受賞者総説

二枚貝キャッチ収縮の制御機構に関する生化学的研究

(平成 15 年度日本水産学会賞奨励賞受賞)

船 原 大 輔*

三重大学生物資源学部

Studies on the regulatory mechanisms involved in catch
contraction of molluscan smooth muscles

DAISUKE FUNABARA*

Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu, Mie 514-8507, Japan

二枚貝閉殻筋やムラサキガイ前足牽引筋 (ABRM) は、長時間にわたって張力を発生し続けることができる。¹⁾ この現象は古くから知られ、その様子がまるで止め金 (キャッチ) で留めたようであることから、キャッチ収縮と名付けられた。この特異な筋収縮現象は、多くの筋生理学者や筋生化学者の関心を誘い、その詳細を解明するために数多くの研究がこれまでに行われてきた。しかしながら未だに全貌の解明には至っていない。特に制御機構に関しては、謎が多く残された状態である。そこで本研究では、キャッチ収縮の制御機構を明らかにすることを目的とし、制御タンパク質の同定を足がかりにして、その分子メカニズムの解明を試みた。

1. キャッチ収縮研究

キャッチ筋は典型的な平滑筋である。キャッチ筋は、アセチルコリンの分泌に伴って細胞内カルシウム濃度が上昇し、カルシウムが直接結合することで活性化したミオシンとアクチンが滑り運動を起こして収縮を開始し、張力を発生する。²⁾ その後、細胞内カルシウム濃度が減少するとキャッチ状態に入り、長時間にわたって張力を発生し続けるが、その間エネルギーはほとんど消費されない。³⁾ キャッチ状態のミオシンは、カルシウムが遊離して不活性化していると考えられている。キャッチ状態はセロトニンの分泌によって解除され、筋肉は張力を失う。その際細胞内に cAMP の蓄積がみられ、それによって cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 (A キナーゼ) が活性化すると考えられている。⁴⁾ したがって、キャッチ解除には A キナーゼによって筋原線維タンパク質がリン酸化されることが必須であると考えられた。す

なわち A キナーゼの標的タンパク質がキャッチ収縮の制御因子であり、その同定がキャッチ収縮制御を解明するために求められた。しかしながら、同定は困難を極め、代表的なキャッチ筋構成タンパク質であるパラミオシン、⁵⁾ ミオシン重鎖⁶⁾ およびミオシン軽鎖⁷⁾ がその候補として報告されたものの、いずれも *in vivo* における決定的な証拠がなく、長い間キャッチ収縮制御タンパク質は不明のままであった。このことが原因で、キャッチ収縮の研究は停滞し、最近までほとんど新しい知見が報告されない状況であった。

2. キャッチ収縮制御タンパク質の同定

このような背景の下、キャッチが解除される際に特異的にリン酸化される成分が ABRM スキンドファイバーを用いた実験で特定された。⁸⁾ すなわち、放射能標識した [γ -³²P]ATP の存在下で、ABRM のキャッチを解除させた後、そのホモジネイトを SDS-PAGE およびオートラジオグラフィーに供したところ、600 kDa のタンパク質に特異的に ³²P の取り込みが認められた。そこで、600 kDa 成分がキャッチ収縮制御タンパク質であると考え、まずその同定を試みた。600 kDa 成分は分子量から、ミニタイチンあるいは twitchin と呼ばれる巨大タンパク質の関連タンパク質と予想された。既報のホタテガイ・ミニタイチンの精製法に従ってムラサキガイ ABRM から精製を試みた結果、単一成分として 600 kDa 成分が得られた。⁹⁾ 精製標品につき、アミノ酸組成、部分アミノ酸配列、および cDNA クローニングによる部分一次構造の解析を行ったところ、線虫 *Caenorhabditis elegans twitchin* をはじめとするタイチン

* Tel : 81-59-231-9564. Fax : 81-59-231-9557. Email : funabara@bio.mie-u.ac.jp

/コネクチンファミリータンパク質と高い相同性を示し、twitchin と同定された。¹⁰⁾ twitchin は、無脊椎動物筋肉に広く存在する筋原線維タンパク質で、特に *C. elegans* の twitchin 欠損株には、横紋筋組織に横紋構造が存在せず、正常に筋収縮ができないことから、筋収縮制御に何らかの役割を果たしていると考えられていたが、¹¹⁾ 生体内における機能が具体的に明らかになったのはこれが初めてであった。

3. ムラサキイガイ ABRM twitchin の性状

3'および5'RACE法を用いたcDNAクローニングにより全一次構造を決定したところ、ムラサキイガイ ABRM twitchin は4736アミノ酸残基から構成される分子量53万の1本のポリペプチド鎖であることが分かった。¹²⁾ モチーフ構造は、イムノグロブリンおよびフィブロネクチンタイプ3様モチーフの繰り返しと、キナーゼドメインから構成されており、線虫 twitchin¹³⁾ や同じファミリーに属するアメリカザリガニ・プロジェクトン¹⁴⁾ とよく似た構造を示した。

twitchin 精製標品につき *in vitro* リン酸化アッセイを詳細に行ったところ、twitchin はAキナーゼによって迅速にリン酸化され、反応開始後すぐに最大リン酸化量に達した。¹⁵⁾ これは、キャッチ状態の解除が速やかに起きる事実とよく一致した。リン酸化量は twitchin 1 モルあたり3モルと算出され、リン酸化部位が複数存在することが示唆された。リン酸化 twitchin のトリプシン完全消化物からリン酸化ペプチドを単離してN末端アミノ酸配列分析を行ったところ、主要と思われる2つのリン酸化部位 D1 および D2 が同定された。¹⁵⁾ それらはAキナーゼの典型的な認識配列をもち、twitchin 分子中、D1 がN末端から7と8番目、またD2 がC末端から3と4番目のイムノグロブリン様モチーフをつなぐ非常に柔軟な領域に存在することが分かった。¹²⁾ D1 あるいはD2 リン酸化部位を特異的に認識する抗体の存在下で行った *in vivo* 張力測定実験で、D1 および D2 の両方がキャッチ収縮制御に関与している可能性が示唆された。¹²⁾ しかしながら、リン酸化部位のリン酸化、脱リン酸化が twitchin の構造にどのような変化をもたらすのか、また、その変化がキャッチ制御にどのような役割を果たしているのか、詳細は現在のところ不明である。今後、さらなる研究が必要である。D1 リン酸化部位周辺のモチーフ構造は、Cタンパク質のそれとよく似ており、機能の類似性が示唆された。¹²⁾ Cタンパク質はミオシンフィラメントを束ねる構造的機能を有すると考えられているものの、¹⁶⁾ 未だ不明な点が多く、真の機能については明らかでない。ABRM twitchin の解析を通じてCタンパク質の機能も明らかにできる可能性がある。

キナーゼドメインは、タイチン/コネクチンファミ

リータンパク質に共通に存在するミオシン軽鎖キナーゼ触媒部位と高い相同性を有する領域で、本ドメインを有する twitchin やその関連タンパク質がキナーゼ活性を有すること、また自己リン酸化することが報告されている。¹⁷⁻¹⁹⁾ そこで、ムラサキイガイ twitchin のキナーゼ活性について検討するために、種々の条件下で実験を行ったところ、ABRM twitchin はリン酸化能をもたないことが示された。¹⁵⁾

4. カルボニンによる筋収縮制御の可能性

キャッチ収縮制御が twitchin のリン酸化を通して行われていることが明らかになり、スイッチのオン・オフのように、キャッチ収縮制御を明快に説明できるようになった。ところで、脊椎動物平滑筋でラッチ機構と呼ばれるキャッチ収縮とよく似た現象が観察されることが知られている。²⁰⁾ ラッチ機構がキャッチ収縮と同様に twitchin もしくはその関連タンパク質によって制御されているかどうかは全く不明であるが、現在のところラッチ機構の制御因子の1つとして筋原線維タンパク質の1つであるカルボニンが報告されている。²¹⁾ カルボニンはニワトリ平滑筋で発見されたアクチン結合タンパク質で、細いフィラメントに結合することで筋収縮を制御していると考えられている。²²⁾ ラッチとキャッチが似た現象を示すということは、似たような制御を受けている可能性を示唆しており、したがってキャッチ収縮制御にカルボニンが関与していることが十分に考えられた。しかしながら、カルボニンはいくつかの無脊椎動物で発現が確認されているものの、^{23,24,25)} 二枚貝などの軟体動物での存在の有無は不明であった。そこで、ムラサキイガイ ABRM 筋原線維を二次元電気泳動で展開したところ、主要構成タンパク質であるミオシン重鎖、ミオシン軽鎖、アクチン、パラミオシン、およびトロポミオシンのほかに、約45 kDaの未知成分のスポットが確認された。²⁶⁾ この45 kDa タンパク質を各種クロマトグラフィーを用いてABRMから単離した。部分アミノ酸配列分析した結果、既報の他生物種由来のカルボニンと高い相同性を示し、またウェスタンブロッティングで市販の抗カルボニン抗体と反応性を示し、45 kDa タンパク質はカルボニンと同定された。cDNA クローニングによる全一次構造解析の結果、ABRM カルボニンは403アミノ酸残基からなり、分子量は45万と推定された。²⁷⁾モチーフ構造は、他生物種由来カルボニンと同様にカルボニンホモロジドメインとカルボニンドメインから構成されていた。ABRM カルボニン存在下でアクトミオシン Mg^{2+} -ATPase 活性を測定したところ、カルボニン濃度依存的に活性が阻害されることが明らかとなり、²⁶⁾ ABRM カルボニンと脊椎動物カルボニンが同様の機能を有していることが示唆された。したがって、

ABRM カルボニンがキャッチ収縮制御に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。カルボニンの機能解析も、キャッチ収縮の制御機構の全貌を明らかにする上で重要であると思われる。

おわりに

キャッチ収縮が発見されてからおよそ1世紀が経った。長い間キャッチ収縮研究の進展はみられなかったが、本研究の成果によって、全貌解明へ向けて再び歩み出すことができた。筆者は本研究をさらに推し進め、twitchin やカルボニンがどのタンパク質とどのように相互作用して収縮を制御しているのかを明らかにしていきたいと考えている。キャッチ収縮が脊椎動物平滑筋のラッチ機構と類似点が多いことも非常に興味深く、本研究で蓄積されつつある知見が、医学的にも関心の高いラッチ機構の解明にも貢献できるのではないかと期待している。

謝 辞

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科渡部終五教授の御指導と御鞭撻の下に遂行されたものであり、ここに深甚なる謝意を表する。また、共同研究者として貴重な御助言や実験の御指導を頂いたアメリカ合衆国ジェファーソン医科大学 Marion J. Siegman 教授および Thomas M. Butler 教授、ならびにアリゾナ大学 David J. Hartshorne 教授に衷心より感謝する。さらに、本研究を御支援していただいた三重大大学生物資源学部加納哲教授に御礼申し上げる。最後に、実験等で御協力頂いた東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物工学研究室および三重大大学生物資源学部生体高分子化学研究室内の諸氏に心から感謝する。

文 献

- 1) Winton FR. The changes in viscosity of an unstriated muscle (*Mytilus edulis*) during and after stimulation with alternating, interrupted and uninterrupted direct currents. *J. Physiol.* 1937; **88**: 492–511.
- 2) Szent-Györgyi AG, Chantler PD. Control of contraction by calcium binding to myosin. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C (eds) *Mycology*, McGraw Hill, New York, 1994; 506–528.
- 3) Watabe S, Hartshorne DJ. Paramyosin and the catch mechanism. *Comp. Biochem. Physiol.* 1990; **96B**: 639–646.
- 4) Achazi RK. 5-HT induced accumulation of 3',5'-AMP and the phosphorylation of paramyosin in the ABRM of *Mytilus edulis*. *Malacologia* 1979; **18**: 465–468.
- 5) Watabe S, Tsuchiya T, Hartshorne DJ. Phosphorylation of paramyosin. *Comp. Biochem. Physiol.* 1989; **94B**: 813–821.
- 6) Castellani L, Cohen C. Myosin rod phosphorylation and the catch state of molluscan muscles. *Science* 1987; **235**: 334–337.
- 7) Sohma H, Yazawa M, Morita F. Phosphorylation of regulatory light chain a (RLC-a) in smooth muscle myosin of scallop, *Patinopecten yessoensis*. *J. Biochem.* 1985; **98**: 569–572.
- 8) Siegman MJ, Mooers SU, Li C, Narayan S, Trinkle-Mulcahy L, Watabe S, Hartshorne DJ, Butler TM. Phosphorylation of a high molecular weight (~600 kDa) protein regulates catch in invertebrate smooth muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1997; **18**: 655–670.
- 9) Vibert P, Edelstein SM, Castellani L, Elliott BW Jr. Minittins in striated and smooth molluscan muscles: structure, location and immunological crossreactivity. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1993; **14**: 598–607.
- 10) Siegman MJ, Funabara D, Kinoshita S, Watabe S, Hartshorne DJ, Butler TM. Phosphorylation of a twitchin-related protein controls catch and calcium sensitivity of force production in invertebrate smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; **95**: 5383–5388.
- 11) Waterston RH, Thomson JN, Brenner S. Mutants with altered muscle structure of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 1980; **77**: 271–302.
- 12) Funabara D, Watabe S, Mooers SU, Narayan S, Dudas C, Hartshorne DJ, Siegman MJ, Butler TM. Twitchin from molluscan catch muscle: primary structure and relationship between site-specific phosphorylation and mechanical function. *J. Biol. Chem.* 2003; **278**: 29308–29316.
- 13) Benian GM, Kiff JE, Neckelmann N, Moerman DG, Waterston RH. Sequence of an unusually large protein implicated in regulation of myosin activity in *C. elegans*. *Nature* 1989; **342**: 45–50.
- 14) Oshino T, Shimamura J, Fukuzawa A, Maruyama K, Kimura S. The entire cDNA sequences of projectin isoforms of crayfish claw closer and flexor muscles and their localization. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2003; **24**: 431–438.
- 15) Funabara D, Kinoshita S, Watabe S, Siegman MJ, Butler TM, Hartshorne DJ. Phosphorylation of molluscan twitchin by the cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* 2001; **40**: 2087–2095.
- 16) Davis JS. Interaction of C-protein with pH 8.0 synthetic thick filaments prepared from the myosin of vertebrate skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1988; **9**: 174–183.
- 17) Heierhorst J, Probst WC, Vilim FS, Buku A, Weiss KR. Autophosphorylation of molluscan twitchin and interaction of its kinase domain with calcium/calmodulin. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 21086–21093.
- 18) Heierhorst J, Probst WC, Kohanski RA, Buku A, Weiss KR. Phosphorylation of myosin regulatory light chains by the molluscan twitchin kinase. *Eur. J. Biochem.* 1995; **233**: 426–431.
- 19) Maroto M, Vinos J, Marco R, Cervera M. Autophosphorylating protein kinase activity in titin-like arthropod projectin. *J. Mol. Biol.* 1992; **224**: 287–291.
- 20) Dillon PF, Aksoy MO, Driska SP, Murphy RA. Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle. *Science* 1981; **211**: 495–497.
- 21) Haeberle JR. Calponin decreases the rate of cross-bridge cycling and increases maximum force production by smooth muscle myosin in an *in vitro* motility assay. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 12424–12431.
- 22) Takahashi K, Hiwada K, Kokubu T. Isolation and characterization of a 34,000-dalton calmodulin- and F-actin-

- binding protein from chicken gizzard smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986; **141**: 20–26.
- 23) Irvine M, Huima T, Prince AM, Lustigman S. Identification and characterization of an *Onchocerca volvulus* cDNA clone encoding a highly immunogenic calponin-like protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1994; **65**: 135–146.
- 24) Royuela M, Fraile B, Picazo ML, Paniagua R. Immunocytochemical electron microscopic study and Western blot analysis of caldesmon and calponin in striated muscle of the fruit fly *Drosophila melanogaster* and in several muscle cell types of the earthworm *Eisenia foetida*. *Eur. J. Cell Biol.* 1997; **72**: 90–94.
- 25) Yang W, Zheng YZ, Jones MK, McManus DP. Molecular characterization of a calponin-like protein from *Schistosoma japonicum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1999; **98**: 225–237.
- 26) Funabara D, Nakaya M, Watabe S. Isolation and characterization of a novel 45-kDa calponin-like protein from anterior byssus retractor muscle of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish. Sci.* 2001; **67**: 511–517.
- 27) Funabara D, Nakaya M, Watabe S. Molecular characterization of calponin from molluscan catch muscle. *Fish. Sci.* 2002; **68**: supplement II, 1609–1610.