

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570097

研究課題名(和文)細胞運動制御の新展開：筋収縮調節タンパク質トロポニンによる細胞運動の制御

研究課題名(英文)Regulation of cell motility by troponin, a calcium-regulatory protein.

研究代表者

大日方 昂 (Obinata, Takashi)

千葉大学・融合科学研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：40012413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：クマムシでは咽頭以外の全身の非横紋運動細胞のアクチン線維ネットワークにトロポニン(Tn)の存在を免疫染色法により明らかにし、アクチン線維を分離シムノプロット法によりTnIバンドを同定した。次に、最も原始的な後口動物である棘皮動物有柄ウミユリ及び半索動物ギボシムシの平滑筋でTnの有無を検討、いずれの筋でもTnを欠損するがパラミオシン(PM)の存在を見いだした。棘皮動物ウニ、ナマコ筋での知見と併せ、後口動物の進化過程では、PMを保持しながらTnを欠損するグループ(棘皮動物と半索動物)とTnを保持しながらPMを欠損するグループ(原索動物～脊椎動物)とに分かれたであろうことを提起した。

研究成果の概要(英文)：Troponin is known as a Ca²⁺-dependent regulator of striated muscle contraction. In this study, we revealed the following. 1) Troponin is localized along actin filament networks of non-striated muscles of tardigrade (water bear) with the antibody against troponin I (TnI) and a TnI band was specified in a SDS-PAGE pattern of isolated actin filaments by western blotting. 2) Non-striated muscle of sea lily that constitutes most basal group of extant echinoderms as well as non-striated muscle of acorn worm, a member of hemichordates, lack a troponin-regulatory system, while they contain paramyosin. Echinoderm and hemichordate muscles are quite different from the muscles of other chordates (ascidian, amphioxus and vertebrates), but seem more like the muscles of protostomes, although echinoderms and hemichordates are categorized in deuterostomes together with chordates.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学；動物整理；行動

キーワード：筋収縮制御 細胞運動 トロポニン トロポミオシン アクチン ミオシン パラミオシン カルシウム制御

1. 研究開始当初の背景

筋収縮・弛緩は細胞内 Ca イオン濃度の変化によって制御されるが、この制御を担う Ca イオン受容蛋白質・トロポニン_Iは、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) 一般的には、横紋筋特有の収縮制御因子と考えられた。また、脊椎動物横紋筋トロポニン_Iは筋収縮を抑制するが Ca イオン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た。ところが、1970年代に、原索動物ホヤ平滑筋に、トロポニン_Iの存在が見いだされ、さらにホヤ類の平滑筋、横紋筋に存在するトロポニン_Iが過去に知られたトロポニン_Iの特性とは異なり、Ca イオン依存的に筋収縮を促進する「アクセル型特性」をもつことが明らかにされた。また、線虫の生殖巣に存在する筋上皮細胞 (筋様細胞) のアクチンネットワークにトロポニン_I成分 (トロポニン_C およびトロポニン_I) が存在し、排卵の制御に不可欠な役割を果たすことが知られた。一方、後口動物の進化の初期段階に位置する棘皮動物のウニやナマコの筋は、後口動物としては例外的にトロポニン_Iをもたず、パラミオシンをもつことが知られた。これらのことから、非横紋筋細胞におけるトロポニン_Iの存在はどれだけ普遍的か、機能の特性はどうか、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。また、後口動物の進化過程でのトロポニン_Iの発現と機能的多様性がどう生じてきたかも関心事として浮上した。

2. 研究の目的

非横紋性運動細胞をもつ種々の動物をモデルにして、アクチン線維系にトロポニン_Iがどう普遍的に存在し機能的な役割を果たすかを解析すること、後口動物の進化過程でのトロポニン_Iの発現と機能の多様化を探ること、特に進化の最も初期段階にある後口動物を対象に調べること、さらに無脊椎動物でトロポニン_Iの機能に影響を及ぼす可能性がある蛋白質について検討することも目的にした。

3. 研究の方法

(1) クマムシの非横紋筋細胞の解析

ごく微小な動物の故、運動細胞の分離は不可能なので、多数の動物を顕微鏡下で集め、① SDS 溶液で抽出した全蛋白質、② 動物をホモジェナイズして、弛緩溶液 (ATP と EGTA を含む低塩溶液) でアクチン線維を解離させて分離し回収した天然アクチン線維の構成蛋白質を SDS-PAGE で分離、抗トロポニン_I (TnI) 抗体、抗アクチン抗体を用いたウエ

スタンブロット法で解析した。一方、スライド上に張りつけて凍結切断したクマムシを用いてアクチン線維とトロポニン_I (TnI) の局在パターンを間接蛍光抗体法で解析した。

(2) 有柄ウミユリ (トリノアシ) とギボシムシの非横紋筋の収縮制御蛋白質の解析

トリノアシ筋は筋の間の微小な筋を顕微鏡下で、ギボシムシの筋は吻、襟部、体幹部から摘出、抽出全蛋白質を SDS-PAGE と抗パラミオシン抗体、抗アクチン抗体を用いたウエスタンブロット法で解析、さらにホモジェナイズした筋から弛緩溶液 (ATP と EGTA を含む低塩溶液) でアクチン線維を解離させて分離、回収した天然アクチン線維の構成蛋白質を SDS-PAGE とウエスタンブロット法で解析、さらにアクチン線維とミオシンとの相互作用の Ca イオン感受性を ATPase 測定で調べた。

(3) 線虫 (*C. elegans*) のカルポニン類似タンパク質 UNC-87 の機能特性の解析

組み替え UNC-87 蛋白質は大腸菌発現系で作成、線虫ミオシン、ウサギミオシン、ウサギアクチンは既知の方法で組織から抽出精製。UNC-87 とミオシンの結合は低速遠心の共沈法で、UNC-87 のアクチン-ミオシン相互作用への効果は ATPase 測定で、UNC-87-アクチン-ミオシンの複合体形成は蛍光標識アクチン線維に他の2つの蛋白質を混合、蛍光顕微鏡で観察、解析した。

4. 研究成果

(1) クマムシの非横紋筋細胞におけるトロポニン_Iの検出 (詳細は Obinata T et al BioArchitecture 1: 96-102, 2011 を参照)

まず、顕微鏡下で微小なクマムシを集め、約100個体から抽出した全蛋白質を SDS-PAGE とウエスタンブロット法で調べたところ、図1に示すように、抗アクチン抗体では分子量約42,000の単一バンドが、抗線虫 TnI 抗体 (回虫の TnI に対して作成された抗体) で分子量約31,000の単一のバンドが検出された。このサイズは、線虫の TnI よりやや小さいが、種々の動物の TnI のサイズに近いもので、クマムシの TnI と同定された。そこで、さらに、一般にトロポニン_Iをもつアクチン線維が運動装置から解離する (筋肉が弛緩する) 条件、即ち、カルシウムキレート剤 (EGTA) と ATP を含む生理的塩濃度の溶液中でクマムシをホモジェナイズするとアクチン線維が解離し、超遠心で回収された。このアクチン線維に TnI が存在することが SDS-PAGE とウエスタンブロット法で確認された。クマムシの TnI、TnC については適切な抗体が無く、未解析である。

そこで、更にクマムシ非横紋運動細胞におけるトロポニン_Iが、細胞内でどのように局在しているかを明らかにするために、抗線虫

TnI 抗体を用いて、以下の手順により、蛍光抗体法で調べた。まず、クマムシを Poly-L-lysine でコーティングしたスライドガラス上におき、カバーガラスを乗せて軽く抑えて扁平にし、ドライアイスで急速凍結し割断、4% PFA (パラフォルムアルデヒド) 溶液で固定、最後に抗 TnI 抗体およびファロイジン染色。この手法が極めて有効であることが解った。

凍結割断されたクマムシを、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にある非横紋性の筋細胞がもつアクチン線維のネットワーク (ローダミン標識ファロイジンで可視化される) と同様のパターンで TnI が存在することが認められた (図 1、右図)。ただ、咽頭部 (図では星印でマーク) ではアクチンが明瞭に検出されるのに、抗 TnI 抗体では染色されなかった。咽頭部には TnI が存在しないか、別の抗原性をもつ TnI が存在する可能性もある。

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。材料の量的な制約の故、これ以上の解析はできなかったが、成果を論文発表した。

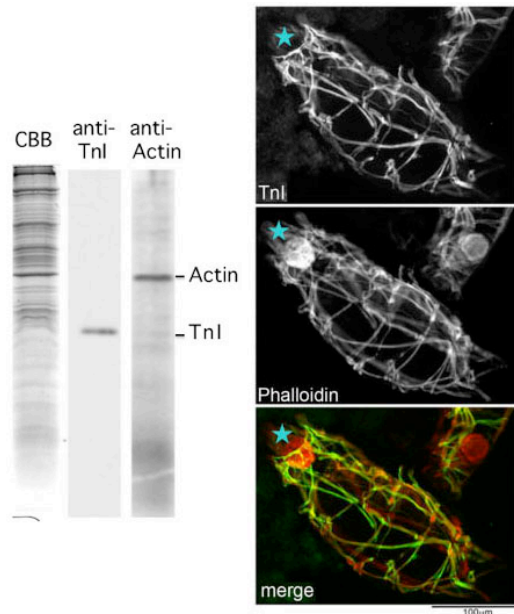


図 1. 左図:クマムシ全蛋白質を SDS-PAGE パターン (左) と抗 TnI 抗体 (中央)、抗アクチン抗体 (右) を用いたウエスタンブロット法解析。右図:クマムシ体幹部の抗 TnI 抗体染色像 (上段) とローダミンファロイジン染色でみたアクチン線維の存在パターン (中段)。下段は merge 像:赤はローダミンファロイジン、緑は TnI。★は咽頭、ここには TnI が検出されない

(2) 棘皮動物および半索動物の筋の運動制御蛋白質の解析

最も原始的な棘皮動物 (最も原始的な後口

動物でもある) である有柄ウミユリ類であるトリノアシの非横紋筋、および半索動物であるギボシムシの非横紋筋を採取、天然アクチン線維を分離し、そこにトロポニンがあるかどうかを SDS-PAGE で解析するとともに、天然アクチン線維がミオシン Mg²⁺-ATP アーゼを Ca イオン依存的に活性化するか否かを解析した。トリノアシの筋の全抽出蛋白質の SDS-PAGE パターンを他の棘皮動物 (ウニ、ナマコ) と比較すると、全般に類似しているがトリノアシの場合アクチンの存在量が相対的に多い特徴がある (図 2、A 図)。トリノアシの筋、ギボシムシの筋のいずれでも分離した天然アクチン線維にトロポミオシンは存在するがトロポニンは検出されなかった (トリノアシのアクチン線維については (図 2、B 図参照)。トリノアシの筋、ギボシムシの筋から得た天然アクチン線維をミオシンに加えるとミオシン Mg²⁺-ATP アーゼが Ca イオン非依存的に著しく活性化されるのが見られた (図 2、C 図参照)。トロポニンの欠損がアクチン線維の機能面からも確認された。一方、パラミオシンは既に作成してあったウニパラミオシンに対する抗体 (ナマコパラミオシンにも反応する) を用いて、トリノアシの筋、ギボシムシの筋のいずれにもパラミオシンの存在が確認された (図 2、A 図の PM 表示のバンドがパラミオシン)。サイズは約 100 kDa、ミオシンより多量に存在することが明らかになった。

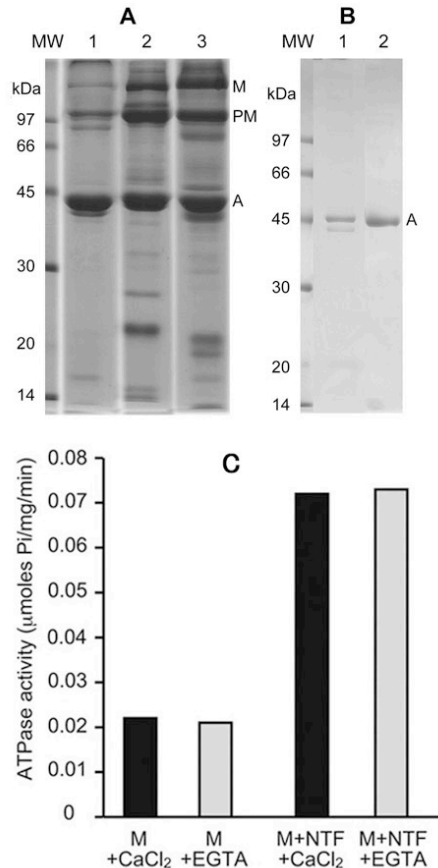
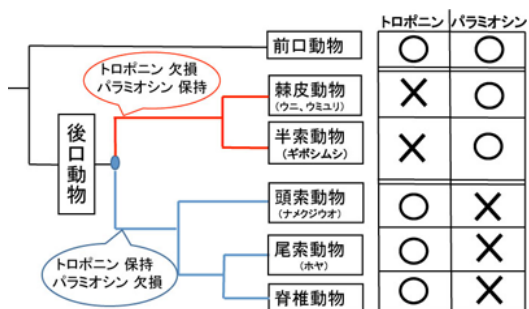


図 2. A 図: トリノアシ (lane 1)、ウニ (lane 2)

2)、ナマコ (lane 3) の筋構成蛋白質の SDS-PAGE パターン。M: ミオシン、PM: パラミオシン、A: アクチン。B 図: トリノアシの分離アクチン線維 (lane 1) とアクチンマーカー (lane 2)。C 図: トリノアシの分離アクチン線維 (NTF) による Ca イオン非依存的なミオシン ATPase の活性化

図 3 に示すように、後口動物の進化の過程で、パラミオシンを保持しながらトロポニンを欠損するグループ (棘皮動物と半索動物) と、トロポニンを保持しながらパラミオシンを欠損するグループ (原索動物~脊椎動物) とに分かれたであろうと結論された。トリノアシに関しては、詳細は Obinata T. et al Zool. Sci. 31: 122-128, 2014 を参照。ギボシムシについては近々公表の予定。



棘皮動物、半索動物の筋肉は脊索動物と異なる方向に多様化した

図 3. 後口動物の進化過程での筋におけるトロポニンとパラミオシンの発現変化を示す模式図

(3) プラナリア非横紋筋のトロポニン

体幹部に非横紋筋細胞をもつプラナリアのトロポニンの機能と存在様式の解析のために、天然アクチン線維の分離に成功した。このアクチン線維はミオシン ATPase 活性を顕著に高めることが確認されたが、Ca イオンの有無による違いは見られなかった。これはプラナリアが強いプロテアーゼをもつことから、アクチン線維にトロポニンがあったとしても、分解により活性を失ったと見なされた。トロポニンを認識できる抗体がないこと、生体から抽出蛋白質にトロポニンのバンドの確認も困難であった。しかし、ゲノム情報をもとに、トロポニン 3 成分 (TnT, TnI, TnC) の cDNA プローブを作成して、RT-PCR 法で解析を行った結果、プラナリア非横紋筋細胞でトロポニン 3 成分 (TnT, TnI, TnC) が発現されていることが確認された。また、TnC に関しては Ca イオン感受性をもつ組み替え蛋白質が作成され、その存在が実証された。

(4) 線虫 (*C. elegans*) のカルポニン類似タンパク質 UNC-87 の機能特性について

脊椎動物では、カルポニンが平滑筋と非筋細胞に存在しアクチン-ミオシン相互作用に抑制的に働くことがわかっている。線虫には、カルポニンと類似したドメイン構造をもつカルポニン類似タンパク質 (UNC-87) が横紋筋にも存在する。単一の UNC-87 遺伝子から生ずる 2 つのアイソフォーム (UNC-87L と UNC-87S) がある。両者はほとんど同一の構造をもつが、UNC-87L は、N-端領域に UNC-87S にはない若干の伸長部位をもつ。UNC-87 がアクチン線維に結合することは既に知られているが、機能的役割は解明されていない。UNC-87 がアクチン線維結合蛋白質であることから、同じくアクチン線維に結合して働くトロポニンによる制御系に影響を与える可能性も念頭に UNC-87 の機能特性を調べた。

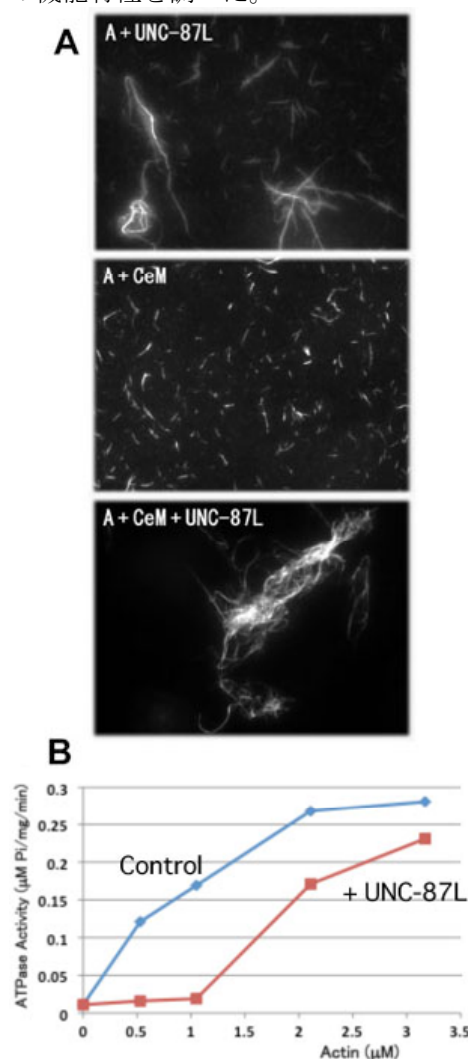


図 4: A 図 蛍光標識アクチン線維に UNC-87L を添加 (上段)、蛍光標識アクチン線維に線虫ミオシンを添加 (中段)、蛍光標識アクチン線維に線虫ミオシン、更に UNC-87L を添加 (下段) 場合の蛍光顕微鏡像。B 図 アクチンによるミオシン ATPase 活性化に対する UNC-87 の効果。測定条件: 0.42 μM ミオシン, 0.96 μM UNC-87L, 0~3.5 μM アクチン, 67 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM ATP, pH 7.5

UNC-87LとUNC-87Sを大腸菌発現系で作成、まず、UNC-87のミオシンとの相互作用の有無を調べた。ウサギのミオシンまたは線虫のミオシンをUNC-87LまたはUNC-87Sと混合し、しばらくおいてから低速遠心すると、UNC-87L、UNC-87Sいずれもがウサギのミオシンまたは線虫のミオシンと共に沈殿することが認められた。この条件ではUNC-87単独では沈殿しないことから、UNC-87L、UNC-87Sいずれもがウサギのミオシン、線虫のミオシンと結合して複合体を作ることが明らかになった。更に、ミオシン、アクチン線維、UNC-87LまたはUNC-87Sを混ぜると、ミオシンとアクチン線維、アクチン線維とUNC-87を混ぜたときは異なる大きな集合体を形成することが顕微鏡下で観察された(図4A)。ミオシンとアクチン線維の複合体がATP添加で解離する条件においてもミオシン-アクチン線維-UNC-87の複合体は解離しないので、UNC-87がミオシンとアクチン線維を架橋するものと結論された。更に、UNC-87はアクチンによるミオシンATPaseの活性化に抑制的に働くことが明らかになった(図4B)。UNC-87の2つのアイソフォームはほとんど同様の機能をもつが、UNC-87LはUNC-87Sより強い活性をもつことも解った。以上をまとめると、UNC-87(カルポニン類似タンパク質)は、① アクチンのみならず、ミオシンとも結合し両者を架橋すること、② アクチン-ミオシン相互作用に抑制的に働くこと、が結論された。なお、トロポニンによるCa依存的なアクチン-ミオシン相互作用の制御にUNC-87がどう影響を与えるかは今後の課題である。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者に下線)

(1) 雑誌論文 (計4件)

① Obinata T., Amemiya S., Takai R., Ichikawa M., Toyoshima Y. Y. and Sato N. Sea lily muscle lacks a troponin-regulatory system, while it contains paramyosin. *Zool. Sci.* 31(3), 2014, 122-128 (査読あり). doi: 10.2108/zsj.31.122

② Obinata T. and Sato N. Comparative studies on troponin, a Ca^{2+} -dependent regulator of muscle contraction, in striated and smooth muscles of protochordates. *Methods* 56(1), 2012, 3-10 (査読あり). doi: 10.1016/j.ymeth.2011.09.026

③ Miyauchi-Nomura S., Obinata T. and Sato N. Cofilin is required for organization of sarcomeric actin filaments in chicken skeletal muscle cells. *Cytoskeleton*, 69,

2012, 290-302 (査読あり)
doi: 10.1002/cm.21025

④ Obinata T., Ono K. and Ono S. Detection of a troponin I-like protein in non-striated muscle of the tardigrades (water bears). *BioArchitecture* 1(2), 2011, 96-102 (査読あり). doi: 10.4161/bioa.1.2.16251

(2) 学会発表 (計5件)

① 大日方昂, 佐藤成樹, 高井亮介, 雨宮昭南 ウミユリ類トリノアシ筋の蛋白質の特徴 日本動物学会第84回大会 2013年9月26日 岡山 岡山大学津島キャンパス

② 三森あい, 大日方昂, 高井亮介, 佐藤成樹 プラナリアトロポニンの発現部位の解析 日本動物学会第84回大会 2013年9月26日 岡山 岡山大学津島キャンパス

③ 大日方昂, 山城佐和子, 斧加奈子, 劉中美, 斧正一郎 Functional properties of UNC-87, a calponin-related protein, in *C. elegans* 日本細胞生物学会第65回大会 2013年6月19日 名古屋 愛知県産業労働センター

④ 大日方昂, 山城佐和子, 斧加奈子, 劉中美, 斧正一郎 線虫 (*C. elegans*) のカルポニン類似タンパク質 UNC-87 の機能特性 日本動物学会第83回大会 2012年9月13日 大阪 大阪大学

⑤ 大日方昂, 佐藤成樹 筋収縮制御蛋白質トロポニンの新展開-機能の多様性と新たな機能的役割 日本動物学会第82回大会シンポジウム 最先端の筋肉研究 2011年9月21日 旭川 旭川市クリスタルホール

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大日方 昂 (Obinata Takashi)
千葉大学・大学院融合科学研究科・名誉教授
研究者番号: 40012413

(2) 研究分担者

佐藤 成樹 (Sato Naruki)
千葉大学・大学院融合科学研究科・講師
研究者番号: 40261896

(3) 研究協力者

斧 正一郎 (Ono Shoichiro)
Emory University, Atlanta, USA
Associate Professor