和文タイトル

英文タイトル：Structure and Function of Ca^{2+}-induced Contractile 3 nm Diameter Biofilament

代表研究者	早稲田大学	浅井　博	Waseda University	Hiroshi Asai
共同研究者	宮城教育大学	見上　一幸	Miyagi University of Edu..	Kazuyuki Mikami
共同研究者	早稲田大学	東中川　徹	Waseda University	Tohru Higashinakagawa
共同研究者	早稲田大学	板橋　岳志	Waseda University	Takeshi Itabashi

研究目的

スパズミン（20KDa Ca^{2+}結合タンパク質）は、ツリガネムシの茎部にあるCa^{2+}誘起収縮性器官スパズモネームの主要構成タンパク質である。

これまで、*Zoothamnium*（枝分かれツリガネムシの一種）のスパズミンに関しては、*Z.geniculatum* において 2 種のスパズミンの存在とそれぞれのアミノ酸組成が明らかにされているのみである。スパズモネームの収縮メカニズムは、スパズモネームの特性とタンパク質組成の点において、*Z.geniculatum* とは異なった *Z . arbuscula* strain Kawagoe においてマクロなアプローチによりが研究されてきた。今後スパズモネームの収縮メカニズムを分子レベルからも解明するため、本研究では、まず *Z . arbuscula* スパズミン cDNA 塩基配列の決定とスパズミン相互作用タンパク質の同定を行った。

研究経過

スパズミン遺伝子の同定

Carchesium スパズミン gDNA 塩基配列に特異的なプライマーを用いた RT-PCR によって *Z . arbuscula* スパズミン cDNA 部分配列が、2 種類得られた(*spasmin 1*、*spasmin 2*)。*Spasmin*

1 遺伝子について、inverse PCR 及び RACE-PCR を用いて gDNA、cDNA 塩基配列を決定した。このスパズミン遺伝子には、イントロンが存在せず、531bp（アミノ酸 177 残基）であった。このスパズミンは、分子量 19,659Da、等電点 4.68 のカルシウム結合タンパク質であると予測された。

カルシウム結合タンパク質 Spasmin1 には、４つの EF-Hand（カルシウム結合ドメイン）のうち、カルシウム結合可能なサイトは 1 つしか存在しないと予測される。これは、これまでに明らかになっている *Vorticella* スパズミンや *Carchesium* 18k スパズミンに存在する EF-hand 数とは異なる。そして、スパズモネームの張力実験などから、*Z. arbuscula* には、結合能の違うカルシウム結合タンパク質が少なくとも 2 つ以上は存在すると示唆されていたが、Spasmin1 とは異なるスパズミンの存在が cDNA 部分配列(*spasmin 2*)からも示唆された。

アミノ酸配列の比較から、２つ目、４つ目の EF-hand には、１アミノ酸残基欠失、４アミノ酸残基挿入がそれぞれある。また、その領域の DNA 配列を spasmin 同士の比較は、特に変異の激しい領域であることがわかった。カルシウム結合タンパク質がイントロンの挿入によって多様化してきたことを考えると、以上の結果は、２つ目、４つ目の EF-hand は、イントロンの挿入とその後の突然変異により ORF に組み込まれ、カルシウム結合能を欠失したと示唆している。また、この領域はN末端アミノ酸配列と同様に変異が激しく、カルシウム結合タンパク質の機能に重要なN末端配列だけでなく、この領域も機能に関係していると考えられる。

スパズミンと相同タンパク質であるセントリンとともに、近隣結合法、最尤法により分子系統樹を作成した。その結果、*Zoothamnium* spasmin1 と *Vorticella* スパズミンは、原生動物のセントリンとともに他セントリンと異なる幹を形成した。このことは、スパズミンを含む原生動物のセントリンは、ヒトを含む他セントリンとの機能多様性を示唆した。

Z. arbuscula スパズモネームは、２種類のカルシウム結合能をもつ。Spasmin 1 がカルシウム結合能を一つしか持たないことから、(1)spasmin1、spasmin2 とカルシウム結合能の異なるカルシウム結合タンパク質が存在する、(2)もしくは spasmin 同士がダイマー形成をしている可能性がある。

スパズミン相互作用タンパク質の同定

スパズモネームを構成する200 kDaタンパク質が、*Carchesium*で発見された。この200 kDaタンパク質はスパズモネームの伸縮運動に必須である。しかし、スパズミンとの相互作用については、これまで確認されていなかった。抗スパズミン抗体を用いた免疫沈降法や、GST融合スパズミンを用いた共沈法により、200 kDaタンパク質はカルシウム依存的にスパズミンと結合することを確認した。しかし、遺伝子同定用のプライーマー作成のために、200 kDaタンパク質のアミノ酸解析を行い、現在解析中である。

また、上記方法により、高分子、低分子タンパク質にいくつかのカルシウム依存的スパズミン相互作用タンパク質を新たに発見した。我々は、このタンパク質類にフィラメントを架橋するようなタンパク質が含まれていると予測している。

スパズモネームの赤外顕微分光光度計による解析

本研究に用いられた本研究に用いられたスパズモネームは、巨大型であって、直径が約３０－４０　μｍ、長さが約３００－４００　μｍもある。したがって、既存の赤外顕微分光光度計を用いて、スパズモネーム内タンパク質のペプチッド２次構造を調べることができる。我々の予備的研究によれば、Ca^{2+} の不存在下で、αヘリックス構造の存在が認められ、Ca^{2+} の存在下で、αヘリックス構造の存在%が著しく減少すること見出した。ただし、β構造の存在および増減については、解析することが出来なかった。ところで、別のスパズミン溶液実験では、Ca^{2+} の十分量存在下で、スパズミンのαヘリックス量は、スパズモネーム内タンパク質全体のそれについての結果とは逆に、２０　%増加すること、を確認してある。　200 kDaタンパク質のαヘリックス構造が、Ca^{2+} の添加下で、ランダムコイル構造（すなわち、ゴム状無秩序構造で、エントロピー力の発現の源）に転位すると暗示される。　このことは、有名なファイマンの運動性生体高分子のラチェットメカニズム（マックスウエルの魔、彼の力学教科書に記載）のモデルそのものと成り得る、と我々は信じている。

蛍光相関スペクトロスコピーの理論的研究

蛍光相関スペクトロスコピーの方法は、タンパク質および生体器官の動的機能の研究に将来有望な研究手法である、と予てから本研究代表者は考えていた。この方法（蛍光自己相関スペクトロスコピーおよび蛍光相互相関スペクトロスコピー）は、Ca^{2+}誘起収縮性器官スパズモネームの主要構成タンパク質のダイナミックスのみならず筋原繊維内タンパク質のダイナミックスなどの研究に、使用可能である。

すでに、過去二十数年の間に、第一、第二および第四論文を欧文科学雑誌に発表した。第三論文は、Biophysical Chemistry に誘いにより日本人編集者に投稿したが、査読者に送付することなく、無視されてしまった。その論文は、レーザー光の定常干渉下における蛍光相関スペクトロスコピーの理論的基礎を展開したものであった。　実は、２００２年度米国生物物理学会年会において、レーザー光の定常干渉下における生物物理学的研究の新手法（上に述べた方法とは異なる）の発表があった。

そこで、本研究代表者は第四論文を改めて発表準備中である。さらに、第五論文となる研究を本研究室の学部４年生と協同で完成させたので、それも欧文科学雑誌に投稿準備中である。

さて、本研究助成金の一部をカールツアイス製蛍光自己/相互相関スペクトロスコピー購入の自己負担金として賄うことができたので、巨大スパズモネームおよびタガメ飛翔筋に適用研究する予定である。

考察

以上述べたように、巨大ツリガネムシを用いて、我々はCa^{2+}誘起収縮性器官スパズモネームの収縮のメカニズムをほぼ解明した。ここで、注意すべきことは、スパズモネームの収縮が純物理学的現象であると共に、また生物学的現象・純生理学的現象である、ということである。さらに、この収縮性器官の運動性主要構成タンパク質の一次構造の解明は、この一年以内にほぼ完了し得る、と予想している。

結語

以上述べてきたように、単細胞繊毛虫類ツリガネムシの３ナノメーター巾フィラメント

の Ca２＋励起収縮のメカニズムを、ほぼ明らかにしたと、本発表者は考えている。実は、１９３０年代から１９５０年代にかけて、筋肉の運動メカニズムは、ゴム弾性的すなわちエントロピー的であると、多くの著名な高分子学者や生物物理学者は、素朴にまた期待をこめて、考えてきた。その夢が、まったく異なる運動器官の３ナノメーター巾バイオフィラメントで、実現された。

将来の研究発展への意義

今後の問題は、３ナノメーター巾バイオフィラメント（多細胞生物にも有るとして）の生物学的役割を解明することであろう。多分、Ca２＋シグナリングを伴う細胞分裂の問題が、中心的課題となろう。

以下に少し長くなるが、その発想の根源を述べる。

すなわち、我々は、核内に存在するナノフィラメント、特に動原体（キネトコア）に存在するコロナ状ファイバーに注目している。特に動原体外側部を構成するコロナ・ファイバーまたは fibrous corona と呼ばれ始めたもやもやとした構造タンパク質類は、微小管の捕獲などに重要であると、我々は予測する。このフィラメントの機能・構造を明らかにすることは、有糸分裂時の Ca2+、染色体と微小管間の動的メカニズムの研究（主に欧米でのみ）に新たな知見を与え、全ての生物はどのように有糸分裂するか？という謎の解明に重要であると考えている。しかし、細胞分裂の動的メカニズムは、主に微小管による分裂課程の進行に関する研究のみが盛んである。細胞生物学(翻訳書)の本の第１８章差う棒分裂の仕組みの９１８ページによれば「中心体およびこれに含まれる中心小体について（本研究代表者によれば、動原体も含む筈）、細胞生物学者は百年以上もの間、悩み続けているが、何から出来ているのか、複製の仕方はどうか、進化の過程でどのように生じてきたのかなどの基本的問題はまだ解明されていない」と記されている。　この問題の解決の糸口またはキーワードは、Ｃa2＋励起収縮性の３　ナノメーター 直径バイオフィラメントであると、本研究代表者は信じる。コロナ・ファイバーまたは fibrous corona　という言葉があることを知ったのは、２００１年２月のボストンにおける米国生物物理学年会の総説講演を聴いたときである。聴覚の Hair Cell の論文（Hudspeth,Nature Vol341,1989 年）に３nm 直系フィラメント

が電顕で観察されたという報告と役割の記事が一つのみ見つかった。

一般にCa2+励起収縮性繊維は、原生動物ツリガネムシの茎部に存在するスパズモネームと呼ばれる器官に、またゾウリムシなどでは、原形質膜に裏打ち構造に顕著に見られる。スパズモネームは、アクチン繊維（太さ約８ｎｍ）などと比べて非常に細く、太さ３ｎｍのCa2+励起収縮性フィラメント束で構成され、構成タンパク質類についても、我々のみが盛んに研究している。Ca2+結合タンパク質（Centrin/Caltractin/spasmin）のみは、我々も含めて世界の数ヶ所で研究されている。Ca2+が細胞分裂を制御していることや、他に類のない繊維の細さから、「キネトコア・コロナ・ファイバーは、ツリガネムシのCa2+励起収縮性ナノフィラメントに類似したフィラメントである」という確信を持っている。この確信を証明する本研究は、Ca2+励起収縮性ナノフィラメントの分子というミクロな世界から、マクロな有糸分裂メカニズムまでの一連の解明へとつながり、他種バイオフィラメントも複雑に関与する様々な生命現象の研究分野において、極めて大きな意義があると考えている。現在までに明らかにしている原生動物のCa2+励起収縮性フィラメント構成タンパク質類の知見を基にして、今までに類のないアプローチをすることで、分子レベルからキネトコア・コロナ・ファイバーの構成タンパク質類、それらの機能・局在性を明らかにし、さらに有糸分裂時におけるこのナノファイバーの機能を解明したい。

また核は、Ca2+依存的ATP非依存的な収縮・弛緩運動が可能であり、その運動メカニズムはアクチン・ミオシン系やチューブリン・ダイニン系によるものでなく、Ca2+励起収縮性繊維によると予測される。その機能や構成タンパク質類ついてはまだ分かっていない。細胞分裂時のダイナミックな核の変化を考えれば、核内のCa2+励起収縮性繊維の解明は極めて大きな意義があると考えている。　これまで、細胞分裂メカニズムをCa2+励起収縮性繊維に注目した研究はなく、先行研究では見えていないCa2+とCa2+励起収縮性繊維による細胞分裂の動的メカニズムが、本研究によって独創的なモデルを新たに提案できることは間違いないと考えている。　これが成功すれば、２００１年度の3人のノーベル医学・生理学賞受賞者の仕事に勝るとも劣ないかなあ！！　生きている限り、知的遺産の創生に貢献していきたい、と本研究代表者等は考えている。

研究発表

口頭発表

1．*Zoothamnium arbuscula* のスパズミン遺伝子の単離、第３４回日本原生動物学会、2001,11、金沢

2．Ca^{2+}励起収縮性巨大スパズモネームを構成するタンパク質類の gDNA、cDNA の解析、2002 年生体運動研究合同班会議、2000,1、千葉

3．Evidence that hydrophobic 50 kDa protein and its putative tetramer are essential for spasmoneme contraction、6th Asian Conference on Ciliate Biolology、2002,7、Tsukuba、Japan

4．Ca^{2+}励起収縮性繊維を構成する新規タンパク質、第 73 回日本動物学会、2002,9、金沢

5．３ナノメター直径バイオフィラメントの Ca^{2+}結合シグナル変換機構、第 35 回日本原生動物学会 2002,11、高知

6．Hypothesis toward the evolution of calcium-binding protein, spasmin in *Zoothamnium arbuscula* strain Kawagoe (Protozoa, Ciliophora)、The American Society of Cell Biology 42nd Annnual Meeting、2002,12、San Francisco、USA

誌上発表

1．T. Itabashi, K. Mikami and H. Asai ; Phylogenetic Relationships between *Vorticella convallaria* and Other Species Inferred from Small Subunit rRNA Gene Sequences, *Zoological Science* 19: 931-937 (2002)

2．T. Itabashi, K. Mikami and H. Asai ; Characterization of the *spasmin 1* gene in *Zoothamnium arbuscula* strain Kawagoe (protozoa, ciliophora) and its relation to other spasmins and centrins, *Research in Microbiology,* In press

Abstract

Zoothamnium arbuscula strain Kawagoe is a giant sessile peritrich ciliated protozoa that possesses a contractile organelle called a spasmoneme. We report here on the molecular characterization and provide an opportunity to discuss the evolutionary relationships of the *Z. arbuscula* spasmin; spasmins belong to the calmodulin superfamily and are the major components of spasmoneme filaments. We analysed and obtained the whole sequence of the *spasmin 1* gene and a partial sequence of the *spasmin 2* gene. It is surprising that the sequence of *spasmin 1* does not contain introns and encodes an open reading frame of 531-bp. It predicts a product of 177 amino acids with a calculated molecular mass of 19,659 Da and a p*I* of 4.68. The amino acid sequence has two putative calcium-binding domains. One of them is a functional domain, as defined by the EF-hand consensus. The varieties of spasmins were revealed by comparison with amino acid components and molecular relationships of spasmin 1 protein and other spasmins. A comparison of the amino acid sequence between the *Z. arbuscula* spasmin and known centrins indicates that spasmins have a one residue deletion in the EF-hand domain-2 and four residue insertions in domain-4, as does the *Vorticella* spasmin. However, there are large variations in the amino acid sequence at domain-4 within spasmin 1, spasmin 2 and the *Vorticella* spasmin.