

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580293

研究課題名(和文) 棘皮動物の筋収縮調節機構に関する研究

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms for echinoderm muscle contraction

研究代表者

田中 啓之(Tanaka, Hiroyuki)

北海道大学・水産科学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90241372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：棘皮動物の筋肉はほとんどが平滑筋であり、その収縮は、他の動物の平滑筋のように、ミオシン軽鎖のCa²⁺依存的なリン酸化によって制御されると考えられてきた。本研究では、ウニの筋肉において、高等動物の横紋筋で知られるトロポニンによる制御機構も存在する可能性が示された。また、ウニのトロポニンの構造上の特徴から、脊椎動物のトロポニンとは異なる作動機構によって収縮が調節されると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Most of the musculature in echinoderms are smooth muscle and the contraction of which is believed to be regulated by the phosphorylation of myosin light chain depending on intracellular Ca²⁺ concentration as in the case of other smooth muscles in higher animals. In this study, troponin which is known as an actin-linked regulatory protein of striated muscles was revealed to be present in the various smooth muscles of sea urchin. The subunits of sea urchin troponin were obtained by the expression system constructed in Escherichia coli and were confirmed to be functional in vitro, even though they are lacking some regions which are known to be essential for the Ca²⁺-dependent activation of vertebrate striated muscle contraction. Therefore, the sea urchin troponin should activate the contraction by the acting mechanisms different from those of vertebrate troponin.

研究分野：水産生化学

キーワード：棘皮動物 筋肉 筋収縮の調節 トロポニン ウニ

1. 研究開始当初の背景

筋肉の収縮はアクチンフィラメントとミオシンフィラメントが互いに滑り込むことによって起こるが、その際、ミオシン分子は、ATPをADPとリン酸に分解し、生じた化学エネルギーを利用してアクチンフィラメントを手繰り寄せる。この筋収縮は、神経刺激に連動した細胞内のCa²⁺濃度変化によって調節され、その分子機構は、動物や筋肉の種類によって多様である。横紋筋では、多くの場合、アクチンフィラメント上に存在するトロポニンがその役割を果たしており、Ca²⁺はトロポニンのサブユニットであるトロポニンCに結合し、トロポニンIのアクチンへの結合を解除して、アクチンとミオシンの相互作用を引き起こす。一方、平滑筋では、Ca²⁺はカルモジュリンに結合し、このCa²⁺-カルモジュリン複合体がミオシン軽鎖キナーゼに結合してこれを活性化する結果、ミオシンの調節軽鎖がリン酸化されてアクチンとミオシンの相互作用が促進される。

棘皮動物は、神経刺激によって固さを変える結合組織を持つ唯一の動物で、それが筋肉と協調して作用することで、体勢の維持や運動を行っている。このような特徴を持つ棘皮動物の筋肉は、特異な収縮調節機構を持つ可能性も考えられる。棘皮動物の筋肉は大部分が平滑筋であり、一般的な平滑筋と同様、ミオシン軽鎖のリン酸化による調節系を持つと考えられてきた(文献①および②)。しかし、近年になって、アメリカムラサキウニ・ゲノムプロジェクトが行われた結果、トロポニンIやトロポニンTをコードする遺伝子の存在が示され、トロポニンによる収縮調節機構の存在が示唆された。また、トロポニンCの遺伝子は確認されておらず、このトロポニンがどのような分子機構で筋収縮を調節するのか関心が持たれた。

2. 研究の目的

棘皮動物の筋収縮を調節するタンパク質を同定し、収縮調節がどのような機構で行われているかを明らかにする。また、収縮調節タンパク質の構造と機能を解析し、分子作動機構が脊椎動物や他の無脊椎動物の場合とどのように異なるか、比較生化学的に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) キタムラサキウニ、マナマコ、およびマヒトデの筋組織を材料とし、アクトミオシンを抽出して、それを構成する各種のタンパク質をSDS-PAGEで分析した。さらに、得られたバンドのタンパク質をゲル内でプロテアーゼ消化し、生じたペプチドを質量分析に供することで、タンパク質の同定を行うと共に、部分アミノ酸配列を分析した。また、アクトミオシンにニワトリの砂嚢から調製したミオシン軽鎖キナーゼとリコンビナント・キタムラサキウニ・カルモジュリンを加えて、ア

クチンとミオシンの相互作用の指標であるMg-ATPase活性を測定し、それがCa²⁺によってどのように影響されるかを調べると共に、ミオシン軽鎖のリン酸化状態についても質量分析によって検討した。

(2) 公開されているアメリカムラサキウニ・ゲノムデータを参考に、プライマーを設計し、キタムラサキウニ顎骨間筋からトロポニンIおよびトロポニンTをコードするcDNAをクローニングした。得られたcDNAの塩基配列を解析すると共に、発現用プラスミドpET-16bに挿入して、大腸菌を形質転換し、キタムラサキウニ・トロポニンIおよびトロポニンTを大腸菌発現によって大量調製した。また、キタムラサキウニ・カルモジュリンについても、同様にして調製した。精製したリコンビナント・トロポニンIおよびTは、アクチン-トロポミオシン複合体との結合性を共沈実験によって調べると共に、ウサギ再構成アクトミオシンに添加して、Mg-ATPase活性に及ぼす効果を測定し、筋肉の収縮調節に関わる機能を解析した。また、リコンビナント・トロポニンIおよびTをウサギに免疫して抗血清を作成し、ウェスタンブロッティングや免疫染色を行って、生体内にトロポニンが存在していることを確認すると共に、局在部位を明らかにした。

4. 研究成果

(1) キタムラサキウニ顎骨間筋に含まれるタンパク質の解析

キタムラサキウニ顎骨間筋を低塩濃度緩衝液でホモジナイズして抽出される筋形質画分と、抽出残渣から高塩濃度緩衝液で抽出されるアクトミオシンを調製し、その特性を解析した。筋形質画分をSDS-PAGEに供し、主要なバンドのタンパク質について、アメリカムラサキウニ・ゲノムデータに対する同定を行ったところ、精子鞭毛クレアチンキナーゼ(アクセションNo.: XP_785882)、 α -アクチニン(アイソフォームX2; XP_797562)、ミオシン軽鎖キナーゼ(XP_003724502)、筋肉タイプアクチン(アイソフォームX1; XP_011661664)、並びに、カルポニン様配列をもったmuscle-specific protein 20(XP_011667424)の存在を確認できた(図1左)。また、アクトミオシンについても同様に、ツイッチン(XP_011677154)、ミオシン重鎖(アイソフォームX5; XP_003727482)、筋肉タイプアクチン(アイソフォームX1; XP_011661664)、トロポミオシン(アイソフォームX3; XP_011679985)、muscle-specific protein 20(XP_011667424)、ミオシン調節軽鎖12A(XP_783666)、並びに、ミオシン必須軽鎖(アイソフォームX1; XP_783518)の存在を確認した(図1右)。さらに、アクトミオシンには、SDS-PAGEで分子量約100,000を示すパラミオシン様のタンパク質が大量に含まれており、それは、ミオシン重鎖(ア

イソフォーム X8; XP_011682900) と同定された。しかし、XP_011682900 の配列は 1,940 アミノ酸からなり、計算分子量は 222,743 であって SDS-PAGE での値と一致しない。このことから、ウニのパラミオシンが、軟体動物筋に知られるミオロッドのように、ミオシン重鎖遺伝子からオルタネイティブスプライシングによって生じる可能性が示唆された。また、アクトミオシンには、Tyr に富んだ分子量約 30,000 のタンパク質が含まれており、部分アミノ酸配列より、uncharacterized protein LOC105443693 (XP_011675497) の N 末端側の配列に相当すると考えられたが、類似したアミノ酸配列を持った他のタンパク質がこれまでに報告されておらず、その役割は不明であった。さらに、トロポニンに関連したバンドは確認されなかったが、後述するウェスタンブロットリングにより、抗トロポニン I 血清と反応するタンパク質が分子量約 70,000~90,000 の位置にわずかながら検出された。以上の結果から、ウニの顎骨間筋におけるトロポニンの存在量は微量であると考えられた。

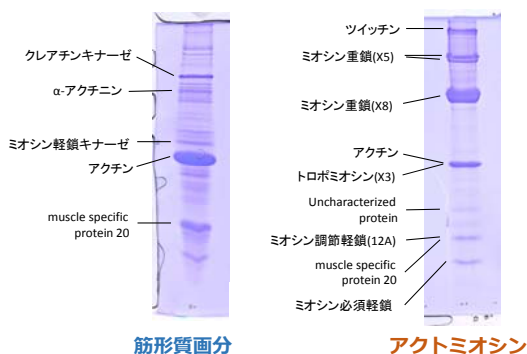


図1 キタムラサキウニの筋肉に確認されたタンパク質

キタムラサキウニ・アクトミオシンの Mg-ATPase 活性は 15° C において、0.002 ($\mu\text{mol Pi/mg/min}$) 程度と低く、 Ca^{2+} 感受性も示さなかった。しかし、ニワトリ砂嚢から調製したミオシン軽鎖キナーゼとリコンビナント・キタムラサキウニ・カルモジュリンを添加すると、 Ca^{2+} 存在時において、活性が約 80% 増大し、 Ca^{2+} 感受性が付与された。これらの結果から、顎骨間筋の収縮調節は、主として他の動物の平滑筋と同様なミオシン軽鎖の Ca^{2+} 依存的リン酸化によって行われると考えられ、トロポニンの寄与は小さいと判断された。

(2) キタムラサキウニ・トロポニンサブユニットの cDNA クローニング

アメリカムラサキウニ・ゲノムデータベースにあるトロポニン I をコードする mRNA の塩基配列 (XM_011671568)、また、トロポニン T をコードする mRNA の配列 (XM_786046) に基づいて、プライマーを設計し、キタムラサキウニ顎骨間筋から RT-PCR によって cDNA をクローニングした。トロポニン I について

は、翻訳領域のうち 629 bp を明らかにできたが、5' 末端側に未解析の領域が存在する。また、3' RACE により、3' 非翻訳領域の配列および長さが多様な mRNA の存在が示された。明らかになった翻訳領域は 209 アミノ酸残基に相当し、C 末端側の 189-200 残基目の領域は他種トロポニン I との相同性が高く、アクチンと結合して収縮を抑制する機能を持つ「阻害部位」であると考えられたが、その中に 2 残基の Glu が存在するなど、他に例のない特徴も認められた。また、阻害部位より C 末端側は、わずか 9 残基しかなく、他種トロポニン I に比較して C 末端が著しく短縮し、その結果、脊椎動物トロポニン I において Ca^{2+} 依存的にトロポニン C と結合する「調節領域」を欠損していた。一方、N 末端側には、脊椎動物トロポニン I にはない大きな伸長領域が存在し、荷電アミノ酸に富むこの伸長領域の存在は、昆虫や軟体動物など他の無脊椎動物のトロポニン I にも共通する特徴と考えられた。また、トロポニン T については、678 bp からなる翻訳領域の全長をクローニングでき、トロポニン I やトロポミオシンを結合する部位等、機能部位配列が保存されていることを確認した。明らかになったトロポニン I および T のアミノ酸配列を用いて、分子系統樹を作成すると、いずれも軟体動物や節足動物よりも、脊索動物のトロポニンに対して類縁関係が深いことが示唆された。

(3) キタムラサキウニ・リコンビナント・トロポニンサブユニットの作成と機能解析

トロポニン I の残基 6-209 の領域、N 末端伸長領域を欠いた残基 95-209 の領域、または、トロポニン T の全長のそれぞれをコードする cDNA を発現プラスミドに組み込み、大腸菌発現によってこれらのタンパク質を調製した。得られたリコンビナント・トロポニン I をウサギアクトミオシン-トロポミオシンに加え、Mg-ATPase 活性の阻害効果 (筋収縮の阻害活性) を調べたところ、阻害効果はウサギ・トロポニン I の 1/4 程度にとどまった。これは、「阻害部位」に Glu が存在することや、C 末端が短縮していることと関連すると推測された。また、共沈実験により、リコンビナント・トロポニン I が、他の動物のトロポニン I のように、F-アクチンと結合することを確認した。さらに、3 M 尿素存在下のポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、トロポニン I はウサギ・トロポニン C またはキタムラサキウニ・カルモジュリンと Ca^{2+} 存在下においてのみ結合し複合体を形成することが示された。一方、アカザラガイおよびロブスターのトロポニン C とは結合しなかった (図 2)。また、リコンビナント・トロポニン T は、F-アクチン・トロポミオシンと共沈したことから、トロポミオシンに対する結合能を持つと考えられた。さらに、ウサギ再構成アクトミオシン-トロポミオシンにトロポニン T を加えると、Mg-ATPase 活性をわ

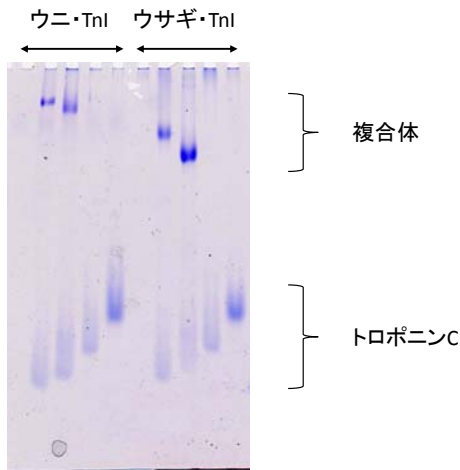


図2 ウニまたはウサギのトロポニン(TnI)をそれぞれ、左からカルモジュリン、ウサギトロポニンC、ロブスター・トロポニンCまたはアカザラガイ・トロポニンCの順に混合して電気泳動した。ゲルは2 mMのCaCl₂を含んでいる。

上方のバンドは、両者が結合して生じた複合体であり、下方のバンドはトロポニンCである。Ca²⁺を含まないゲルでは、複合体は観察されなかった。

ずかに活性化した(図3-④)。また、トロポニン T とトロポニン I の等モル混合物は、ATPase 活性を強く阻害した(図3-⑥)。これらの特性は、脊椎動物トロポニンサブユニットの特性に類似していた。さらに、トロポニン I : トロポニン T : カルモジュリンのモル比 1:1:1 での混合物は、Ca²⁺非存在時に ATPase 活性を阻害する一方、Ca²⁺存在時にはわずかに活性化し、脊椎動物トロポニン複合体に類似した Ca²⁺感受作用を示した(図3-⑨)。以上の結果から、ウニの生体内において、カルモジュリンを Ca²⁺結合サブユニットとするトロポニン様 3 成分複合体が存在し、筋収縮を調節している可能性が示された。

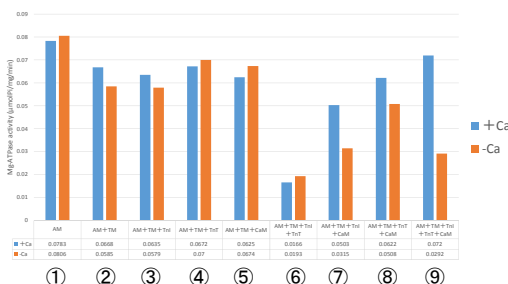


図3 リコンビナント・トロポニンサブユニットがウサギ再構成アクトミオシンのMg-ATPase活性に及ぼす効果

- ①ウサギ再構成アクトミオシン (AM)
- ②AM + ウサギトロポニン(Tm)
- ③AM + Tm + トロポニンI (TnI)
- ④AM + Tm + トロポニンT (TnT)
- ⑤AM + Tm + カルモジュリン (CaM)
- ⑥AM + Tm + TnI + TnT
- ⑦AM + Tm + TnI + CaM
- ⑧AM + Tm + TnI + TnT + CaM
- ⑨AM + Tm + TnI + TnT + CaM

(4) ウニ・トロポニンの局在部位の検討

リコンビナント・トロポニン I をウサギに免疫して得た抗血清は、ウェスタンブロッティングにおいて、キタムラサキウニ・アクトミオシン、筋形質画分および天然アクチンフ

ィラメントのいずれにも存在する約 70 から 90 kDa の成分と反応した。この成分は SDS-PAGE ゲルの CBB 染色では確認できず、存在量が少ないと考えられた。また、キタムラサキウニ組織切片の免疫染色実験において、顎骨間筋、二叉骨上挙筋、食道、瓶囊、および精巢の筋組織部分に、トロポニン I の陽性反応が認められ(図 4)、存在量は微量ながら、トロポニンが筋収縮調節の役割を果たしている可能性が考えられた。

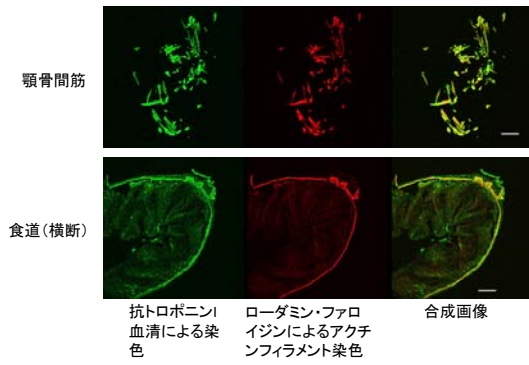


図4 抗トロポニン血清による免疫染色(バーは200 μm) アクチンと抗原の存在部位が一致している。

(5) 各種棘皮動物の筋タンパク質の特性

キタムラサキウニ以外にも、マナマコの体壁縦走筋およびマヒトデの管足から天然アクトミオシンを調製した。キタムラサキウニ・アクトミオシンと同様に、得られたアクトミオシンの Mg-ATPase 活性は低く、Ca²⁺感受性も見られなかったが、ニワトリの砂囊より調製したミオシン軽鎖キナーゼとリコンビナント・カルモジュリンの存在下では、Ca²⁺依存的に活性が増大した。また、ヒトデ管足のアクトミオシンについては、その時、ミオシンの調節軽鎖がリン酸化されていることが、尿素ゲル電気泳動並びに質量分析によって確かめられた。さらに、マナマコ体壁縦走筋ホモジェネートには、抗キタムラサキウニ・トロポニン I 血清と反応性を示すタンパク質は見出されなかった。

以上の結果を総合すると、棘皮動物の筋肉では、主に、脊椎動物平滑筋と同様に、Ca²⁺-カルモジュリンに依存したミオシン調節軽鎖のリン酸化によって収縮が引き起こされるが、特にウニ類に関しては、微量のトロポニンが確かに存在しており、収縮の調節に関与していると推測された。

<引用文献>

- ①T. Obinata, M. Ikeda, and T. Hayashi, The native actin filaments from sea urchin muscle, *Int. J. Biochem.*, 5, (1974), 875-884
- ②W. G. L. Kerrick and L. L. Bolles, Evidence that myosin light chain phosphorylation regulates contraction in body wall muscles of the sea cucumber, *J. Cell. Physiol.*, 112, (1982), 307-315

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 1 件)

①波多野淳治・田中啓之、「キタムラサキウニ平滑筋におけるトロポニンの存在」、日本動物学会第 86 回新潟大会、平成 27 年 9 月 17 日、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市)

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

波多野 淳治 (HADANO, Junji)
森田 隆寛 (MORITA, Takahiro)
能登 公輝 (NOTO, Kouki)
関司 秀樹 (ZUSHI, Hideki)
服部 一輝 (HATTORI, Kazuki)