

令和元年5月14日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07872

研究課題名(和文)二枚貝平滑筋キャッチ収縮機構における細いフィラメント構成分子の役割に関する研究

研究課題名(英文) Roles of thin-filament associated proteins in catch contraction of bivalve smooth muscles

研究代表者

船原 大輔 (Funabara, Daisuke)

三重大学・生物資源学研究所・准教授

研究者番号：00335150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：二枚貝の閉殻筋などを構成する平滑筋はエネルギーを消費しないで長時間にわたって張力を維持するキャッチ収縮を行う。その分子機構を明らかにすることを目的として、細いフィラメントに関連したタンパク質に着目し、それらの解析を行った。アコヤガイ閉殻筋の細いフィラメント系タンパク質について、等温滴定型カロリメトリーによる相互作用解析を行ったところ、カルポニンとトロポミオシンが結合した。またキャッチ収縮制御タンパク質トゥイツチンとトロポミオシンとの相互作用解析では結合が認められなかった。本研究により、キャッチ収縮機構に細いフィラメント構成分子のいくつかが関与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋肉は生物にとって最も重要な組織の1つであり共通のメカニズムを有しているが、生物種によって特徴もみられる。その1つが軟体動物平滑筋のキャッチ収縮である。キャッチ筋は長時間にわたってエネルギーをほとんど使わずに張力を発生しつづけることができるが、その分子メカニズムは部分的にしか分かっていない。その全貌を明らかにすることは、生物の多様性の1つを明らかにすることにもなる。また、大きな力を効率よく発揮するメカニズムはバイオミメティクス(生物模倣)にも活用できる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：Molluscan smooth muscles comprising of adductor muscles are able to maintain the tension for long periods with little energy consumption. To elucidate a molecular mechanism of catch contraction, interaction among thin-filament associate proteins were analyzed using isothermal titration calorimetry (ITC). ITC revealed that calponin isoforms interacted with tropomyosin; twitchin, the regulator protein of catch contraction, was unable to interact with tropomyosin. These findings suggest that some thin-filament associated proteins are involved in the catch contraction.

研究分野：生体高分子化学

キーワード：二枚貝 閉殻筋 キャッチ筋 キャッチ収縮 平滑筋

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

キャッチ収縮は二枚貝平滑筋特有の筋収縮現象である。キャッチ筋は長時間にわたってエネルギーほとんど消費することなく張力を発生し続けることができる。キャッチ収縮は太いフィラメントの構成成分であるミオシンの結合タンパク質のトゥイッチンによって制御される。一方、細いフィラメント関連タンパク質であるトロポミオシン、トロポニンやカルポニンは脊椎動物の筋収縮制御に関与する。それらは軟体動物にも存在することが知られている。軟体動物における細いフィラメント関連タンパク質の解析は非キャッチ筋においてよく研究されているが、その機能は未だよくわかっていない。またキャッチ筋にもそれらタンパク質は存在するが、キャッチ収縮における役割は全く不明である。キャッチ収縮のメカニズムの全貌を明らかにするために、細いフィラメント関連タンパク質の機能解析が望まれている。

### 2. 研究の目的

本研究ではキャッチ収縮における細いフィラメント関連タンパク質の役割を分子レベルで明らかにすることを目的としている。これまでキャッチ収縮の制御メカニズムは太いフィラメントを中心に解析が進められてきたが、それだけでは十分にキャッチ収縮のメカニズムを説明することができない。本研究ではこれまでに存在が明らかになっている細いフィラメント関連タンパク質であるトロポミオシン、トロポニン及びカルポニンの分子間相互作用解析を行うことによって、それらのキャッチ収縮における役割の一端を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) アコヤガイ閉殻筋細いフィラメント系タンパク質の大腸菌発現系の構築

アコヤガイ閉殻筋の細いフィラメント系タンパク質であるトロポミオシン-1 および-2、トロポニン C、トロポニン T、トロポニン I、カルポニン 1~7 の大腸菌発現系を構築した。トロポニン C、トロポニン T、トロポニン I、カルポニン 1~7 については、ヒスチジンタグ融合タンパク質とした。発現タンパク質の精製は、常法に従って行った。

#### (2) トロポニン C の解析

アコヤガイ・トロポニン C とカルシウム結合部位を変異させたトロポニン C 変異体に対して、カルシウムイオンの結合について、等温滴定型カロリメトリー (ITC) を用いて解析した。また、カルシウムイオンが結合したトロポニン C の立体構造の変化を示差走査熱量測定 (DSC) を用いて解析した。

#### (3) トロポミオシンの解析

アコヤガイ・トロポミオシン-1 および-2 が閉殻筋にどのように存在するかを調べるために、閉殻筋から精製したトロポミオシンと、発現トロポミオシン-1、発現トロポミオシン-2 を DSC 測定し、それらの熱安定性を比較した。

#### (4) カルポニンとトロポミオシンの相互作用解析

アコヤガイ・カルポニン 1~7 とトロポミオシン-1 について、個装結合実験を行い両者の結合性について調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) アコヤガイ閉殻筋細いフィラメント系タンパク質の発現および精製

トロポミオシン-1 および-2、トロポニン C、トロポニン T、トロポニン I、カルポニン 1~7 について、全て発現に成功した。トロポミオシン-1 および 2 については、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル過クロマトグラフィーを用いて精製したところ、解析するのに十分な純度の標品が得られた。トロポニン C、トロポニン T、トロポニン I、カルポニン 1~7 については、ヒスチジンタグを利用したアフィニティークロマトグラフィーにより、本研究の解析に必要な標品が得られた。

#### (2) アコヤガイ・トロポニン C の性状

アコヤガイ・トロポニン C にはカルシウムイオンが結合性について ITC 解析を行ったところ、図 1A に示すような結果が得られ、両者が結合することがわかった。アコヤガイ・トロポニン C は、その一次構造からカルシウム結合にひとつような EF ハンド構造が 1 箇所存在することが予想されたが、そ

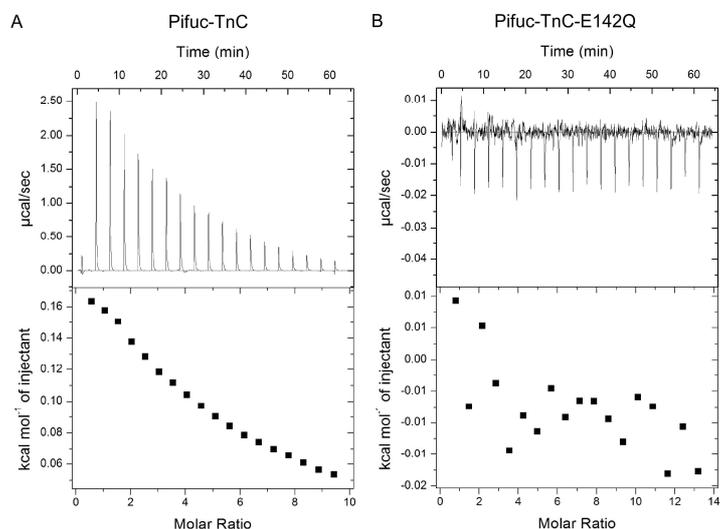


図 1. アコヤガイ・トロポニン C と変異体のカルシウム結合解析.

のEFハンド構造の一次構造を変異して、カルシウム結合能を失わせたトロポニン C 変異体を用いて同様に ITC 解析を行ったところ、図 1B に示すような結果が得られ、トロポニン C 変異体へのカルシウムイオンの結合反応は検出されなかった。したがって、アコヤガイ・トロポニン C にはカルシウムイオン結合部位が 1 箇所だけであることがわかった。

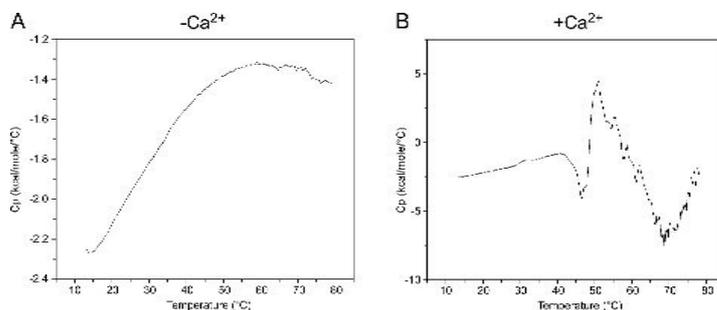


図 2 . アコヤガイ・トロポニン C と変異体の熱安定性解析 . A , カルシウム非存在下 . B , カルシウム存在下 .

またカルシウム非存在下および存在下で、アコヤガイ・トロポニン C の熱安定性を DSC 解析して調べたところ、図 2 に示すような結果が得られ、それぞれで得られた DSC 曲線から、アコヤガイ・トロポニン C はカルシウムの結合にともなって、立体構造が変化していることがわかった。以上の結果は、アコヤガイ・トロポニン C がカルシウムの結合によって、その立体構造を変え、機能を変化させていることを示唆している。二枚貝トロポニン C の筋収縮における役割について、その分子機構はよくわかっていないが、本研究で得られた結果は、二枚貝においても脊椎動物と同様にトロポニン C はカルシウムによって構造変化を起こし、筋収縮制御に関わっている可能性を示した。

### ( 3 ) アコヤガイ・トロポミオシンの性状

アコヤガイには、トロポミオシンアイソフォームであるトロポミオシン - 1 とトロポミオシン - 2 が存在する。遺伝子発現解析からキャッチ筋にはトロポミオシン - 1 とトロポミオシン - 2 の両方が発現し、非キャッチ筋にはトロポミオシン - 1 が主に発現していることが示唆されている。タンパク質レベルでの発現を確認するために、アコヤガイキャッチ筋および非キャッチ筋から精製したトロポミオシンと、本研究で作製した発現トロポミオシン-1 および発現トロポミオシン-2 をそれぞれ DSC 解析して図 3 に示す結果が得られた。それぞれの DSC 曲線を比較したところ、発現トロポミオシン - 1 と発現トロポミオシン - 2 の熱安定性は大きく異なった。非キャッチ筋トロポミオシンの DSC 曲線は発現トロポミオシン - 1 のそれとよく似ていた。また、キャッチ筋トロポミオシンの DSC 曲線は、発現トロポミオシン - 1 と発現トロポミオシン - 1 の両方の特徴を有していた。以上の結果から、閉殻筋のうちキャッチ筋にはトロポミオシン-1 と-2 の両方が、非キャッチ筋にはトロポミオシン-1 が主に存在することがわかった ( 図 3 )。したがって、トロポミオシン - 1 が非キャッチ筋の収縮制御に関与し、トロポミオシン - 2 がキャッチ収縮に関与する可能性が考えられた。

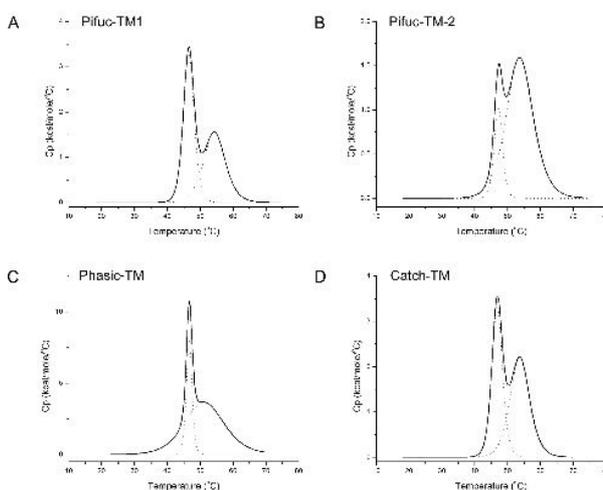


図 3 . アコヤガイ・トロポミオシンの熱安定性解析 . A , 発現アコヤガイ・トロポミオシン-1 . B , 発現アコヤガイ・トロポミオシン-2 . C , アコヤガイ非キャッチ筋トロポミオシン . D , アコヤガイキャッチ筋トロポミオシン .

### ( 4 ) アコヤガイ・カルポニンとトロポミオシンの相互作用

脊椎動物ではカルポニンは細いフィラメント上に分布することが知られている。そこで、アコヤガイ・カルポニン 1 ~ 7 とトロポミオシン - 1 との相互作用について解析した。カルポニン 1 ~ 7 のそれぞれをプローブとした、アコヤガイ・トロポミオシン-1 に対する固相結合実験を行ったところ、すべてのカルポニンアイソフォームがトロポミオシン - 1 と結合することがわかった。以上の結果から、カルポニンが脊椎動物と同様に、筋収縮の制御に関与している可能性が示された。

### ( 5 ) これからの展望

本研究では、アコヤガイの主要な細いフィラメント系タンパク質であるトロポミオシン-1 およびトロポミオシン-2、トロポニン C、トロポニン T、トロポニン I、カルポニン 1~7 の発現精製に成功し、それらの相互作用解析が可能となった。本研究で得られた知見は、二枚貝閉殻筋で細いフィラメント系タンパク質が収縮制御に関与する可能性があることを示唆しており、キャ

ッチ収縮を含む閉殻筋収縮制御の分子機構を理解するための一助となった。本研究では、作製したすべての細いフィラメント系タンパク質の解析はできなかったが、今回作製した標品を用いてさらなる解析を進めていくことが可能である。そうすることで、二枚貝閉殻筋収縮機構における細いフィラメント系タンパク質の役割を明らかにすることが期待できる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Molecular Cloning and Tissue Distribution of Troponin I from the Japanese Pearl Oyster, *Pinctada fucata*. Funabara Daisuke, Urakawa Yoshinori, Kanoh Satoshi. AMERICAN JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY 9(2) 29-40. 2019年 DOI: <https://doi.org/10.4236/ajmb.2019.91002>. 査読有
2. Tropomyosin Isoform Expression in the Adductor Muscle of the Japanese Pearl Oyster, *Pinctada fucata*. Funabara Daisuke, Ohta Ayaka, Sueyoshi Jungo, Kanoh Satoshi. AMERICAN JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY 9(1) 16-27 2019年1月 DOI: <https://doi.org/10.4236/ajmb.2019.92003>. 査読有
3. Ca<sup>2+</sup>-Induced Conformational Change of Troponin C from the Japanese Pearl Oyster, *Pinctada fucata*. Funabara Daisuke, Ishikawa Daisuke, Urakawa Yoshinori, Kanoh Satoshi. AMERICAN JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY 8(4) 205-214 2018年10月 DOI: <https://doi.org/10.4236/ajmb.2018.84018>. 査読有
4. Molecular Cloning and Tissue Distribution of Troponin C from the Japanese Pearl Oyster, *Pinctada fucata*. Funabara Daisuke, Urakawa Yoshinori, Kanoh Satoshi. AMERICAN JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY 8(3) 166-177 2018年7月 DOI: <https://doi.org/10.4236/ajmb.2018.83014>. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

1. ムラサキイガイ・トゥイッチン D1 リン酸化領域におけるリン酸化部位の同定 . 船原大輔・西村悠貴・加納 哲 . 平成 31 年度日本水産学会春季大会 . 2019 年 .
2. New insights into the molecular mechanism of molluscan catch contraction: the twitchin D1 phosphorylation site interacts with tropomyosin in a phosphorylation-sensitive manner . Daisuke Funabara, Ikuko Nakano and Satoshi Kanoh . 日本水産学会創立 85 周年記念国際シンポジウム . 2018 年 .
3. アコヤガイ・カルポニンとトロポミオシンの分子間相互作用解析 . 石川大祐, 丸本彩加, 船原大輔, 加納哲 . 2017 年度マリンバイオテクノロジー学会大会 . 2017 年 .
4. 二枚貝の筋肉タンパク質 . 船原大輔 . 平成 29 年度日本水産学会春季大会 . 2017 年 .
5. アコヤガイ・カルポニンの発現精製とカルシウム結合能の解析 . 石川大祐, 丸本彩加, 高宮健吾, 船原大輔, 加納哲 . 平成 29 年度日本水産学会春季大会 . 2017 年 .
6. アコヤガイ閉殻筋の微細構造ならびに主要筋タンパク質と閉殻力の相関について . 船原大輔, 加納哲 . 平成 29 年度日本水産学会春季大会 . 2017 年 .
7. アコヤガイ筋肉タンパク質の立体構造の予測と結晶化条件の検討 . 玉野隼治, 船原大輔, 加納哲 . 平成 28 年度日本水産学会中部支部大会 . 2016 年 .
8. アコヤガイ閉殻筋トロポミオシンとトロポニンの分子間相互作用解析 . 石川大祐, 船原大輔, 加納哲 . 平成 28 年度日本水産学会秋季大会 . 2016 年 .
9. アコヤガイ・トロポミオシンとトロポニン T,I,C の発現精製およびそれらの分子間相互作用解析 . 石川大祐, 船原大輔, 加納哲 . 2016 年度マリンバイオテクノロジー学会大会 . 2016 年 .