

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：84502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23612009

研究課題名(和文) 昆虫飛翔筋の神経系を介さないメカノセンシング機構の解明

研究課題名(英文) Mechano-sensing mechanism of insect flight without nervous control in insect flight

研究代表者

岩本 裕之 (IWAMOTO, Hiroyuki)

公益財団法人高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・主幹研究員

研究者番号：60176568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：蚊のような小型の昆虫は、500Hz以上の周波数で羽ばたいて飛ぶ。通常の収縮・弛緩の繰返しでは実現不可能な高周波の羽ばたきを可能にするのは、昆虫飛翔筋の高い自励振動能力であり、これには「伸長による活性化」というメカノセンシング機構が必須である。本研究では、大型放射光実験施設SPring-8の発生する高輝度X線とCMOS型超高速ビデオカメラを使用し、生きた昆虫の羽ばたき中の飛翔筋内の分子の動きを毎秒5000コマで記録することにより、「伸長による活性化」の分子機構に関する重要な手がかりを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The wing-beat frequencies of small insects like mosquitos can reach 500 Hz or higher. Such high frequencies cannot be reached by repeating ordinary contraction-relaxation cycles. Instead, they are made possible by the capacity of self-sustained oscillation of the flight muscle, and a mechano-sensing mechanism called "stretch activation" is essential for this capacity. In this study, we were able to obtain crucial information in clarifying the molecular mechanism of "stretch activation" by recording the molecular movement within the flight muscle of live beating insects at a speed of 5000 frames/s by using the high-flux X-ray beams of SPring-8 and ultrafast CMOS video cameras.

研究分野：生物物理学、X線回折学

科研費の分科・細目：メカノバイオロジー

キーワード：メカノセンシング 昆虫飛翔筋

1. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫はなぜ速く羽ばたくか？

昆虫は地球上で最も繁栄した動物群で、その繁栄の秘密は飛行能力の獲得と体の小型化にある。しかし体を小型化すると、速く羽ばたかないと飛べないという問題が生じた。それは、体重が体長の3乗に比例するのに対し、揚力は体長の4乗に比例するからである(Dickinson, *Curr. Biol.*, 2006)。実際、蚊は500Hzで、さらに小型のユスリカは1000Hzで羽ばたく(Sotavalta, *Biol. Bull.*, 1953)。この羽ばたき周波数を通常の収縮・弛緩の繰り返しで実現するのは不可能である、というのは①羽ばたきごとに神経インパルスを送る中枢の負担が増え、②収縮弛緩ごとに必要な細胞内カルシウムのくみ出しに多大なエネルギーが必要になるからである(収縮弛緩は細胞内カルシウム濃度により制御される)。

(2) 昆虫のとった生存戦略 そこで、進化した小型昆虫は「非同期型飛行筋」を採用することでこの問題をクリアした。これは低い神経インパルス頻度で飛行筋を活性化状態に保ち、そのうえで飛行筋を自励振動させるものである。これで中枢は個々の羽ばたきを指令する労力から解放され、羽ばたきごとに細胞内カルシウムをくみ出す必要もなくなる。自励振動は、2組の拮抗する飛行筋が互いに相手を引っ張り合うことで起こる。一方が短縮すると他方は引き伸ばされ、それが刺激になって活性化されて力を発生し、もう一方を引っ張り返すのである。すなわち飛行筋のメカノセンシングが重要である。このメカノセンシング機能は「伸長による活性化」(Stretch activation、以後SAと略す)と呼ばれる。

(3) 分かっていないメカノセンシングの仕組み 細胞膜を除いてもSAはそのままなので、この機能が収縮装置自体に備わっているのは明らかである。それでは何が伸張刺激を検知しているのか？ これについては様々な仮説が提唱されている。1つは収縮蛋白のアクチンとミオシンの周期が合っていないものが、わずかな伸張により揃うというもの(Wray, 1979)、もう1つは上記カルシウムのセンサであるトロポニンが、カルシウムの代わりに伸張を感じるというもの(Bullardら、2004)であるが、何れにも反論があり、研究開始当初の時点で決定的な説はなかった。

2. 研究の目的

上に述べたように、蚊のような小型の昆虫は高い周波数で羽ばたいて飛ぶ。通常の収縮・弛緩の繰り返しでは到底実現不可能な高周波の羽ばたきを可能にしているのは、昆虫飛行筋(羽を動かす筋肉)の高い自励振動能力であり、これに飛行筋細胞自体のメカノセンシングが深く関わっている。ところが長年の研究にもかかわらず、このメカノセンシング、すなわちSAの分子機構は全く分かっていない。本

研究の目的は、X線回折法に遺伝子工学的手法など各種手法を組み合わせ、昆虫飛行筋のSAの分子機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究の成果は多岐に亘るので、主要な成果のみについてその研究方法を記述する。

(1) トロポニンが伸長の機械的信号を検知するという仮説の検証。 これは研究開始時点で最も有力視されていたSAの分子機構に関する仮説である。トロポニンはアクチン繊維上にあり、アクチン繊維の片方の端は何にも結合していないフリーエンドであるため、トロポニンが伸長を検知するためには何らかの構造が伸長のシグナルをトロポニンに伝える必要がある。そして、昆虫飛行筋のトロポニンの3成分のうちの一つであるトロポニンIのC末端にプロリン、アラニンに富んだ非常に長い延長部があり、これが伸長のシグナルをミオシン繊維からトロポニン本体に伝えるというのがBullardらが提唱した説である(Bullard & Pastore, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 2011)。これが事実であるかどうかを確かめるには、トロポニンIの長い延長部を除去して、SAが消失するか否かを調べればよい。そこで試料としてマルハナバチ飛行筋から単離して細胞膜を取り除いた(脱膜した)筋線維を用い、これを特異的な蛋白分解酵素Igaseで処理することで延長部を除去し、力学実験によってSAに対する効果を調べるとともに構造に対する影響を調べるためX線回折および電子顕微鏡観察を行った。

(2) 生きた昆虫の飛行筋からの高速X線ムービー撮影 これまでの飛行筋の研究は、主に昆虫から単離し、細胞膜を取り除いた脱膜筋線維を用いて行われてきた。しかし、そこで行われた観察の結果が生きた昆虫の中で実際に機能している飛行筋にも同様に当てはまるかどうかは確認する必要がある。そこで生きたマルハナバチを用い、この羽ばたき中に飛行筋にX線を照射し、そのX線回折像がどう変化するかを時間分解能0.2msで記録した。実験は大型放射光実験施設SPring-8の高輝度ビームラインBL40XUで行った。羽ばたき中の昆虫の飛行筋にX線を照射するため、いわゆる“Tethered flight”の方法を用いた。これは飛行筋のある昆虫の胸部をアルミ管の先端に接着して昆虫を一定位置に保ち、足を何にも触れさせないことで昆虫に自分が空中にあるものと錯覚させて羽ばたきを促す方法である。昆虫の胸部には2種の拮抗する飛行筋(体の前後方向に走るDorsal longitudinal muscle (DLM)と、背腹方向に走るDorso-ventral muscle (DVM))があり、それらは約60度の角度で交わるのだが、その交点にX線ビームを照射することで2種の飛行筋からの回折像を同時記録した。X線回折像の記録にはX線イメージインテンシファイヤにCMOS型高速ビデオカメラを組み合わせて用いた。また同様のCMOS型高速ビデオカメラをもう1台

用い、こちらは羽ばたき中のマルハナバチの姿を直接記録した。これらの2台のカメラはマスタースレーブ接続し、共通のクロックで作動させることで完全同期させることができ、X線回折変化を羽ばたきの位相に正確に対応させることができた(図1)。

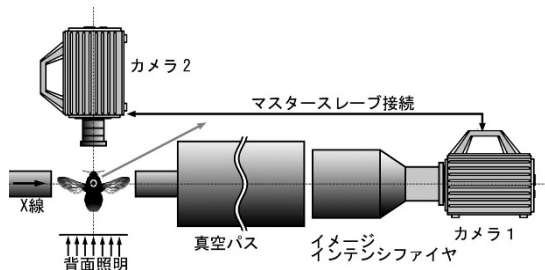


図1. X線回折実験のセットアップ。

4. 研究成果

(1)トロポニンが伸長の機械的信号を検知するという仮説の検証。昆虫飛翔筋以外のトロポニンIは分子質量25kDa程度であるが、昆虫飛翔筋のものはC末端にある非常に長い延長部のため、SDS電気泳動パターン上の見かけの分子量は80kDa程度となる。マルハナバチではこの延長部は他の昆虫よりわずかに短いと思われ、70kDaの位置にバンドが現れる(図2、レーンa)。この延長部を抗原とした抗体(MAC143)との交差反応性を調べるためウェスタンブロットを行ったところ、このバンドはMAC143と交差反応をすることが認められた(図2、レーンe)。電気泳動パターンの下に示したのはマルハナバチに近縁なセイヨウミ

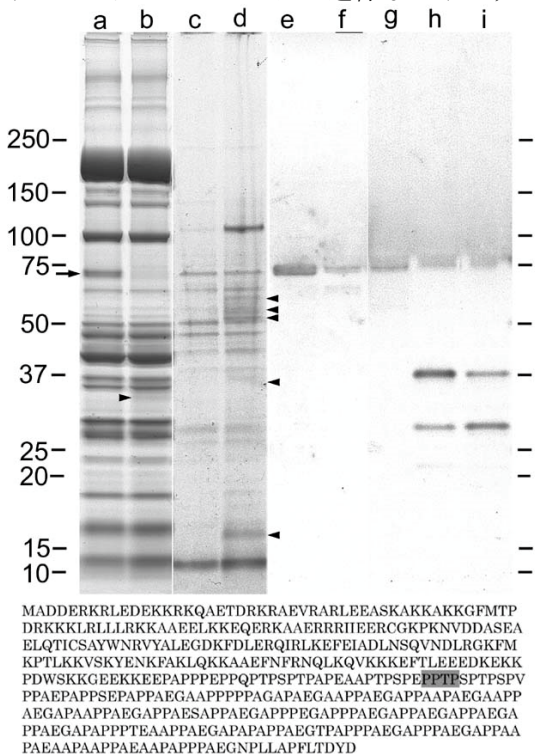


図2. マルハナバチ飛翔筋線維のSDS電気泳動パターンとウェスタンブロット。

ツバチのトロポニンIのアミノ酸配列であり、延長部の基部に近いところにIgaseで切断される配列(グレー)がある。

この筋線維をIgaseで一晩(12時間)処理したところ、70kDaのバンドが消失するとともに、約30kDaの弱いバンドが新たに出現した(レーンb)。また上澄には多数のバンドが出現した(レーンd)。ウェスタンブロット上では、筋線維の70kDaのバンドの染色は弱くなり(レーンf)、上澄には新たに約38kDaと約28kDaのバンドが交差反応することが認められた(レーンh)。従ってこれらはIgase処理によって切断され、上澄中に遊離した分解産物と考えられる。上澄をさらにIgase中に放置すると38kDaと28kDaのバンドの強度が逆転するので(レーンi)、28kDaの産物は38kDaの産物がさらに分解されてできたものと考えられる。

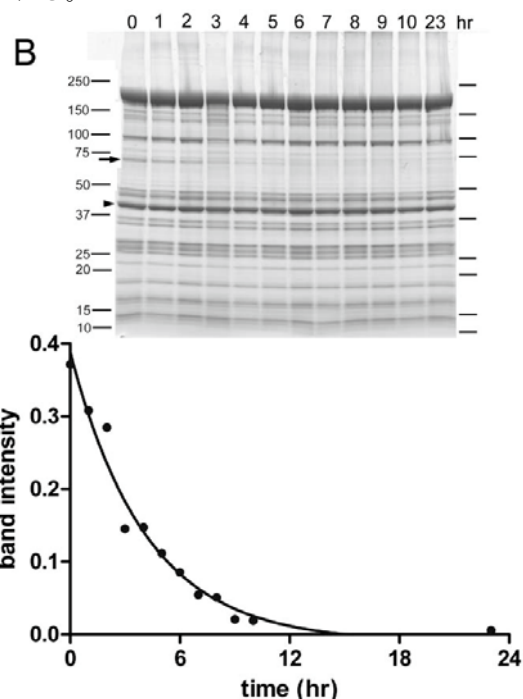


図3. IgaseによるトロポニンI延長部切断の時間経過。

図3はIgaseによる延長部切断の時間経過を測定したものである。70kDaのバンドの濃度をアクチンのバンドの濃度で正規化して処理時間に対してプロットしたのが下のグラフである。濃度減少の速度定数は0.241時間⁻¹であり、これに従えば12時間の処理後には切断されずに残っている延長部はわずか3%ということになる。

以上から、一晩(12時間)Igase処理を行えば大部分(97%)の延長部を除去できることが分かった。延長部がSAにとって重要であるなら、Igase処理によってSAは消失すると予想される。そこでIgase処理を行った筋線維をカルシウムで活性化し、これに伸長を加えて

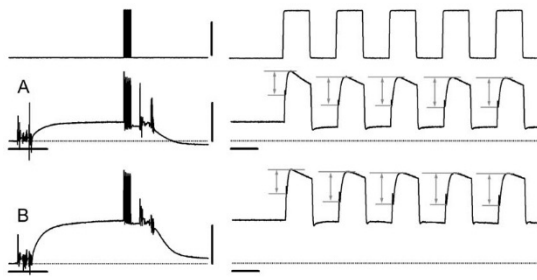


図 4. コントロール(A)と Igase 処理飛翔筋線維の伸長に対する力学応答。右側は時間スケールを拡大したもので、矢印が SA 張力の大きさを表す。

SA が生じるかどうか力学測定を行った(図 4)。まず Igase を含まない液で処理をした対照群の筋線維は、伸長に対して正常な SA を示した(図 4A)。一方 Igase で処理した筋線維も、若干等尺性張力が増え、それに伴って SA 張力の振幅が減ったものの SA そのものはほぼ正常であり、SA 張力の発生速度も対照と変わりがなかった。この結果は SA にとってトロポニン I の延長部は必要でないことを明瞭に示している。

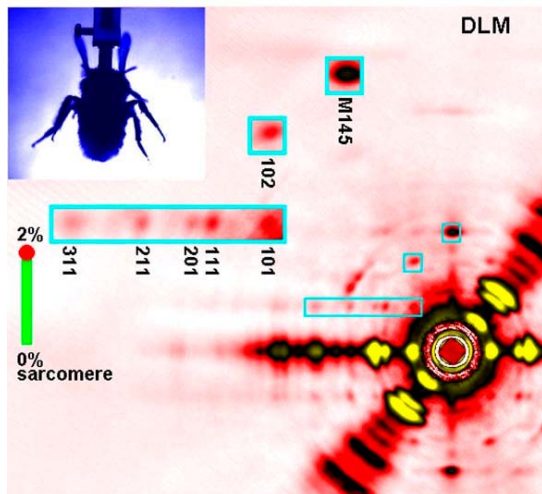


図 5. 9 匹のマルハナバチから記録した回折像を加算した X 線ムービーの 1 コマ。

(2) 生きた昆虫の飛翔筋からの高速 X 線ムービー撮影

図 5 には、実験に用いた 9 匹のマルハナバチから得られた X 線回折像を加算して作成したムービーの 1 コマを、そのタイミングでのハチの像と共に示している。回折像中央の円形に抜けた部分がビームストップの影であり、ここが X 線ビームの位置である。この回折像には、向きの異なる DLM と DVM の回折像が重なって記録されており、そのうちの DLM の赤道反射が水平になるように向きを回転して示したものである。赤道反射とは筋線維の繊維軸と直角の方向に生じる強い反射であり、筋フィラメントの 6 角格子状の配列に由来するものである。これに対して、繊維軸に沿ってみられる反射を子午線反射という。

その他に赤道反射に平行に多数の層状の反射が見られるが、これらは層線反射といってアクチンやミオシンの分子が繊維軸に沿ってらせん状に配列することによる。層線反射は、本来は連続した強度をもつ反射であるが、昆虫飛翔筋ではタンパク配列の規則性が非常に高いため(結晶性のため)、特に赤道に近い層線反射がスポット状に分断される。反射がスポット上になるのは結晶の反射がスポット状になるのと同じ原理であり、それぞれのスポットは結晶の面指数(hkl)で表すことができる。

生きたマルハナバチに X 線を照射した場合は上記のように、DLM、DVM の回折パターンが重なって記録されるのであるが、幸いこれら 2 種の筋肉の繊維軸の角度は 60 度程度であるので、多くの場合回折パターン上に現れたスポットがどちらの筋肉に由来するかを同定することが可能である。

このような回折像からさまざまな情報を得ることができる。それぞれの反射スポットの強度は羽ばたきの進行につれて変化するのだが、これはミオシン分子がアクチン分子へ結合解離を繰り返すような構造変化を反映したものである。赤道反射の間隔を精密に測定すると、筋肉の長さ変化を推定できる。これは筋細胞が体積一定の物体のように振舞うため、筋肉が短縮すれば筋フィラメントの格子間隔が広がるためである。また筋肉が力を発生すると筋フィラメントが弾性的に引き伸ばされるので、子午線上の反射の位置を精密に測定すると筋肉の発生張力を推定することができる。このようにして生きた昆虫の筋肉から多くの情報を非侵襲的に得ることができるのが X 線回折法の大きな特長である。

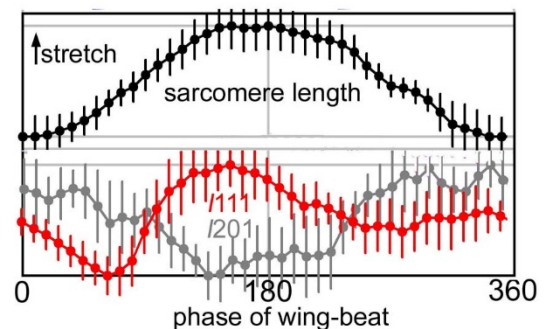


図 6. 図 5 のムービーを解析して得られた 111、201 反射強度変化の時間経過。上のトレースは赤道反射位置から推定した筋肉長。

このようにして得られた情報は非常に多いが、その中で羽ばたき中の筋肉の長さ変化と、X 線反射のうちで 111 反射、201 反射と呼ばれる 2 種の反射の強度変化をまとめて図 6 に示す。今回の実験結果で非常に重要なのが、この 2 つの反射の挙動である。111 反射は、飛翔筋が引き伸ばされる、つまり「伸張による活性化」が起こるタイミングで著しく増強されることが観察された。またそれと同時に、隣

にある 201 反射が相補的に弱くなった。これらの反射の挙動は、ミオシンの力発生に伴って変化する他の反射の挙動とは明らかに異なっている。

実は、この反射は筋細胞を急速に伸張したときに、最初に反応する反射であることが脱膜標本を用いた実験で分かっていた (Iwamoto and Yagi, 米国生物物理学会, 2011)。今回の実験で、これが生きた昆虫でも起こる現象であり、またその強度変化もかなり顕著であることが分かったのである。つまり、収縮タンパクにかなり大きな構造変化が起きていることを示している。

それでは具体的にどのような構造変化が起きたら観察された 111 反射と 201 反射の相補的な強度変化が説明できるのだろうか？ この

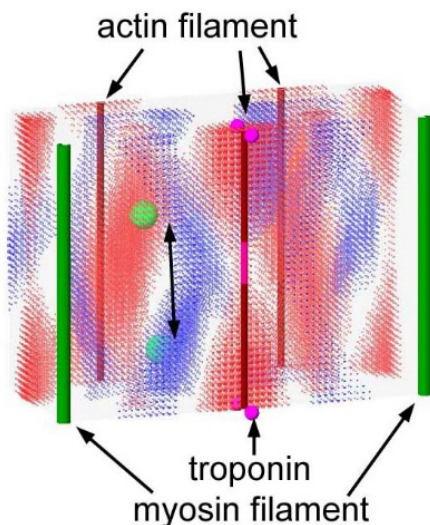


図 7. モデル計算により求めた筋フィラメント格子の単位胞中のミオシン頭部の位置と反射強度との関係。赤い部分が 111 反射が強く、201 反射が弱い場所。青い部分はその逆。

強度変化を報告した論文では、筋フィラメントの格子内の平面に沿ってタンパク質の質量が移動したときの反射の強度変化をモデル計算によって求め、観察された強度変化をトロポニンの移動によって説明するのは困難であるが、すでにアクチンに結合しているミオシン頭部が移動するのであれば容易に説明できると論じた (Iwamoto and Yagi, Science, 2013)。しかし飛翔筋を伸張したときに実際に起こるタンパク質の移動は 3 次元的と予想されるので、計算を 3 次元空間に拡張して行なった (Iwamoto and Yagi, 米国生物物理学会, 2014)。

図 7 は筋フィラメントの 6 角格子の体積の一部を直方体状に切り出し、斜めから見たところである。図の中の赤い部分は 111 反射が強く 201 反射が弱い領域、青い部分は 201 反射が強く 111 反射が弱い領域である。つまり、タンパク分子が青の領域から赤の領域に移動すれば、111 反射の相補的な増強が説明できる。特に 201 に対して 111 が最も強いホットスポットと、その真逆のクールスポットの間

をタンパクが移動すれば(図の緑のボールの位置)、最も大きな相補的強度変化を起こすことができる。この 2 つのスポットの繊維軸に沿った間隔は約 20nm で、筋肉の約 1.3% の伸張に相当する。これは実際「伸張による活性化」を起こすのに必要な伸張量に近い。これだけ大きな移動ができ、また観察された強度変化を説明するのに十分な質量をもっているのはミオシン頭部以外にありえない。またこの計算は、ミオシン頭部がアクチンの周期に沿って配列していないと成り立たないので、この計算結果は既にアクチンに結合しているミオシン頭部の変形が強度変化を起こすことを示している。

以上から、「伸張による活性化」のタイミングに一致して見られる 111 反射、201 反射の顕著な相補的強度変化は既にアクチンに結合したミオシンの伸張による変形を反映して、これが「伸張による活性化」の引き金になっている可能性が高い。すなわち、アクチンに結合して力発生の準備段階にあるミオシンが伸張により変形を受けることで力発生を開始することが「伸張による活性化」の分子機構であると推定される。

疲労して張力の低下した脊椎動物の骨格筋を引き伸ばすと非常に大きな力を出して抵抗するが、我々はこの伸張による活性化も同様の分子機構で起こっているという論文を発表している (Iwamoto, Biophys. J., 1995)。つまり昆虫飛翔筋も、脊椎動物骨格筋と同様の分子機構によって引っ張りによる張力増強を行なっているということになる。昆虫飛翔筋は、飛翔筋にしかない特異的なタンパク質を利用するのではなく、脊椎動物にもある一般的な筋肉の性質を利用することによって「伸張による活性化」を実現したと考えられるのである。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 岩本裕之. ハチの羽ばたく仕組みを高輝度シンクロトロン放射光 X 線で解明. *Isotope News*, 718: 2-8 (2014). 査読無
- ② 岩本裕之・八木直人. ハチの高速羽ばたきの分子引き金. *Science: サイエンス誌に載った日本人研究者*, 2014 Issue, 64 (2014). 査読無
- ③ 岩本裕之. 昆虫の卓越した能力を化学する: 昆虫飛翔時の卓越した筋肉の動き. *化学と教育*, 61: 384-387 (2013). 査読無
- ④ Iwamoto, H. and Yagi, N. The

molecular trigger for high-speed wing beats in a bee. *Science*, 341: 1243-1246 (2013). 査読有 doi: 10.1126/science.1237266.

⑤ Iwamoto, H. Flight muscle-specific Pro-Ala-rich extension of troponin is important for maintaining the insect-type myofibrillar lattice integrity. *J. Struct. Biol.*, 183: 33-39 (2013). 査読有 doi: 10.1016/j.jsb.2013.05.009.

⑥ Iwamoto, H. The long C-terminal extension of insect flight muscle-specific troponin-I isoform is not required for stretch activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 431: 47-51 (2013). 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.101

[学会発表] (計 10 件)

① 岩本裕之。超高速 X 線ビデオ撮影で探る昆虫飛翔筋の動作機構。第 31 回エアロ・アクアバイオメカニズム学会講演会。2014 年 3 月 17 日、東京 (2014)。

② Iwamoto, H. and Yagi, N. Three-dimensional considerations for X-ray diffraction signals that occur ahead of stretch activation in insect flight muscle. *Biophysical Society USA*, 2014. 2. 15-19, San Francisco, CA, USA (2014).

③ 岩本裕之、八木直人。マルハナバチ飛翔筋トロポニン I の長い延長部の構造的役割。日本生物物理学会第 51 回年会。2013 年 10 月 28-30 日、京都(2013)。

④ 岩本裕之、八木直人。羽ばたき中のマルハナバチ飛翔筋の超高速 X 線回折。日本動物学会第 84 回大会。2013 年 9 月 26-28 日、岡山(2013)。

⑤ Iwamoto, H. and Yagi, N. Coordination of two antagonistic flight muscles during wing-beat of bumblebee visualized by ultrafast X-ray diffraction movies. *Biophysical Society USA*, 2013. 2. 2-6, Philadelphia, PA, USA (2013).

⑥ 岩本裕之、八木直人。マルハナバチ飛翔筋の超高速 X 線回折と羽ばたきの同時記録。2013 年生体運動研究合同班会議、2013 年 1 月 12-14 日、東広島(2013)。

⑦ Iwamoto, H. and Yagi, N. Role of Pro-Ala-rich extension of troponin in insect flight muscle as examined by X-Ray diffraction. *Biophysical Society USA*, 2012. 2. 25-29, San Diego, CA, USA

(2012).

⑧ 岩本裕之、八木直人。昆虫飛翔筋トロポニン I に特異的な長い延長部の本当の役割。2012 年生体運動研究合同班会議、2012 年 1 月 6-8 日、つくば(2012)。

⑨ 岩本裕之、八木直人。昆虫飛翔筋の伸長受容蛋白。日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 21-23 日、旭川(2011)。

⑩ 岩本裕之、八木直人。昆虫飛翔筋ストレッチセンサーの同定。日本生物物理学会第 49 回年会。2011 年 9 月 16-18 日、姫路(2011)。

[その他]

① プレス発表:「超高速 X 線ムービー撮影により昆虫の羽ばたき機構を解明」2013 年 8 月 (プレスリリース)
http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/press_release/2013/130826/

② 一般向け講演会:「ハチの羽ばたきをとらえて筋肉の働きを知る」SPRING-8 コンファレンス 2014 2014 年 3 月 7 日 大阪

③ ホームページ 「昆虫の飛翔に迫る～高速の羽ばたきを生み出す分子機構」(研究成果をやさしく解説)
http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/research_highlights/no_74/

④ パンフレット:「昆虫の飛翔に迫る～高速の羽ばたきを生み出す分子機構～」SPRING-8 NEWS 74 号 (2014 年 5 月号)
http://www.spring8.or.jp/pdf/ja/SP8_news/no74_14/no74.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 裕之 (IWAMOTO, Hiroyuki)
公益財団法人 高輝度光科学研究センター
利用研究促進部門 主幹研究員
研究者番号: 60176568