

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07143

研究課題名(和文) 横紋筋及び非横紋筋細胞における運動制御機構の普遍性と多様性

研究課題名(英文) Universality and diversity of regulatory mechanisms for muscle contraction in striated and non-striated muscle cells

研究代表者

佐藤 成樹 (SATO, Naruki)

千葉大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：40261896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ギボシムシの体壁平滑筋にトロポニンが存在しないがパラミオシンが存在することを示し、半索動物と棘皮動物(水腔動物)の筋が進化の過程で脊索動物の筋とは異なる多様性を獲得したことを明らかにした。扁形動物・プラナリアにトロポニン3成分(TnT, TnI, TnC)と考えられるタンパク質が発現していることを示し、非横紋筋細胞におけるトロポニンの普遍性を明らかにした。Cタンパク質とHタンパク質がミオシンだけでなく、アクチン線維に結合する多機能タンパク質であることを明らかにし、筋収縮制御に関わる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：(1) I examined the muscle of a hemichordate, to clarify whether this animal is like echinoderms or like the other deuterostome animals. I identified a paramyosin, which is a myosin binding protein characteristic of muscle of invertebrate animals, in the smooth muscle of acorn worm. On the other hand, troponin, a Ca<sup>2+</sup>-dependent regulator of muscle contraction, was not detected in the isolated thin filaments. The results indicate that troponin is lacking in thin filaments of acorn worm muscle just as in those of echinoderms. The muscle of hemichordate acorn worm is quite similar to echinoderm muscles, but different from chordate muscles. (2) I revealed that troponin, which is characteristic of striated muscle of various animals, is expressed in non-striated muscle cells of planaria. (3) Myosin-binding protein-C and -H bound to not only myosin filaments and connectin/titin but also actin filaments. The results suggest that mybp-C and -H might be regulators of muscle contraction.

研究分野：生物学

キーワード：横紋筋 非横紋筋 筋収縮 トロポニン 半索動物 ミオシン結合タンパク質 パラミオシン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) トロポニン<sup>1</sup>は脊椎動物の横紋筋(骨格筋と心筋)の収縮運動の制御に不可欠なタンパク質複合体である。アクチン-ミオシン相互作用の抑制因子として働き、Ca<sup>2+</sup>と結合することで抑制が解除され収縮運動が可能となる。さらに、トロポニンは平滑筋には存在せず、横紋筋に特異的なタンパク質であるということが、これまでの一般的な理解であった。しかし報告者は脊椎動物への進化の前段階にある原索動物・尾索類カタユレイボヤでは横紋筋だけでなく、平滑筋にもトロポニンが存在すること、どちらの筋のトロポニンも既知のトロポニンにみられる収縮運動を抑制する「ブレーキ型」ではなく、Ca<sup>2+</sup>存在時に収縮運動を促進する「アクセル型」特性をもつことを解明した。一方、頭索類ナメクジウオ横紋筋のトロポニンは、脊椎動物の場合と同様に「ブレーキ型」特性を示すことを明らかにした。このことから、脊索動物の進化過程のうち原索動物・頭索類から脊椎動物への進化において、トロポニンは「ブレーキ型」機能特性を継承し、尾索類への進化では「アクセル型」機能を新規に獲得したことを明らかにした(Dennisson et al. Zool Sci 2010, Ohshiro et al. Biochemistry 2010, Obinata & Sato. Methods 2012)。一方、海外の研究からも、トロポニンが横紋筋以外の組織でも重要な役割を持つことが指摘されている。例えば、線虫の生殖巣筋様細胞に発現するトロポニンが放卵制御に関わること、ショウジョウバエではトロポニン I が染色体の安定性と細胞極性の維持に重要(Ono & Ono. Mol Biol Cell 2004, Sahota et al. J Cell Sci 2009)という報告がある。哺乳類でも血管など幾つかの平滑筋組織にトロポニンが発現し、機能するという報告がある(Moran et al. Cell Motil Cytoskeleton 2008, Kajioka et al. Sci report 2012)。これまで、非横紋筋細胞の収縮運動の制御はトロポニンではなく、ミオシン軽鎖のリン酸化によるミオシン重鎖のアクチン結合部位の活性化と繊維の集合、及び、アクチン結合タンパク質に依存したアクチン繊維の動的再編成によるものとされている。しかし以上の研究から、非横紋筋細胞においてもトロポニンによるカルシウム依存的な運動制御が重要であることが示されつつあり、新たなトロポニン研究を速やかに行う必要性がでてきた。(2) 一方、最近の研究より、脊椎動物横紋筋の筋収縮にトロポニンだけでなく、ミオシン結合タンパク質 C (C-タンパク質) が関与することがわかってきた。C-タンパク質は横紋筋に発現するミオシン結合タンパク質で、家族性肥大型心筋症の原因因子として心筋の機能維持における重要性が世界的に注目されている。報告者はこれまでに、筋原繊維構造の形成と維持におけるミオシン結合タンパク質の役割を研究し、ニワトリ及びマウス C-タンパク質の塩基配列を明らかにし、そ

の発現様式と機能を解明した(Yasuda et al. J Mol Cell Card 1995, Kurasawa et al. Muscle & Nerve 1995, Saruta et al. Zool Sci 2010)。さらに、加齢に伴い機能異常を示す C-タンパク質変異体が正常な C-タンパク質の代わりに、マウス心臓に発現することを同定した(Sato et al. Mol Biol Cell 2003)。さらに、C-タンパク質が N 端領域でアクチン繊維に結合しアクチン-ミオシン相互作用に影響をあたえること、及び、このアクチン繊維との結合能力は C-タンパク質のアイソフォーム毎に異なることを見だし、「C-タンパク質が筋原繊維の安定化や維持に必要なだけでなく、アクチンとミオシンの両方に結合して筋収縮を調節する筋収縮制御タンパク質である」ことを新たに提案した。

## 2. 研究の目的

トロポニンは横紋筋特異的に発現し、その筋収縮を制御する唯一のタンパク質と考えられている。しかし報告者は、原索動物尾索類では横紋筋だけでなく平滑筋細胞にも発現し、さらに機能特性が脊椎動物等とは大きく異なることを明らかにした。一方、ミオシン繊維の安定化を担うと考えられたミオシン結合タンパク質が筋収縮の制御にも関与する事を明らかにしつつある。そこで本研究は、(1) 非横紋筋細胞におけるトロポニンの新たな機能的役割の解明と、(2) 横紋筋収縮制御におけるミオシン結合タンパク質(C-タンパク質と H-タンパク質)の役割の解明をおこない、細胞運動の制御機構に関する従来の概念を再考する。これらの研究を通して横紋筋及び非横紋筋細胞における運動制御機構の普遍性と多様性を包括的に理解することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 非横紋筋細胞におけるトロポニンの新たな機能的役割の解明: 扁形動物、半索動物、脊椎動物の平滑筋細胞や非筋細胞などの非横紋性運動細胞に着目し、トロポニンの普遍性と機能の多様性を明らかにする。特に扁形動物はプラナリアを、半索動物はギボシムシを対象とする。方法はプラナリアについてはゲノム情報からの探索、同定後は該当遺伝子産物から組換え体を作製し、その機能解析を行う。可能であれば、天然アクチン繊維を組織から分離することでトロポニンの有無の検討を行う。さらに RNAi による発現抑制により、その役割の解明を試みる。半索動物の筋に関しては世界的にもほとんど研究がされておらず、遺伝子情報についても不足しているため、生体から直接トロポニンを単離することを試み、半索動物の筋の性質を明らかにする。

(2) 横紋筋収縮制御におけるミオシン結合タンパク質の役割の解明: C-タンパク質と H-タンパク質に注目して、それぞれの組み換え体を作製し、その生化学的機能や生理的機

能を *in vitro* で解析する。特に、アクチンとの相互作用についてを中心に調べ、アクチン結合領域の決定やアクチン線維との結合様式の同定を行う。これらを通して、ミオシン結合タンパク質による横紋筋収縮制御の分子メカニズムの解明を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) 半索動物・ギボシムシの筋肉の性質：

脊椎動物では横紋筋の筋収縮がトロポニンにより制御される。脊椎動物以外の後口動物では原索動物・ナメクジウオの横紋筋、ホヤの横紋筋と平滑筋にトロポニンが発現している。しかし、後口動物でも棘皮動物の筋肉にはトロポニンは認められない。後口動物グループを構成する脊椎動物と原索動物、さらに進化的系統が大きく離れた前口動物の筋肉においてトロポニンが存在するのにもかかわらず、同じ後口動物である棘皮動物の筋肉ではトロポニンが認められないことは大変興味深い。一方、前口動物の筋肉においてミオシンフィラメントの核となりフィラメントの集合と安定化に寄与すると考えられているパラミオシンは、後口動物においては棘皮動物の筋肉に発現するが、脊椎動物や原索動物の筋肉には見られない。そこで本研究は非横紋筋細胞におけるトロポニンの発現とその機能、及び後口動物の進化における筋肉の多様性を理解することを目的として、棘皮動物と姉妹群を構成する半索動物・ギボシムシにおける筋肉の性質をトロポニンとパラミオシンを指標として研究した。

実験材料は東北大学浅虫臨海実験場の協力の下に青森県陸奥湾産のミサキギボシムシ (*Balanoglossus misakiensis*) を用いた。はじめにギボシムシ成体の体壁筋の構造を電子顕微鏡で観察した。その結果、平滑筋からなることがわかった (図1)。

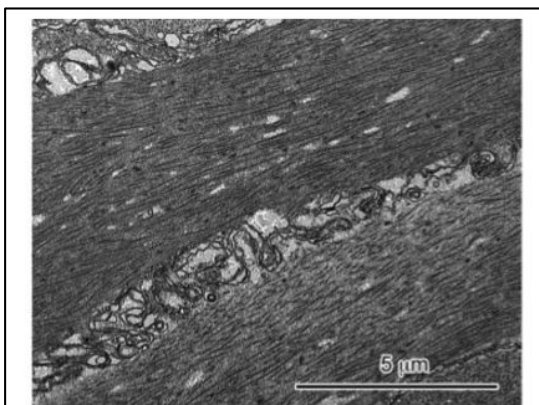


図1 ギボシムシ体壁筋の電子顕微鏡像。多数の筋原繊維が存在するが、横紋構造は認められず、平滑筋であることがわかる。

次に、成体ギボシムシの体壁筋に対して SDS-PAGE を行ったところ、ミオシン、アクチンと思われる分子のほか、既知のパラミオシンと同様の分子量を示す約 100 kDa のタンパク質が認められた (図2)。そこで、棘皮動物におけるパラミオシンの単離法を応

用して 100 kDa タンパク質を単離した。単離したタンパク質はウニのパラミオシン抗体に反応し、ニワトリ平滑筋から精製したミオシンフィラメントと結合した。さらに高濃度の Mg イオン存在下でパラクリスタルを形成し、電子顕微鏡による negative staining の観察から、既知のパラミオシンと同様に 145 Å の周期を示す縞模様が認められた (図2)。これらのことから、100 kDa タンパク質はギボシムシのパラミオシンであることが明らかとなった。

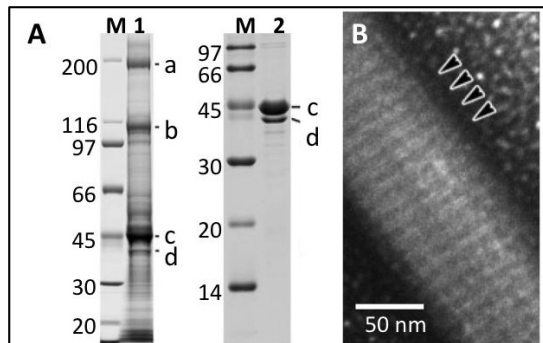


図2 (A) ギボシムシ体壁筋 (レーン1) と NTF (レーン2) の電気泳動像。a, ミオシン; b, パラミオシン; c, アクチン; d, トロポニン。Mは分子量マーカー (kD)。 (B) ギボシムシ・パラミオシンによるパラクリスタル構造。

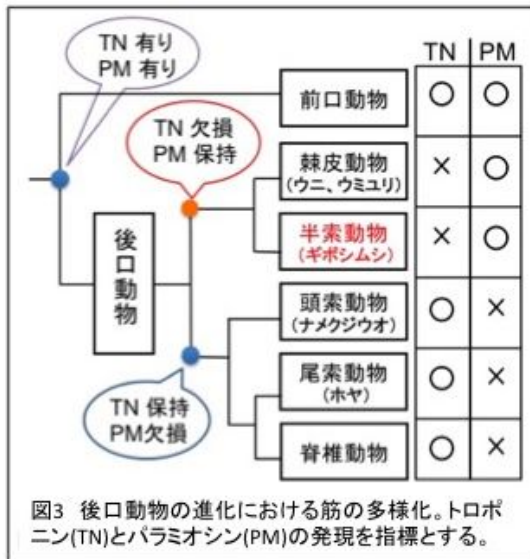
一方、海産無脊椎動物の天然アクチン線維 (NTF) 単離法を応用して、成体体壁筋から NTF を単離した。SDS-PAGE の結果、ギボシムシ NTF には主に約 42 kDa と 40 kDa のタンパク質が存在していることがわかった。42 kDa のタンパク質はイムノブロットからアクチンであることが示され、40 kDa のバンドは尿素電気泳動において移動度が遅れたことからトロポミオシンであることが示された。これらの結果よりギボシムシ筋肉の NTF は主にアクチンとトロポミオシンから構成され、トロポニンと思われる分子の存在は見いだせなかった (図2)。単離したギボシムシ NTF にウサギ骨格筋から精製したミオシンを加えて、actin-activated myosin ATPase 活性を測定したところ、Ca イオンの有る無しに関わらず活性化が認められた。これらの結果から、ギボシムシの成体体壁筋には棘皮動物の筋肉と同様にトロポニンシステムは存在しないことがわかった。

これらのことから、半索動物は棘皮動物の筋肉と同様に進化の過程でパラミオシンを保持する一方、トロポニンが失われたことがわかった。一方、原索動物や脊椎動物の筋肉ではトロポニンを保持しパラミオシンが失われたことから、同じ後口動物でも、水腔動物の筋肉は脊索動物の筋肉とは異なる方向へ多様化したことが明らかとなった (図3)。

##### (2) プラナリア非横紋筋細胞におけるトロポニンの発現及び機能の解析：

本研究では、非横紋筋細胞中におけるトロポニンの発現や機能の一般性を明らかにすることを目的とし、横紋筋細胞を持たないに

も関わらず筋型のミオシン重鎖を発現する



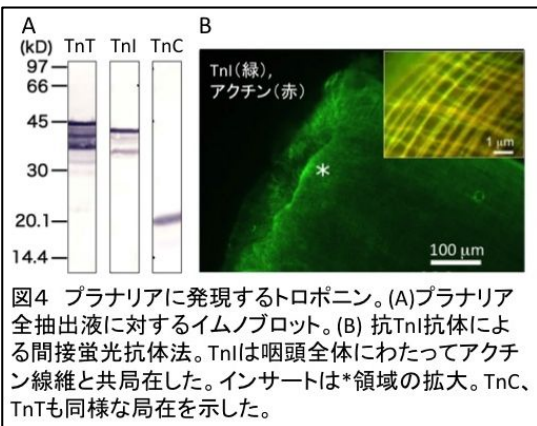
プラナリア(*Dugesia japonica*)に着目した。学習院大学阿形清和教授の協力のもとプラナリアゲノムデータからトロポニンサブユニット遺伝子の解析を行った結果、既知のトロポニンサブユニット(TnC, TnI, TnT)に類似した遺伝子が存在した。プラナリアのTnCと考えられる遺伝子産物は154アミノ酸(推定分子量: 17.7kDa)からなり、アカザラガイ等の軟体動物TnCと約70%の高い相同性を示した。また、分子のC端側にCaイオン結合ドメインのコンセンサス配列が1カ所認められた。TnIと考えられる遺伝子産物は287アミノ酸(推定分子量: 33.4kDa)からなり、線形動物や軟体動物のTnIと約60%の相同性を示した。また、分子の中央部にアカザラガイTnIのアクトミオシン相互作用抑制領域と相同性が認められた。TnTと考えられる遺伝子産物は323アミノ酸(推定分子量: 38.2kDa)からなり、軟体動物のTnTと分子の全体に渡って約70%の高い相同性を示した。これら遺伝子の転写産物の発現をRT-PCRにより検討した結果、筋組織が多く存在する咽頭で発現が高いことが明らかになった。

そこで、これら遺伝子産物が実際にプラナリアの筋肉で発現しているかを明らかにするため、TnC, TnI及びTnTと考えられる遺伝子をプラナリアから単離し、大腸菌発現系により遺伝子組換えタンパク質を作製し、それぞれの分子に対する抗体を作製した。得られた抗体を用いてプラナリア個体の全抽出液に対してイムノブロットを行ったところ、TnCについては分子量20kDaに、TnIについては分子量42kDaに、TnTについては分子量45kDaの位置に特異的に反応し、これら遺伝子産物がタンパク質として実際に発現していることが証明された(図4)。そこで、間接蛍光抗体法により発現部位を同定した。その結果TnC, TnI及びTnTは、いずれもアクチン繊維と共に体壁筋と咽頭筋において高い発現が認められた。より詳細に解

析するため、単離した咽頭を観察した結果、TnC, TnI及びTnT全ての分子が格子状に分布筋繊維のアクチンフィラメント上に局在することが明瞭に示された(図4)。

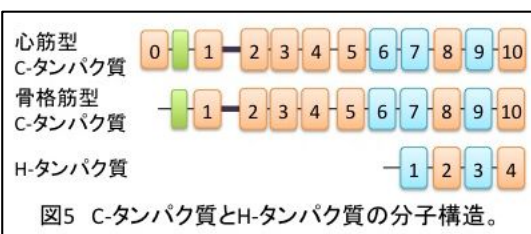
次に、各成分の機能を検討した。TnCと構造がよく似たCaイオン結合タンパク質として、平滑筋細胞の筋収縮制御に関わるカルモジュリンが存在する。両者はアミノ酸配列からだけでは、区別することは難しい。そこで、組換え体TnCとCaイオンの結合様式を調べた結果、カルモジュリンとは異なる、TnCに特徴的なCaイオン結合能が示された。また組み換え体TnIとTnTがそれぞれウサギのアクチン線維と結合することも明らかとなった。

これらの結果から、原始的な動物であるプラナリアの非横紋筋細胞においてトロポニン様分子が発現することが明らかになり、動物の進化の初期からトロポニンがCaイオン依存的に非横紋性筋細胞の収縮制御に関与することが強く示唆された。



### (3) ミオシン結合タンパク質による横紋筋収縮制御の分子メカニズムの解明:

ミオシン結合タンパク質(C-タンパク質)は主に immunoglobulin domain (Ig) と fibronectin type III repeat (FN)の繰り返し構造から成り、脊椎動物横紋筋の筋タイプ特異的に心筋型、骨格筋遅筋型、骨格筋速筋型の3種類のアイソフォームが特徴的に発現する(図5)。これまでの研究より分子のC端側でミオシンフィラメントと connectin/titin に結合し、N端側がアクチン線維と結合することが明らかとなった。そこでまず本研究ではC-タンパク質のアクチン結合の様式を心筋型N端領域(CN, ドメイン0~3)、遅筋型N端領域(SN, N端~ドメイン4)、速筋型N端領域(FN, N端~ドメイン4)の組み換え体を作製して検討した。アクチン線維と



の共沈実験、濁度解析、電子顕微鏡解析を行った結果、C-タンパク質はアクチン線維を束化する活性を持ち、その活性は速筋型が最も強く、次いで心筋型、遅筋型であることがわかった(図6)。また、速筋型アイソフォームにおいては、1番目のIgと2番目のIgの間に存在する linker 領域が特に重要であることが示された。さらにこの束化能はC-タンパク質のN端領域に複数のアクチン結合部位が存在するためではなく、むしろ2量体を形成することによるものであることが強く示唆された。

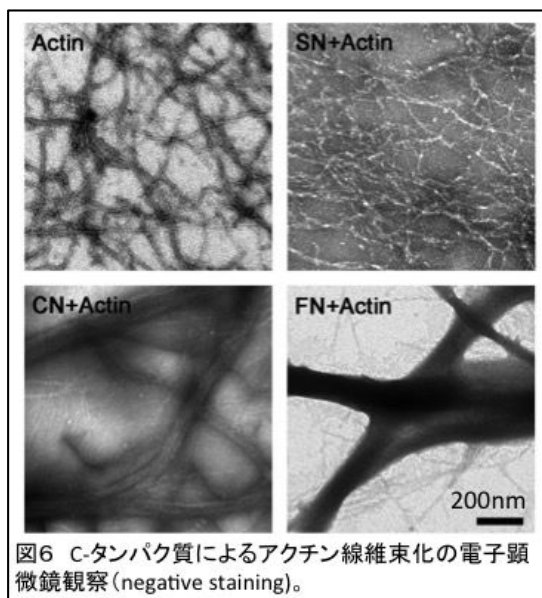


図6 C-タンパク質によるアクチン線維束化の電子顕微鏡観察(negative staining)。

もう一つ、ミオシン結合タンパク質 H-タンパク質は、C-タンパク質のC端側領域と相同なドメイン配列から構成される分子で、主に横紋筋に発現する(図5)。これまでの研究より H-タンパク質もミオシンフィラメントと connectin/titin に結合することがわかってきたが、未だその機能はほとんど理解されていない。そこで本研究では H-タンパク質の組み換え体を作製し、その機能を解析した。その結果 C-タンパク質だけでなく H-タンパク質もアクチン線維に結合して束化することが示された。また、その結合部位としてドメイン2のIgが重要であることが示唆された。一方、C-タンパク質についても、分子のN端領域だけでなく H-タンパク質と相同なC端領域のドメイン8(Ig)に第2のアクチン結合部位が存在すること、しかしN端側と異なりアクチン束化活性は弱いことが示された。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Characterization of paramyosin and thin filaments in the smooth muscle of acorn worm, a member of hemichordates.  
Sonobe H., Obinata T., Minokawa T.,

Haruta T., Kawamura Y., Wakatsuki S., Sato N. The Journal of Biochemistry. 2016. 160. 369-379. (DOI: 10.1093/jb/mvw047) 査読あり

〔学会発表〕(計 7件)

(1)大木匠、小谷野菜穂、若槻真隆、佐藤成樹 H-protein のアクチンフィラメントに対する結合様式の解析 日本動物学会 2017年9月21日~23日 富山

(2)若槻真隆、佐藤成樹 ミオシン結合タンパク質 C のアクチン結合能の解析 生体運動研究合同班会議 2017年1月6日~8日 神戸

(3)花島章、佐藤成樹、木村澄子、櫻井隆、村山尚 コネクチンに結合する新規タンパク質の探索と解析 日本動物学会 2015年9月17日~19日 新潟

(4)若槻真隆、原口武士、大日方昂、佐藤成樹 C-protein N端側領域のアクトミオン滑り運動への影響 日本動物学会 2015年9月17日~19日 新潟

(5)宮本浩貴、三森あい、吉田静流、大日方昂、佐藤成樹 プラナリア非横紋筋細胞におけるトロポニンの発現及び機能の解析 日本動物学会 2015年9月17日~19日 新潟

(6)菅生真貴子、佐藤成樹 ニワトリ H-protein とサルコメア構成タンパク質との結合 日本動物学会 2015年9月17日~19日 新潟

(7)若槻真隆、川村勇樹、大日方昂、佐藤成樹 マウス C-protein の N 端側領域がアクチン-ミオシン相互作用に及ぼす影響 日本細胞生物学会 2015年6月30日~7月2日 東京

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
千葉大学理学部生物学科筋発生生物学  
<http://life.s.chiba-u.jp/bio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 成樹 (SATO, Naruki)  
千葉大学・大学院理学研究院・准教授  
研究者番号：40261896

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

美濃川 拓哉 (Minokawa, Takuya)  
川村 勇樹 (Kawamura, Yuuki)