

機関番号： 32511
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20570075
 研究課題名 (和文) 筋収縮制御因子トロポニンの非横紋筋での機能的役割

研究課題名 (英文) Functional role of troponin, a muscle regulatory protein, in non-striated muscle

研究代表者

大日方 昂 (OBINATA TAKASHI)
 帝京平成大学・現代ライフ学部・非常勤講師
 研究者番号： 40012413

研究成果の概要 (和文)： 線虫、ホヤ (尾索類)、クマムシを用いた研究から、これまで横紋筋の収縮制御因子として知られてきたトロポニンが非横紋筋細胞 (平滑筋細胞や筋上皮細胞) でも収縮制御に関わること、特に線虫では産卵時の生殖巣筋上皮細胞の収縮制御に不可欠な役割を果たすことを見出した。脊椎動物トロポニンは Ca²⁺ イオン不在時に収縮運動の抑制因子として働く。頭索類ナメクジウオトロポニンは同様の性質をもつが、ホヤの平滑筋のトロポニン、横紋筋のトロポニンは Ca²⁺ イオン存在下で収縮運動の促進因子として機能することを見出した。分子構造の比較解析と合わせて、脊椎動物の進化過程でのトロポニンの多様化を解明した。

研究成果の概要 (英文)： Troponin has been known as a Ca²⁺-dependent regulator of muscle contraction characteristic of skeletal and cardiac muscles. In this investigation, we revealed the following. 1) Troponin also plays an essential role in contractile regulation of non-striated muscles such as smooth muscle and myoepithelial cells in ascidian, nematode, and tardigrade (water bear). 2) Troponin of vertebrate and amphioxus (cephalochordate) functions as a brake for muscle contraction in the absence of Ca²⁺, while troponin in ascidian (urochordate) functions as Ca²⁺-dependent accelerator for contraction. Based on the functional diversity and evolutionary comparison of troponin molecular structure, we suggest that divergence of troponin occurred during evolution of chordates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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： トロポニン、Ca²⁺-制御タンパク質、収縮運動、非横紋筋、アクチン線維、
アクチン-ミオシン相互作用

1. 研究開始当初の背景
 筋収縮・弛緩は細胞内カルシウムイオン

(Ca²⁺) 濃度の変化によって制御されるが、
 この制御を担う Ca²⁺ 受容タンパク質・トロ

ポニン、最初、脊椎動物横紋筋で見出され (Ebashi, 1964)、その後、無脊椎動物の横紋筋にも広く分布することがわかり (Lehman et al, 1973) 横紋筋特有の収縮制御因子と考えられた。脊椎動物横紋筋トロポニンは筋収縮を抑制するが Ca^{2+} によりその抑制が解除されるという機能特性 (ブレーキ型特性) をもつことが知られてきた。ところが、申請者らは原索動物マボヤの平滑筋 (体壁筋) に、 Ca^{2+} 依存的に収縮運動を活性化する機能特性 (アクセル型特性) をもつトロポニンを見出し、非横紋筋細胞におけるトロポニンの存在、機能の特性、およびその役割が新たな問題としてクローズアップされた。その後、原索動物 (ナメクジウオ) 横紋筋には、脊椎動物横紋筋トロポニンと同様のブレーキ型機能特性をもつトロポニンの存在が明らかになり、ホヤ横紋筋のトロポニンの特性はどうか課題として残された。一方、線虫の生殖巣を取り囲む筋上皮細胞 (平滑筋よりも一層未発達な運動装置をもつ細胞) にトロポニンの成分の一つ TnC の存在が知られ (Ono and Ono, 2004)、他のトロポニン成分の存在とその機能的役割が関心事として浮かび上がってきた。これらのことから、脊椎動物を含む種々の非横紋筋細胞 (平滑筋、筋上皮細胞など) にトロポニンがどのように分布し、どのような役割をもち、どのような機能的多様性があるのかが関心事となった。トロポニンの役割は従来の理解を超えて多様かつ広範である可能性が生じており新たな研究が求められる状況となっている。

2. 研究の目的

本研究は、いくつかの動物をモデルにして非横紋筋細胞におけるトロポニン局在の普遍性を探ると共に、遺伝子操作によりトロポニンをもつ非横紋筋細胞でトロポニン欠損状態を導いた際の表現形質を調べることなどによりトロポニンの機能的役割を探り、さらに組み換え体タンパク質を作成して非横紋筋におけるトロポニンの分子機能の特性を調べ、横紋筋の場合と比較検討して、トロポニンの機能的意義を非横紋筋・横紋筋を通じて明らかにすることを目的とした。具体的には、
(1) 線虫の筋上皮細胞でのトロポニンの機能的役割を、RNAi などの適用によりトロポニン欠損状態を導くなどして解明する
(2) 線虫以外の動物を材料にして平滑筋や筋上皮細胞のような原始的な筋細胞においてトロポニンがどの程度普遍的に存在するかを探る。
(3) 非横紋筋・横紋筋間でのトロポニンの分子機能特性を、組み換え体タンパク質を用いるなどして調べ、非横紋筋細胞におけるトロポニンの機能的意義を種々の事例で比較検討して明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 線虫 (*C. elegans*) の非横紋筋細胞 (筋上皮細胞) におけるトロポニンの機能的役割について、特にトロポニン成分の一つ TnI に焦点を絞って以下のように解析した。

① 2次元電気泳動による線虫筋様細胞と横紋筋で発現する TnI の比較検討

線虫にはサイズ、pI が異なる複数の TnI のアイソフォームが存在することが、遺伝子解析で明らかになっているので、線虫の横紋筋部位と非横紋筋細胞 (筋上皮細胞) を切り分けて、SDS-PAGE と2次元電気泳動、ウエスタンブロットを行い、非横紋筋細胞に発現する TnI をタンパク質レベルで特定化することを試みた。

② RNAi 投与によるトロポニン発現抑制と生殖巣筋様細胞の機能

線虫では、RNAi 投与によりタンパク質発現を容易に抑制できるので、この手法により生殖巣の筋上皮細胞での TnI の発現を抑制し、ウエスタンブロットと免疫細胞染色により TnI の消失を確認、その上で、トロポニンを欠損する筋上皮細胞でのアクチン細胞骨格の形態変化、生殖細胞の形態変化、生殖細胞からの放卵、放精がどう影響されるかを調べた。

(2) 線虫以外の動物の非横紋筋細胞におけるトロポニンの解析

種々の動物を試験的に検討の結果、線虫に近縁のクマムシ (緩歩動物) が優れた実験モデルとわかったので、クマムシを主な実験対象とした。クマムシは微小動物で日本国内では十分量の入手が困難であるが、米国では必要量を容易に調達出来るので、米国での共同研究として実施した。

① 免疫細胞化学的手法によるクマムシ非横紋筋細胞でのトロポニン (TnI) の検出と局在の検討

抗線虫トロポニン (TnI) 抗体 (Nakae & Obinata: Zool. Sci. 10, 375-379, 1993) を用いて、ウエスタンブロットと組織の蛍光抗体染色により TnI を検出、細胞内での局在パターンを解析した。

② 分離アクチン線維でのトロポニンの検出

ホヤ平滑筋や横紋が不十分な幼若骨格筋などから天然アクチン線維を分離することに成功した経験 (Obinata 他: Develop. Growth. Diff. 16, 105-121, 1974; Obinata 他: Int. J. Biochem. 5, 875-884, 1974; Toyota 他: Comp. Biochem. Physiol. 62B, 433-441, 1979 他) に準じて、クマムシ非横紋筋細胞から弛緩溶液 (ATP + EGTA を含む液) でアクチンフィラメントを遊離させて回収し、アクチンフィラメントに TnI の結合の有無を SDS-PAGE とウエスタンブロット法で解析した。

(3) 原索動物ホヤの非横紋筋 (平滑筋) と

横紋筋のトロポニンの機能特性の比較検討
ゲノム情報がわかっているカタユウレイボヤ
を材料として、大腸菌発現系で平滑筋トロポ
ニンの成分（トロポニン T、I、C）、横紋筋の
トロポニンの成分（トロポニン T、I、C）の
組み替え体タンパク質を作成し、トロポニン
3成分からなる機能複合体を再構成して、筋
収縮運動系（アクチン・ミオシン複合体）の
機能に対する Ca^{2+} -依存的な制御を解析した。

4. 研究成果

(1) 線虫非横紋筋細胞（筋上皮細胞）にお
けるトロポニンの機能的役割について（詳細
はObinata et al., J Cell Sci 123: 1557-1566,
2010 参照）

線虫 (*C. elegans*) をトロポニン I (TnI)
に対する抗体で染めたところ、体壁筋（横紋
筋）以外にも、生殖巣にある筋上皮細胞（図
1）のアクチン線維ネットワークが染まり、
ここに TnI が存在することが確認された（図
2の黄緑色の染色）。この様なアクチン線維
ネットワークに TnI が存在することはこれまで
いかなる動物でも観察されていない。生殖
巣の筋上皮細胞以外の部分にはアクチンは
検出される（図2の赤色の染色）が TnI は検
出されない。

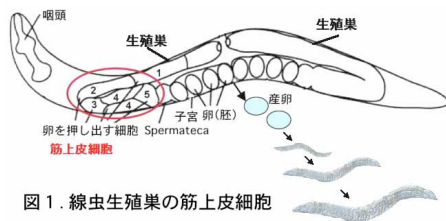


図1. 線虫生殖巣の筋上皮細胞

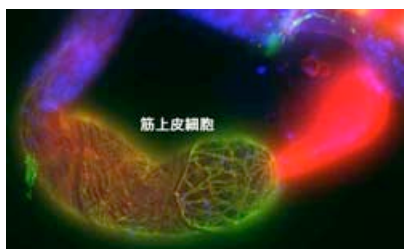


図2. 筋上皮細胞の抗体染色像：黄緑が TnI の
染色、赤はアクチンを検出するファロイジン染色

線虫には4つの TnI 遺伝子が存在し、4つ
の TnI タンパク質アイソフォームが作られる
（図3）。これらの内、*tni-1*、*tni-2* が生殖
巣で発現することがこれまでの遺伝子解析
および今回のタンパク質レベルの解析で明
らかになった。一方、体壁筋では *tni-1*、*tni-2*、
tni-3 が発現する。線虫のミュータントで、
tni-2 を欠損するもの (*Unc27* と呼ばれる)
がある。従って、このミュータントでは
tni-1 を欠損させれば、生殖巣に TnI を全く
もたない線虫をつくりだせることになる。

線虫 (*C. elegans*) のトロポニン I (TnI) アイソフォーム

遺伝子	a.a	分子量	発現部位	野生型線虫 (N2)	ミュータント (<i>Unc27</i>)
<i>tni-1</i>	250	28.9	体壁筋 及び生殖巣	あり	あり
<i>tni-2</i> (<i>unc27</i>)	242	27.6	体壁筋 及び生殖巣	あり	欠損
<i>tni-3</i>	260	29.8	体壁筋	あり	あり
<i>tni-4</i>	194	23	咽頭筋	あり	あり

図3. 線虫における TnI アイソフォームの発現

そこで、*Unc27* ミュータントを *tni-1* に対
する RNAi で処理することにより生殖巣に
TnI をもたない線虫を作成できた。TnI の
欠損は蛍光抗体染色とウェスタンブロッ
ト法で確認した。TnI 欠損の線虫では生殖
巣が過剰収縮して著しい形態異常を起こ
し、産卵がうまく行えなくなることが明ら
かになった。*tni-1*-RNAi で処理しない
Unc-27 は *tni-1* をもつため産卵が可能で
あり、野生型で *tni-1* の発現を抑えても、
tni-2 と *tni-3* の存在の故に問題は起こら
ないことも確認された（図4）

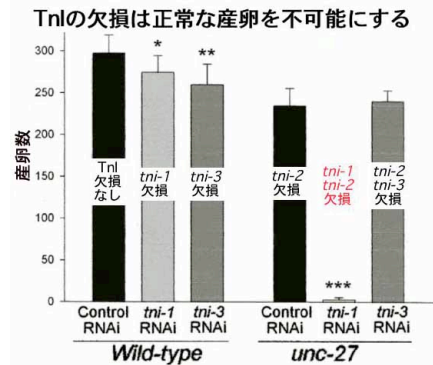


図4. TnI アイソ欠損によって起こる産卵の異常

以上の結果から、トロポニンが横紋筋の収
縮制御を担うという従来の理解を超えて、
筋上皮細胞という非横紋筋の収縮制御に
関わり、産卵の制御に重要な役割を果たす
ことが明らかになった。

(2) 線虫以外の動物の非横紋筋細胞にお
けるトロポニンの検出

線虫に近縁の微小動物クマムシ（緩歩動
物門）を用いて解析した。この動物では、
全身に非横紋筋細胞が張り巡らされてい
ることが知られている。これまでの電子顕
微鏡観察によればこれらの細胞内では平
滑筋の場合の様にアクチン線維が細胞内
を走行している。クマムシを凍結切断して、
抗線虫 TnI 抗体で染色すると、咽頭部の筋
を除くからだのほとんど全域の筋細胞が
アクチンと同様のパターンで存在するこ
とが認められた（図5）。

ウェスタンブロット法でも TnI のバンドが
検出された。クマムシの TnI は線虫のもの
よりやや小さく分子量は31,000程である。

さらに、トロポニンをもつアクチン線維が

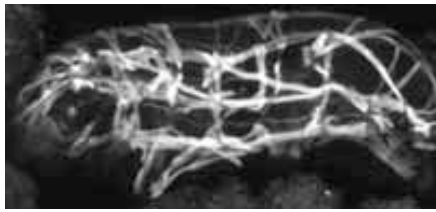


図5. クマムシの抗 TnI 抗体染色像

運動装置から解離する（弛緩する）条件、即ち、カルシウムキレート剤（EGTA）と ATP を含む生理的延納度の溶液中でクマムシをホモジナイズすると TnI をもつアクチン線維が解離することが認められた。以上の観察から、クマムシの非横紋筋細胞ではトロポニンがアクチン線維に存在し、収縮制御を担っているであろうと推測された。

クマムシ以外に、非横紋筋細胞をもつと推測されるプラナリアで解析を試みたが、トロポニンを認識できる抗体を用意できず結果を得ることは出来なかった。

(3) 原索動物ホヤの非横紋筋（平滑筋）トロポニンと横紋筋のトロポニンの機能特性の比較検討（詳しくは Ohshiro et al, *Biochemistry* 49: 9563-9571, 2010 参照）

ホヤでは成体の体壁に平滑筋、幼生の尾部に横紋筋が存在する。ゲノム情報が明らかになっているカタユレイボヤをモデルとして、それぞれの筋に存在するトロポニンの3成分（TnT、TnI、TnC）を大腸菌発現系で作成、精製して、その後3成分を混合して機能をもつトロポニン複合体を再構成して機能特性（アクチン・ミオシン相互作用の制御にどのように作用するか）を解析した。その結果、平滑筋のトロポニン複合体、横紋筋のトロポニン複合体のいずれもが Ca^{2+} の存在下でアクチン・ミオシン相互作用（アクトミオシンの Mg^{2+} -ATP アーゼ活性）を著しく促進するが、 Ca^{2+} の非存在下でアクチン・ミオシン相互作用をほとんど抑制しないことが明らかになった（図6）。

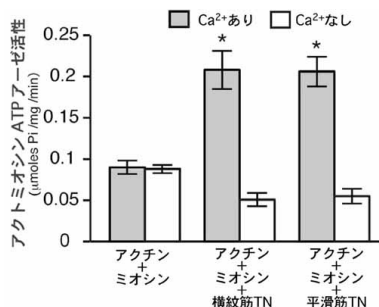


図6. カタユレイボヤの横紋筋および平滑筋トロポニン (TN) のアクトミオシン ATP アーゼへの作用

即ち平滑筋トロポニン、横紋筋トロポニンのいずれもがアクセル型特性をもつのである。

このようなトロポニンによるアクチン・ミオシン相互作用の促進はトロポニン T (TnT) によることがわかった。ただし、TnT は Ca^{2+} 非依存的に作用し、トロポニン複合体になると Ca^{2+} 依存的に作用する。TnT 分子内のアクチン・ミオシン相互作用促進に関わる領域を特定した。 Ca^{2+} 依存的にアクチン・ミオシン相互作用を促進するトロポニンはホヤ類に特有のもので、ホヤと同じく原索動物に属するナメクジウオのトロポニンは脊椎動物の場合と同様に、 Ca^{2+} の非存在下でアクチン・ミオシン相互作用抑制するブレーキ型の性質をもつことを我々は確かめている (Dennisson et al, *Zool Sci* 27: 461-469, 2010) (図7参照)。

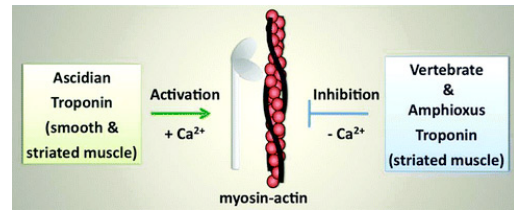


図7. 脊椎動物、原索動物トロポニンに見られる機能の多様性

脊椎動物と原索動物トロポニンに見られる機能の多様性が、脊椎動物への進化過程でどのように生じたかを考察するために、TnT の分子構造（アミノ酸の配列）のホモロジーの程度を脊椎動物（ヒト、ゼブラフィッシュ）、原索動物尾索類（ホヤ）、原索動物頭索類（ナメクジウオ）間で比較検討した。図8で見て取れるように、TnT の分子構造がホヤ類では脊椎動物とは異なる方向に分岐したことがわかる。TnI についてもほぼ同様な分子構造の類縁関係を見ることができた (Dennisson et al, *Zool Sci* 27: 461-469, 2010)。ホヤトロポニンが独特の機能をもつ（図8）ようになったことはこのように分子構造の面からも確認されたのである。

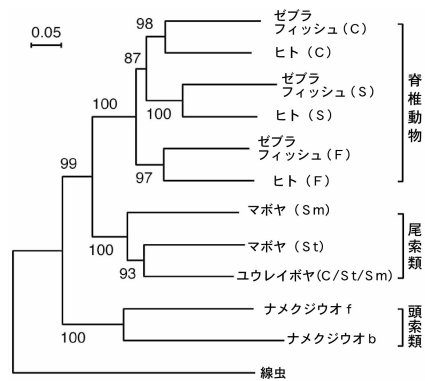


図8. 脊椎動物、尾索類、頭索類の TnT の一次構造の相同性から見た系統的比較

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)

(1) 雑誌論文 (計5件)

- ① Ohshiro K, Obinata T, Dennisson JG, Ogasawara M and Sato N (2010) Troponin in both smooth and striated muscles of ascidian, *Ciona intestinalis*, functions as a Ca^{2+} -dependent accelerator of actin-myosin interaction. *Biochemistry* 49: 9563-9571 (査読あり)
- ② Obinata T, Ono K and Ono S (2010) Troponin I controls ovulatory contraction of non-striated actomyosin networks in the *C. elegans* somatic gonad. *Journal of Cell Science* 123: 1557-1566 (査読あり)
- ③ Dennisson JG, Tando Y, Ogasawara M, Kubokawa K, Sato N and Obinata T (2010) Functional characteristics of amphioxus troponin in regulation of muscle contraction. *Zoological Science* 27: 461-469 (査読あり)
- ④ Saruta K, Obinata T and Sato N. (2010) Differential expression of two isoforms of myosin-binding protein C in developing chicken cardiac and skeletal muscle cells *Zoological Science* 27: 1-7 (査読あり)
- ⑤ Ohshiro K, Dennisson J, Tandoh Y, Sato N and Obinata T (2008) Comparative study of protochordate troponin in the regulation of muscle contraction. *In* "Proceedings of the 9th International Congress on Cell Biology" ICCN 2008, Medimond, Italy, pp. 79-83 (査読なし)

(2) 学会発表 (計7件)

- ① 大日方昂, 斧加奈子, 斧正一郎 非横紋性運動細胞のアクチン細胞骨格へのトロポニンの局在 日本動物学会第81回大会 2010年9月 東京
- ② Obinata T, Ono K and Ono S. Troponin I is essential for contractile regulation of non-striated muscle in the *C. elegans* somatic gonad. The American Society for Cell Biology 49th Annual Meeting, December

2009, San Diego.

- ③ 大日方昂, 斧加奈子, 斧正一郎 線虫生殖巣筋上皮細胞の収縮制御にトロポニンIが欠かせない 日本動物学会第80回大会 2009年9月 静岡
- ④ 佐藤成樹, デニソン ジェネット, 大城克志, 大日方昂 脊索動物の進化とトロポニンの機能的多様化 日本動物学会第80回大会 2009年9月 静岡
- ⑤ Obinata T, Ono K and Ono S. Characterization of troponin I that is essential for contractile regulation of non-striated muscle in the *C. elegans* somatic gonad. 日本細胞生物学会第61回大会 2009年6月 名古屋
- ⑥ 大城克志, デニソン ジェネット, 大日方昂, 佐藤成樹 トロポニンの脊索動物間における構造的類縁関係と機能の多様性 日本動物学会第79回大会 2008年9月 福岡
- ⑦ Obinata T, Ohshiro K, Dennisson J, Tandoh Y and Sato N. Comparative Study of Protochordate Troponin in the Regulation of Muscle Contraction. 9th International Congress on Cell Biology, October 2008, Seoul (優秀ポスター賞受賞)

[図書] (計 件)

[その他]

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大日方 昂 (Obinata Takashi)

研究者番号: 40012413

(2) 研究分担者

佐藤成樹 (Sato Naruki)

研究者番号: 40261896

(3) 研究協力者

斧正一郎 (Ono Shoichiro)

Emory University, Atlanta, USA

