

平成 21 年 6 月 11 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18570066

研究課題名 (和文) キャッチ結合組織の総合的研究

研究課題名 (英文) Studies on catch connective tissues

研究代表者

本川 達雄 (MOTOKAWA TATSUO)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：80092352

研究成果の概要：キャッチ結合組織を用いると、筋肉を用いるのに比べ、非常に少ない消費エネルギーで姿勢維持が可能なことを示した。キャッチ結合組織に特異的な神経を発見した。キャッチ結合組織の硬さ変化機構に関わるタンパク質を分離した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	660,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：生理学、動物、棘皮動物、キャッチ結合組織、神経支配

1. 研究開始当初の背景

キャッチ結合組織は棘皮動物に特有の、硬さを変える結合組織である。この研究を行っているのは、世界には小生とイギリスの Wilkie 以外にいない。キャッチ結合組織の理解は、棘皮動物がなぜそのような形をとり、そのような生活をするのかということを理解する鍵になるものだというのが小生の主張であるが、残念ながらそれほどキャッチ結合組織の研究は進んでいない。特に硬さ変化の分子機構や、硬さの神経支配については、ほとんどわかっていなかった。

2. 研究の目的

キャッチ結合組織の全ての面について様々な面から研究し、キャッチ結合組織を総合的に

に理解することを目的とした。

(1)キャッチ結合組織の神経支配：結合組織の硬さが神経の支配を受けていることが、キャッチ結合組織の大きな特徴である。われわれはナマコから4種類の生理活性ペプチドを単離・同定している。これらがナマコの体内でどのような分布をしているのか、ナマコ以外にもこれらのペプチドがみられるのかを調べ、神経支配機構を明らかにする。

(2)キャッチ結合組織の分子機構：硬さ変化は神経からの刺激により、何らかの物質が分泌されて細胞外成分の硬さが変わると考えられる。その物質とはどんなものであり、硬さ変化の分子機構はどのようなものなのだろうか。硬化因子を追求し、その働きを調べてキャッチの分子機構に迫る。

(3) キャッチ結合組織という他の動物門にはみられないキャッチ結合組織を、そもそも棘皮動物がもつことは、どのような利点があるのだろうか。これにつき、エネルギー経済の利点から追求してみる。

(4) キャッチ結合組織は小生がナマコを、Wilkie がクモヒトデを主に用いて研究してきた。それ以外の棘皮動物（ヒトデ、ウミユリ、ウニ）のキャッチ結合組織については、研究が少なく、とくにヒトデについての研究は皆無に近い。そこでヒトデ体壁のキャッチ結合組織について研究する。

(5) ウニについては、管足の結合組織について研究する。キャッチ結合組織は管足にも存在しているらしく、歩行に関係していると推測されているが、実験的に実証はされていない。ウニの歩行を研究し、歩行に管足や棘のキャッチ結合組織がどのように関わっているかを調べる。

(6) ウミユリについては、結合組織性収縮について調べる。かつてキャッチ結合組織を研究していた際に、ウミユリやウミシダの腕や巻枝の靭帯は、硬さ変化を示すのみならず、能動的な収縮を起こすことに気がついた。この結合組織による収縮はどのようなものなのだろうか？

3. 研究の方法

(1) 神経支配について：

ナマコから単離した NGIWYamide と stichopin の抗体を作成し、ナマコのさまざまな部分の抗体染色を行い、どの部分に抗体陽性細胞があるかを調べた。またヒトデとウニでも同様のことを行った。棘皮動物の神経系を特異的に染める抗体 1E11 を用い、ナマコペプチドを含む細胞が神経なのかを確かめた。

(2) 分子メカニズムについて：

ニセクロナマコ体壁を EGTA と NaCl を含む溶液中でホモジナイズし、遠心した上清を硫酸で沈殿させ、沈殿を溶かしたものを陰イオンカラムにかけ、硬化活性のある画分をゲル濾過した。

真皮が硬くなる際の、重量と体積変化を測定した。

(3) ナマコ真皮のエネルギー消費量について：クイロナマコ体壁真皮のエネルギー消費量を、酸素消費量を測定することによりもとめ、縦走筋のそれとを比較した。測定はクラーク型の酸素電極を用いた。解剖により、ナマコの体全体に占める結合組織量を求めた。

(4) ヒトデ体壁真皮のキャッチ結合組織について：

アオヒトデは分厚い体壁をもち、筋肉を含まない真皮片を体壁から切り出すことができる。アオヒトデ真皮のクリープ試験を行い、アセチルコリンや高濃度にカリウムイオン

を含む人工海水 (KASW) の刺激により硬さが変わるかどうかを見た。また、アオヒトデ真皮の酸素消費量を調べた。

(5) ウニの歩行について：

ガンガゼやツマジロナガウニやバフンウニを用い、ウニの歩いていく方向、歩く際に管足や棘をどのように使うか、管足はどの程度の能動的な力を出すのか、また受動的にはどの程度の力に耐えるのかを測定した。

(6) ウミシダの結合組織性収縮について：

ウミシダの腕は、円盤状の骨片 (腕板) 同士が関節を介して、一列に積み重なってできている。腕板と腕板とは筋肉と靭帯 (結合組織) で結びついている。筋肉は反口側にしか存在しない。筋肉を取り除いても、KASW による刺激に反応して、腕は屈曲する。つまり、関節をつないでいる靭帯が縮むのである。多数の関節を含む腕の標本を用いて、今まで腕の屈曲をみてきたが、これでは、1 つの靭帯の収縮特性は分からなかった。そこでハナウミシダを用い、1 個の関節のみを含む標本 (単関節標本) をもちいて収縮の様子を観察した。

4. 研究成果

(1) 神経支配について：

1E11 はナマコの放射神経を染めたため、この抗体は、ナマコの神経も染色することが確かめられた。NGIWYamide 抗体は放射神経を染めた。1E11 と NGIWYamide の二重染色をすると、神経の一部は両方の抗体で染まってきた。NGIWYamide は神経ペプチドであることが確かめられた。

体壁内には 1E11 で染まる神経繊維がかなりの数見られ、その一部は NGIWYamide の抗体でも染まった。イトマキヒトデやガンガゼの放射神経も NGIWYamide の抗体で染まったため、このペプチド (もしくはそれに類似のもの) は棘皮動物内で広く働いている神経ペプチドだと思われる。

Stichopin の抗体と 1E11 で二重染色すると、stichopin 抗体で染まる細胞および突起は 1E11 でも染まった。Stichopin も神経ペプチドである。Stichopin 陽性細胞が見られた場所は、体壁真皮、縦走筋の筋膜、管足の結合組織、総排泄腔の結合組織、放射神経の外側神経と下側神経とを隔てている結合組織にみられた。結合組織中のみ見られたため、結合組織特異的な神経ということになる。そのような神経は動物界では今まで知られていない。放射神経の外側神経と下側神経とを隔てている結合組織中で見られるものは突起をもたず、直径 10-15 μm の丸い細胞で、形と場所が特定しやすいため、電子顕微鏡で観察できた。これは 2-5 μm の顆粒がぎっしりと詰まった典型的な分泌細胞である。Stichopin 陽性細胞には、丸い形の神経分泌細胞と、細長い突起をもつ神経との 2 種類が

存在する。分泌細胞は体腔や神経上腔、管足の管腔に面したところに多くみられ、この腔へと顆粒の内容を分泌するホルモン様の作用をもつのではないと思われる。

(2)分子メカニズムについて：

ニセクロナマコ体壁から分子量 34kDa のテンシリンを単離した。同様のタンパク質はすでに Trotter たちによりキンコから分離同定されている。ナマコ体壁は3つの力学的状態をとる。軟らかい状態、標準状態、硬い状態である。標準状態は、軟らかい状態と硬い状態の単なる中間状態ではなく、3つは硬さのみではなく、エネルギー損失やひずみ依存性において、それぞれ異なる状態であることが分かっている。体壁真皮の詳細な力学試験を行った結果、テンシリンは軟らかい状態の真皮を標準状態に変化させるが、標準状態のものをさらに硬くすることはなかった。ナマコ真皮のコラーゲン溶液にテンシリンを作用させると、コラーゲンが凝集する。これは硬さ変化機構に関係しているかもしれない。

テンシリンとは別に、約 4kDa のタンパク質がみつかった。このタンパク質は標準状態の真皮を硬い状態にする。ただし軟らかい状態の真皮を標準状態にするのではない。これら2つのタンパク質の発見により、同じ硬くなると言っても、「軟らかい状態→標準状態」の変化と、「標準状態→硬い状態」の変化とは、異なる機構による可能性が高くなった。

「標準状態→硬い状態」の変化において、真皮の重量と体積が1割減少することがわかった。これほどの減少は、含水量の減少でしか説明できない。「軟らかい状態→標準状態」の変化の際にはこの減少は見られなかった。ここでも、二つの硬さ増加機構に違いのあることが示唆された。高浸透圧の海水により真皮の重量を減少させても、それほど大きな硬さ変化は見られないため、単純に水の出入りだけでは硬さ変化は説明できない。硬くなる際、疎水結合の増加や解離基の減少などにより、水がはじき出されている可能性がある。

(3)ナマコ真皮のエネルギー消費量について：キャッチ結合組織のエネルギー消費量を初めて測定した。クイロナマコ真皮の酸素消費率 VO_2 は、標準状態で $1.61\mu\text{l/g/h}$ 、硬い状態では若干増加し $2.45\mu\text{l/g/h}$ であった。縦走筋の VO_2 は弛緩状態で $9.21\mu\text{l/g/h}$ 、収縮中は $23.5\mu\text{l/g/h}$ であった。結合組織の酸素消費は筋肉より格段に低く、硬い状態でも収縮中の筋肉のほぼ 1/10 にしかすぎない。縦走筋の収縮力を測定し、また、真皮の硬さを測定して比較すると、2%ひずみに抵抗する際には、真皮の方が筋肉より 7 倍もの力を発生する。つまり、筋肉ではなく結合組織を硬くして姿勢を維持すると、1/70 の省エネになるという計算になる。

結合組織がナマコの体の中での占める割

合を調べたところ、58%であり、筋肉のそれは 6.6%であった。哺乳類ではその比は逆転しており、結合組織は 14%、筋肉は 45%である。ナマコは同じ体重の哺乳類の 1/100、無脊椎動物の 1/10 しかエネルギーを使わない。このような大きな省エネには、ナマコが筋肉ではなくキャッチ結合組織を多用し、これで姿勢維持を行っていることが大きく寄与していると推測した。

(4)ヒトデ体壁真皮のキャッチ結合組織について：

アオヒトデ真皮は機械刺激、アセチルコリン、KASW により、可逆的に硬くなった。これは筋肉を含まない真皮が硬さ変化を示すという、ヒトデ綱での初めての結果である。

アオヒトデの VO_2 を測定した。海水中で休めておいた真皮の VO_2 は $0.58\mu\text{l/g/h}$ 、硬い状態ではわずかに増加して $0.74\mu\text{l/g/h}$ であった。頂上縦走筋の VO_2 は弛緩状態で $8.62\mu\text{l/g/h}$ 、収縮中は $34.08\mu\text{l/g/h}$ であった。ここでも結合組織の VO_2 は筋肉より桁違いに少なかった。

(5)ウニの歩行について：

ガンガゼは水平面を歩く際には、棘を使って歩き、管足は使わなかった。垂直面を登る際には、当然管足を使うと思われてきた。ところが、管足の発生する活動的力を測定し、体の前面にあって壁に付着している管足の数を数えると、これらの管足だけでは、体を引き上げるには力が足りない。考えられる機構は、体の前面の管足も後面の管足も、ウニを壁面に押しつけるように力を発生し、それによって生じる摩擦力を利用して、棘で体を上に進めていると考えるのが妥当だと結論に達した。この際、管足は収縮力を発生し続けずに、管足壁のキャッチ結合組織が硬くなっている可能性が高い。

ガンガゼの歩行については大変面白いことが分かってきた。水平方向に速く歩く際には、ウニは前端をもちあげていき、急激にそれを下げるといふ、上下運動をくり返す。体を持ち上げて不安定にし、前にこけながら歩いていくのである。これは速度を増すためと考えられ、体が下がる時に前進速度が最大になった。

(6)ウミシダの結合組織性収縮について：

単関節でも、KASW によって張力が発生した。この張力は KASW を取り去っても維持された。Quick release を行ったところ、能動的な張力発生は3分間程度であった。ムスカリンにより、靭帯を軟らかくしておいて KASW を与えると、収縮は相動性になった。これらのことから、通常の結合組織性収縮においては、短い収縮の後に、靭帯はそのままの長さでキャッチ機構により硬くなっていると考えられる。

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 Takemae, N., Nakaya, F., and Motokawa T. (2009) Low oxygen consumption and high body content of catch connective tissue in body contribute to low metabolic rate of sea cucumbers. *Biol. Bull.* 216:45-54. (査読あり)
- ② Yoshimura, K. and Motokawa T. (2008) Bilateral symmetry and locomotion: do elliptical regular sea urchins proceed along their longer body axis? *Marine Biology*, 154:911-918. (査読あり)
- ③ Tamori, M., Saha, A.K., Matsuno, A., Noskor, S.C., Koizumi, O., Kobayakawa, Y., Nakajima, Y., and Motokawa, T. (2007) Stichopin-containing nerves and secretory cells specific to connective tissue of the sea cucumber. *Proc. R. Soc. Lond. B* 274:2279-2285. (査読あり)
- ④ Tamori, M., Yamada, A., Nishida, N., Motobayashi, Y., Oiwa K. and Motokawa T. (2006) Tensilin, a stiffening protein from holothurian dermis, does not induce the stiffest state of catch connective tissue. *J. Exp. Biology* 209: 1594-1602. (査読あり)
- ⑤ Saha, A.K., Tamori, M., Inoue, M., Nakajima, Y., and Motokawa, T. (2006) NGIWyamide induced contraction of tube feet and distribution of NGIWyamide-like immunoreactivity in nerves of the starfish *Asterina pectinifera*. *Zool. Sci.* 13:627-632. (査読あり)

[学会発表] (計 17 件)

- ① Yoshimura, K. and Motokawa, T. (2009, 1月6日) To which direction do regular sea urchins walk? International Echinoderm Conference, Hobart, Australia.
- ② Ellers, O., Yoshimura, K., Motokawa, T. (2009, 1月3日) An inverted pendulum model for underwater walking. Society for Integrative and Comparative Biology, Boston, U. S. A.
- ③ 吉村和也, 本川達雄 (2008, 9月26日) 正形類ウニの進行方向は必ずしもランダムではない。動物行動学会、金沢。
- ④ 吉村和也, 本川達雄 (2008, 9月5日) ウニの進行方向はランダムではない。日本動物学会、福岡。
- ⑤ 池谷知昭, 山田章, 田守正樹, 本川達雄 (2008, 9月5日) ナマコのキャッチ結合組織に働く新規硬化因子。日本動物学会、福岡。
- ⑥ 真部嘉春, 田守正樹, 小泉修, 小早川義尚,

本川達雄 (2008, 9月7日) キャッチ結合組織の硬化因子テンシリンのナマコ内分布。日本動物学会、福岡。

- ⑦ 吉村和也, 本川達雄 (2007, 10月19日) 左右対称の正形類ウニは防御面を最大にしつつ進行する。日本動物行動学会、京都。
- ⑧ 宮本康司, 吉村和也, 本川達雄, 幸島司郎 (2007, 10月19日) ナガウニの採食行動。日本動物行動学会、京都。
- ⑨ 梅山研一, 本川達雄 (2007, 9月22日) ウニの硬さ可変結合組織のエネルギー消費率。日本動物学会、弘前。
- ⑩ 吉村和也, 本川達雄 (2007, 9月22日) 左右対称の正形類ウニの進行方向: 防御面積最大仮説の検証。日本動物学会、弘前。
- ⑪ 近藤滋, 梅山研一, 本川達雄 (2007, 9月22日) ヒトデ体壁結合組織の硬さ変化とエネルギー消費量。日本動物学会、弘前。
- ⑫ 渡辺あゆみ, 吉村和也, 本川達雄 (2006, 9月23日) ウニの移動における棘と管足の役割。日本動物学会、岡山。
- ⑬ Saha, A., 田守正樹, 小泉修, 小早川義尚, 本川達雄 (2006, 9月23日) スチコピン (ナマコ由来ペプチド) のナマコ内における分布。日本動物学会。松江。
- ⑭ 吉村和也, 本川達雄 (2006, 9月23日) 楕円形のウニは殻の長軸方向に進む。日本動物学会。松江。
- ⑮ Motokawa, T., Tamori, M. and Yamada, A. (2006, 8月11日) Proteins that increase stiffness of holothurian dermis. International Echinoderm Conference, New Hampshire, U. S. A.
- ⑯ Yoshimura, K. and Motokawa, T. (2006, 8月11日) Does the regular sea urchin with bilateral symmetry show preferred orientation in locomotion? International Echinoderm Conference, New Hampshire, U. S. A.
- ⑰ 本川達雄 (2006, 7月15日) 生物の形。材料。時間。スーパーコンピュータ研究会。東京。

[図書] (計 4 件)

- ① 本川達雄 「世界平和はナマコとともに」 (2009) 阪急コミュニケーションズ p.287
- ② 本川達雄 「ウニ学」 (2009) 東海大学出版会 p.472
- ③ 本川達雄 「サンゴとサンゴ礁のはなし」 中央公論新社 p.274
- ④ 本川達雄 (2006) 「“スーパーファイバー” スーパーバイオミメティックスー近未来の新技术創成」 (本宮達也 監修) NTS の中の2節を担当。1章1節「生物の形とサイズ: 進化的アプローチ」、2章2節「生物の設計原理と繊維: 結合組織を例として」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本川 達雄 (MOTOKAWA TATSUO)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
教授
研究者番号：80092352

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし