

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月23日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2011

課題番号：20580217

研究課題名（和文） 軟体動物の筋収縮調節と温度適応に関する研究

研究課題名（英文） Temperature adaptation and regulatory mechanisms of molluscan muscle contraction

研究代表者

田中 啓之 (TANAKA HIROYUKI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・助教

研究者番号：90241372

研究成果の概要（和文）：

筋収縮を神経刺激に応じて制御するタンパク質であるトロポニン-トロポミオシンについて、軟体動物のものは古くから研究されてきた脊椎動物のものとは異なるメカニズムで作用することを明らかにした。また、このメカニズムが他の無脊椎動物にも存在する普遍的なものである可能性を示した。さらに、軟体動物が、特性の異なるトロポニンの様々な分子種を筋細胞内に作り出し、それが温度環境への適応や、種毎の生態の相違に関連している可能性も示した。

研究成果の概要（英文）：

We revealed that molluscan troponin-tropomyosin, the regulatory protein of muscle contraction, functions through the novel molecular mechanism that is different from those known for vertebrate troponin-tropomyosin. In addition, we suggested that the novel mechanism is present in arthropods and echinoderms and ubiquitous for invertebrate animals. Furthermore, we revealed that molluscs express various isoforms of the regulatory proteins, the biochemical properties of which are significantly different from each other. We proposed that the presence of these isoforms should be associated with the temperature adaptation of the molluscs and the difference of the locomotor habits of molluscan species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	200,000	60,000	260,000
年度			
総計	4,100,000	1,230,000	5,330,000

研究分野：水産化学、生化学、タンパク化学、分子生物学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：軟体動物、筋収縮調節、分子機構、トロポニン、遺伝子、温度適応

## 1. 研究開始当初の背景

軟体動物の筋肉はミオシン軽鎖系とトロポニン-トロポミオシン系の2つの収縮調節系タンパク質を合わせ持つ特徴を持つが、2つの調節系が併存する意義やそれらの役割分

担については不明であった。そのような中で、(1)軟体動物トロポニン-トロポミオシンが脊椎動物のものにはない構造および機能上の特徴を持つことが明らかとなり、定説では説明のできない新規の分子作動機構によっ

て、筋収縮を調節している可能性が示された。  
(2)軟体動物筋において、低温下では、トロポニン-トロポミオシン系、また、高温下では、ミオシン軽鎖系の機能が亢進することが報告され、温度条件によって両者の役割分担が変化している可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

(1)低温で効果的に筋収縮を調節する軟体動物トロポニン-トロポミオシンについて、新規分子作動機構の存在を明確にし、その詳細を解明する。

(2)軟体動物筋の2つの収縮調節系の役割が温度によってどのように変化しているかを検討し、軟体動物における2つの収縮調節系の存在と温度適応の関連を明確にする。

## 3. 研究の方法

(1)軟体動物筋トロポニン-トロポミオシンによる筋収縮調節の分子機構の解析

### ①蛍光エネルギー移動法によるアカザラガイ・トロポニンの高次構造変化の解析

まず、アカザラガイ・トロポニンサブユニットの一次構造上の種々の部位に、唯一のCysを有する変異体を大腸菌発現によって作成し、これを蛍光ドナーまたはアクセプターで化学標識した。それらの標識サブユニットでトロポニン-トロポミオシンや、アクチンフィラメントを再構成し、トロポニンCへのCa<sup>2+</sup>結合に伴って、ドナーとアクセプター間の距離がどのように変化するかを蛍光エネルギー移動法によって解析した

### ②化学架橋実験によるアカザラガイ・トロポニンサブユニットの一次構造・機能相関の解析

①で作成した変異体を化学架橋試薬で標識し、再構成トロポニンやアクチンフィラメントを作成後、紫外線を照射し、架橋試薬の近傍に存在する分子との間に共有結合を形成させた。反応生成物を分析し、架橋試薬の導入部位と空間的に近接するサブユニットを同定し、一次構造上のどの部位が他のサブユニットとの相互作用部位となっているかを検討した。

### ③表面プラズモン共鳴法や等温滴定型熱量分析法によるアカザラガイ・トロポニンサブユニット間の相互作用の解析

軟体動物および脊椎動物のトロポニンサブユニットやその種々の部位からなる断片について、他のサブユニットやアクチンとの結合親和性が、筋収縮の調節に際して、どのように変化しているかを解析し、結果を比較した。

### ④軟体動物型新規トロポニン作動機構の動

## 物界における普遍性の検討

軟体動物トロポニンの分子作動機構には、トロポニンCのC末端ドメインへのCa<sup>2+</sup>結合で収縮が調節される、また、トロポニンIのC末端側領域がトロポニンCと結合しない、など、脊椎動物トロポニンにはない特徴が存在する。このような特徴を持ったトロポニンが、節足動物や棘皮動物など他の無脊椎動物の筋肉にも存在するかどうかについて、検討を行った。

(2)温度環境への適応に関連した調節タンパク質アイソフォームの発現やその制御に関する解析

### ①アカザラガイ・トロポニンI遺伝子の構造解析

アカザラガイ・トロポニンIには、N末端伸長領域を持った52K-TnIと、これを持たない19K-TnIの2種類のアイソフォームが存在する。これらのアイソフォームは、筋収縮の活性化能が異なるほか、至適温度が異なるなどの特徴があり、貝類が温度環境の変化に適応するため、これらのアイソフォームの発現比率を変化させている可能性が示唆された。そこで、これらのトロポニンIの遺伝子をクローニングし、アイソフォームの形成機構や温度依存的発現の機構解明の基礎とすることを試みた。

### ②トロポニンサブユニットのアイソフォームの機能的差異と発現の解析

軟体動物のトロポニンIやトロポニンCのアイソフォームについて、試験管内で機能を比較し、機能的差異が筋肉の特性にどのような影響を与えているかを推測すると共に、それが軟体動物の環境への適応や生態とどのように関連しているかを考察した。

## 4. 研究成果

(1)蛍光エネルギー移動法により、アカザラガイ再構成アクチンフィラメント中における、トロポニンIのC末端側に存在する残基266と、アクチンの残基374の間の距離を測定した。その結果、Ca<sup>2+</sup>非存在時/存在時において、3.89 nm/4.37 nmと見積もられた。一方、コントロール実験として、ウサギ速筋再構成アクチンフィラメントを用いて同様の測定を行ったところ、4.17 nm/5.47 nmであり、アカザラガイはウサギに比較してCa<sup>2+</sup>依存的な距離の変化が小さいことが明らかとなった(図1)。脊椎動物筋を材料としたこれまでの研究により、トロポニンIのC末端側の領域は、Ca<sup>2+</sup>非存在時にはアクチンと結合して収縮を抑制し、存在時にはアクチンから解離し、トロポニンCに結合して収縮抑制を解除する、という収縮調節の分子

機構上、要となる動きをすることが提唱されてきた。しかし、本研究の結果は、軟体動物の場合そのような機構が存在せず、異なるメカニズムによって収縮が調節されることを示している。

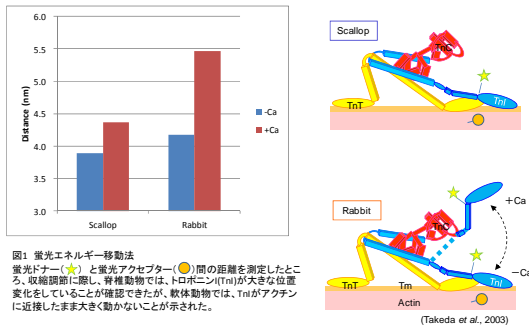


図1 蛍光エネルギー移動法  
蛍光ドナー(●)と蛍光アクセプター(○)間の距離を測定したところ、収縮調節に関し、脊椎動物では、トロポニン(TnT)が大きな位置変化をしていることが確認できたが、軟体動物では、TnTがアクチンに近接したまま大きく動かないことが示された。

(2) 化学架橋実験の結果、再構成アクチンフィラメントにおいて、アカザラガイ・トロポニン I の残基 266 は  $Ca^{2+}$  の有無に関わらずトロポニン T に近接していることが示された。一方、ウサギ速筋トロポニン I は  $Ca^{2+}$  存在時にトロポニン C に近接する一方、非存在時にはアクチンに近接することが示された。これらの結果は、先述の蛍光エネルギー移動法の結果と共に、トロポニン I の C 末端側領域の高次構造や機能が、軟体動物と脊椎動物でかなり異なることを示している。さらに、アカザラガイ・トロポニン I の種々の残基に架橋試薬を導入し、再構成トロポニン複合体中でこれらの残基が相互作用する分子を同定したところ、軟体動物トロポニン I に特徴的で、存在意義の不明な N 末端伸長領域は、どちらかというトロポニン C に近接していることが示された。さらに、残基 147~162 の領域は、脊椎動物と同様にトロポニン C 結合部位であることが確認されたほか、トロポニン C への  $Ca^{2+}$  結合に伴って、残基 147 はトロポニン C から遠ざかる一方、残基 160 は接近するような高次構造変化をしていることが示された(図2)。また、残基 183 および 200 については、脊椎動物と同様にトロポニン T に結合していることが示された。

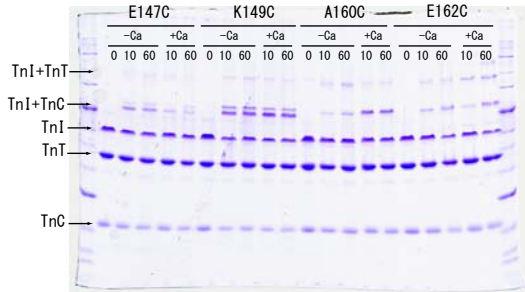


図2 化学架橋実験

アカザラガイ・トロポニン I の残基 147、149、160、および 162 を化学架橋試薬で標識し、トロポニン C およびトロポニン T サブユニット共に、再構成トロポニンとし、10分または60分間紫外線を照射した。反応産物を SDS-PAGE で解析した結果、 $Ca^{2+}$  依存的に残基 147、149、および 160 は、それぞれ、トロポニン C から遠ざかる、移動しない、および接近することが示唆された。

(3) 表面プラズモン共鳴法および等温滴定型熱量分析法により、アカザラガイ・トロポニン I の残基 147~162 の領域とトロポニン C の C 末端ドメインの結合定数が、トロポニン C への  $Ca^{2+}$  結合に伴ってどのように変化するかを解析した。その結果、結合定数は、 $Ca^{2+}$  によって約 3 倍大きくなる一方、 $Mg^{2+}$  による変化は認められなかった。この  $Ca^{2+}$  による変化が、軟体動物筋の収縮を起こす引き金となっていると考えられた(図3、投稿中)。

また、トロポニン T とトロポミオシンの相互

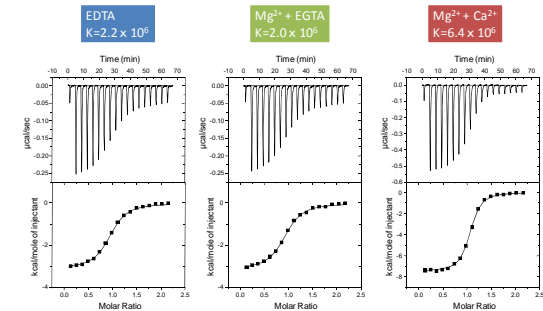


図3 等温滴定型熱量分析(ITC)によるアカザラガイ・トロポニンフラグメント(残基130-183)とトロポニンCのC末端ドメインの相互作用測定  
 $Mg^{2+}$  の存在によって結合定数は変化しないが、 $Ca^{2+}$  の存在は、結合定数を約3倍大きくすることを示している。

作用についても解析を行ったところ、軟体動物トロポニン T は、脊椎動物トロポニン T とは異なり、トロポミオシンとの結合能をほとんど持たないことが示された(図4、2009年度日本水産学会秋季大会において発表)。

(3) 以上の結果をまとめると、軟体動物トロ

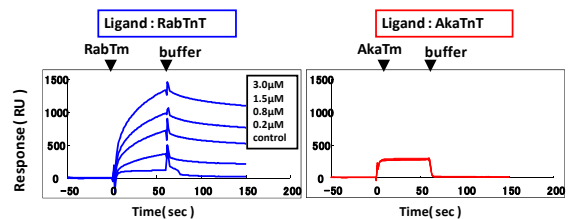


図4 表面プラズモン共鳴法によるトロポニン T (TnT) とトロポミオシン(Tm)の相互作用解析  
ウサギ速筋TnTを固定化したセンサーチップにウサギTmは強く結合することが示されたが、アカザラガイTnTを固定化したセンサーチップに、アカザラガイTmは全く結合性を示さなかった。

ポニンについては、

①トロポニン C の C 末端ドメインへの  $Ca^{2+}$  結合によって筋収縮を調節するが、その時、トロポニン I の残基 147~162 の領域と C 末端ドメイン間の相互作用が強くなるような構造変化を伴う。

②トロポニン I の C 末端側領域が、脊椎動物のように、大きな構造変化をせず、収縮時および弛緩時を問わずアクチンおよびトロポニン T に近接している。

③トロポニン T がトロポミオシンと結合しないことから、トロポニンをアクチンフィラメントに固定する役割を果たしているのは②の知見からも、トロポニン I であると考えられる。

等の特徴を有していることが明らかとなり、

脊椎動物トロポニンとは異なる新規の分子作動機構によって筋収縮を調節していると考えられた。

(4) 軟体動物トロポニン-トロポミオシン系に見出された新規分子作動機構が、動物界に普遍的に分布している可能性を検討するため、節足動物（アメリカンロブスター）のトロポニンについて、トロポニンCのN末端ドメインのCa<sup>2+</sup>結合能を失わせ、C末端ドメインにしかCa<sup>2+</sup>を結合しない変異体を作成した。この変異体トロポニンCを用いてトロポニンを再構成し、筋収縮の調節能を検討したところ、不完全ながら調節能を有していることが確かめられた。さらに、この調節能は低いCa<sup>2+</sup>濃度で発揮されることが明らかとなり、節足動物トロポニンは細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が低い収縮の初期においては、軟体動物型のメカニズムによって収縮を活性化し、さらに細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇すると、脊椎動物型のメカニズムによって完全な張力を発生するのではないかと考えられた（図5、2009年度日本水産学会秋季大会並びに2012年生体運動研究合同班会議において発表）。

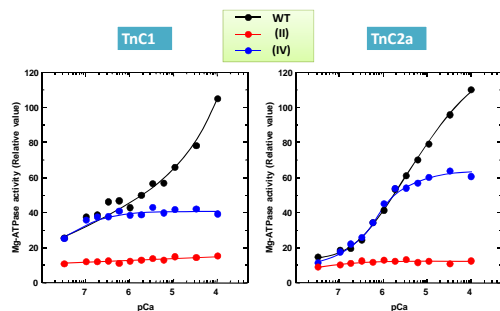


図5 アメリカンロブスタートロポニンCのアイソフォームについて、N末端ドメインにしかCa<sup>2+</sup>を結合しない変異体(●)およびC末端ドメインにしかCa<sup>2+</sup>を結合しない変異体(●)を作成し、再構成トロポニンとして、アクトミオシン・MgATPase活性の調節能を検討した。C末端ドメインにしかCa<sup>2+</sup>を結合しない変異体は、低いCa<sup>2+</sup>濃度範囲において、野生型(●)と良く一致する活性化曲線を示した。

一方、棘皮動物であるアメリカムラサキウニにも、トロポニンIやトロポニンTの遺伝子が存在することが近年報告されたことを踏まえ、キタムラサキウニの顎骨間筋から、RT-PCRによってこれらのcDNAのクローニングを行った。cDNAの塩基配列より、キタムラサキウニ・トロポニンIは、軟体動物トロポニンIと類似したN末端伸長領域を持ち、さらに、C末端側のトロポニンC結合部位を欠損していることが明らかになった。従って、棘皮動物の筋肉はトロポニンによる収縮の制御を受け、さらにその分子機構は、軟体動物型のメカニズムであると推測された。

(5) アカザラガイ・トロポニンIには、N末端伸長領域を有する52K-TnIとこれを持たない19K-TnIの2つの主要アイソフォームが存在する。これらには、機能上の差があり、52K-TnIの方が19K-TnIよりも、収縮の阻害

作用が弱く、活性化作用が強いことが報告されている。また、52K-TnIは19K-TnIに比較して低温適性が高いことも示唆されている。そこで、これらのトロポニンIアイソフォームの遺伝子を解析し、アイソフォームができる機構やアイソフォームが存在する意義の解明を図ることを試みた。まず、アカザラガイの精巢からゲノムDNAを抽出し、アカザラガイ・トロポニンI-cDNAをプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行った結果、これらのアイソフォームがシングルコピー遺伝子から生じることが示唆された。さらに、ゲノミックPCRにより、トロポニンI遺伝子の構造解析を行った結果、遺伝子の全長は約50kbp以上に及ぶことが明らかとなり、18のエキソンが同定された。それらのうち、1から4番目のエキソンは、52K-TnIにのみ用いられ、5番目のエキソンは、19K-TnIにのみ用いられることがわかった。従って、両アイソフォームは、遺伝子の転写開始点が切り替わることによって形成される可能性が考えられた。また、5番目と6番目のエキソンの間のイントロンに、近縁の二枚貝であるアズマニシキの熱ショックタンパク質(HSP70)遺伝子のイントロンに見られる配列と高い相同性を示す領域が見出され、温度に依存したこれらのアイソフォームの選択的発現に関与している可能性も示唆された。一方、エキシソンの幾つかは、心筋に特異的なアイソフォームでのみ用いられており、オルタネイティブスプライシングによって、単一の遺伝子から多様なアイソフォームが組織特異的に発現していることが示された（図6）。

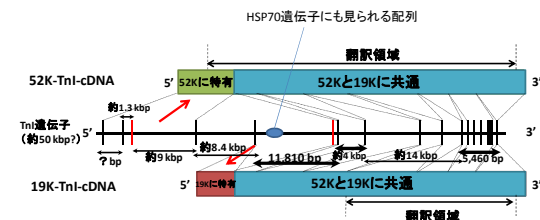


図6 アカザラガイトロポニンI遺伝子の構造  
縦線で示したエキソンが52K-TnIおよび19K-TnIをコードするmRNAの形成に際し、どのように用いられるかを示している。赤の縦線は、心筋特異的なアイソフォームにおいてのみ用いられるエキソンである。

(6) アカザラガイおよびホタテガイは互いに近縁の二枚貝であるが、アカザラガイが暖水域に生息し、岩着生であるのに対し、ホタテガイは寒流域に生息し、底生性で遊泳能力が高い、といった生態の違いがある。両者の筋組織には、152アミノ酸からなるLongタイプトロポニンCと150アミノ酸からなるShortタイプトロポニンCの2つのトロポニンCアイソフォームが存在する。これらの発現分布をウェスタンブロッティングによって調べた結果、アカザラガイの横紋閉殻筋では、Shortタイプが多く、Longタイプは少ない一方で、ホタテガイの横紋閉殻筋では、逆に

Long タイプが多く、Short タイプは少ないことが明らかになった。また、アカザラガイにおいては、横紋閉殻筋、心筋、外套膜筋に Short タイプが多く、平滑閉殻筋、足糸牽引筋、並びに鰓には Long タイプが多いことも明らかになった。さらに、アカザラガイ Long および Short タイプトロポニン C の大腸菌発現を行い、得られたリコンビナントタンパク質を再構成トロポニンとして、筋収縮の調節能を比較した結果、Long タイプは Short タイプよりも低い  $Ca^{2+}$  濃度で収縮を活性化できることがわかった。従って、神経刺激に伴う細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の増大とともに、Long タイプを多く含むホタテガイ横紋閉殻筋は、Short タイプを多く含むアカザラガイ横紋閉殻筋よりも早く収縮を開始し、より大きな張力を発生すると考えられた(図 7)。横紋閉殻筋は殻の開閉運動を担う主要な筋肉であることから、このような特性は、アカザラガイが岩着生であるのに対し、ホタテガイは底生性かつ殻を開閉して得られる水流による高い遊泳能力を有することと関連すると考えられた。また、生息水温の低いホタテガイは、低温による筋収縮速度や張力の低下を補うために、Long タイプのトロポニン C を多く発現させている可能性もあると考えられた。

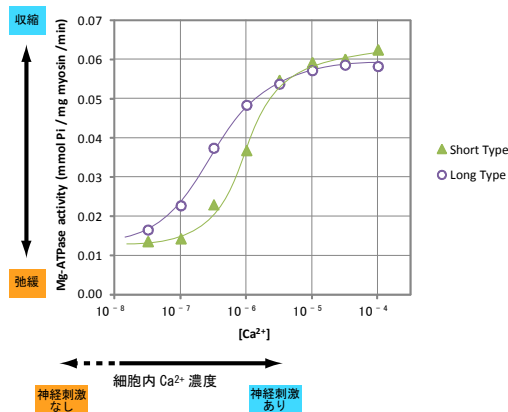


図 7 アカザラガイ・トロポニン C アイソフォームを含むトロポニンによるアクトミオシン Mg-ATPase の活性化曲線

筋細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度は神経刺激に応じて  $10^{-9}$  M から  $10^{-5}$  M の範囲で変化する。Mg-ATPase 活性は、アクチンとミオシンの相互作用に依存し、張力の発生状態を反映すると考えられている。

## 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)

[学会発表] (計 3 件)

①田中 啓之、「ロブスター・トロポニン C の N および C 末端ドメインへの  $Ca^{2+}$  結合が筋収縮調節において果たす役割」、2012 年生体運動研究合同班会議、2012 年 1 月 6 日、筑波大学

②塚本 洋之、「軟体動物および脊椎動物トロ

ポニンのサブユニット間相互作用の比較」、日本水産学会秋季大会、2009 年 10 月 1 日、岩手県民情報交流センター

③高橋 博貴、「節足動物トロポニン C の構造と機能に関する研究」、日本水産学会秋季大会、2009 年 10 月 1 日、岩手県民情報交流センター

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 啓之 (TANAKA HIROYUKI)  
北海道大学・大学院水産科学研究院・助教  
研究者番号：90241372

### (2) 研究分担者

尾島 孝男 (OJIMA TAKAO)  
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授  
研究者番号：30160865