最近の研究から

マイクロビームを用いた昆虫飛翔筋の進化の
過程に関する構造研究

高輝度光科学研究センター利用研究促進部門 岩本裕之, 井上勝晶, 八木直人

Hiroyuki IWAMOTO, Katsuaki INOUE and Naoto YAGI: Evolution of Insect Flight Muscle Structure as Studied by Using X-ray Microbeams

X-ray diffraction patterns were recorded from the frozen-hydrated myofibrils of insect flight muscle. X-ray microbeams, generated at the high-flux BL40XU beamline of SPring-8, were irradiated along the myofibrillar axis so that the diffraction patterns were recorded from single myofibrils (diameter, $2 \sim 3 \mu\text{m}$). A total of 50 insect species, covering all the major winged insect orders, were examined. The results show that insects with an asynchronous flight muscle operation have giant single-crystal type myofibrils, in which the orientations of the myofilament lattice planes are preserved along their entire length. The functional significance of having such a highly regular structure is discussed.

1. はじめに

約3億5000万年前に出現した昆虫は、現在地球上で最も種類数の多いという点で最も繁栄した生き物である。そして地上で昆虫のいない空間を探すのが困難なくらい、あらゆる環境に適応して生息している。昆虫は進化の非常に早い段階でヒトなどの脊椎動物と分岐したもので、多くの点で脊椎動物とは非常に違った体のデザインを取り入れている。外骨格の採用、ガスを細部まで直接供給する呼吸様式、変態などがそれである。しかし非常に似ているのが筋肉の基本構造で、ヒトの骨格筋も昆虫の筋肉も横紋筋と呼ばれる共通の構造をもつ(図1)。細長い横紋筋

細胞の中には、径 $1 \sim 3 \mu\text{m}$ の筋原繊維と呼ばれるものがぎっしりつまっている。1本の筋原繊維は、筋節と呼ばれる収縮機能の最小単位(長さ $2 \sim 3 \mu\text{m}$)が直列に多数つながってできている。光学顕微鏡で観察すると、この筋節の横並びが横縞のように見えるのがその名の由来である。横紋筋はクラゲ(腔腸動物)のような非常に原始的な動物にも見られ、脊椎動物と昆虫が分岐する以前から用いられていた非常に古いデザインと考えられる。また細胞内カルシウム濃度を変えて収縮・弛緩を制御する点も共通である。運動神経のインパルスによって筋細胞膜が興奮し、細胞内のカルシウム貯蔵部位(筋小胞体)からカルシウムイオンが放出される。弛緩時には筋小胞体のカルシウムポンプによって筋細胞質中からカルシウムイオンが汲み出される。これらの機構も昆虫と脊椎動物で共通である。

2. 横紋筋のX線回折

脊椎動物の骨格筋にX線を照射すると数多くの反射を生じる。それらは骨格筋細胞内にある各種の収縮タンパクの規則的な配列に由来する。まず、収縮タンパクのアクチンとミオシンは、異なるらせん対称性をもった筋フィラメントを形成している。このため回折像中に2種のらせん周期に対応する層状の反射(層線反射)が生じる(図2A)。この層線反射の強度分布はらせんのフーリエ変換であるベッセル関数で表され、基本的に連続関数である。また、筋フィラメント同士は六角格子状に配列しているため、これに由来する強度の高いブラッグ反射が赤道方向に生じる(赤道反射)。

図1 脊椎動物骨格筋と昆虫飛翔筋の構造。(Structures of vertebrate skeletal muscle and insect flight muscle.)

図2 従来法による脊椎動物骨格筋と昆虫飛翔筋のX線回折像。(X-ray diffraction patterns from vertebrate skeletal muscle and insect flight muscle, recorded by a conventional method.) (A) ウサギ骨格筋, (B) ガガンボ(ハエ目)の飛翔筋. A, Mはそれぞれアクチン, ミオシンフィラメント由来の層線反射で, 数字は次数.

3. 昆虫飛翔筋の特徴

3.1 同期型動作と非同期型動作

昆虫が地球上に繁栄した理由は, 飛翔能力の獲得と体の小型化であろう. 昆虫は3億5000万年前, まだ鳥も翼竜もいなかったころから地球の空を飛び回っていた. また現在知られる最小の昆虫は体長が0.18 mmしかなく, 単細胞生物のゾウリムシより小さい. これら2つの特徴により, 昆虫はあらゆる生息環境に分布を広げることができたのであろう.

昆虫が飛ぶのに用いる筋肉, すなわち飛翔筋も横紋筋であり, その構造も初期には体壁筋と変わらなかったと考えられる. しかし, 体の小型化に伴って昆虫は大きな問題に直面し, その解決のため飛翔筋は横紋筋の基本構造を保ったまま, 機能的にも構造的にも特殊化することになった.

その問題とは小型化によって高い周波数で羽ばたく必要が生じたことで, その周波数は小型の蚊の仲間でも最高1000 Hzに達する.¹⁾先に述べた筋小胞体からのカルシウムイオンの放出・再取り込みで収縮弛緩を制御する方式で実現できる羽ばたきの周波数は100 Hzが限度と言われる. 実際, より原始的なバッタなどはこの方式で羽ばたいている. このタイプの昆虫の神経インパルスと羽ばたきは完全に同期しているため, 同期型と呼ばれる(図3A).

しかし, 100 Hzより高い周波数で動作させるには筋小胞体と, カルシウムポンプにエネルギー(ATP)を供給するミトコンドリアが非常に発達する必要がある. 肝心の収縮装置を収容する場所がなくなってしまう. そこで, 蚊を含む進化した昆虫ではいくつかの戦略の組み合わせでこの問題を解決している.

まず, これらの昆虫が飛ぶとき, 飛翔筋は基本的に収縮したままであり, その収縮状態は羽ばたきより低い頻度

図3 同期型(A)と非同期型(B)飛翔筋の動作の概念図。(Schematic diagram of action of synchronous and asynchronous flight muscles.) SPring-8 ホームページより改変.

図4 伸長による活性化(stretch activation, SA)と, 2種の拮抗筋の動作概念図。(Schematic diagrams of stretch activation and the two antagonistic muscles.) 長さは上が伸長方向. 実際は矩形波で駆動されているわけではない.

の神経インパルスによって維持されていて, 細胞内カルシウム濃度も一定である. こうすることで羽ばたきごとにカルシウムの放出・汲み上げを行う必要がなくなり, 筋小胞体も発達せずミトコンドリアも収縮装置にエネルギーを供給するだけでよい. この方式は羽ばたきと神経インパルスの周波数が一致しないので, 非同期式と呼ばれる(図3B). 次に, 収縮状態のままで羽ばたくことができるように, 飛翔筋は収縮中に自律振動する機能を備えている. 自律振動には2つの機構が関係している. 1つは間接飛翔筋で, 飛翔筋が胸部の外骨格を変形させることで間接的に羽を動かす方式である. 間接飛翔筋には胸部を前後方向に走るdorsal longitudinal muscle (DLM)と, 背腹方向に走るdorsoventral muscle (DVM)の2種があり, これらは互いに拮抗筋(一方が縮むと他方が伸ばされる)である. 2つ目はstretch activation (SA, 伸長による活性化)で, 筋肉を外から引っ張ると遅れて強い力を発生する性質である(図4).

逆に短縮させると、遅れて収縮力が減少する。それで拮抗筋の一方が他方により引き伸ばされると、SAにより発生した力で相手を引き伸ばし返すが、自身は短縮して力を失い再び相手により引き伸ばされる。これを繰り返して羽ばたきを持続することができる。

3.2 Stretch activation (SA) の分子機構

SA を可能にする分子機構として「マッチーミスマッチ仮説」が提唱されている。²⁾ これはミオシン・アクチンの分子が互いにきわめて精密に配置されているため、ある筋節長では分子の相互作用 (すなわち力発生) がほとんど起こらず、それより筋節をわずかに伸長すると相互作用する分子の数が劇的に増えるというものである。

これを少し詳しく説明すると、ミオシンもアクチンもらせん状のフィラメントを形成しているため、筋節の中でミオシン分子があるアクチン分子の近くにあっても、お互いが相互作用できるように向き合っているとは限らない。アクチンフィラメントの中で、アクチン分子がうまくミオシンフィラメントのほうを向いている領域を「ターゲットゾーン」という。1本のミオシンフィラメントの周りには6本のアクチンフィラメントがあり、それをミオシンフィラメントのほうからぐるりと回ってながめると、ターゲットゾーンもらせん状に配置している (図5)。ある長さでは、どのミオシン分子もターゲットゾーンから離れているため、アクチンと相互作用できるものはほとんどない (図5A)。しかしこれを約2 nm引き伸ばすだけで多くのミオシン分子がターゲットゾーンに入り、相互作

図5 「マッチーミスマッチ仮説」に基づく stretch activation の分子機構. (Molecular mechanism of stretch activation based on the “match-mismatch hypothesis”.) 1本のミオシンフィラメントを取り巻く6本のアクチンフィラメント (灰色) をミオシン側から眺めたところ。ターゲットゾーンにあるアクチン分子を白丸、ミオシン分子の位置を小さな黒丸、また実際に相互作用できる位置にあるミオシン分子を大きな黒丸で表す。(A) の長さで相互作用できるものはほとんどないが、20 nm伸長すると (B) 多くの分子が相互作用できるようになる。

用するものが圧倒的に増加する (図5B)。この「マッチーミスマッチ仮説」は、実際に電子顕微鏡下でミオシン分子がターゲットゾーンに選択的に結合する様子が観察されること³⁾、飛翔筋の長さを変えていくと張力が3.8 nm (アクチンフィラメントのらせんピッチ) ごとに周期的に変化すること⁴⁾ から支持されている (ただし反論もある。これについては最後に簡単に述べる)。

上の「マッチーミスマッチ仮説」によれば、SAが起こるためには収縮タンパクの配列が三次元空間的に高い規則性 (つまり結晶性) をもつ必要がある。結晶のX線回折像の特徴はラウエ関数で表現される離散的なブラッグ反射である。実際、昆虫飛翔筋試料として最もよく用いられてきたタガメ飛翔筋では、赤道反射だけでなく層線反射 (特に低次の層線) も離散的なブラッグ反射列になることが知られており、その筋節がそれ自身1個のタンパク単結晶とみなせることがわかっていた。昆虫飛翔筋の回折像の例を図2Bに示す。また昆虫飛翔筋にはアクチン・ミオシン間の相互の位置関係を保つのに役立つ特別な構造がある。それは筋節の境界にあるZ膜 (図1参照) とミオシンフィラメントを結ぶC-フィラメントという短く強固な弾性タンパクのフィラメントである。このC-フィラメントのため、昆虫飛翔筋は脊椎動物骨格筋のように自由に長さを変えることはできない。

4. 単一筋原繊維のX線回折像

さて、ここからわれわれの研究の話に入る。筋肉は古くからX線回折実験の試料として用いられてきた。実験室のX線発生器の時代には筋肉1本をまるごと用いるのが普通で、第2世代放射光施設の時代に入っても単一筋細胞 (径100 ~ 200 μm) が最小であった。第3世代放射光施設のSPring-8が利用可能になったとき、その可能性を追求するため小角散乱ビームラインBL45XUにおいて筋細胞内の単一の筋原繊維 (径2 ~ 3 μm) から回折像の記録を試みた。

試料はマルハナバチの飛翔筋である。昆虫飛翔筋を選んだのは、上記のように高い規則性により強い反射が得られると期待したからである。単離した筋原繊維は取扱が難しく、単結晶性のためX線を繊維軸に直角に当てる通常の方法ではすべての反射が同時に記録できないという困難が予想された。そこで、筋原繊維の径以下 (径2 μm) のX線マイクロビームを作り、繊維軸に平行に当てることで (エンドオン照射) 筋細胞中の1本の筋原繊維を狙い撃ちし、すべての反射を同時記録することにした (図6)。この方法で記録されるものは赤道反射と同等だが、ブラッグ反射ではなく平面回折格子からの回折像に近い。X線の進行方向のコヒーレンス長は短いので異なる筋節間の干渉は起こらず、筋細胞内に並んだ個々の筋節からの独立な回折像が強度加算されて記録されると考えられる。

単一の筋節のエンドオン回折像に期待されるのは六角

図6 X線マイクロビームによる単一筋原繊維のエンドオン回折像記録。(End-on diffraction pattern recorded from a single myofibril by using an X-ray microbeam.) SPring-8 ホームページより改変.

図7 1本の筋原繊維内の筋節の格子面の配列。(Possible patterns of arrangement of sarcomere lattice planes within a single myofibril.) (A) は全長にわたって格子面が揃っている場合, (B) は格子面がまったくランダムな場合. 予想される回折像を右の円内に示す. 文献7) より改変.

格子状に並んだ一群のスポット反射であるが, 筋節が多数直列に並んだ筋原繊維の場合はいくつかのケースが考えられる(図7). 図7Aのようにすべての筋節の格子面が揃っていれば単一六角格子の反射が観察されるはずだが, 筋フィラメントはZ膜により分断されているため, 格子面は図7Bのようにずれて粉末回折のような同心円の反射になると予想した.ところが実際に測定すると単一六角格子の反射が記録され, 格子面は図7Aのように筋原繊維の全長にわたって完全に揃っていることが判明した.⁵⁾ 筋原繊維の全長が3 mm程度あり, この中には1000個もの筋節があることを考えれば, この規則性の高さは驚くべきものである. 昆虫飛翔筋では個々の筋節が結晶性であるだけでなく, 筋原繊維全体が1個のタンパク巨大単結晶とみなせる構造をとっているのである.

5. 筋原繊維結晶性の系統進化

上の測定に用いたマルハナバチは最も進化した昆虫の1つであったのだが, 次の疑問は筋原繊維の巨大単結晶構造が進化の過程でどのように生じてきたかということであった. 巨大単結晶型は, 進化した非同期型の昆虫に限られるのだろうか? そこで, 原始的なものから進化したものまで, できるだけ多くのグループの昆虫から飛翔筋をとり, マイクロビーム回折法により構造を調べることにした.

上の測定では筋細胞をそのまま常温において測定して

図8 各種昆虫の急速凍結筋原繊維のエンドオン回折像。(End-on diffraction patterns recorded from quick-frozen myofibrils from various insects.) (A) マルハナバチ (ハチ目), (B) フトハチモドキバエ (ハエ目), (C) ウリハムシ (甲虫目), (D) クロカミキリ (甲虫目), (E) アオクサカメムシ (カメムシ目), (F) ハルゼミ (カメムシ目), (G) エゾギクキンウワバ (チョウ目), (H) ホシヒメホウジャク (チョウ目スズメガ科), (I) ショウリョウバッタ (バッタ目), (J) ミヤマカワトンボ (トンボ目). SPring-8 ホームページより改変.

いたが, 試料の状態が不安定で照射損傷を受けやすいという問題があった. そこで試料を急速凍結し, そのまま低温(液体窒素温度)で測定する方法を開発した.⁶⁾ これによって試料の安定性が大幅に増すとともに照射損傷にも格段に強くなり, 高輝度ビームラインBL40XUでのハイスループット測定が可能になった.

このようにして, 主要な有翅昆虫のすべての目にわたる50種の昆虫から飛翔筋筋原繊維のエンドオン回折像を記録した.⁷⁾ 代表的なものを図8に示す. ハチやハエ, 甲虫やカメムシ類の回折像はいずれも明瞭な単一六角格子の特徴を示し, 巨大単結晶型の筋原繊維をもつことがわかる(図8A~E). 個々の反射もシャープで, 格子面間隔も揃

図9 エンドオン回折像の角度自己相関関数の例 (ハルゼミ). (Example of the angular autocorrelation function of an end-on diffraction pattern (cicada).) 回折像 (A) の2,0 反射領域を直線状に展開したのが (B)、その反射強度分布の鳥瞰図 (C)、角度自己相関関数の鳥瞰図 (D)。ランダムに反射スポットが並んでいるように見えるが、正確に60度ごとの位置にピークがあり、少数 (3 個) の単一六角格子のパターンが重なっているのがわかる。

っていることがうかがえる。これらの昆虫はいずれも非同期型の飛翔筋をもつ。それに対して、ガやバッタなどでは回折像がまけた同心円状であり、格子が揃っていないうえ格子面間隔のバラつきも大きいことがわかる (図8G, I)。これらの昆虫は同期型の飛翔筋をもつ。

また筋原繊維構造の長距離規則性を客観的に評価するため、マイクロビームに対して試料をXY方向に一定間隔でスキャンし、得られた100枚以上の回折像すべてを解析した。その解析項目の1つは角度自己相関関数

$$f(\theta) = \int_0^{360} I(x) \cdot I(x+\theta) dx$$

である。これは回折像の中で最も強度の高い2,0 反射を含む散乱角での散乱強度 I を円周に沿って測定し、ある角度 (θ) 離れた2点の散乱強度の積を全円周に沿って積分したものである (図9)。この関数が60度のところにピークをもつとき、ある場所にピークがあればその60度先にもピークがある傾向を示していて、六角格子の特徴と判断される。多数のピークがランダムにあるように見えても、自己相関関数の60度のところにピークがあれば、小数の六角格子の回折像が重なっていることが予測される。また自己相関関数の60度ピークの高さと反射のシャープさ (半値幅の逆数) の間には正の相関が認められた。

このようないくつかのパラメータから総合的に判断したとき、同期型飛翔筋をもつ種であっても規則性の高さに日本結晶学会誌 第48巻 第5号 (2006)

関して中間型が存在することが明らかになった。その1つはトンボ目で、最も原始的な有翅昆虫と考えられているが、回折像は明瞭な六角格子の特徴を示す (図8J)。またガの仲間是一般的に格子の規則性が低い、スズメガ科だけは回折像が比較的少数の六角格子に由来することを示し、反射も比較的シャープである (図8H)。これらの昆虫はいずれも飛翔に強く依存した生活形態をもっている。

また、セミは典型的な巨大単結晶型昆虫のカメムシ類と同じ目に属するが飛翔筋は同期型である。セミの飛翔筋筋原繊維の格子構造規則性はスズメガより高く、まれに単一六角格子由来の回折像が記録されることもある (図8F)。さらに通常法の回折実験で、筋節内の収縮タンパクの結晶性もカメムシ類と同じように高い (岩本ら、未発表)。セミがいずれ非同期型の昆虫へ進化していく途上にあるのかはわかっていない。

6. 巨大単結晶型筋原繊維の意義

これまでの話をまとめると、同期型飛翔筋をもつ昆虫の筋原繊維の規則性は低いものが多いが、一部には部分的な規則性を発達させているものもある。他方、非同期型飛翔筋をもつ昆虫の筋原繊維は調べた限りでは例外なく巨大単結晶型である。非同期型飛翔筋は進化の途上で異なる種群に独立に何回も生じたと考えられている。それにもかかわらず、非同期型飛翔筋は結晶性の筋節やC-フィラメントの存在など、多くの特徴を共有している。そして今回、巨大単結晶型という特徴も共有することがわかった。非同期型の飛翔筋が巨大単結晶型の構造をもつ意義とは一体何であろうか？

前に述べた「マッチーミスマッチ仮説」によれば、非同期型動作に必要なSAにはアクチン・ミオシン間の厳密な分子配列が必須である。それらの位置関係を厳密に保つのに有用な構造がミオシンフィラメントとZ膜を結ぶC-フィラメントである。連続切片の電顕観察で調べられたミツバチ飛翔筋のZ膜はC-フィラメントとアクチンフィラメントを組み込んだ幾何学的精度の高い六角格子で、⁸⁾これが正確には半ピッチずつ平行移動させながら筋フィラメントの格子面を隣の筋節に伝達する構造となっている。今回の結果は、この伝達がわずかの欠陥もなく、1000個先の筋節まで驚異的な精度で行われることを示している。また非同期型飛翔筋のもう1つの共通点は筋原繊維同士横のつながりがなく、1本1本が力学的に独立している点である。このような構造では、途中に不連続な箇所 (例えば格子面の回転) があればそこに応力が集中して筋原繊維が破断する可能性もある。力学特性を均一に保つうえでも巨大単結晶型は有利なのかもしれない。

しかし「マッチーミスマッチ仮説」には異論もある。Squireによると、1本のミオシンフィラメントを考えれば確かに「マッチーミスマッチ仮説」は成り立つかもしれない

いが, 周りのミオシンフィラメントの位置はずれているので発生張力は平均化されてしまうのだという。⁹⁾ Squire は, 代わりに筋収縮調節タンパク (カルシウムの有無により収縮弛緩を調節するタンパク) がSAに関係する可能性を述べている。その1つがカルシウム受容タンパクのトロポニンCであるが, タガメは飛翔筋にだけカルシウム結合能のない分子種を多く発現し, これがカルシウムの代わりに伸長によって飛翔筋を活性化するという。¹⁰⁾ この分子種のホモログ (相同タンパク) はほかの非同期型昆虫でも見ついている。トロポニンCに力学感受性があるかは不明だが, SAに収縮調節タンパクも関係していることは確からしい。

7. おわりに

3億5000万年の進化の過程が作り出した昆虫の非同期型飛翔筋は, 生体システムとして非常に完成度の高いものである。そして今回, 巨大単結晶性という新たな驚きがある。しかし, これによって飛翔筋の進化メカニズムの謎はかえって深まったのかもしれない。系統の異なる種群に独立に出現したにもかかわらず, 非同期型飛翔筋は上に述べた多数の特徴を必ずセットにもつ事実の説明は容易ではない。そしてさらに今回そのリストに1品目追加したことになる。しかしこの謎を解き明かすことは, ヒトを含めたあらゆる生物の進化メカニズムの理解につながる。なぜなら昆虫もヒトも, 同じ地球上でともに進化してきた生き物なのだから。

文 献

- 1) R. K. Josephson, J. G. Malamud and D. R. Stokes: *J. Exp. Biol.* **203**, 2713 (2000).
- 2) J. S. Wray: *Nature* **280**, 325 (1979).
- 3) R. T. Tregear, M. C. Reedy, Y. E. Goldman, K. A. Taylor, H. Winkler, C. Franzini-Armstrong, H. Sasaki, C. Lucaveche and M. K. Reedy: *Biophys. J.* **86**, 3009 (2004).
- 4) R. H. Abbott and P. E. Cage: *J. Muscle Res. Cell Motil.* **5**, 387 (1984).

- 5) H. Iwamoto, Y. Nishikawa, J. Wakayama and T. Fujisawa: *Biophys. J.* **83**, 1074 (2002).
- 6) H. Iwamoto, K. Inoue, T. Fujisawa and N. Yagi: *J. Synchrotron Rad.* **12**, 479 (2005).
- 7) H. Iwamoto, K. Inoue and N. Yagi: *Proc. R. Soc. Lond. B* **273**, 677 (2006).
- 8) J. F. Deatherage, N. Cheng and B. Bullard: *J. Cell Biol.* **108**, 1775 (1989).
- 9) J. M. Squire: *J. Muscle Res. Cell Motil.* **13**, 183 (1992).
- 10) B. Agianian, U. Krzic, F. Qiu, W. A. Linke, K. Leonard and B. Bullard: *EMBO J.* **23**, 772 (2004).

プロフィール

岩本裕之 Hiroyuki IWAMOTO
(財)高輝度光科学研究センター
Japan Synchrotron Radiation Research Institute,
SPring-8
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5198,
Japan
e-mail: iwamoto@spring8.or.jp
専門分野: X線繊維回折

井上勝晶 Katsuaki INOUE
(財)高輝度光科学研究センター
Japan Synchrotron Radiation Research Institute,
SPring-8
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5198,
Japan
e-mail: katsuino@spring8.or.jp
専門分野: X線小角散乱

八木直人 Naoto YAGI
(財)高輝度光科学研究センター
Japan Synchrotron Radiation Research Institute,
SPring-8
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5198,
Japan
e-mail: yagi@spring8.or.jp
専門分野: 非結晶X線回折