

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：84502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440185

研究課題名(和文) 構成蛋白成分を交換した筋線維を用いた昆虫飛翔筋動作機構の解明

研究課題名(英文) Study on the mechanism of action of insect flight muscle using muscle fibers with exchanged protein components

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・特別研究員

研究者番号：60176568

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)：昆虫は最高で1秒に1000回も羽ばたくことができるが、これは昆虫の飛翔筋(羽ばたきに使われる筋肉)が高速振動できるからである。この飛翔筋の特性が、飛翔筋の構成タンパクのどれに由来するかを明らかにするため、飛翔筋の特定の構成タンパクを別の動物由来のものに交換する技術を開発した。今回、昆虫飛翔筋のアクチン繊維を抽出し、ウサギ骨格筋のアクチン繊維に置換することに成功した。X線回折法により、ウサギのアクチン繊維は筋線維内に正しい位置と向きで再生され、飛翔筋のミオシンと硬直複合体を形成できることが確認された。

研究成果の概要(英文)：Insects can beat their wings at frequencies of up to 1000 times/s. This is due to the capacity of the flight muscle to undergo fast oscillations. To clarify which of the constituent proteins this property comes from, we developed techniques to exchange specific constituent proteins with exogenous ones obtained from other organisms. Here we succeeded in replacing the endogenous actin filaments of the flight muscle with those from rabbit skeletal muscle. X-ray diffraction studies indicated that the rabbit actin filaments were regenerated in the right position in the muscle with a right orientation, and that the endogenous myosin can form rigor complexes with the rabbit actin filaments.

研究分野：生物物理学、動物学、X線回折学

キーワード：昆虫飛翔筋 X線回折 シンクロトロン放射光

1. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫飛翔筋動作機構に関する従来の研究

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翔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。その結果、蚊のような小型昆虫には毎秒500-1000回も羽ばたいているものがある。通常の収縮-弛緩のくり返しによってこの羽ばたき周波数を実現するのは不可能である。

小型の昆虫では、「非同期型飛翔筋」という動作方式を採用することで、この高い羽ばたき周波数を実現している。非同期型飛翔筋では、細胞内カルシウム濃度を一定のレベルに保つことで収縮装置を常にオンの状態に保ったうえで、収縮装置が自励振動を起こす。神経インパルスは細胞内カルシウム濃度を保つのに必要な最低限のものが送られるだけで、羽ばたきとは全く同期していないため、非同期型飛翔筋と呼ばれている(原始的な昆虫ではインパルスと羽ばたきが1:1に対応しており、同期型飛翔筋と呼ばれる)。

この非同期型飛翔筋が、どのような分子機構で自励振動を行うことができるのか、それを解明することが重要な課題であったが、現在に至るまで、完全な解明には至っていない。

自励振動が起こるうえで非常に重要な機能が「伸張による活性化」(Stretch activation, SA)である。これは、筋肉が伸張されると遅れて大きな収縮力を発生する仕組みである。昆虫の胸部には2対の拮抗する大きな飛翔筋があり、これが胸部外骨格を変形させることで間接的に羽を駆動する(間接飛翔筋)のだが、これらの2対の筋肉は一方が収縮すると他方が引き伸ばされる関係にあり、これによって上記のSAの機構によって自励振動を持続することができる。

このSAの分子機構については諸説あったが、最近まで最も有力とされていたのが、アクチン繊維上にあるカルシウム結合タンパクのトロポニンが、カルシウムの代わりに伸張を感じて飛翔筋を活性化するというものである(Agianian et al., EMBO J, 2004)。この論文は意表をつく結論によって注目された。トロポニンには3つのサブユニットがあり、その1つトロポニンCがカルシウムを結合する。トロポニンCはカルモジュリンと同じくEF-handタンパクで、N末端側とC末端側にそれぞれ2個の2価イオン結合部位がある。脊椎動物骨格筋では、N末端側の2個のカルシウム結合部位が収縮調節に直接関わっており、C末端側にはマグネシウムしか結合しない。

上記の論文(Agianian et al.)は、昆虫飛翔筋に特異的なトロポニンCはN末端側のカルシウム結合部位を2個とも欠損しているこ

と、またこれをN末端側にカルシウム結合部位のあるアイソフォームに交換すると伸張による活性化が起こらなくなることを示し、このトロポニンCがカルシウムの代わりに伸張を検知するのだと主張したわけである。

しかしトロポニンC自体の形態は脊椎動物のものとは変わらず、これが直接伸張を検知するとは考えにくい。一方もう1つのサブユニットであるトロポニンIのC末端側には脊椎動物にはない異常に長い延長部があり、ミオシン繊維に届く長さである。そこでこの延長部が実際に伸張をトロポニン複合体に伝えるメカニカルセンサーであると考えられた。この考えは欧米の研究者に広く受け入れられていた。

(2) 研究代表者がこれまでに行った研究

研究代表者は、上記の説が正しいかどうかを検証するための実験を行なった。それは非常に配列特異性のたかいタンパク分解酵素を使い、トロポニンIの長い延長部だけを切断する実験である。結果は、延長部を97%取り除いても、伸張による活性化はそのままであった(文献7)。これでトロポニンIの長い延長部がメカニカルセンサーであるという説は完全に否定されてしまった。また、生きて羽ばたいているマルハナバチの飛翔筋にX線を当て、毎秒5000コマの超高速X線回折ムービーを記録したところ、飛翔筋がちょうど引き伸ばされるタイミングで強度が大きく変化する信号があることを見出した。この強度変化はトロポニンの構造変化では説明困難だがミオシンの構造変化で容易に説明できる。すなわちメカニカルセンサーはミオシンそのものであるという可能性が強く示唆された。この結果はScience誌に掲載され(文献1)、Nature誌のNewsでも取り上げられるなど反響を呼んだ。これはミオシンの役割を強く示唆するけれど、ミオシンの伸張による変形と活性化の因果関係を直接に立証するまでには至っていない。

2. 研究の目的

上記の研究から更に踏み込み、飛翔筋と脊椎動物骨格筋との間で収縮タンパクの交換実験等を行なうことにより、自励振動能力を与えるのに最も重要な役割を果たすタンパクを特定することが本研究の主要な目的である。その他に関連して飛翔筋構造・機能の普遍性に関する研究、Science誌に発表した2次元モデルの3次元への拡張なども行った。

3. 研究の方法

試料は主にマルハナバチかミカドガガンボの飛翔筋(Dorsal longitudinal muscle, DLM)である。これを弛緩液とグリセリンの

50%混合物により脱膜処理をして使用した。

(1) ミオシン交換実験

飛翔筋のミオシンを、ウサギ骨格筋由来のミオシンに交換する実験を行った。ウサギ骨格筋由来のミオシンは、以前に抽出精製し、保存してあったものを用いた。ミオシンは、筋肉組織中では重合してフィラメントを形成しているが、KCl を添加してイオン強度を上げると溶解する。この交換実験には、ミオシンの溶解する KCl 濃度が昆虫と脊椎動物で異なることを利用した。まず、ウサギミオシンが溶解するぎりぎりの KCl 濃度(150mM)でウサギミオシンを添加した。ウサギミオシンは予め蛍光色素の Alexa488 で染色しておいた。ウサギミオシンの取り込みは蛍光顕微鏡で確認した。また筋肉の微細構造が保たれているか、フィラメントを形成しているかについては X 線回折法と電子顕微鏡で確認した。この実験にはミカドガガンボの飛翔筋線維を用いた。マルハナバチのミオシン繊維は極めて安定で、1M の KCl 濃度でも抽出されない。

(2) アクチン交換実験

この実験にはマルハナバチの飛翔筋線維を用いた。まず飛翔筋のアクチンを除去するのだが、これにはF-アクチン(繊維状アクチン)切断タンパクであるゲルゾリンを用いた。ゲルゾリンは脊椎動物の血清に含まれるタンパクで、カルシウムの存在下でF-アクチンを切断する。ゲルゾリンは牛血清由来のものを Sigma-Aldrich より購入した。これにはカルシウムキレーターである EGTA が含まれているようであり、そのまま溶かして用いるには都合がわるいので、脱塩カラムによって溶液交換をしたうえで用いた。

筋線維のミオシンがアクチン繊維に結合して、アクチンの切断を阻害することを防ぐため、ATP を添加する必要があるが、ATP とカルシウムが共に存在する条件は活性化条件であるため、処理中に筋線維が収縮してしまうのを防ぐため、ミオシン阻害剤を加えておく。ミオシン阻害剤としてはプレビスタチンまたはブタンジオン-2-モノオキシム(BDM)を用いた。

ここに低イオン強度でウサギ骨格筋の脱重合したアクチン(G-アクチン)を加え、イオン強度を上げて筋線維内で重合させ、F-アクチンに転換させた。ウサギ骨格筋アクチンは Sigma-Aldrich より購入したものである。

飛翔筋のアクチンが除去され、ウサギアクチンが再生したか否かの確認には、SDS 電気泳動と X 線回折実験を用いた。特にアクチン繊維が筋線維軸に沿って正しく再生しているかを確認するためには、X 線回折実験によってアクチンらせん由来の層線反射が再生しているかを観察するのが有効である。

4. 研究成果

(1) ミオシン交換実験

まず、蛍光標識したウサギミオシンをミカドガガンボ飛翔筋線維内に導入した実験であるが、ATP 存在下で溶解している余剰のミオシン分子を洗い流した後で蛍光顕微鏡により観察したところ、緑色の蛍光が観察され、ウサギミオシンが取り込まれていることが確認できた。X 線回折実験(ここで用いたミオシンは蛍光標識していない)でもミオシン由来の反射が確認され、またフィラメントの 6 角格子に由来する反射も残っていた。しかし、このように交換操作を行った筋線維は、力学的に非常に弱くなっており、わずかな外力で簡単に切れてしまうため、その後に予定していた力学特性の測定は不可能であった。電子顕微鏡で観察したところ、ミオシン繊維は筋線維軸に平行に存在していたが、ミオシン繊維の中央部分にある M 帯という構造が失われており、その部分のミオシン繊維の電子密度も減少しているようであった。M 帯は筋線維構造の integrity を保つのに重要な役割をしており、昆虫のミオシン繊維そのものはある程度の高イオン強度条件下でも可溶化しないけれど、M 帯を構成しているオプスクリンというタンパクがより低いイオン強度で可溶化してしまうため、筋線維全体としての力学強度が減少したものと考えられる。このことより、ミオシン交換実験を継続することを断念し、アクチン交換実験を行うことにした。

(2) アクチン交換実験

まず、市販の牛血清由来ゲルゾリンを、脱塩カラムを用いて ATP とカルシウムを含む液に溶液交換を行った。手動で 200 μ L 程度のフラクションを取り、タンパク濃度の最も高いフラクションを用いて飛翔筋線維を 1 晩処理したところ、効率的にアクチンが抽出されることが判明した。SDS 電気泳動では、可溶性画分にゲルゾリンとともにアクチンのバンドが現れた。一方で、筋線維に残っているアクチンのバンドが極めて弱くなり、同時にアクチン上にある収縮調節蛋白のトロポニンのバンドも弱くなった。X 線回折パターンを見ても、未処理の筋線維では非常に強いアクチン第 6、第 7 層線反射が殆ど認められなくなり、効率的にアクチン繊維が除去されたことが分かる。

アクチンが効果的に除去されたことを確認したうえで、ウサギ G-アクチンを浸透させ、十分に浸透したところでイオン強度を上げて重合させた。SDS 電気泳動では、筋線維からのサンプルにアクチンのバンドが処理前と再生しているのが確認された。X 線回折実験でも、一旦消失したアクチン第 6、第 7 層線反射が回復しているのが確認され、処理前

と同程度の配向を保ったアクチン繊維が筋線維内に再生していることが確認できた。ただし、SDS 電気泳動では処理前と同程度の濃度のアクチンのバンドが観察されたにもかかわらず、層線反射強度は処理前のレベルには回復しなかった。これは、一部のアクチンは筋フィラメントの格子に組み入れられない形で再生したためと考えられる。

このようにアクチンを再生した筋線維について、ミオシンの機能が保存されているかを調べるため、まず ATP とミオシン阻害剤を洗い流して硬直状態になるかを調べた。硬直状態とは ATP 非存在下で、ミオシンがアクチンのらせん周期に沿って強く結合する状態であり、アクチン由来の各層線反射の強度が非常に増大する。しかし、最初にミオシン阻害剤としてプレビスタチンを用いたところ、ATP を除去してもアクチン由来の各層線反射の強度の増大は見られなかった。プレビスタチンは低濃度で有効なミオシンに対する親和性が非常に高い阻害剤であり、ミオシンを不可逆的に阻害したものと考えられた。

そこで、プレビスタチンよりもミオシンに対する親和性が低く、容易に洗い流すことのできる阻害剤の BDM を代わりに用いたところ、ATP の除去によりアクチン由来の各層線反射の強度が増大することが確認され、ミオシンが機能を保っていることが確認できた。

次にこうしてアクチンを再生した筋線維の力学特性を測定した。残念ながらこの筋線維では現在のところ活性化張力は観察されなかった。この原因については調査中であるが、アクチン繊維が Z 膜につながっていない、飛翔筋ミオシンとウサギアクチンの相性が悪い(ウサギアクチンと昆虫アクチンではらせん対称性が異なるため、硬直結合は作ることができても活性化がうまくいかない可能性がある)。しかし昆虫飛翔筋中にウサギアクチン繊維を再生する手順が確立したことは非常に有意義なことである。

以上のように、異種の動物由来の収縮タンパク繊維をもつハイブリッド筋線維の作成に成功したものは世界にも出版例がなく、昆虫飛翔筋の高速振動の分子機構完全解明に向けた大きな進歩となった。今後は実験プロトコルの検証も含め、収縮張力発生可能なハイブリッド筋線維の作成に向けて更に研究を重ねる予定である。

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 4 件)

Iwamoto, H. The tymbal muscle of cicada has flight muscle-type sarcomeric architecture and protein expression. *Zool. Lett.*, in

press.(2017) 査読有り

Iwamoto, H. The earliest molecular response to stretch of insect flight muscle as revealed by fast X-ray diffraction recording. *Sci. Rep.*, 7:42272 (2017). doi: 10.1038/srep42272. 査読有り

Iwamoto, H. X-ray diffraction pattern from the flight muscle of *Toxorhynchites towadensis* reveals mosquito's specific phylogenetic position in Diptera. *Zool. Lett.*, 1:24 (2015) DOI 10.1186/s40851-015-0024-1. 査読有り

Iwamoto, H., Trombitás, K., Yagi, N., Suggs, J.A. and Bernstein, S.I. X-ray diffraction from flight muscle with a headless myosin mutation: implications for interpreting reflection patterns. *Front. Physiol. Striated Muscle Physiol.*, 5: 416 (2014). doi: 10.3389/fphys.2014.00416. 査読有り

[学会発表](計 15 件)

Iwamoto, H. Reconstruction of functional insect flight muscle fibers with rabbit skeletal muscle actin. *Biophysical Society 61st Annual Meeting*, February 11-15, New Orleans, USA (2017).

岩本裕之. 超音波を発生する昆虫の筋肉の構造。2017 年成体運動合同班会議。2017 年 1 月 6-8 日、神戸国際会議場、兵庫県、神戸市(2017)。

岩本裕之. シンクロトロン放射光 X 線の動物学への適用：昆虫飛翔筋の高速 X 線回折像記録。第 22 回国際動物学会・第 87 回日本動物学会合同大会。2016 年 11 月 14-19 日、沖縄コンベンションセンター、沖縄県、宜野湾市(2016)。

Iwamoto, H. The tymbal muscle of cicadas resembles flight muscle in structure and protein expression. 第 22 回国際動物学会・第 87 回日本動物学会合同大会。2016 年 11 月 14-19 日、沖縄コンベンションセンター、沖縄県、宜野湾市(2016)。

Iwamoto, H. Reconstitution of functional insect flight- and rabbit skeletal hybrid muscle fibers as monitored by X-ray diffraction. 第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年 11 月 25-27 日、つくば国際会議場、茨城県、つくば市(2016)。

Iwamoto, H. Ultrafast X-ray diffraction movie from the flight muscle of alive bee during wing-beat. 31st International Congress on High Speed Imaging and Photonics. Hotel Hankyu Expo Park, Osaka Prefecture, Suita City, November 7-10 (2016)(招待講演).

岩本裕之. 高速 X 線回折ムービー記録による昆虫飛翔筋動作機構の解明。第 56 回生物物理若手の会 夏の学校。2016 年 9 月 2-5 日、支笏湖ユースホテル、北海道、千歳市 (2016)(招待講演)。

岩本裕之. X 線で探るセミの歌声の起源。2016 年生体運動合同班会議、2016 年 1 月 8-10 日、京都国際会館、京都府、京都市 (2016)。

Iwamoto, H. and Yagi, N. X-ray diffraction from insect flight muscle fibers with exchanged contractile proteins. Biophysical Society 59th Annual Meeting, February 7-11, Baltimore, USA (2015).

Iwamoto, H. High-speed in vivo X-ray video recording from live bees. Insect Muscle 2015: Biomedical and Biophysical Perspectives. February 6, Baltimore, USA (2015).

岩本裕之. 羽ばたいている昆虫の飛翔筋分子ダイナミクスを X 線で眺める。神戸大学先端融合科学シンポジウム。2015 年 1 月 19-20 日、神戸大学、兵庫県、神戸市 (2015)(招待講演)。

岩本裕之、八木直人. 日本最大の蚊、トワダオオカの飛翔筋線維の X 線回折。2015 年生体運動合同班会議。2015 年 1 月 7-9 日、学習院大学、東京都(2015)。

岩本裕之、八木直人. X-ray diffraction from insect flight muscle with exchanged contractile proteins. 日本生物物理学会第 52 回年会、2014 年 9 月 25-27 日、札幌コンベンションセンター、北海道、札幌市 (2014)。

岩本裕之、八木直人. 収縮蛋白を交換した昆虫飛翔筋線維の X 線回折。日本動物学会第 85 回大会。2014 年 9 月 11-13 日、東北大学、宮城県、仙台市(2014)。

Iwamoto, H. Molecular mechanism of action of insect flight muscle. International Workshop for Diamond Researchers on 'Three Dimensional Development of Lab-Exchange Type

Biomedical Science Research Consortium' Kamogawa Seminar House, Chiba Prefecture, Kamogawa city, September 14 (2014)(招待講演)。

〔その他〕

ホームページ等

昆虫の羽ばたきを起こす筋肉内の分子変化の精密測定に成功 (プレスリリース)
http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/press_release/2017/170208/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 裕之 (IWAMOTO, Hiroyuki)

(公財)高輝度光科学研究センター 利用
研究促進部門 特別研究員

研究者番号 : 60176568