

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570092

研究課題名(和文) キャッチ結合組織の硬さ変化の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the stiffness change of catch connective tissue

研究代表者

田守 正樹 (Tamori, Masaki)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号：50236767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ナマコの体壁真皮はキャッチ結合組織と呼ばれる刺激に反応して硬さが変わる結合組織である。細胞外基質に直接作用して真皮を軟化させる物質は、これまで知られていなかった。我々は強い機械的刺激をあたえると著しく軟化するシカクナマコの真皮から軟化タンパク質を精製し、ソフニン(softenin)と名付けた。ソフニンの分子量は約20 kDaであった。ソフニンは生きた細胞を含んだナマコの真皮だけでなく、細胞を破壊した真皮も軟化させたので、ソフニンは真皮の細胞外基質に直接作用して真皮を軟らかくすると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The holothurian body wall dermis is a catch connective tissue which changes its stiffness in response to stimulation. Substances which soften the dermis by working directly on its extracellular matrix had been unknown. We purified a softening protein from the dermis of a sea cucumber *Stichopus chloronotus* whose dermis dramatically softens in response to strong mechanical stimulation. We named this protein softenin. The apparent molecular mass of softenin is 20 kDa. Softenin softened the fresh dermis which contained living cells. The protein also softened the dermis whose cells had been disrupted. This result suggests that softenin softens the dermis by working directly on the extracellular matrix of the catch connective tissue.

研究分野：動物生理学

キーワード：生理学 動物

1. 研究開始当初の背景

棘皮動物は、可逆的に硬さを変える結合組織を持つ。この結合組織はキャッチ結合組織と呼ばれ棘皮動物の全てのグループに見られる。キャッチ結合組織は棘皮動物に独特の組織で、外界からのさまざまな刺激に反応して硬さを変える。キャッチ結合組織の細胞外成分はコラーゲン繊維やグリコサミノグリカンなどの巨大分子で構成されている。棘皮動物は、キャッチ結合組織を使って低いエネルギー消費で長時間、姿勢を維持することができる。神経伝達物質のアセチルコリンなどをキャッチ結合組織に添加すると急激かつ可逆的な硬さ変化が起きることから、この組織は神経支配で硬さ変化をおこすと考えられている。しかしタンパク質分子レベルでどのような機構で硬さ変化がおきるかは、ほとんどわかっていないかった。

キャッチ結合組織であるナマコの体壁真皮は1個体から得られる量も多くタンパク質の精製などの生化学的な研究むきの実験材料だといえる。以前にアメリカの Trotter らは樹手目のナマコ(*Cucumaria frondosa*)の真皮から真皮を硬くする作用を持つタンパク質(テンシリン; tensilin)を精製していた。我々も楯手目に属するニセクロナマコ(*Holothuria leucospilota*)の真皮からテンシリンを精製することに成功した[<引用文献>]。我々は精製したテンシリンを用いて動的力学試験をおこない、定量的に硬さやエネルギー散逸率(energy dissipation ratio)を測定し、テンシリンはカルシウム欠除海水中で軟らかくなったナマコの真皮を硬くするが、テンシリン単独の作用では真皮は最も硬い状態にはならないことをあきらかにした。以前にナマコの真皮には軟らかい状態、硬い状態の他に力学的に性質の異なる標準状態(軟らかいと硬いの中間の状態)があるというナマコの真皮の硬さの3状態説が提唱されていたが、以上の結果はナマコの真皮を軟らかい状態から標準状態にする硬化因子(即ちテンシリン)と標準状態から硬い状態にする硬化因子が異なることを示しており、3状態説を支持する(図1、参照)。我々は、さらにニセクロナマコの真皮からテンシリンとは異なる硬化因子を部分精製した[<引用文献>]。この「新規硬化因子」は天然海水と等濃度のカルシウムイオンを含む正常人工海水中の真皮、即ち標準状態の真皮を硬くする因子である(図1、参照)。

上記のナマコ以外にも真皮が硬さ変化をおこすものは知られていた。楯手目に属するシカクナマコ(*Stichopus chloronotus*)に強い機械的刺激を与えると、その真皮がドロドロに溶けてしまうことがわかってきた。

2. 研究の目的

我々はタンパク質分子レベルで、どのような機構でキャッチ結合組織の硬さ変化がおこるのかを解明することを目的に本研究を開

始した。本研究では、まず「新規硬化因子」を完全に精製することをこころみだが、それは難しい事がわかった。よって次に硬化因子とは逆のはたらきを持つ軟化因子をナマコから抽出することをこころみた。

3. 研究の方法

軟化因子の抽出には、楯手目に属するシカクナマコ(*Stichopus chloronotus*)の体壁真皮を用いた。シカクナマコを用いたのは、このナマコの体壁真皮が著しく軟化をおこすことから、真皮が大量の軟化因子を含んでいると考えたからである。緩衝液中に浸した真皮をステンレス棒で刺激すると、真皮は急激に軟化した。この真皮の抽出液を陰イオン交換クロマトグラフィーおよび2種類のゲル濾過クロマトグラフィーで精製していくことで軟化因子を追った。抽出液および精製した画分の軟化活性は、動的力学試験により確かめた。試験にはシカクナマコの真皮だけではなく、ニセクロナマコ(*Holothuria leucospilota*)の真皮も用いた。前者は界面活性剤 Triton X-100 処理によって細胞を破壊した真皮「トリトンモデル」を、後者はトリトンモデルだけでなく、トリトンモデルを凍結融解処理して細胞外成分間の相互作用を解除した真皮「トリトン凍結融解モデル Triton-Freeze-Thaw model」(TFT モデル)、そして細胞破壊処理をおこなっていない生きた細胞を含む真皮(fresh dermis)の3種類の試料を用いた。これらの試料に±5%の引張歪みを繰り返し加え、その時に発生する応力を測定した。1周期の歪みでは、引張歪みが最大の時に応力は最大であった。したがって、歪みが+5%の時の応力を1周期中の硬さの指標とした。抽出液および精製物を真皮に投与した時の硬さの変化から軟化活性の有無を判別した。

精製したタンパク質をエドマン分解し、そのN末端アミノ酸配列を解析した。

4. 研究成果

シカクナマコの真皮抽出液には、シカクナマコ真皮のトリトンモデルに対する軟化活性があった。抽出液は細胞外成分に直接作用する軟化因子を含んでいると考え、3段階のカラムクロマトグラフィー(陰イオン交換クロマトグラフィーと2種類のゲル濾過クロマトグラフィー)を使って軟化活性を持つ画分の精製を進めた。カラムクロマトグラフィーを使って精製した画分をSDS-PAGEで泳動した結果、見かけの分子量が20 kDaの単一のバンドを得た。このタンパク質を軟化因子だと見なした。このタンパク質は糖鎖検出試薬で染まったので糖タンパク質である。軟化因子のN末端アミノ酸配列を解析し、17残基分の配列を得た。BLASTを用いて相同性解析を行った結果、この配列と高い相同性を持ち、軟化の作用を説明できるような既知タンパク質は見つからなかった。ゆえに、このタ



図1 ナマコの真皮の硬さの3状態仮説

ンパク質は新発見のものであると考え、キャッチ結合組織を軟化させるというはたらきからソフニン(softenin)と命名した。

ソフニンはシカクナマコ真皮のトリトンモデルだけでなく、ニセクロナマコ真皮のトリトンモデルも軟化させた。この結果は、ソフニンおよび、その相同タンパク質がナマコに広く分布する、共通の軟化因子であることを示唆する。ソフニンは真皮のトリトンモデルだけでなくニセクロナマコの fresh dermis も軟化させた(図2、参照)。よって、細胞の生死とソフニンの軟化活性には関係がない。TFT モデルはトリトンモデルよりも軟らかく、ソフニンを与えても軟化しなかったが、ニセクロナマコ由来の硬化タンパク質テンシリンを投与すると硬くなった(図3、参照)。テンシリンはナマコから単離したコラーゲン原繊維を凝集させる作用があることから、テンシリンがコラーゲン原繊維に直接はたらきかけて真皮を硬化させている可能性が指摘されていたが、この結果はソフニンと同じくテンシリンが細胞外成分に作用していることの初の実験的証拠である。テンシリンの作用で硬化した TFT モデルはテンシリンを除くと、わずかに軟らかくなり、そこにソフニンを加えると急激に軟化した(図3、参照)。これらの結果は、トリトンモデルは標準状態、TFT モデルは軟らかい状態の fresh dermis の力学的状態に対応し、ソフニンが標準状態の真皮を軟らかくすることを示唆している(図1、参照)。

ニセクロナマコの体壁真皮から単離したコラーゲン原繊維を用いて、凝集アッセイをおこなった。以前から知らせていたように、単離したコラーゲン原繊維の懸濁液にテンシリンを加えると原繊維の凝集がおこった[<引用文献>]。テンシリンの作用で凝集した原繊維にソフニンを加えると原繊維は分散した。テンシリンの作用で凝集した原繊維を繰り返し凍結融解しても原繊維は同じように分散した。これらの結果は、テンシリンによってコラーゲン原繊維間に架橋が形成され、凍結融解処理によって架橋が破壊されることおよび、ソフニンが架橋の形成を妨げることによって真皮を軟らかくすることことを示唆する。

本研究をおこなうことによってナマコの真皮から未知の軟化タンパク質ソフニンを精製することができた。ソフニンは図で示したように標準状態の真皮を軟らかくする因子である。また本研究によってソフニンもテンシリンも、ともに細胞外基質に作用して真皮を軟化あるいは硬化させることがあ

らかになった。

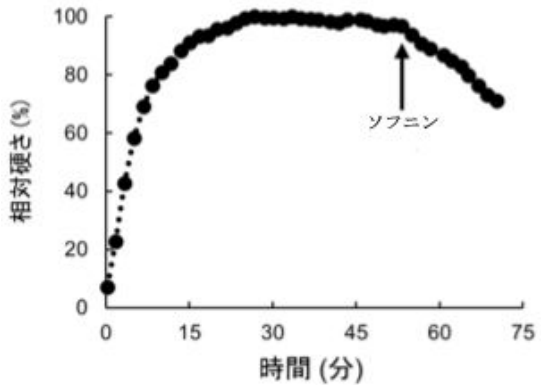
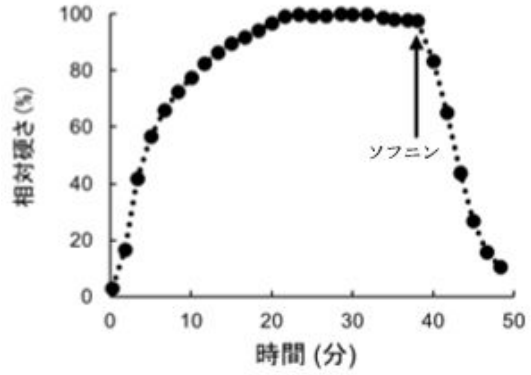


図2 ソフニンはシカクナマコ(上)およびニセクロナマコ(下)の真皮のトリトンモデルを軟化させた

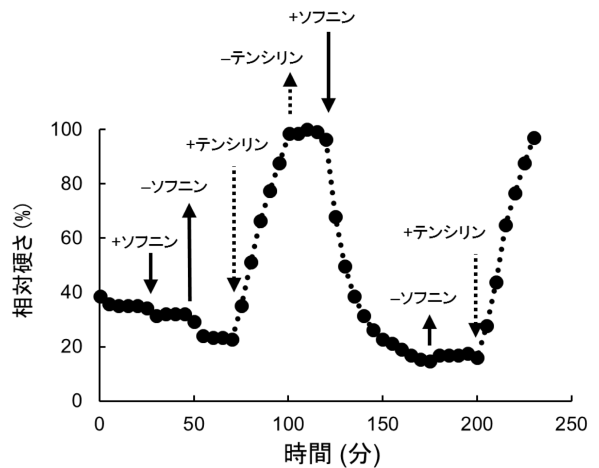


図3 ニセクロナマコの真皮の TFT モデルを用いたソフニンとテンシリンの組み合わせ実験

<引用文献>

Masaki Tamori, Akira Yamada, Naoto Nishida, Yumiko Motobayashi, Kazuhiro Oiwa & Tatsuo Motokawa; Tensilin-like stiffening protein from *Holothuria leucospilota* does not induce the stiffest state of catch connective tissue. Journal of Experimental

Biology, 209, 2006, 1594-1602
Akira Yamada, Masaki Tamori, Tomoaki Iketani, Kazuhiro Oiwa & Tatsuo Motokawa; A novel stiffening factor inducing the stiffest state of holothurian catch connective tissue. Journal of Experimental Biology, 213, 2010, 1960-1966

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)

Maya Mizuno, Akira Yamada, Kaori Fukunaga & Hiroaki Kojima; Far-infrared spectroscopy of salt penetration into a collagen fiber scaffold. Journal of Biological Physics 査読有、印刷中

DOI: 10.1007/s10867-015-9379-y

Yasuhiro Takehana, Akira Yamada, Masaki Tamori & Tatsuo Motokawa; Softenin, a novel protein that softens the connective tissue of sea cucumbers through inhibiting interaction between collagen fibrils. PLoS ONE 査読有、Vol. 9, 2014, e85644

DOI: 10.1371/journal.pone.0085644

山田 章、生体分子の省エネルギーメカニズム、情報通信研究機構研究報告、査読無、59(2)巻、2013、7-12

Akira Yamada; Energy-saving mechanisms in biological molecular machines. Journal of the National Institute of Information and Communications 査読無、Vol. 60(2)、2013、7-12

Akira Yamada, Maki Yoshio & Kazuhiro Oiwa; Myosin Mg-ATPase of molluscan muscles is slightly activated by F-actin under catch state *in vitro*. Journal of Muscle Research and Cell Motility 査読有、Vol. 34、2013、115-123

[学会発表](計 20 件)

田守 正樹、大澤 得二、竹花 康弘、本川 達雄、キャッチ結合組織硬化時の細胞外基質の形態変化、日本動物学会 第 85 回年次大会、2014 年 9 月 11 日～2014 年 9 月 13 日、東北大学川内北キャンパス(宮城県、仙台市)

Akira Yamada, Yasuhiro Takehana, Masaki Tamori & Tatsuo Motokawa; Connective tissues in echinoderm animals that can reversibly change their stiffness and their stiffening protein factors. The 58th Annual Meeting of the Biophysical Society (USA), 2014 年 2 月 19 日、San Francisco, USA

Yasuhiro Takehana, Akira Yamada, Masaki Tamori & Tatsuo Motokawa; A sea-cucumber derived novel protein that softens the cell-disrupted catch connective tissue through inhibiting the interaction between collagen fibrils. The 58th Annual Meeting of the Biophysical Society (USA), 2014 年 2 月 19 日、San Francisco, USA

山田 章、竹花 康弘、田守 正樹、本川 達雄、棘皮動物コラーゲン性のキャッチ結合組織を軟化させる新規タンパク質因子、日本生物物理学会 第 51 回年次大会、2013 年 10 月 28 日、国立京都国際会館(京都府、京都市)

竹花 康弘、山田 章、田守 正樹、本川 達雄、シカクナマコ体壁真皮を軟化させるタンパク質の発見、日本動物学会 第 84 回年次大会、2013 年 9 月 28 日、岡山大学津島キャンパス(岡山県、岡山市)

Maya Mizuno, Akira Yamada, & Kaori Fukunaga; Terahertz spectroscopic analysis of collagen fibers in the presence of salts. The 38th International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz waves, 2013 年 9 月 5 日、Maintz, Germany

Maya Mizuno, Akira Yamada, & Kaori Fukunaga; Analysis of absorption properties and behavior of collagen fibers in terahertz band. BioEM2013, 2013 年 6 月 12 日、Thessaloniki, Greece

Maya Mizuno, Akira Yamada, & Kaori Fukunaga; Experimental observation of collagen fibers denaturation using terahertz spectroscopy. International Workshop on Optical Terahertz Science and Technology, 2013 年 4 月 2 日、京都府、京都市

竹花 康弘、山田 章、田守 正樹、本川 達雄、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 第 65 回関東支部大会、2013 年 3 月 16 日、東京工業大学大岡山キャンパス(東京都)

小嶋 寛明、平林 美樹、榊原 齊、山田 章、田中 秀吉、水野 麻弥、福永 香、テラヘルツ技術とバイオ標準技術との融合 テラヘルツ波の産業応用の可能性、テラヘルツ研究センター設置記念講演会、2013 年 1 月 16 日、イイノ&カンファレンスセンター(東京都)

山田 章、竹花 康弘、田守 正樹、本川 達雄、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 回年次大会、2012 年 9 月 22 日～2012 年 9 月 24 日、名古屋大学東山キャンパス(愛知県、名古屋市)

竹花 康弘、山田 章、田守 正樹、本川 達雄、シカクナマコ体壁から得た体壁

を軟化させる因子、日本動物学会 第 84 回年次大会、2012 年 9 月 13 日、大阪大学豊中キャンパス（大阪府、大阪市）

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 -KARC 連携セミナー、2012 年 2 月 6 日、大阪大学豊中キャンパス（大阪府、大阪市）

Masaki Tamori; Recent studies on echinoderm connective tissues. 第 3 回 JAMBIO フォーラム、2012 年 1 月 21 日、東京大学（東京都）

竹花 康弘、池谷 知昭、山田 章、田守 正樹、本川 達雄、細胞を破壊したキャッチ結合組織（ナマコ真皮）に対する抽出物の効果、日本動物学会 第 82 回年次大会、2011 年 9 月 21 日、旭川クリスタルホール（北海道旭川市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田守 正樹 (TAMORI, Masaki)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教
研究者番号：50236767

(2) 研究分担者

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・主任研究員
研究者番号：80359075

(3) 連携研究者

()

研究者番号：