

生体分子の省エネルギーメカニズム

山田 章

我々の腕や脚の筋肉は、たとえば重いものを持ち続けるといった、力を維持するというこのためには多くのエネルギーを消費し、そのために疲労してしまうことは周知の事実である。ところが、二枚貝の貝柱は、貝殻を閉じる筋肉であるが、貝殻を閉じた状態を低エネルギー消費で長時間にわたって維持し続けるという機能も持ち合わせている。この機能がタンパク質分子の相互作用に起因することが示され、その実態が明らかになってきた。

1 まえがき

限られたエネルギーをいかに有効に使うのかということは、今の社会にとっても極めて重要な問題である。生物の世界においてもしかりであり、40億年もの進化の歴史において、さまざまなエネルギー有効利用、省エネルギーの戦略が獲得されてきた。タンパク質分子などの生体分子を人工デバイス構築の素材として利用する技術を開発するという立場においても、また、長い進化の歴史を持つ天然の生体分子が有するエネルギー戦略からこれからのさまざまな技術開発のヒントを得るという立場においても、生体分子の省エネルギーメカニズムを研究することは重要な意味を持っている。

そのような生物の省エネルギーメカニズムの中で、我々は、二枚貝の筋肉に見られる、「キャッチ」と呼ばれるメカニズムの仕組みについて研究を続けてきている。「キャッチ」とはどのようなものなのか、まずはその概要を解説し、次に我々が取り組んできた「キャッチ」機構の機能再構成技術の開発について述べる。そして最後に、この研究開発から得られた知見をもとに、二枚貝が進化の過程でとってきた生存戦略についても考察したい。

2 二枚貝の貝柱は性質が異なる複数の筋肉から成る

アサリやハマグリなどの二枚貝を煮たり焼いたりすると、貝殻が大きく開く。これは、二枚の貝殻をつなぐ蝶番が弾性を持っており、外力が働かない場合には貝殻が開いてしまうようになっているからである。ところが、貝が活着している時は、貝殻はほとんど閉じられた状態に維持されているのが普通である。この貝殻を閉じるのは筋肉である貝柱なのであり、これが、常

時、力を維持することによってこの状態を維持しているのである^[1]。この状態は、ちょうど、我々が重い物体を持ち上げ続けているという状態に相当する。これを続けていれば、筋肉はエネルギーをどんどん使って、疲れてしまうのは誰しも経験したことがあるであろう。ところが、貝のある種の筋肉はエネルギーをほとんど消費しないことが、古くから知られていた^[2]。しかし、それが生体分子のレベルでどのような仕組みになっているのかがわかってきたのは、ここ15年ぐらいのことである。

生きている貝の貝柱を見ると、多くの場合、2つの部分から成り立っていることが分かる^[3]。図1に、食用にもなっている2種類の貝を示してある。図の左は我々が実験にもよく使用しているマガキ（学名：*Crassostrea gigas*）で、1本の貝柱が黄色がかった円形に近い部分と白色の三日月形の部分とから成っている。図の右はホタテガイの仲間のヒオウギガイ（学名：*Mimachlamys nobilis*）である。大きな黄色がかった円形の部分のわきに、小さな白色の部分がある。これらは、マイクロメーターレベルの微細構造が異なっていることがわかっている（図2）。白色の部分は、両種とも平滑筋で、黄色がかった部分は、マガキでは斜紋

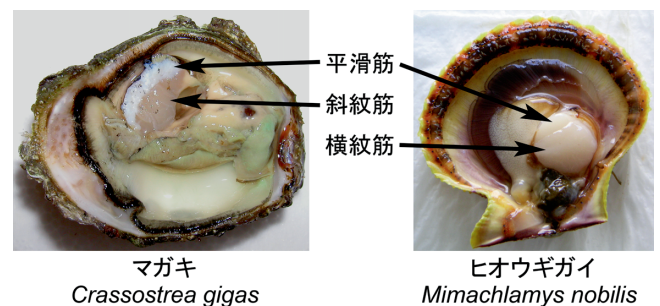


図1 マガキ（左）とヒオウギガイ（右）の貝柱の筋肉
両者の白色の部分は平滑筋、マガキの黄色がかった部分は斜紋筋、ヒオウギガイの黄色がかった部分は横紋筋である。

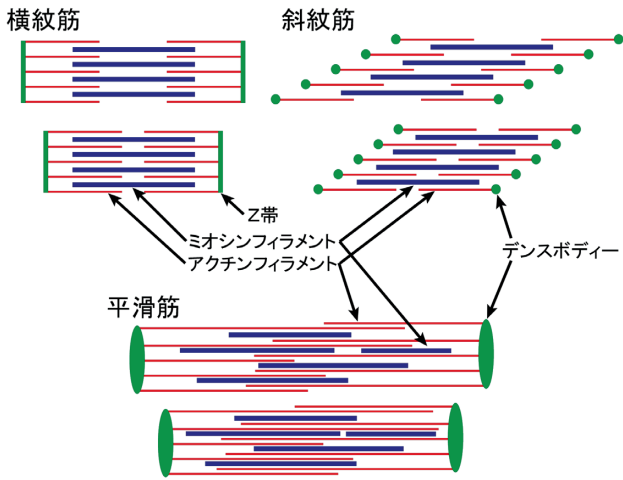


図2 横紋筋、斜紋筋、平滑筋の微細構造の模式図
いずれも、ミオシンフィラメント（青色）とアクチンフィラメント（赤色）というタンパク質の繊維状構造の束からなっているが、その配置が異なる。それぞれにおいて、筋肉が収縮する前（上）と後（下）を示してある。ミオシンフィラメントとアクチンフィラメントが互いに滑りあうことで、筋肉が収縮する。この時に、ATPの加水分解によるエネルギーを消費する。

筋、ヒオウギガイでは横紋筋である。

筋肉の細胞の中では、ミオシンフィラメント（図2、青色）とアクチンフィラメント（図2、赤色）というタンパク質の繊維構造が多数集まって束になっている。筋肉が収縮するとき、すなわち筋肉の「活性化状態」においては、これらのフィラメントが互いに滑り合うのである。この時にはエネルギーの供給が必要で、アデノシン三リン酸（ATP）が加水分解されてアデノシン二リン酸（ADP）に変換される化学変化によって供給される。この滑り運動は、筋肉から取り出したタンパク質を使って再構成することができ、その運動を光学顕微鏡で観察することができる（図3）。ここではアクチンフィラメントには蛍光色素が結合されており、蛍光観察によって可視化されている。ミオシンフィラメントはガラス基板上に固定されているが、蛍光観察では見えていない。蛍光色素で可視化されたアクチンフィラメントが時間とともに動いていくのがわかる。このように、生体内で起こっていることと同じ現象を人工的に再現する実験は「インビトロ再構成実験」と呼ばれている^[4]。「ビトロ」とはガラスのことで、さらには試験管などのガラス製実験器具のことを示している。図3の左側はマガキの平滑筋から調製したミオシンフィラメント、右側はマガキの斜紋筋から調製したミオシンフィラメントを使っている。観察の時間間隔が異なっていることに注意されたい。斜紋筋のミオシンフィラメントは、平滑筋のそれよりも約5倍の速さでアクチンフィラメントを動かすのである^[5]。

このことは、筋肉が収縮する速さに反映される。平滑筋はゆっくりと収縮するのに対し、斜紋筋は速く収縮する。ヒオウギガイなどのホタテガイの仲間でも、

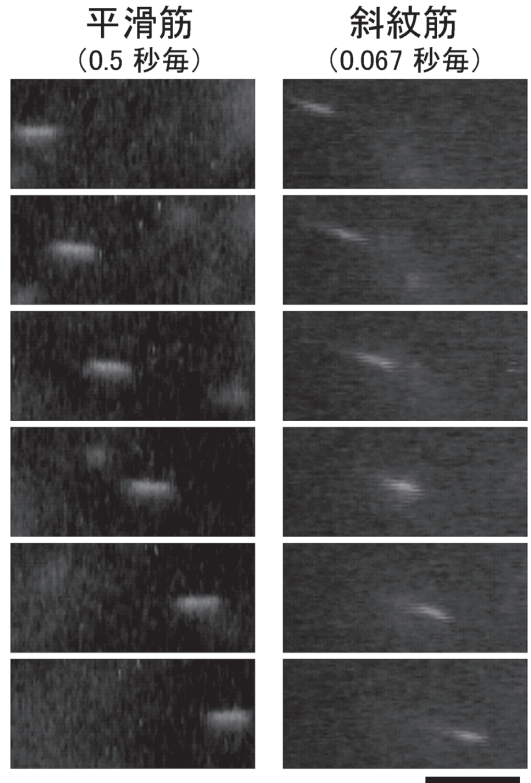


図3 滑り運動の「インビトロ再構成実験」
マガキの平滑筋（左）と斜紋筋（右）から調製したミオシンフィラメントの上を滑り運動するアクチンフィラメントの連続顕微鏡写真を示してある。時間間隔が異なっていることに注意していただきたい。斜紋筋のミオシンフィラメントでは、平滑筋のミオシンフィラメントでの約5倍の速さでアクチンフィラメントが滑り運動する。スケールバーは5μm。

平滑筋はゆっくりと収縮するのに対し、横紋筋は速く収縮する。ホタテガイの仲間は、外敵に襲われた時などに貝殻を激しく繰り返して開閉することによって水流を起こし、水中を泳いで逃げるのであるが、この時にはこの大きな横紋筋を使うのである。マガキの斜紋筋も、貝殻を素早く閉じるときに使われる。

3 省エネルギー型筋肉「キャッチ筋」

では、白色の平滑筋部分はどのような時に活躍するのであろうか。図3の実験で見たように、平滑筋のミオシンフィラメントによるアクチンフィラメントの滑り運動は遅く、筋肉の収縮もゆっくりとしている。従って、貝殻はゆっくりとしか閉じない。先に述べたように、二枚貝は、生きていた限り蝶番の弾性に打ち勝って貝殻を閉じ続けていないといけない。この働きを担っているのが貝柱の平滑筋部分なのである。この筋肉は古くから「キャッチ筋」として知られ、その性質が研究されてきた。「キャッチ」とはドアの留め金のこと、ドアが開かないように「引っかかり」をつくる。「キャッチ筋」も、貝殻が開き切ってしまうように「引っかかり」をつくる機能を持つと考えられて

きた。「引っかかり」ができていない状態は「キャッチ状態」と呼ばれており、「キャッチ筋」は、この状態になることによって、我々の手足の筋肉よりもはるかに少ないエネルギー消費で「物体を持ち上げ続ける」ことができる省エネルギー型の筋肉なのである。

キャッチ筋は、収縮した直後にキャッチ状態になる。我々の手足では、筋肉が収縮した後、「力を抜けば」、筋肉はだらりと軟らかくなって「弛緩」してしまうのだが、キャッチ筋では「力を抜いても」筋肉が硬い状態が持続して「キャッチ状態」に移行する。しかし、いつまでもこの状態であっては都合が悪い。多くの二枚貝はプランクトンを食餌としており、これを含む水を体内に取り込まないといけない。もちろん、取り込んだ水から呼吸のための酸素も取り込まれる。外界からプランクトンや酸素を含む水を取り込み、また老廃物等を排出するためにも、貝殻を少し開いておく必要もあるのだ。

キャッチ状態を維持するか、解除して筋肉を弛緩させるかは、タンパク質分子のリン酸化-脱リン酸化(図4)という、生物ではごくありふれた制御方法が使われている。キャッチの制御に関わるタンパク質はトウイッチンと呼ばれ、ミオシンフィラメントに結合していることがわかっている。このタンパク質の特定の水酸基が、リン酸化酵素によってリン酸化されると、キャッチ状態は解除され、筋肉は弛緩する^[6]。これをリセットするのが脱リン酸化酵素で、リン酸基をはずしてもとの水酸基に戻すのである^[7]。

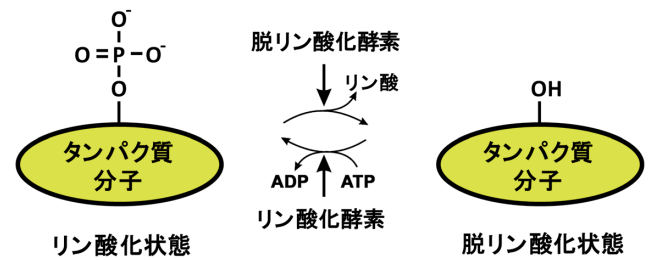


図4 タンパク質分子のリン酸化と脱リン酸化
ATPと酵素の働きによって、タンパク質分子の特定の部位に可逆的にリン酸が共有結合で付加される。生物の細胞内には、この2種類の状態を使って様々な制御をする仕組みが広く存在する。

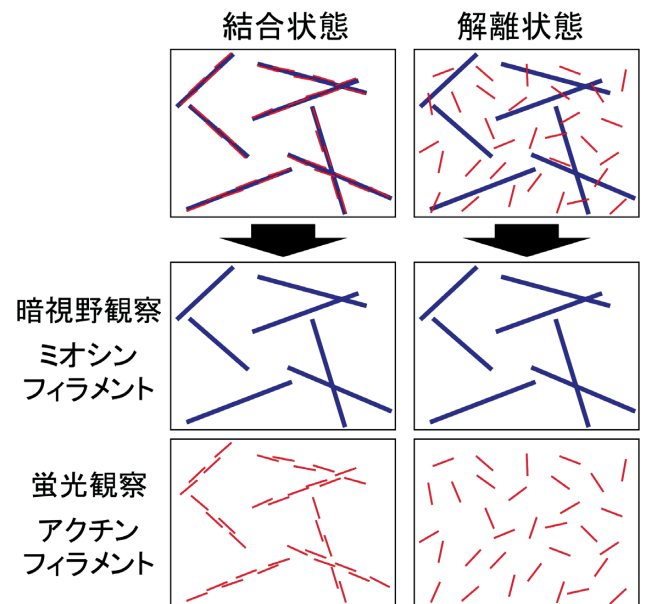


図5 ミオシンフィラメント(青色)とアクチンフィラメント(赤色)の結合状態(左)と解離状態(右)を光学顕微鏡で識別する実験方法
ミオシンフィラメントは暗視野観察によって、アクチンフィラメントは蛍光観察によって可視化される。両フィラメントが結合していれば両観察法の像はほぼ一致し、解離していれば像はまったく一致しない。

4 キャッチ状態のインビトロ再構成

筋肉が収縮するとき、すなわち「活性化状態」では、ミオシンフィラメントとアクチンフィラメントの間で滑り運動が起こることはすでに述べた。それでは、「キャッチ状態」や「弛緩状態」のときには、これらのフィラメントはどのようにになっているのであろうか。我々は、収縮状態の滑り運動を観察したときのように、これらの状態をインビトロ再構成実験で再現することに成功した。結論から述べると、筋肉が高い張力を維持する「キャッチ状態」では、アクチンフィラメントはミオシンフィラメントに結合し、高い張力を維持できない「弛緩状態」では、これらのフィラメントはほとんど結合しないということがわかったのである^[8]。

図5は、この「結合状態」とそうでない「解離状態」とを識別する実験法を模式的に示した図である^[9]。ミオシンフィラメントはアクチンフィラメントよりもかなり太いので、可視光線をよく散乱することがわかっている。従って、散乱光を顕微鏡で観察する暗視野観察法を使うと、ミオシンフィラメントのみを観察する

ことができる。一方、アクチンフィラメントは図3の実験と同じように蛍光色素で標識しておく。蛍光色素だけを見る蛍光観察法を使うと、アクチンフィラメントのみを観察することができる。両フィラメントが結合していれば、同じ視野を暗視野観察法と蛍光観察法で観察すれば、その見え方はほぼ一致することになる。両フィラメントが解離していれば、その見え方はほとんど一致しない。

図3の実験では、アクチンフィラメントはミオシンフィラメントの上を滑り運動している。この時は、これらのフィラメントを浸している水溶液中のカルシウムイオン濃度が高いのである。一般に、筋肉が収縮するときには、細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇し、これが信号となってフィラメント間の滑り運動が起こる。細胞内のカルシウムイオン濃度が低下すると、我々の手足の筋肉は弛緩するが、キャッチ筋では、弛

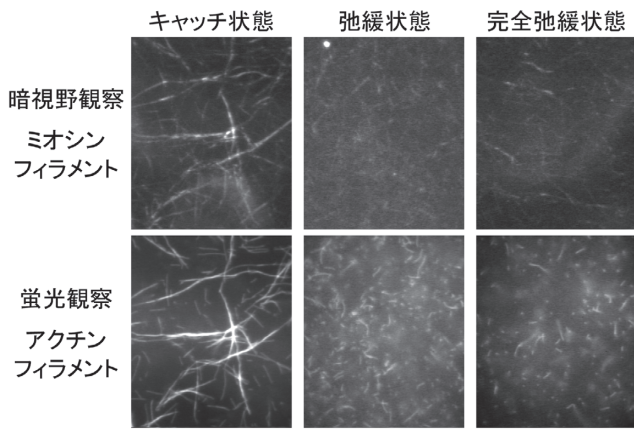


図6 マガキ平滑筋から得たミオシンとトウイチチンを使ったキャッチ状態のインビトロ再構成実験
スケールバーは20μm

緩する場合とキャッチ状態になる場合とがある。これを制御するのが、先に述べたタンパク質トウイチチンのリン酸化-脱リン酸化である。カルシウムイオン濃度が低い状態でトウイチチンがリン酸化されていると「弛緩状態」に、脱リン酸化されていると「キャッチ状態」になる。

では、実験に移ることにしよう(図6)。カルシウムイオン濃度は低く保つことにする。トウイチチンがない状態でミオシンフィラメントにアクチンフィラメントを作用させても、これらの結合は全くと言ってよいほど起こらない(図6右「完全弛緩状態」)。これに対し、脱リン酸化されたトウイチチンが存在する場合には、アクチンフィラメントはミオシンフィラメントに強く結合し、太い束になっているのが観察される(図6左「キャッチ状態」)。この状態がまさにキャッチ筋が高い張力を維持することができるキャッチ状態の再現なのである。そして、確かに、トウイチチンが存在したとしてもそれがリン酸化されていれば、アクチンフィラメントはほとんどミオシンフィラメントに結合しない(図6中「弛緩状態」)。わずかにアクチンフィラメントが結合しているのが見られるが、これは、実験においては、リン酸化を完全にすることができないためであるのかもしれない。

5 「キャッチ筋」以外のキャッチ状態

古くから「キャッチ筋」として知られてきた筋肉は、二枚貝の平滑筋である。それ以外の筋肉は、「キャッチ筋」とはされていなかった。我々の分子レベルでの研究で、キャッチ状態は、ミオシンフィラメント、アクチンフィラメント、トウイチチン、そしてそのリン酸化を制御する酵素があれば再構成できることがわかった。ミオシンフィラメントとアクチンフィラメントは、

筋肉細胞はもとより、真核生物の細胞内に広く存在することがわかっている。トウイチチンはもともと線虫で見つかったタンパク質で^[10]、類似のものであればヒトを含む脊椎動物にも存在する。トウイチチンのリン酸化状態を変えるリン酸化、脱リン酸化酵素も、真核生物の細胞内に広く存在することがわかっている。とすると、ここで1つの疑問が生じる。「キャッチ」なるものは二枚貝の平滑筋に限ったものではなく、他の様々な動物組織に存在するのではないだろうか。

この疑問に答えるための第一歩として、先ほども登場したマガキの斜紋筋とヒオウギガイの横紋筋を試してみることにした。これらの筋肉にも、平滑筋よりも少量ではあるが、トウイチチンが存在する。これらの筋肉からミオシンとトウイチチンを精製して図6と同じ実験を行うと、結果もやはり同様となった^[5]。筋肉細胞中のトウイチチンの量が少ないことを考えると、これらの筋肉が平滑筋部分のような高い張力を維持できるはっきりとした「キャッチ状態」にはならないのかもしれない。しかし、弱いながらも張力のある程度維持できる状態にはなることがあると考えられる。

貝柱の斜紋筋や横紋筋部分は、もし、多量のトウイチチンを含んでいれば、平滑筋のようなキャッチ状態になりうると考えられる。そのようになっていけば、斜紋筋や横紋筋の部分で貝殻を閉じ続けることができるようになり、平滑筋部分は不要になるであろう。しかし、実際の二枚貝の進化はそちらには進まず、斜紋筋や横紋筋とは別に平滑筋を装備する方向に進んだ。これはいったい、どうしてなのであろうか。

6 キャッチ状態のエネルギー消費

キャッチ筋の酸素消費量測定などの研究により、キャッチ状態になったときのエネルギー消費がかなり低いことが知られてきた。しかし、これらの測定法では、筋肉細胞に存在する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に過ぎない。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は一致せず、「酸素負債」として後の時点での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、誤差を生むことになる。

我々は、筋肉から精製したタンパク質だけを使って、フィラメントが滑り運動をする「活性化状態」(図3)、高い張力を維持する「キャッチ状態」(図6左)、キャッチが解除された「弛緩状態」(図6中)、キャッチ状態

表1 マガキの平滑筋と斜紋筋から得たミオシンフィラメントとトゥイッチンで再構成した様々な状態での滑り運動速度と消費エネルギー(ATP加水分解速度)の比較

	平滑筋	斜紋筋
活性化状態の滑り運動速度*	$3.3 \pm 0.3 \mu\text{m s}^{-1}$	$16.4 \pm 2.0 \mu\text{m s}^{-1}$
活性化状態のエネルギー消費**	$0.82 \pm 0.16 \text{ s}^{-1}$	$9.5 \pm 2.1 \text{ s}^{-1}$
キャッチ状態のエネルギー消費**	$0.013 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$	$0.041 \pm 0.005 \text{ s}^{-1}$
弛緩状態のエネルギー消費**	$0.0036 \pm 0.0007 \text{ s}^{-1}$	$0.011 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$
完全弛緩状態のエネルギー消費**	$0.0012 \pm 0.0001 \text{ s}^{-1}$	$0.0047 \pm 0.0007 \text{ s}^{-1}$

*: 平均値 ± 標準偏差。Tsutsui et al. (2007)

** : ミオシン分子がATPを加水分解する速さ。平均値 ± 標準誤差。Yamada et al. (2013)

を構成するために必須のタンパク質トゥイッチンがない「完全弛緩状態」(図6右)をインビトロで再構成することに成功した。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になった。実際に測定した結果を、マガキの平滑筋と斜紋筋と比較して、表1にまとめた。図3の実験における滑り運動速度も載せてある。

「活性化状態」において、斜紋筋の滑り運動速度は平滑筋の約5倍であるが、エネルギー消費は約10倍にもなる。「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1,000分の1程度であった。注目すべき点は、「キャッチ状態」においてもある程度のエネルギー消費があるということである。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、斜紋筋の方が平滑筋の3~4倍になっている。トゥイッチンがリン酸化されて「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る。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、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必要とすることを示している^[11]。

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るのではないだろうか。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用意して貝殻を閉じ続ける方が、エネルギー消費が少な

くて済む、という省エネルギー戦略であったのかもしれない。

7 おわりに

「生物多様性」という言葉が示すように、地球上には様々な生物がそれぞれの戦略で生存を続けている。二枚貝の貝柱の筋肉に見られる省エネルギー戦略もその1つであろう。生体材料を技術利用しようとする立場においても、また、生物の生存戦略から学んで様々な技術開発を進めようとする立場においても、このような生物の戦略を研究する意義は大きいものであろう。しかし、二枚貝のキャッチについてもそのすべてが解明されたわけではなく、ましてや、多様化した生物がとってきた戦略が調べ尽くされたわけでもない。我々がここで述べたような基礎研究を続けなければならない理由も、このようなところにあるはずである。

【参考文献】

- 1 J. Lowy and B. M. Millman, "The contractile mechanism of the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis*," *Phil. Trans. B*, Vol. 246, No. 728, pp. 105-148, Jan. 1963.
- 2 F. Baguet and J. M. Gillis, "Energy cost of tonic contraction in a lamellibranch catch muscle," *J. Physiol.*, Vol. 198, No. 1, pp. 127-143, Sep. 1968.
- 3 J. Bowden, "The structure and innervation of lamellibranch muscle," *Intl. Rev. Cytol.*, Vol. 7, pp. 295-335, 1958.
- 4 S. J. Kron and J. A. Spudich, "Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 83, No. 17, pp. 6272-6276, Sep. 1986.
- 5 Y. Tsutsui, M. Yoshio, K. Oiwa, and A. Yamada, "Striated muscle twitchin of bivalves has "catchability", the ability to bind thick filaments tightly to thin filaments, representing the catch state," *J. Mol. Biol.*, Vol. 365, No. 2, pp. 325-332, Jan. 2007.
- 6 M. J. Siegman, D. Funabara, S. Kinoshita, S. Watabe, D. J. Hartshorne, and T. M. Butler, "Phosphorylation of a twitchin-related protein controls catch and calcium sensitivity of force production in invertebrate smooth muscle," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 95, No. 9, pp. 5383-5388, April 1998.
- 7 L. Castellani and C. Cohen, "A calcineurin-like phosphatase is required for catch contraction," *FEBS Lett.*, Vol. 309, No. 3, pp. 321-326, Sep. 1992.
- 8 A. Yamada, M. Yoshio, H. Kojima, and K. Oiwa, "An *in vitro* assay reveals essential protein components for the "catch" state of invertebrate smooth muscle," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 98, No. 12, pp. 6635-6640, Jun. 2001.
- 9 Y. Tsutsui, M. Yoshio, K. Oiwa, and A. Yamada, "Twitchin purified from molluscan catch muscles regulates interactions between actin and myosin filaments at rest in a phosphorylation-dependent manner," *J. Muscle Res. Cell Motil.*, Vol. 26, No. 6-8, pp. 461-465, Dec. 2005.
- 10 G. M. Benian, J. E. Kiff, N. Neckelmann, D. G. Moerman, and R. H. Waterston, "Sequence of an unusually large protein implicated in regulation of myosin activity in *C. elegans*," *Nature*, Vol. 342, No. 6245, pp. 45-50, Nov. 1989.
- 11 A. Yamada, M. Yoshio, and K. Oiwa, "Myosin Mg-ATPase of molluscan muscles is slightly activated by F-actin under catch state *in vitro*," *J. Muscle Res. Cell Motil.* Vol. 34, No. 2, pp. 115-123, May 2013.

2 生命の基本原理の探求



山田 章 (やまだ あきら)

未来 ICT 研究所バイオ ICT 研究室主任研究員
理学博士
生物物理学