

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570167

研究課題名（和文）Twitchinによるアクトミオシン分子間相互作用制御に関する研究

研究課題名（英文）Study on the regulation of actomyosin interactions by twitchin

研究代表者

山田 章（YAMADA AKIRA）

独立行政法人情報通信研究機構・未来 ICT 研究所バイオ ICT 研究室・主任研究員

研究者番号：80359075

研究成果の概要（和文）：キャッチ状態、すなわち、脱リン酸化された twitchin 存在下において、ミオシンの ATP 加水分解活性がアクチンフィラメントによってわずかに活性化されることが明らかになった。この実験結果に基づき、twitchin そのものはミオシン頭部と相互作用しないが、アクチンフィラメントと複合体を作って相互作用し、その際に ATP 加水分解をわずかに活性化するというキャッチ状態の分子機構モデルを提案した。

研究成果の概要（英文）：Mg-ATPase was slightly activated by F-actin under the catch state, that is, in the presence of dephosphorylated twitchin. Based on the results, we propose a molecular mechanism for the catch, where twitchin alone does not interact with the myosin catalytic motor domain but its complex with F-actin does, forming the bridge between actin and myosin filaments and the myosin slowly hydrolyzes Mg-ATP in the catch state.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：運動・輸送、生物物理、分子モーター、タンパク質

1. 研究開始当初の背景

Twitchin は線形動物の筋肉で発見されたタンパク質である (Benian et al., 1989, Nature, 342, 45-50)。これは脊椎動物骨格筋の connectin/titin と構造上類似しており、節足動物の projectin などとともに、一つの 'protein family' を形成している

(Benian et al., 1999, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 138, 235-268)。これらのタンパク質は、有紋筋においてミオシンフィラメントの長さをそろえ、また、筋肉の構造的な収縮単位であるサルコメアにおけるミオシンフィラメントの位置を調節する機能を持っていると考えられてきた (Labeit

& Kolmer, 1995, Science, 270, 293-296. など)。ところが、サルコメア構造がない二枚貝の平滑筋にも twitchin が存在することが明らかになり、その機能は不明とされていた (Vibert et al., 1993, J. Muscle Res. Cell Motil., 14, 598-607.)。

一方、軟体動物二枚貝の平滑筋にはエネルギーをほとんど消費せずに高い張力を維持する状態（「キャッチ状態」と呼ばれている）になることができることが、古くから知られていた。比較的最近になって、脱膜筋標本を使った実験などから、キャッチ状態の調節が twitchin のリン酸化によって行なわれていることが分かってきた (Siegman et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 5383-5388. など)。しかし、筋肉細胞内には様々な要素が含まれていることなどのため、キャッチ状態の分子レベルの実体を明らかにすることはできなかった。

これに対し、我々は、精製したタンパク質（アクチン、ミオシン、twitchin）を使って、twitchin のこの機能を光学顕微鏡観察によって可視化することに成功した (Yamada et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 6635-6640.)。Twitchin のリン酸化の程度によってアクチン-ミオシンフィラメント間の相互作用の強さが変化し、相互作用が強い状態が筋肉のキャッチ状態に対応しているのである。さらに、我々は、この実験系によって、二枚貝の平滑筋だけではなく有紋筋の twitchin も同様の状態になりうることを明らかにし (Tsutsui et al., 2006, J. Mol. Biol., 365, 325-332.)、このキャッチ状態になるという機能がそれまで知られていた以上に普遍的なものであることが分かってきた。Twitchin 類似タンパク質が動物界に広く存在することから、この機能ももっと普遍的なものである可能性があり、もしそうであれば、キャッチ状態に関する研究の意義もより大きなものとなると考えられた。

2. 研究の目的

ミオシンフィラメント上に存在するタンパク質 twitchin は、二枚貝の筋肉においては収縮後にエネルギーをほとんど消費せずに高い張力を維持するキャッチ状態の制御に関与している。二枚貝平滑筋や斜紋筋から精製したミオシンと twitchin、及びウサギ骨格筋から精製したアクチンでキャッチ状態を再構成する手法を用い、キャッチ状態における高い張力の分子レベルでの実体をより詳細に明らかにするとともに、この手法を他の動物組織にも適用することにより、キャッチ状態と同様の状態が動物界の中でどの程度普遍的に存在するかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

精製したタンパク質等を組み合わせて、twitchin がアクチン-ミオシンフィラメント間相互作用の強さを制御する機能を可視化する実験系を応用した実験を行なうこと等により、筋肉の高張力維持に関わるフィラメント間相互作用の分子レベルでの実体の詳細を明らかにし、twitchin によるアクチン-ミオシン相互作用制御の分子モデルを構築する。特に、精製したタンパク質だけで再構成した実験系は他の成分の混在による影響を排除できるため、エネルギー消費などのデータを、脱膜筋標本などよりも正確に取得できると考えられる。また、同様の実験系を、二枚貝以外の twitchin を有する種々の動物の筋肉等の組織に適用し、この twitchin の制御機能の動物界における普遍性を検討する。

4. 研究成果

二枚貝マガキ (*Crassostrea gigas*) の平滑筋と斜紋筋から精製したミオシンと twitchin、ウサギ骨格筋（速筋）から精製してファロイジン存在下で重合させたアクチンフィラメントを用いて、キャッチ状態や弛緩状態などを再構成し、その分子状態を詳細に調べる研究を進めた。特に、これらの状態におけるミオシンの定常状態での ATP 加水分解活性を正確に測定し、比較した結果に注目した。

キャッチ筋の酸素消費量測定などの研究により、キャッチ状態におけるエネルギー消費がかなり低いことが知られていた。しかし、これらの測定法では、筋肉細胞に存在する他の様々な要素によるエネルギー消費も合わせた総エネルギー消費量を観測していることになってしまう。また、一般に、ある時点における酸素消費量は、必ずしもその時点におけるエネルギー消費量と一致するとは限らず、「酸素負債」として後の時点における酸素消費に持ち越されることもある。さらに厳密な議論をすると、エネルギー源として何を使ったのか、ブドウ糖なのか、脂肪酸なのか、などといったことによっても、同じエネルギー量を得るために必要となる酸素量が異なり、誤差を生じることになると考えられる。

我々は、筋肉から精製したタンパク質だけを使って、フィラメントが互いに滑り運動をする「活性化状態」、高い張力を維持する「キャッチ状態」、キャッチが解除された「弛緩状態」、キャッチ状態を構成するために必須のタンパク質 twitchin がいない「完全弛緩状態」をインビトロで再構成した。これらの再

構成系におけるエネルギー消費は酸素などによるものではなく、モータータンパク質であるミオシンが直接行うATPの加水分解によるもののみである。従って、上述のような誤差を生じる様々な要因を排除して、これらの状態におけるエネルギー消費を測定することが可能となった。

「活性化状態」において、斜紋筋のフィラメント滑り運動速度は平滑筋の約5倍であったが、エネルギー消費は約10倍にもなった。「完全弛緩状態」においてもわずかなエネルギー消費が認められたが、それはどちらの筋肉においても「活性化状態」の1000分の1程度であった。注目すべき点は、「キャッチ状態」においても、わずかではあるが、「弛緩状態」よりも高いエネルギー消費があるということであった。それは、どちらの筋肉の場合も「活性化状態」の100分の1程度で、斜紋筋では平滑筋の3~4倍になった。Twitchinがリン酸化されて「弛緩状態」になると、このエネルギー消費はほとんどなくなった。このことは、キャッチ状態を維持するにもエネルギーが必要であり、また、平滑筋をキャッチ状態にするよりも斜紋筋をキャッチ状態にする方が多くのエネルギーを消費することを示している。

ここに、二枚貝が斜紋筋や横紋筋とは別に平滑筋を「キャッチ筋」として進化させてきた理由があったのではないかと考えられた。斜紋筋や横紋筋をキャッチ状態にして貝殻を閉じ続けるよりも、これらとは別に平滑筋を発達させて、それをキャッチ状態にして貝殻を閉じ続けるほうが、全体としてはエネルギー消費が少なく済む、という省エネルギー戦略であったのではないかと考えられた。

このATP加水分解活性測定実験の結果で最も注目すべき点は、上記の「キャッチ状態」における付加的なエネルギー消費が、アクチンフィラメントが存在することによってはじめて出現したことである。我々は、この事実から、「twitchin そのものはミオシン頭部と相互作用しないが、アクチンフィラメントと複合体を作って相互作用し、その際にATP加水分解をわずかに活性化する」という、キャッチ状態の分子機構モデルを提案し、誌上論文に発表した (Yamada et al., 2013, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 34, 115-123.)。

また、これまでに開発した二枚貝の筋肉のキャッチ状態を再構成する手法を、二枚貝以外の主要な綱に属する軟体動物の種から得た組織にも適用した。これらの組織には筋肉細胞も含まれているとされている。特にtwitchin等のタンパク質を精製しなくても判別可能な簡便手法も見出しており (Yamada et al., 2004, *J. Biol. Chem.*, 279, 40762-40768.)、この手法を改良して適用することによって効率的に研究を進め、これら

の動物種にも二枚貝の筋肉のものと同様のフィラメント間相互作用制御機構が存在することを示した。このことにより、この制御機構が、これまでに考えられている以上に普遍的なものであることが明らかになった。

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5件)

- ① Akira Yamada, Energy-saving mechanisms in biological molecular machines, *J. Natl. Inst. Info. Com. Technol.*, 査読無、2014, in press
- ② 山田章, 生体分子の省エネルギーメカニズム, 情報通信研究機構季報, 査読無、59巻、2013、印刷中
- ③ Akira Yamada, Maki Yoshio, Kazuhiro Oiwa, Myosin Mg-ATPase of molluscan muscles is slightly activated by F-actin under catch state in vitro, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 査読有、Vol.34, No.2, 2013, 115-123
DOI:10.1007/s10974-013-9339-8
- ④ Akira Yamada, Masaki Tamori, Tomoaki Iketani, Kazuhiro Oiwa, Tatsuo Motokawa, A novel stiffening factor inducing the stiffest state of holothurian catch connective tissue, *J. Exp. Biol.*, 査読有、Vol.213, 2010, 3416-3422
DOI:10.1242/jeb.044149
- ⑤ 山田章, 二枚貝の筋肉から見えてくるアクチンミオシン系の優れた機能、日本生物物理学会誌「生物物理」、査読無、50巻、2010、122-123
DOI:10.2142/biophys.50.122

[学会発表] (計7件)

- ① 山田章, 棘皮動物コラーゲン性のキャッチ結合組織における可逆的な硬さ変化の分子機構、日本生物物理学会第50回年会、2012年9月23日、名古屋大学 (愛知県)
- ② 山田章, 'Catch mechanism' found in molluscan animals other than bivalves, Biophysical Society 56th Annual Meeting, USA, 2012年2月26日、San Diego Convention center, San Diego, California, USA
- ③ 山田章, キャッチ筋とキャッチ結合組織——2つの生物組織の硬さ変化の分子機構にせまる——、第6回Σ-KARC連携セミナー (招待講演)、2012年2月6日、大阪大学・豊中キャンパス (大阪府)

- ④ 山田章、軟体動物の筋肉のキャッチ状態においてアクチンフィラメントはミオシン頭部のない太いフィラメントにも結合する、生体運動研究合同班会議、2012年1月6日、筑波大学（茨城県）
- ⑤ 山田章、軟体動物の筋肉に見られるキャッチ状態においてアクチンフィラメントはミオシン頭部のない太いフィラメントにも結合する、日本生物物理学会第49回年会、2011年9月18日、兵庫県立大学・書写キャンパス（兵庫県）
- ⑥ 山田章、軟体動物主要綱の「キャッチ機構」、生体運動研究合同班会議、2011年1月7日、大阪市立大学・杉本キャンパス（大阪府）
- ⑦ 山田章、二枚貝以外の軟体動物のキャッチ機構、日本生物物理学会第48回年会、2010年9月20日、東北大学・川内北キャンパス（宮城県）

[その他]

ホームページ等

独立行政法人情報通信研究機構 未来 ICT 研究所 バイオ ICT 研究室 生体物性グループ
ホームページ

http://www2.nict.go.jp/advanced_ict/bio/w131102/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 章 (YAMADA AKIRA)

独立行政法人情報通信研究機構・未来 ICT
研究所 バイオ ICT 研究室・主任研究員
研究者番号：80359075

(2) 研究分担者

なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

吉雄 麻喜 (YOSHIO MAKI)

独立行政法人情報通信研究機構・未来 ICT
研究所 バイオ ICT 研究室・有期技術員