2627.
- 23) Mani, R.S., McCubbin, W.D. and Kay, C.M. (1974) Biochemistry 13, 5003-5007.
- 24) van Erd, J.P. and Kawasaki, Y. (1973) Biochemistry 12, 4972-4980.
- 25) Potter, J.D., Seidel, J.C., Leavis, P., Lehrer, S.S. and Gergely, J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 7551-7556.
- 26) Ebashi, S., Ohnishi, S., Abe, S., and Maruyama, K. (1974) J. Biochem. 75, 211-213.
- 27) Levine, B.A., Mercola, D., and Thornton, J.M. (1976) FEBS Lett. 61, 218-222.
- 28) Levine, B.A., Mercola, D., Coffman, D., and Thornton, J.M. (1977) J. Mol. Biol. 115, 743-760.
- 29) Seamon, K.B., Hartshorne, D.J., and Bothner-By, A.A. (1977) Biochemistry, 16, 4039-4046.
- 30) Iida, S. (1979). J. Biochem. 印刷中
- 31) McCubbin, W.D., Mani, R.S., and Kay, C.M. (1974) Biochemistry, 13, 2689-2694.
- 32) Ohnishi, S., Maruyama, K., and Ebashi, S. (1975) J. Biochem. 78, 73-81.
- 33) Endo, M. (1972) Nature, New Biology 237, 211-213.
- 34) Kitazawa, T. (1976) J. Biochem. 1129-1147 (1979年3月14日受理).

次号予定内容

(Vol. 19 No.4/通巻104号)

総 説

- 細胞膜の容量性電流.....入交 昭彦
ヘモシアニンの構造と機能.....牧野 誠夫

シンポジウム

- サテライト・ミーティングの報告
生理学における数学的方法.....伊藤 嘉房

図 書 室

- 非線形生物物理系のウィーナー理論.....佐藤 俊輔
タンパク質の物理化学.....高橋 徹

研究室紹介

- NIHに於ける生物物理研究室.....昆 秀夫
東京大学・理学部・物理学科・生物物理.....松本 元
公害研究所.....菅原 洋子
石黒 敬彦