

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06755

研究課題名(和文) 刺胞動物の筋収縮調節機構の解明

研究課題名(英文) Investigation for regulatory mechanisms of cnidarian muscle contraction

研究代表者

田中 啓之(Tanaka, Hiroyuki)

北海道大学・水産科学研究院・助教

研究者番号：90241372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ミズクラゲの横紋筋に、Caイオン濃度依存的にSer/Thr-キナーゼがミオシンに結合・解離することで筋収縮が抑制・脱抑制される新規の筋収縮調節機構が存在する可能性が示された。また、ミズクラゲの横紋筋を構成するその他のタンパク質についても単離・精製して特性を解析した。特に、新規のCaイオン結合タンパク質を見出したが、それが筋収縮調節に関わっているかどうかは明らかにできなかった。また、トロポミオシンについては、組織特異的に3種類のアイソフォームが発現することや、アクチンとミオシンの相互作用を促進する活性を持つことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

刺胞動物は動物進化のごく初期の段階で初めて神経と筋肉を獲得したとされる。刺胞動物の筋肉の収縮は高等動物と同様にATP分解に共役したアクチンとミオシンの相互作用によっているが、それを刺激に応じて調節する分子レベルの機構が不明だった。本研究では、ミズクラゲの筋肉を材料に実験を行い、横紋筋に存在するキナーゼの一種が細胞内Caイオン濃度依存的にミオシンに結合・解離してアクチンとミオシンの相互作用を調節するという新規の筋収縮調節機構の存在を提唱した。

研究成果の概要(英文)：It was suggested that there should be a novel Ca-regulatory mechanism of muscular contraction, which includes the Ca-dependent interaction between Ser/Thr-kinase and myosin in cnidarian striated muscle. We also characterized other muscular proteins purified from moon jelly. Especially, we found a novel Ca-binding protein, AaCBP, specific for the striated musculature, though its participation in the regulation could not be determined. We also revealed the tissue-specific expression of four tropomyosin isoforms. The jellyfish tropomyosin activated the Mg-ATPase activity of reconstituted actomyosin, in contrast to those from other animal species are known to inhibit the activity.

研究分野：海洋応用生命科学

キーワード：筋肉 刺胞動物 カルシウムイオン ミオシン 筋収縮調節 リン酸化 トロポミオシン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物進化の過程で初めて筋肉を獲得したとされる刺胞動物は、横紋筋と平滑筋をもち、それらの形態は高等動物のものと同様である。しかし筋肉を構成するタンパク質には違いが見られ、特に、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化に応じてアクチンとミオシンの相互作用を調節するトロポニンがなく、筋収縮の調節がどのような分子機構で行われるのか、不明だった。

2. 研究の目的

刺胞動物の筋収縮・弛緩の調節、特に、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増減で、アクチンとミオシンの相互作用が促進・抑制される分子レベルの機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ミズクラゲの筋組織からミオシンやその他のタンパク質を精製し、試験管内で特性を調べた。一部のタンパク質は、大腸菌発現によって大量に生成し実験に用いた。また、精製したタンパク質をもとに抗血清を作成して、ウェスタンブロットングや免疫染色による発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) ミズクラゲ横紋筋から新規の Ca^{2+} 結合タンパク質 (AaCBP) を見出した。このタンパク質はミズクラゲのカルモジュリン (CaM) と 44% のアミノ酸配列相同性を示し、分子中の最も N 端側に位置する Site 1 のみに Ca^{2+} を結合すると予測された。ついで、このタンパク質の cDNA をクローニングし、大腸菌発現系によって rAaCBP を調製して生化学的性質を解析した。Tyr 蛍光の Ca^{2+} 滴定により、rAaCBP は、 3×10^5 の結合定数で Ca^{2+} を結合することが示された (図 1)。このことから、筋細胞に刺激が伝達され、細胞内 Ca^{2+} 濃度が高まる筋収縮時に AaCBP は Ca^{2+} を結合する一方、刺激が消失し、細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下した筋弛緩時には Ca^{2+} を解離すると考えられた。また、尿素ゲル電気泳動によって、ニワトリ砂嚢平滑筋のミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) やミズクラゲの Ser/Thr-キナーゼ (AaSTK)、アカザラガイのトロポニン I との相互作用を調べたが、AaCBP は Ca^{2+} の存在・非存在条件に関わらず、いずれとも複合体を形成しなかった。さらに、AaCBP をウサギに免疫して抗血清を作成し、ウェスタンブロットングに用いたところ、ミズクラゲ成体の下傘上皮のホモジェネートに AaCBP が検出され、上傘上皮、口腕、また、ポリプ幼生のホモジェネートには AaCBP が存在しないことがわかった。また、抗血清を用いて、ミズクラゲ下傘上皮の免疫染色を行ったところ、下傘の横紋筋の H 帯 (ミオシンフィラメントの中央部分) に AaCBP が検出され、ミオシンと共局在していることが示唆された (図 2)。しかし、天然及び再構成ミズクラゲ・アクトミオシンの Mg-ATPase 活性に AaCBP の添加は影響を及ぼさず、また、共沈実験によっては、AaCBP とミオシンやアクチンの相互作用は確認されなかった。以上の結果から、AaCBP は、横紋筋に特異的で、ミオシンフィラメント上に存在しており、筋肉の収縮・弛緩に際し、 Ca^{2+} を結合・解離しているが、アクチンやミオシンと直接的に相互作用して筋収縮を Ca^{2+} 依存的に制御する因子ではない、と考えられた。

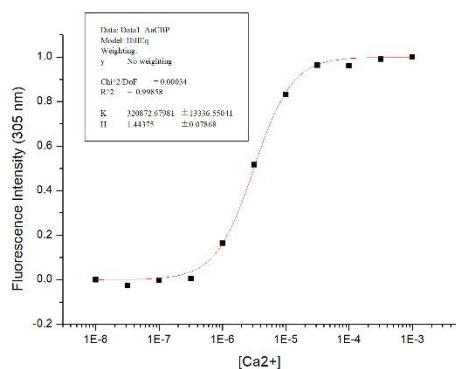


図 1 rAaCBP の Ca^{2+} 結合性

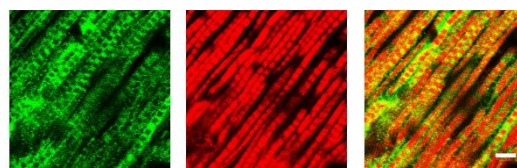


図 2 抗 AaCBP 抗血清によるミズクラゲ下傘横紋筋の免疫染色

左) 抗血清による反応、中) ローダミン・ファロイジンによるアクチンの染色、右) 重ね合わせ画像 (スケールバーは 5 μ m)

(2) ミズクラゲの横紋筋からミオシンを精製し、横紋筋タイプの一次構造を持つ重鎖と、平滑筋タイプの調節軽鎖から構成されたハイブリッド型ミオシンであることを確認した。また、ミズクラゲ横紋筋から抽出したアクトミオシンには、MLCK と同相同性のある AaSTK が含まれていることが既に知られている (Tanaka et al. 2018)。これらのことから、ミズクラゲの横紋筋では、脊椎動物の平滑筋と同様に、 Ca^{2+} -CaM 複合体によって AaSTK が活性化され、ミオシンの調節軽鎖がリン酸化されることで、アクチンとミオシンの相互作用、すなわち筋収縮が促進される可能性

が考えられた。その確認のため、ミズクラゲ横紋筋並びにニワトリ砂嚢平滑筋のホモジェネートを調製して、それらを ATP の存在下で Ca^{2+} の存在または非存在条件としてインキュベートし、SDS-PAGE と Phos-Tag 染色を行って、リン酸化タンパク質を分析した(図3)。その結果、ニワトリ砂嚢平滑筋ホモジェネートでは、 Ca^{2+} 依存的にミオシン調節軽鎖のリン酸化レベルが上昇し、リン酸化による収縮調節機構の作動が確認された。一方、ミズクラゲ横紋筋ホモジェネートでは、 Ca^{2+} 依存的にリン酸化レベルが変化するタンパク質は確認されなかった。従って、ミズクラゲ横紋筋に脊椎動物平滑筋と同様な収縮調節機構は存在しないと示唆された。また、この実験により、AaSTK 自体が、筋ホモジェネートの中で最も高度にリン酸化されたタンパク質であることが明らかになった。ついで、ミズクラゲの横紋筋から AaSTK を単離し、生化学的特性を調べた。単離した AaSTK は 260 nm に紫外吸収極大を示したことから、ヌクレオチドを結合している可能性が考えられた。また、キモトリプシンで限定消化すると、2つのイムノグロブリン様モチーフを含む N 末端ドメインと、キナーゼ配列を含む C 末端ドメインの2つに分断された。それらのうち、リン酸化されているのは C 末端ドメインであることが示された。AaSTK をミズクラゲ横紋筋ミオシンまたは再構成アクトミオシンに添加すると、一部はミオシンに結合し、Mg-ATPase 活性が阻害された。また、その結合と阻害は Ca^{2+} 存在時に解消された(図4)。このことから、AaSTK が筋弛緩時にはミオシンに結合して ATPase 活性を抑制し、筋収縮時にはミオシンから解離して抑制が解除される、という、新規の筋収縮調節メカニズムの存在が示唆された。しかし、精製したミオシン、アクチンと STK のみからなる前述の実験系において、 Ca^{2+} 濃度の変化を検知した因子が何であったのか特定できていない。また、ATPase 活性の阻害や AaSTK のミオシンに対しての共沈が顕著でない場合があるなど、実験条件の検討や再現性の確認がさらに必要である。

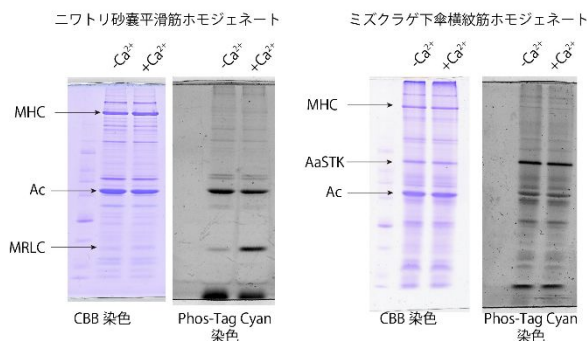


図3 筋ホモジェネートのリン酸化解析

ホモジェネートを 1 mM ATP, $\pm\text{Ca}^{2+}$, 15 の条件で 10 分間インキュベート後、遠心分離し、得られた沈殿を SDS-PAGE で分離し、Phos-Tag Cyan について CBB 染色を行った。MHC: ミオシン重鎖、Ac: アクチン、MRLC: ミオシン調節軽鎖

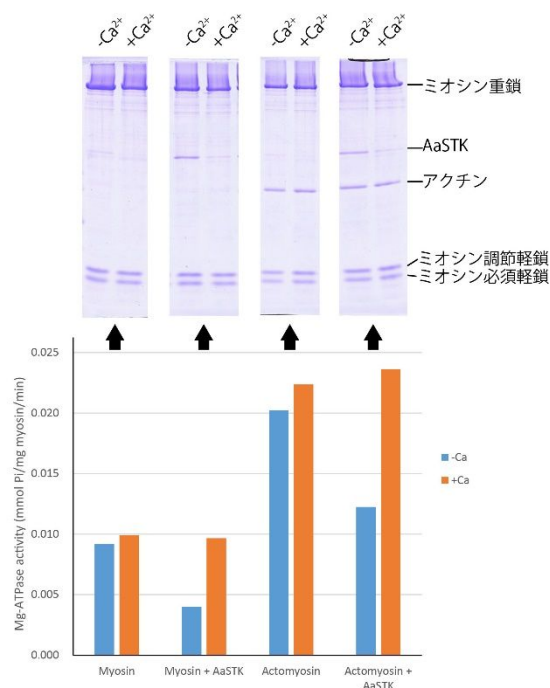


図4 AaSTK の Mg-ATPase 活性調節

0.05 mg/mL ミズクラゲ・ミオシン、0.025 mg/mL ウサギ F-アクチンの混液に AaSTK を加え、15 で Mg-ATPase 活性を測定した(下)。ついで、反応液 200 μL を 10,000 \times g で遠心分離し、ミオシンと共に沈殿したタンパク質を SDS-PAGE で分析した(上)。

AaSTK は Ca^{2+} の非存在条件で ATPase 活性を阻害し、 Ca^{2+} の存在条件ではその阻害は解除された。また、AaSTK は、 Ca^{2+} 非存在条件では、ミオシンと結合して沈殿する一方、 Ca^{2+} 存在条件では、沈殿しなかった。

(3)ミズクラゲのトロポミオシンについては、Tm1 と Tm2 の2つのアイソフォームが存在するが、さらに Tm1 には C 末端側の 27 残基のアミノ酸配列のみが異なる 3 つのバリエーション(Tm1a、Tm1b、および Tm1c)がある。Tm1 と Tm2 は別々の遺伝子にコードされているが、Tm1 のバリエーションは一つの遺伝子からオルタネーティブスプライシングを介して生ずると推測される。本研究では、これらのうち Tm2 について抗血清を調製した。ウェスタンブロットティングと RT-PCR による解析に

より、Tm2 は、横紋筋の存在する下傘上皮のみでなく、平滑筋のみ存在する口腕やポリプ、筋肉の存在しない上傘上皮など、様々な組織に普遍的に発現していることが示唆された。一方、Tm1 の3つのバリエーションは、口腕、上傘上皮、下傘上皮で異なる発現パターンを示すことがわかった(図5)。ミズクラゲ横紋筋からトロポミオシンを精製すると、イオン交換クロマトグラフィーやゲル濾過などの過程で、Tm1c と Tm2 が常に挙動を共にしており、複合体を作っていると考えられた。しかし、トロポミオシンが Tm1c と Tm2 の2つのサブユニットから構成されるヘテロダイマーなのか、あるいは、Tm1c または Tm2 のどちらかのみで構成されるホモダイマーで、それらが会合して複合体となっているのかの判断はできなかった(図6)。精製したトロポミオシンをウサギのF-アクチンに加えると、トロポミオシンはF-アクチンに結合した。また、抗 Tm2 血清で免疫染色を行うと、Tm2 は、下傘横紋筋ではサルコメアのI帯に局在し、また、口腕平滑筋でもアクチンフィラメントと共同在することが示された(図7)。これらの結果から、Tm2 は横紋筋においても平滑筋においてもアクチンフィラメントに結合して存在し、筋繊維の中で細いフィラメント (Thin-filament) を構成していると考えられた。さらに、ミズクラゲ再構成アクトミオシンに精製したトロポミオシンを添加すると、Mg-ATPase 活性の増大が認められ、これは、他の動物のトロポミオシンが Mg-ATPase 活性を阻害するのとは対照的だった。脊椎動物では、トロポミオシンはアクチンに結合してアクチン分子上のミオシン結合部位をブロックし Mg-ATPase 活性を阻害する。さらに、このブロッキングがトロポニンによって Ca^{2+} 依存的に制御されることで筋収縮が調節されている。従って、ミズクラゲ・トロポミオシンが ATPase 活性を促進する特性をもつことは、筋収縮調節機構が脊椎動物とは異なることを反映しているものと推測された。

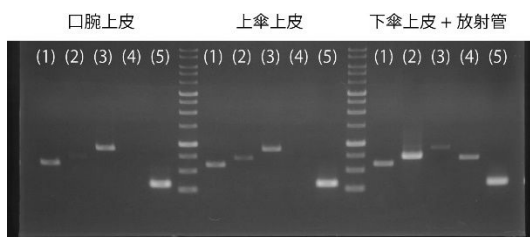


図5 ミズクラゲ・トロポミオシンアイソフォームの RT-PCR による発現解析

成体を口腕、上傘、下傘(放射管を含む)に分割し、酵素処理をした後、上皮組織から RNA を抽出し、cDNA を合成した。

(1) Tm2, (2) Tm1c, (3) Tm1a, (4) Tm1b, (5) Ef1 α

Tm2 はすべての組織から増幅した。Tm1c は口腕で発現せず下傘上皮+放射管で発現している。一方、Tm1a は口腕及び上傘上皮で発現が検出され、下傘上皮+放射管ではわずかしが増幅しなかった。

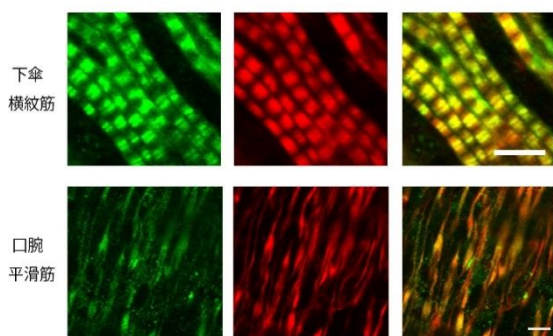


図7 抗ミズクラゲ Tm2 抗体による免疫染色

左) 抗血清による反応、中) ローダミン・ファロイジンによるアクチンの染色、右) 重ね合わせ画像 (スケールバーは 5 μ m)

Tm2 はサルコメアの I 帯、並びに平滑筋のアクチンフィラメント上に局在している。

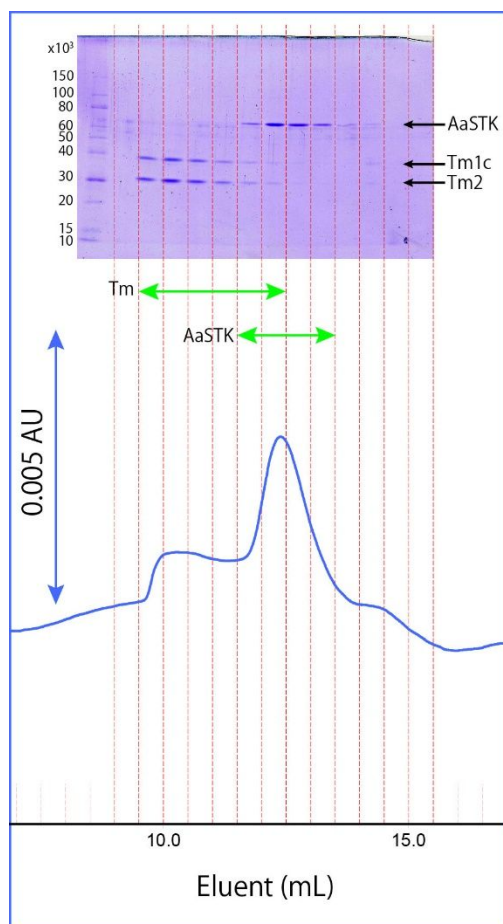


図6 ゲル濾過によるミズクラゲ・トロポミオシンと AaSTK の分離

トロポミオシンは Tm1c と Tm2 が挙動を共にしており、複合体を形成していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中啓之・藤本里佳・松田翔・青木南月実
2. 発表標題 ミズクラゲの再生現象
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田知樹・今井瑞穂・諸岡詩織・長塚康大・大橋慧介・田中啓之
2. 発表標題 ミズクラゲの筋肉構成タンパク質
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>LASBOS moodle 「クラゲ」 https://reput-app.fish.hokudai.ac.jp/course/view.php?id=430</p> <p>Fish of the month -Jellyfish- https://express.adobe.com/page/sT6nACmc0SnSf/</p> <p>「クラゲの筋肉についての研究」加茂水族館・共同研究紹介ポスター(2023)</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	池田 周平 (Ikeda Shuhei)		鶴岡市立加茂水族館飼育科係長

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------