

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2013

課題番号：21570075

研究課題名(和文)硬さ可変結合組織研究の総括

研究課題名(英文)Integrative studies on mechanically mutable connective tissue

研究代表者

本川 達雄 (Motokawa, Tatsuo)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：80092352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：硬さ可変結合組織(CCT)の全側面について研究した。CCTは、軟S、標準M、硬Hの3つの力学的状態を示す。M→Hを起こすNSFと、M→Sを起こすソフニンという新規タンパク質をCCTから単離した。この結果と電子顕微鏡像とから、S→Mはテンシリンによるコラーゲン分子間の凝集(これはソフニンで解除される)、M→HはNSFによるコラーゲン微繊維間の橋掛けによって起こるといふ分子機構を提案した。3状態の酸素消費量と硬さの測定から、CCTを用いて姿勢を維持すると、筋収縮による場合に比べ、1/70の消費エネルギーで済み、棘皮動物のきわめて低いエネルギー消費にCCTが大きく寄与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Mechanically mutable connective tissue (CCT) takes 3 different mechanical states, soft (S), standard (M), and stiff (H). We have isolated from sea cucumbers "NSF", a 2.4 kDa-protein, that caused M to H transition and "softenin", a 20 kDa-protein, that caused M-to-S transition. From these and the images of electron microscopy, we proposed the following molecular mechanism for stiffness changes: the transition from S to M is caused by the aggregation of collagen molecules induced by tensilin, which is antagonized by softenin; the transition from M to H is caused by cross bridging between collagen fibrils by NSF.

The oxygen consumption of 3 states of CCT from 3 different animal classes were measured and compared to that of muscles. The amount to oxygen consumption was lowest in M and highest in S that was far lower than that of relaxed muscles. The posture maintenance through CCT was shown to be the economical way that contributed the low metabolic rate of echinoderms.

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：棘皮動物 結合組織 力学的性質 ナマコ

1.研究開始当時の背景

棘皮動物のキャッチ結合組織 (CCT) は秒単位のすばやい硬さ変化を示す。私はこの 30 年間、進化・生態学上の意味、網ごとの使われ方の多様性、神経支配、力学、分子機構という、CCT のあらゆる側面を調べてきた。力学や分子機構は主にナマコ体壁真皮を用いてきた。硬さは、コラーゲン性結合組織の細胞外成分の硬さの変化によるが、詳細な力学的性質の研究により、硬さには、軟状態 S、標準 (中間) 状態 M、硬状態 H という 3 状態があることを明らかにした。また Trotter は真皮を硬くする tensilin をナマコ体壁から発見した。

2.研究の目的

私は CCT の全体像を構築すべく、こつこつとやってこまできたが、ついに私も定年となり、後継者は世界のどこにも育てていない。そこでまとまった区切りの良い形にして仕事を後世に残す必要を強く感じ、この、現役最後の科研費によりまとめの研究を行うこととした。主な目標は、M H に関わる「真の硬化因子」や軟化因子の発見や、電子顕微鏡レベルでの硬さと形態との対応の発見により、分子機構の全体像を指し示す。CCT は姿勢維持が主な機能であるが、その際、エネルギー消費量が少ないだろうと想像されてきたが実測はない。CCT のエネルギー消費量を通して、棘皮動物という省エネ型動物の生き方を明らかにする。そして、科学論文のみならず、一般向けにナマコと CCT の重要性をアピールする書物も出版する。

3.研究の方法

実験材料として、主にナマコ真皮を用いた。動的力学試験により、硬さを測定した。硬化因子や軟化因子の単離精製においては、真皮抽出物を、陰イオン交換カラムとゲル濾過カラムを何段階か通し、

SDS-PAGE により、単一バンドになることを確かめ、それらのアミノ酸部分配列を決定した。エネルギー消費量は酸素消費率 VO_2 を、酸素電極もしくは蛍光消失原理による光学的酸素モニターによって測定した。

4.研究成果

S M と M H は異なる機構による

M H において、真皮の重量と体積が 1 割減少することがわかった。これほどの減少は、含水量の減少でしか説明できない。S M の変化の際にはこの減少は見られなかった。電子顕微鏡で観察すると、コラーゲン微繊維の間に橋掛け構造がみられ、この数が H では有意に増加していた。S と M との間には橋掛け構造の数に違いはなかった。また、コラーゲン微繊維の断面を観察すると、S では微繊維がさらに細い微繊維に分かれているように見える像が見られ、微繊維内部の凝集力が低下していることが示唆された。

(2) NSF: M H を起こす硬化因子

分子量約 2.4kDa のタンパク質 new stiffening factor (NSF) が M H を引き起こした。しかしこれは S H を引き起こさなかった。

(3) softenin: M S を起こす軟化因子

分子量約 20kDa の糖タンパク質をナマコ体壁の真皮から単離した。M にテンシリンを作用させて S にしたものに、ソフニンを与えると P になった。テンシリンは単離したコラーゲン繊維懸濁液を凝集させるが、凝集物にソフニンを加えると凝集が分散した。以上から、CCT の硬化は 2 段階で起こり、S M はテンシリンによるコラーゲン微繊維内の凝集 (これはソフニンで拮抗される)、M H は NSF によるコラーゲン微繊維同士の橋掛けによる (この

際に水が排除される)という分子モデルを提出した。

(4) CCT のエネルギー消費量

ナマコとウニとヒトデの CCT を用い、各力学的状態での VO_2 を測定したところ、すべてにおいて、S で一番大きく、次が H、一番少ないのが M であった。H ではどの結合組織でも M の 1.5 倍の酸素を消費した。S では M の 2-9 倍の消費率だったが、それでも弛緩中の筋のものより少なかった。 VO_2 と発生する力とを測定し、これらを CCT と筋肉とで比較したところ、CCT を用いて姿勢維持すると、エネルギー消費量が筋肉を用いる場合の 1/70 で済むことがわかった。ナマコ個体の VO_2 を測定し、CCT の酸素消費がその内のどれくらいの割合を占めているかを見積もったところ、M では個体の消費量の 1/4、H では 1/3、S 状態では 3/4 となった。CCT のエネルギー消費量は、個体のエネルギー消費量のかなりの部分を占めていた。棘皮動物は個体のエネルギー消費量が他の動物に比べて極端に低い。CCT が少ないエネルギー消費で支持機能を果たしていることが、そのことに大きく寄与していることが分かった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Takehana, Y., Yamada, A., Tamori, M. and Motokawa, T. (2014) Softenin, a novel protein that softens the connective tissue of sea cucumbers through inhibiting interaction between collagen fibrils. PLoS ONE, 9:e85644. doi:10.1371/journal.pone.0085644 査読有り

Motokawa, T., Sato, E. and Umeyama, K, (2012) Energy expenditure associated with softening and stiffening of echinoderm

connective tissue. Biol. Bull 222:150-157.

<http://www.biolbull.org> 査読有り

Motokawa, T. (2011) Mechanical mutability in connective tissue of starfish body wall. Biol. Bull. 221: 280-289. <http://www.biolbull.org> 査読有り

Yamada, A., Tamori, M., Iketani, T., Oiwa K. and Motokawa, T. (2010) A novel stiffening factor inducing the stiffest state of holothurian catch connective tissue. J. Exp. Biology, 213:3416-3422. doi10.1242/jeb.044149 査読有り

Tamori, M., Takemae, C. and Motokawa, T. (2010) Evidence that water exudes when holothurian connective tissue stiffens. J. Exp. Biol, 213:1960-1966. doi.10.1242/jeb. 038505 査読有り

Takemae, N., Nakaya, F., and Motokawa, T. (2009) Low oxygen consumption and high body content of catch connective tissue in body contribute to low metabolic rate of sea cucumbers. Biol. Bull. 216:45-54. <http://www.biolbull.org> 査読有り

[学会発表](計11件)

Yamada, A, Takehana, Y, Tamori, M, and Motokawa, T (2014). Connective tissues in echinoderm animals that can reversibly change their stiffness. American Biophysical Society, San Francisco, U.S.A. 15 February. Takehana, Y, Yamada, A, Tamori, M, and Motokawa, T (2014). A-sea cucumber derived novel protein that softens the cell-disrupted catch connective tissue through inhibiting the interaction between collagen fibrils. American

Biophysical Society, San Francisco, U.S.A. 15 February.

淵上芳朗、本川達雄 (2013)。ガンガゼにおけるキャッチ結合組織と棘筋の協調的神経支配。日本棘皮動物研究集会、富山大学、12月7日

竹花康弘、山田章、田守正樹、本川達雄 (2013) シカクナマコの体壁真皮を軟化させるタンパク

質の発見。日本動物学会、岡山大学、9月28日

白木智之、田守正樹、本川達雄 (2013) ウニにおける神経ペプチド候補物質 NGFFFamide と NGIYYamide の効果と局在。日本動物学会関東支部大会、東京工業大学、3月16日

竹花康弘、田守正樹、本川達雄、山田章 (2013) キャッチ結合組織(ナマコ真皮)を軟化させる因子の探求。日本動物学会関東支部大会、東京工業大学、3月16日

Yamada, A, Takehana, Y, Tamori, M, and Motokawa, T (2012). Molecular mechanisms of reversible changes in stiffness of echinoderm collagenous “catch” connective tissues. 日本生物物理学学会、名古屋大学、9月22日

白木智之、田守正樹、本川達雄 (2012) ウニ FGFFFamide: ウニのキャッチ結合組織を支配する神経ペプチド。日本動物学会、大阪大学、9月13日

竹花康弘、池谷知昭、山田章、田守正樹、本川達雄 (2011) 細胞を破壊したナマコ真皮に対する真皮抽出物の効果。日本動物学会、旭川、9月21日

本川達雄 (2011) ヒトデ体壁のキャッチ結合組織。日本動物学会、旭川、9月21日

佐藤絵里子、本川達雄 (2010) シカクナマコ結合組織の硬化および軟化に伴うエネルギー消費。日本動物学会、東京大学、9月25日

[図書] (計 1 件)

本川達雄、世界平和はナマコとともに、2009、阪急コミュニケーションズ、287pp.

本川達雄他、ウニ学、2009、東海大学出版会、462pp.

本川達雄、生物学的文明論、2011、新潮社、250pp.

[その他]

ホームページ

<http://home.t01.itscom.net/motokawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本川 達雄(MOTOKAWA, Tatsuo)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号 80092352