

平成21年 5月 11日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780161
 研究課題名（和文）二枚貝キャッチ筋におけるミオシン・アクチン・トウイッチンの結合機序の解明
 研究課題名（英文） The molecular mechanism of the formation of myosin, actin and twitchin complex in bivalve catch muscle
 研究代表者 船原 大輔 (FUNABARA DAISUKE)
 三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授
 研究者番号：00335150

研究成果の概要：

二枚貝キャッチ筋の張力維持機構を分子レベルで明らかにするために、キャッチ収縮制御タンパク質トウイッチンの機能を解析した。非リン酸化状態のトウイッチンは収縮タンパク質であるミオシンのループ2領域とアクチンのサブドメイン1領域に結合して3者で複合体を形成した。リン酸化状態のトウイッチンでは複合体は形成しなかった。トウイッチンはリン酸化によってその立体構造を変化させている可能性が分かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：生体高分子化学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：キャッチ筋，トウイッチン，ミオシン，アクチン，リン酸化，張力維持

1. 研究開始当初の背景

二枚貝閉殻筋やムラサキガイ前足牽引筋（ABRM）は、長時間にわたって張力を維持することができる。このキャッチ収縮はエネルギーをほとんど消費しないことで知られる。キャッチ収縮の分子機構の全貌は明らかとなっていないが、キャッチ収縮制御タンパク質トウイッチンが発見されてから徐々に解明が進んできた。

キャッチ筋は細胞内カルシウム濃度の上昇に伴って張力を発生し（活性状態）、その後カルシウム濃度が弛緩レベルまで低下することでキャッチ状態になる。キャッチ状態

はトウイッチンがリン酸化されることで解除され、筋肉は元の状態に戻る。再び筋肉がキャッチ状態になるためにはトウイッチンが脱リン酸化されなければならない。

トウイッチンのキャッチ収縮制御のメカニズムを分子レベルで明らかにするために、トウイッチンが相互作用する成分を探索したところ、収縮タンパク質であるミオシンとアクチンに結合することが分かった。非リン酸化トウイッチンは、ミオシンとアクチンと結合し、3者で複合体を形成し、それはトウイッチンのリン酸化によって解離した。

ミオシン・アクチン・トウイッチン複合体

の形成が、キャッチ状態における張力維持の本質である可能性が高く、その詳細を明らかにすることが、キャッチ収縮メカニズムを明らかにするために必要である。

2. 研究の目的

既に、アクチンのサブドメイン1領域がトウITCHンに結合することが明らかとなっている。この領域はアクチンとミオシンが滑り運動する際に最初に結合する部位とされ、ミオシンのループ2領域が結合する。したがってトウITCHンもミオシン・ループ2領域に結合する可能性が高いと考えられた。そこで本研究では、ミオシン・アクチン・トウITCHン複合体の結合機序を明らかにするために、ミオシンのトウITCHン結合部位の同定することを目的とし、また、トウITCHンのリン酸化によって複合体が解離するメカニズムをトウITCHンの立体構造変化によるものと考え、トウITCHンのリン酸化状態と非リン酸化状態の立体構造の違いを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 【共沈殿実験】ムラサキイガイ・ミオシン、ニワトリ・FアクチンおよびTWD2-Sの複合体形成に対するループ2ペプチドの影響を調べた。20 µg/ml ミオシン, 1 mg/ml アクチン, 20 µg/ml TWD2-SおよびTWD2-Sに対してモル比 1/10, 1/5, 1/2, 1 および 5/1 のループ2ペプチド, 20 mM 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)-NaOH (pH 7.4), 30 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 0.1 mM O,O'-bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)の混合液を製し、15分間氷上に放置した後、5000gの遠心分離に供した。上清と沈殿をそれぞれSDS-PAGEに供した。ループ2ペプチドの代わりにアクチンペプチドを用いて同様の実験を行った。

【固相结合実験】TWD2-Sのアクチン、ミオシン及びミオシンループ2(CAQNKEAETTGTHKKRKSSA)に対する結合能力のpH依存性を調べた。アクチンはニワトリ骨格筋またミオシンはABRMから精製したものをを用いた。アクチンは50 mM KClを含む20 mM Tris-maleate (pH 7.0)に溶解し、ミオシンは0.6 M KCl and 0.1 mM DTTを含む20 mM MOPS-NaOH (pH 6.8)に溶解した。プラスチックイムノプレートのウェルを50 µg/ml アクチン, 50 µg/ml ミオシンもしくは50 µg/ml ループ2ペプチドでコートした後、キット付属の1 x BSA Diluent/Blocking Solutionでブロッキングした。次に1 mM EGTA および200 mM KClを含む50 mM MOPS (pH 6.7, 7.2, 7.4)に

溶解した30 µg/ml TWD2-Sをプローブとしてウェルに加え1時間室温で放置した。結合の検出はマウス抗His-tag抗体およびアルカリホスファターゼ標識抗マウスIgG抗体をそれぞれ1次抗体および2次抗体として使用して行った。630 nmにおける吸光度を測定した。

【等温滴定熱測定 (ITC) 分析】ITC分析はVP-ITC calorimeter (MicroCal LLC)を用いて行った。測定条件は次の通り: total injections, 25 times; cell temperature, 25 °C; reference power, 10 mCal/s; initial delay, 600 s; syringe concentration, 400 mM; cell concentration, 10 mM; stirring speed, 300 rpm。インジェクションパラメーターは次の通り。volume, 10 µl; duration, 20 s; spacing, 300 s; filter period, 2 s。滴定は25°Cで400 µM ループ2ペプチドを10 µl ずつ10 µM TWD2-Sが1.5 ml 入ったセルにインジェクションすることにより行った。測定バッファーは30 mM potassium phosphate (KPi) (pH 7.0), 4 mM MgCl₂, 1 mM ATP。得られたデータは希釈熱補正した後、Microcal Origin 6.0 softwareを用いてコンピュータ解析した。ループ2ペプチドの代わりにアクチンペプチドを用いて同様の実験を行った。また、TWD2-Sをチオリン酸化TWD2-Sに代えて同様の実験を行った。

4. 研究成果

【共沈殿実験】カルシウム非存在及びATP存在(キャッチ条件)下においてミオシン、アクチン及びTWD2-Sは複合体を形成した(Fig. 1A)。ループ2ペプチドを加えるとアクチンが上清に確認された(Fig. 1A)。これはミオシンとループ2ペプチドが競合した結果、ミオシン・アクチン・トウITCHン複合体が解離したものと考えられた。加えるループ2を増加すればするほど、複合体は解離した。TWD2-Sは上清画分に確認されるようになり、TD2-Sはアクチンとの結合を保持していると考えられた。一方、アクチンペプチドを加えた場合、同じようにミオシン・アクチン・トウITCHン複合体が解離した(Fig. 1B)。これはアクチンとアクチンペプチドが競合した結果と考えられた。加えるペプチドの量を増やせば増やすほど、複合体は解離するようになった。TWD2-Sは沈殿画分に確認され、TWD2-Sのミオシンとの結合は保持されていると考えられた。本実験の結果、ミオシン・アクチン・トウITCHン複合体の形成にはミオシンループ2領域が深く関与していることが明らかとなった。

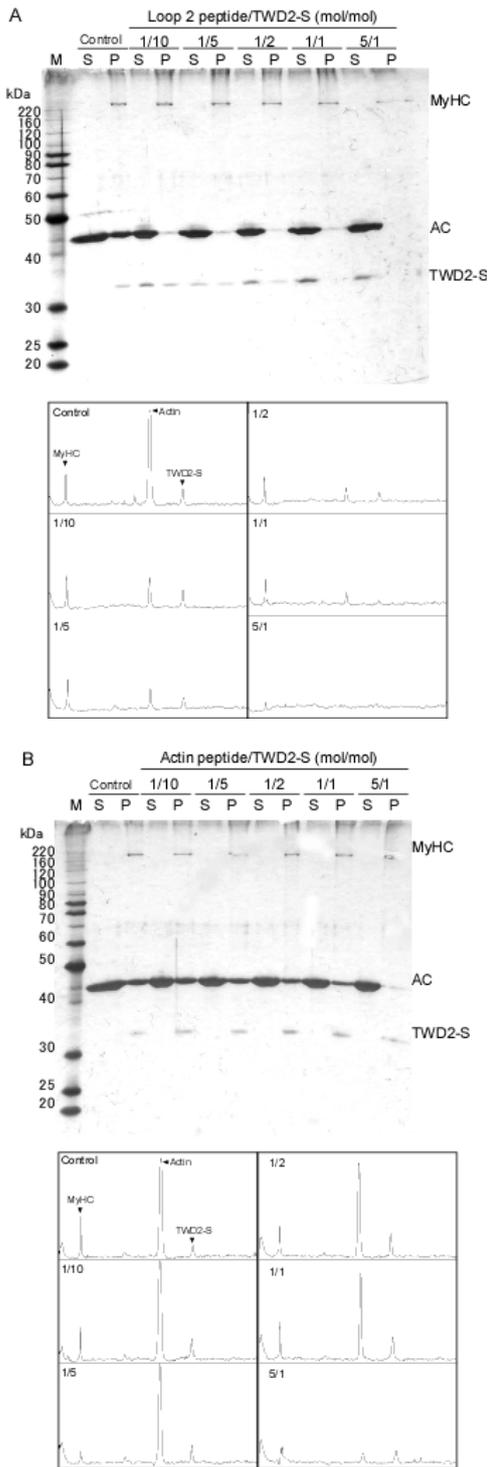


Fig. 1. キャッチ条件下における共沈殿実験. 沈殿画分と上清画分を SDS-PAGE に供した. A, ループ 2 ペプチドを加えた場合. B, アクチンペプチドの場合. SDS-PAGE パターンの下の図は, 沈殿画分のデントグラム. M, 分子量マーカー; S, 上清; P, 沈殿画分; MyHC, ミオシン重鎖; AC, アクチン.

【固相結合実験】ミオシン・アクチン・トウイッチン複合体生成の pH 依存性を, pH 6.7, 7.2, 7.4 および 7.7 における TWD2-S とミオシン, ミオシンループ 2 およびアクチンとの結合性を調べた. TWD2-S とミオシンとの結合性は pH 7.2 で大きく減少した (Fig. 2). ループ 2 ペプチドへの結合は各 pH で有意な差は確認されなかった. アクチンへの結合は pH 7.2, 7.4 および 7.7 において pH 6.7 よりも減少した. このように TWD2-S のミオシンとアクチンに対する結合性は pH が上昇すると減少したが, それでも結合しており, その結果として複合体形成能を失っていないと判断された. したがってミオシン・アクチン・トウイッチン複合体形成は pH にあまり影響されないと結論された.

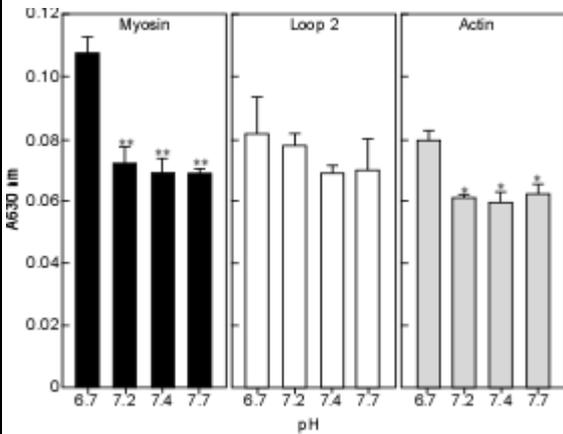


Fig. 2. TWD2-S のミオシン, ミオシンループ 2 ペプチドおよびアクチンへの結合能に及ぼす pH の影響.

【等温滴定熱測定 (ITC) 分析】TWD2-S とミオシンループ 2 ペプチドの結合につき ITC 分析を行い, 結合が確認された (Fig. 3A). また, アクチンペプチドを用いた場合も, 結合が確認された (Fig. 3B). それぞれの場合について, 結合数, 結合定数, ΔH , ΔS が算出された (Fig. 3). また, チオリン酸化処理した TWD2-S は, ミオシンループ 2 およびアクチンペプチドどちらも結合しなかった. 以上の結果から, ミオシン・アクチン・トウイッチン複合体形成にはミオシンループ 2 とアクチンサブドメイン 1 量域が深く関与していることが分かった.

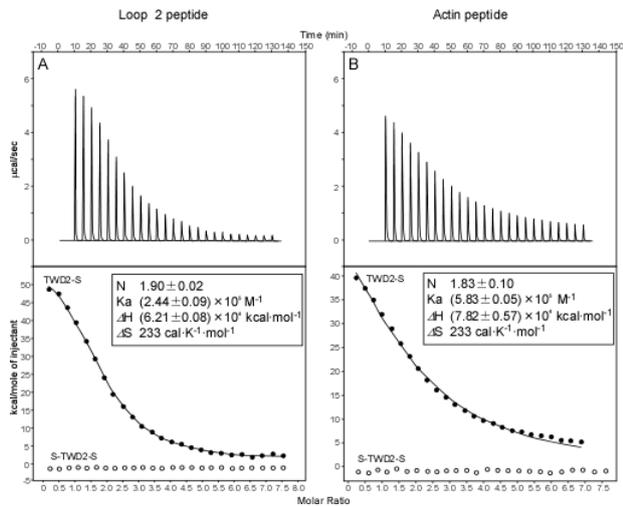


Fig. 3. TWD2-S およびチオリン酸化 TWD2-S とミオシンループ 2 およびアクチンペプチドとの結合の ITC 測定。

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 3 件)

- ① 船原大輔. 二枚貝キャッチ運動の分子メカニズム. 溶接学会誌 **78**, 25-29 (2009). 査読無.
- ② M. Kusaka, D. Ikeda, D. Funabara, S. Watabe. The occurrence of tissue-specific twitchin isoforms in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish. Sci.* **74**, 677-686 (2008). 査読有.
- ③ D. Funabara, C. Hamamoto, K. Yamamoto, A. Inoue, M. Ueda, R. Osawa, S. Kanoh, D. J. Hartshorne, S. Suzuki, S. Watabe. Unphosphorylated twitchin forms a complex with actin and myosin that may contribute to tension maintenance in catch. *J. Exp. Biol.* **210**, 4399-4410 (2007). 査読有.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 森井健太, 大澤里佳, 船原大輔, 渡部終五, 加納哲. 二枚貝キャッチ筋トウITCHINのリン酸化による立体構造の変化. 平成 21 年度日本水産学会春季大会. 平成 21 年 3 月 28 日. 東京海洋大学 (東京都港区).

- ② D. Funabara, D. J. Hartshorne, S. Kanoh, S. Watabe. Molecular Mechanism of Tension Maintenance in Catch Contraction in Invertebrate Smooth Muscle. 第 5 回世界水産学会議. 平成 20 年 10 月 21 日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- ③ N. Morimoto, D. Funabara, S. Kanoh. Characterization of the Kinase Domain in Twitchin from Invertebrate Smooth Muscle. 第 5 回世界水産学会議. 平成 20 年 10 月 21 日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- ④ S. Rokubuichi, D. Funabara, S. Kanoh. Expression Patterns of Paramyosin Gene in Molluscan Striated and Smooth Muscles. 第 5 回世界水産学会議. 平成 20 年 10 月 21 日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- ⑤ T. Aoyama, D. Funabara, S. Kanoh. Characteristics of single cell isolated from molluscan smooth muscle osin Gene in Molluscan Striated and Smooth Muscles. 第 5 回世界水産学会議. 平成 20 年 10 月 21 日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- ⑥ 大澤里佳, 船原大輔, 渡部終五, 加納哲. 二枚貝キャッチ筋ミオシン・アクチン・トウITCHIN複合体生成の熱力学的解析. 平成 20 年度日本水産学会春季大会. 平成 20 年 3 月 28 日. 東海大学 (静岡県静岡市).
- ⑦ 船原大輔, 加納哲, David J. Hartshorne, 渡部終五. キャッチ筋 twitchin のミオシンループ 2 領域とアクチンへの結合. 2008 年生体運動研究合同班会議. 平成 20 年 1 月 8 日. 仙台市戦災復興記念館 (宮城県仙台市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船原 大輔 (FUNABARA DAISUKE)
三重大学・大学院生物資源学研究所・准教授
研究者番号: 00335150

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者