



展 TENBO 望

ハチの羽ばたく仕組みを高輝度シンクロトロン放射光 X 線で解明



岩本 裕之

Iwamoto Hiroyuki

((公財)高輝度光科学研究センター)

1 はじめに

小型の昆虫は非常に速く羽ばたいている。例えば蚊は1秒間に500回も羽ばたくし、更に小型のユスリカなどでは1秒間に1,000回も羽ばたくという¹⁾。これは、体重が体長の3乗に比例するのに対し、羽ばたきによって得られる揚力は体長の4乗に比例するため、小型になるほど速く羽ばたかなければ必要な揚力が得られないからである²⁾。この高速羽ばたきを担っているのは昆虫の胸部にある“飛行筋”と呼ばれる筋肉である。これは我々脊椎動物の骨格筋と同じ横紋筋(顕微鏡で見ると多数の横縞が見られる)である。しかし、脊椎動物骨格筋では到底不可能な1秒に500~1,000回の収縮を可能にするのがどんな分子機構なのかは長い間不明だった。今回筆者らの研究グループは、大型放射光実験施設 SPring-8 の高輝度 X 線を利用することにより、この高速羽ばたきの分子機構について重要な手掛かりを得ることができたので³⁾、その研究内容を本稿で紹介したい。

2 脊椎動物と昆虫における筋収縮方式の違い

脊椎動物骨格筋の基本構造を図1に示す。脊椎動物の筋肉は、中枢から神経指令を1回受け取るごとに1回の収縮・弛緩を行う。筋細胞は神経指令を受け取ると、筋小胞体と呼ばれる脂質でできた袋(図1c)からカルシウムイオンを細胞質中に放出する。放出されたカルシウムイオンは、アクチンフィラメント上にある収縮調節タンパクのトロポニン(図1e)に結合する。これが引き金になり、もう1つの収縮調節タンパクのトロポミオシンが移動してアクチンとミオシンの相互作用の抑制を解除するため、収縮が開始される。

細胞内に放出されたカルシウムイオンは、筋小胞体の表面にあるカルシウムポンプによって再び筋小胞体内に汲み上げられる。こうして筋肉は弛緩する。この汲み上げは濃度勾配に逆らって行われるためエネルギーを必要とする。筋細胞を含む全ての細胞はアデノシン3リン酸(ATP)をエネルギー源として使う。ATPを合成するのはミトコンドリアと呼ばれる細胞小器

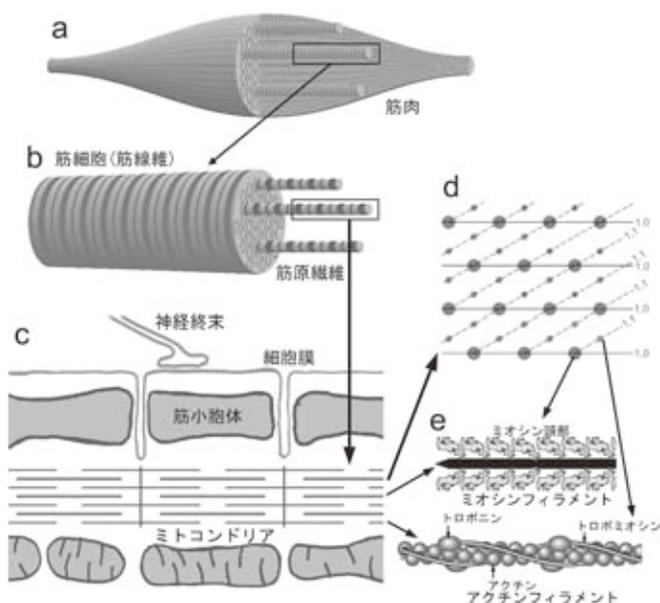


図1 脊椎動物骨格筋の構造
 a, 全筋; b, 1本の筋細胞; c, 筋細胞の縦断面(1本の筋原繊維が含まれている); d, 筋原繊維の横断面; e, 筋フィラメントの構造の模式図。SPring-8 ホームページより改変

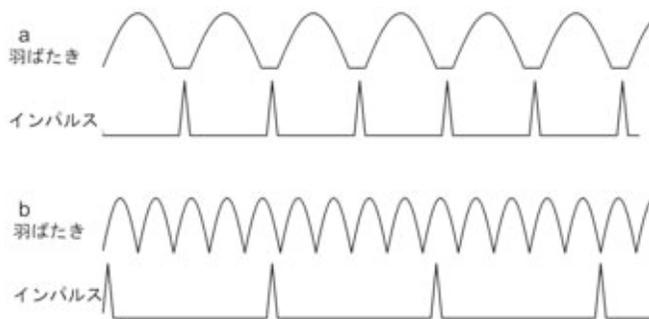


図2 昆虫飛翔筋の動作方式の模式図
 a, 同期型飛翔筋; b, 非同期型飛翔筋。上段が羽の動き, 下段が神経からの指令(インパルス)を示す。SPring-8 ホームページより改変

官(図1c)である。

昆虫でも、バッタのように原始的なものでは人間が手を上下に動かすときと同様に、先に述べたような収縮・弛緩のサイクルを繰り返すことで羽ばたいている。このとき、神経指令と羽ばたきは完全に1対1対応で同期しているため、このような動作方式を持つ飛翔筋を同期型

飛翔筋という(図2a)。この方式による羽ばたきの周波数は毎秒100回が限度といわれている。この方式で更に羽ばたき周波数を上げようとする、カルシウムポンプによるATP消費が激しくなるのでミトコンドリアの体積も増加せざるを得ず、肝心の収縮装置のためのスペースが圧迫されてしまう。

進化した昆虫では、羽ばたきごとにカルシウムの放出、汲み出しをすることをやめ、細胞内カルシウム濃度を低い神経指令頻度で一定に保ち、その上で収縮装置が自励振動を行うことで羽ばたきを行っている。このとき、神経指令と羽ばたきは全く同期していないため、このような動作方式を持つ飛翔筋を非同期型飛翔筋という(図2b)。この方式ではカルシウムポンプのATP消費を抑えられるため、ミトコンドリアの生産するATPの多くを収縮そのものに振り分けることができる。また羽ばたき周波数の上限もなくなり、500 Hzでも1,000 Hzでも可能となる。

非同期型飛翔筋では自励振動を行うことが重要である。この自励振動は、飛翔筋の“伸張による活性化”(筋肉を外から引っ張ると大きな力を出して引っ張り返す性質)という機能によって起こされる。図3にその仕組みを説明する。

進化した昆虫の飛翔筋は間接飛翔筋と呼ばれ、羽を直接動かすのではなく胸部の外骨格を変形させることで間接的に羽を動かす。胸部には2種の拮抗する飛翔筋があり、1つは前後方向に走り(Dorsal Longitudinal Muscle=DLM)、もう1つは背腹方向に走る(Dorso-Ventral Muscle=DVM)。これらは片方が縮むともう片方が引き伸ばされる関係にあ

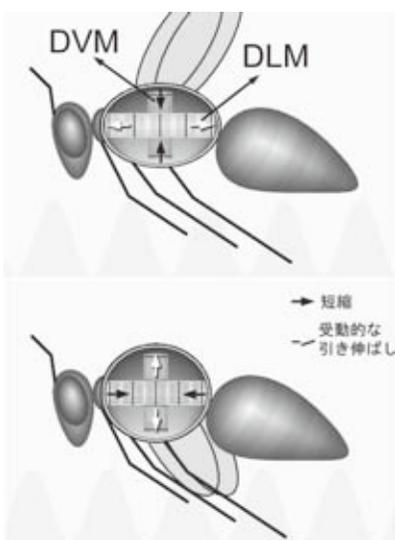


図3 “伸張による活性化”による昆虫飛翔筋の自励振動の仕組み

2種の拮抗する飛翔筋（DLMとDVM）がお互いに引っ張り合うことで自励振動を持続させる。SPring-8ホームページより改変

り、引き伸ばされた方は“伸張による活性化”により相手を引っ張り返すので、お互いを引っ張り返すことで振動を持続することができる。

3 伸張による活性化の分子機構

この“伸張による活性化”はほかの筋肉にも見られるが、昆虫飛翔筋には特に顕著に見られる。したがって、この分子機構の解明は昆虫の高速羽ばたきの理解に非常に重要であるが、今日まで決定的な証拠は得られていなかった。

以前からある説では、全ての筋肉にある主要な収縮タンパクであるアクチンとミオシン、又はそれらの空間配置自体に“伸張による活性化”の仕組みが備わっていると考えられた。その説の1つ“マッチ-ミスマッチ仮説”では、昆虫飛翔筋の収縮タンパクの空間配置が非常に規則的なため、ある筋肉の長さではアクチンと相互作用できるミオシン分子の数が非常に少ないが、筋肉を少し引き伸ばすことで多くのミオ

シン分子がアクチンと相互作用できる位置に移動すると考えられた⁴⁾。

しかし最近では幾つもの特殊なタンパクが昆虫飛翔筋だけに発現していることが明らかになり、これらの飛翔筋特異的タンパク質が“伸張による活性化”を起こすという説がクローズアップされてきた。特に、収縮調節タンパクのトロポニンCを構成する3種のサブユニットのうち、カルシウムを結合するトロポニンCに、昆虫飛翔筋ではカルシウム結合部位を失ったものがあることが発見された⁵⁾。これを通常のトロポニンCに置換すると“伸張による活性化”が消失するという。また、もう1つのサブユニットであるトロポニンIの場合、昆虫飛翔筋のものには異常に長い延長部があり、アクチンフィラメントとミオシンフィラメントを橋渡しできる長さである。これらのことから、トロポニンが伸張のセンサとして働いており、伸張のシグナルはトロポニンIの延長部によってミオシンフィラメントからトロポニンに伝えられるという考え方が浮上した⁶⁾。つまり以前の説とは対照的に、飛翔筋にしかない特異的タンパクが重要だという考え方である。

4 生きた昆虫を用いた高速時分割X線回折実験

これまでの昆虫飛翔筋に関する研究は、主に昆虫の体内から取り出し、筋細胞から細胞膜を取り除いた“脱膜標本”を用いて行われてきた。脱膜標本には、筋細胞内の溶液環境を自由に制御できる、自在の大きさの伸張を加えることができるなど、多くの利点があるが、実際に羽ばたいている昆虫の飛翔筋内部で起こっている現象を知るには生きた昆虫に直接X線を当て、回折像を記録することが望ましい。

筆者らは今回、大型放射光施設SPring-8の中でも、ほかの標準的なビームラインより1,000倍明るいBL40XUビームラインのX線を使い、羽ばたいているマルハナバチの胸部に当

てて生じる X 線回折像を世界最高速の毎秒 5,000 コマの速さで記録することに成功した。マルハナバチの羽ばたきは毎秒 120 回（羽ばたき 1 回が 8 ミリ秒）なので、羽ばたき 1 回を 40 コマの高精度で記録でき、精密な解析が可能になった。

これまでにアメリカの放射光施設 APS で、羽ばたいているショウジョウバエの飛翔筋から X 線回折像を記録した例はあったが⁷⁾、羽ばたき 1 回につき 8 コマの撮影速度（羽ばたきは毎秒 200 回なので撮影速度は毎秒 1,600 コマ相当）で、2 つの拮抗飛翔筋のうち DLM だけの記録であった。

今回の実験の特徴は、2 つの拮抗飛翔筋（DLM, DVM）が重なるところを狙って X 線を当てることで、これらからの回折像を同時記録したということである。これによって 2 つの拮抗飛翔筋がどういったタイミングで作動しているかを明らかにすることができた。

実験には、高速高感度の CMOS ビデオカメラ（1024×1024 ピクセル）を 2 台使用した。1 台は X 線回折像撮影に、もう 1 台はマルハナバチの羽ばたきそのものの映像の記録に使用した。これら 2 台のカメラは共通のクロックとトリガーを使用して完全に同期したタイミングで動作するようにしたため（マスタースレーブ方式）、回折像と羽の位置を完全に 1 対 1 対応させることが可能である。以上の実験のセットアップを X 線光学系とともに図 4 にまとめる。

5 実験結果

まず、マルハナバチの羽ばたきを記録したムービーからの 1 コマを図 5 に示す。各コマでの羽の位置はソフトウェアにより自動認識した。また図 6 には X 線回折像のムービーの 1 コマを、脱膜標本から記録された静止画像と並べて示している。脱膜標本からの画像（図 6 a）で

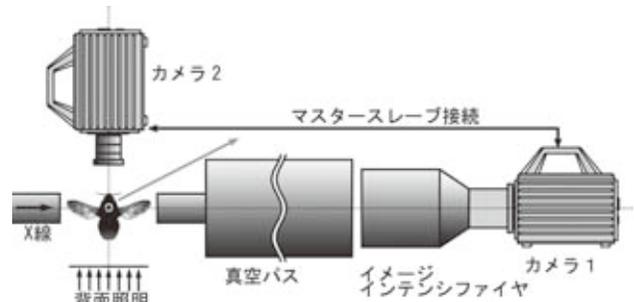


図 4 X 線光学系のセットアップと高速 CMOS ビデオカメラの配置
文献 3) より改変



図 5 マルハナバチの羽ばたきを記録した高速ムービーの 1 コマ
白丸はソフトウェアで自動認識された羽の位置。文献 3) より

は、筋線維は垂直方向に並べられている。中央に円形に抜けた部分がビームストップの影であり、ここが X 線ビームの位置である。回折像全体を地球儀に見立て、X 線ビーム位置から水平に伸びる軸を赤道、垂直に伸びる軸を子午線と呼んでいる。

赤道上にある強い反射（赤道反射）は筋フィラメントの 6 角格子状の配列に由来するもので（検出器の飽和を防ぐため長方形の金属製マスクにより強度を落としている）、子午線上にある反射は筋フィラメントを構成する収縮タンパク分子の長軸方向の周期を反映している。また、子午線から両側に赤道と平行に伸びている反射は層線反射と呼ばれ、筋フィラメントの長軸に沿って収縮タンパク分子がらせん状に配列しているのに対応したものである。本来は赤道

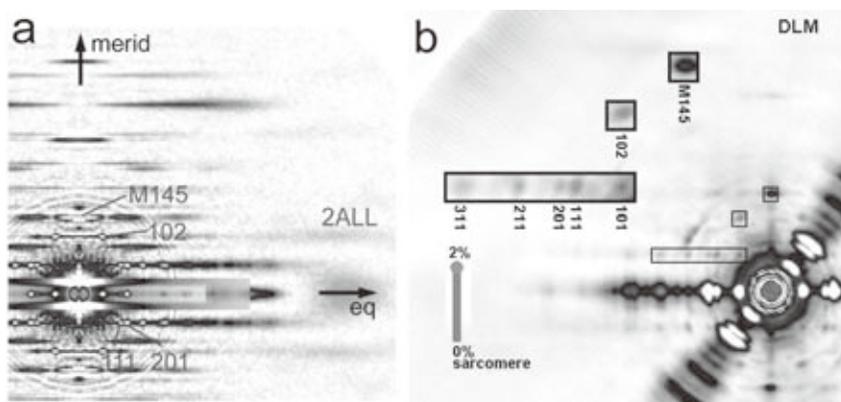


図6 マルハナバチ飛翔筋からのX線回折像

a, 脱膜筋線維標本からの回折像。縦が繊維軸の方向で、これに沿った回折像の軸が子午線 (merid), これと直角の軸が赤道 (eq) である。M145はミオシン由来の周期 14.5 nmの子午線反射, 2ALLはアクチン第2層線反射で、それ以外は結晶性のスポットを面指数 (hkl) で表したものである。b, 生きたマルハナバチから記録されたX線ムービーの1コマで、9匹分のハチの画像を加算したものの。DLMの赤道が水平になるように回転してある。斜めに延びる強い反射の列がDVMの赤道反射。DLMの反射のうち、解析の対象としたものを四角で囲い、左上にその拡大像を示す。図はDLMが最も伸張した瞬間のもの。文献3)より改変

に沿って連続した強度を持つ反射であるが、昆虫飛翔筋ではタンパク配列の規則性が非常に高いため (結晶性のため)、特に赤道に近い層線反射がスポット状に分断される。反射がスポット上になるのは結晶の反射がスポット状になるのと同じ原理であり、それぞれのスポットは結晶の面指数 (hkl) で表すことができる。

生きたマルハナバチにX線を照射した場合は、DLM, DVMそれぞれについて前記のような回折パターンが生じ、それらが重なって記録される。幸いDLMとDVMの繊維軸の角度は60度程度であるので、多くの場合回折パターン上に現れたスポットがどちらの筋肉に由来するかを同定することが可能である。図6bは9匹のマルハナバチからの回折像を加算して作成したムービーの1コマであるが、同定を容易にするためDLMの赤道が水平になるように向きを変えている。こうすることでDLM由来の反射を図6aの脱膜標本からの反射に直接対応させることが可能である。DVMの赤道を水平にしたムービーもあり、これらのムービーが原論

文3)のウェブサイトに公開されている。

このような回折像から様々な情報を得ることができる。それぞれの反射スポットの強度は羽ばたきの進行につれて変化するのだが、これはミオシン分子がアクチン分子へ結合解離を繰り返すような構造変化を反映したものである。赤道反射の間隔を精密に測定すると、筋肉の長さ変化を推定できる。これは筋細胞が体積一定の物体のように振舞うため、筋肉が短縮すれば筋フィラメントの格子間隔が広がるためである。また筋肉が力を発生すると筋フィラメントが弾性的に引き伸ばされるので、子午線上の反射の位置を精密に測定すると筋肉の発生張力を推定することができる。このようにして生きた昆虫の筋肉から多くの情報を非侵襲的に得ることができるのがX線回折法の大きな特長である。

このようにして得られた情報をまとめたのが図7である。DLMとDVMのデータを上下に並べ、羽ばたき2周期分を示しているが、それぞれについて上段は筋肉長 (上向きが伸びる方向) で、ほぼ正弦波の時間経過で振幅は2%程

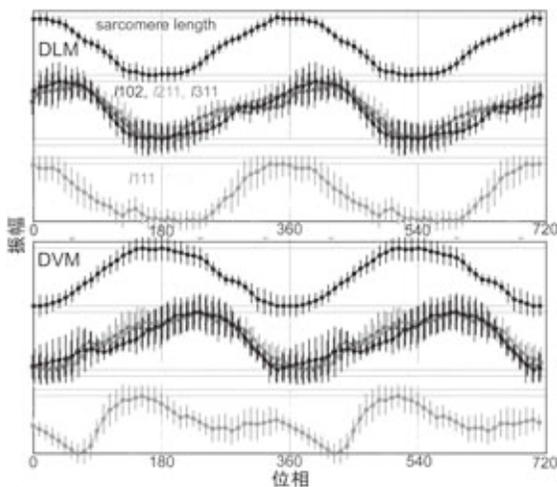


図7 図6bに示したようなX線ムービーの解析結果の一部DLMの結果とDVMの結果を羽ばたき2周期分、縦に並べて示す。それぞれのパネルで上段が筋肉長(振幅2%)、中段がミオシンのアクチンへの結合を反映する3種の反射スポットの強度、下段が111反射の強度である。いずれも振幅が灰色の枠に収まるように正規化して表示している。中段の反射強度の変化が筋肉長の変化に遅れるのに対し、111反射は先行することに注意。文献3)より改変

度である。DLMとDVMの動きはほぼ完全に反位相(〜180度ずれる)である。中段はX線反射スポットの強度で、102反射、211反射、311反射のデータを重ねてある。これらはいずれもミオシンがアクチンに結合したとき(力発生が起きたとき)に増強すると考えられている⁸⁾。力発生の時間経過は示していないが、これらの反射の強度の時間経過に似ている。

下段は111反射の強度である。この反射は先に述べた3つの反射と同様に、ミオシンのアクチンへの結合を反映すると考えられていた⁸⁾。しかし図7に示したとおり、この反射の挙動はほかのものと明らかに異なっている。すなわち、この反射の強度が増加し始めるのはほかの反射より早く、筋肉が引き伸ばされている最中である。これは“伸張による活性化”が開始するタイミングに一致している。実は、この反射は筋細胞を急速に伸張したときに、最初に反応する反射であることが脱膜標本を用いた実験で

分かっていた⁹⁾。今回の実験で、これが起きた昆虫でも起こる現象であり、またその強度変化もかなり顕著であることが分かったのである。つまり、収縮タンパクにかなり大きな構造変化が起きていることを示している。

6 何が分かったか

それでは具体的にどのような構造変化が起きたら観察された111反射の強度変化が説明できるのだろうか? 注目すべきことは、111反射が強くなる時、必ず相補的に隣の201反射が弱くなっている点である。そこで、筋フィラメントの格子の中で、タンパク質をどのように動かしたら相補的な強度変化が再現できるかをモデル計算によって求めた(図8)。

図8は筋フィラメントの六角格子の断面で、最小の繰り返し単位(単位胞)を示したものであるが、この中で(+)と示したのは111反射が強く201反射が弱い領域、(-)と示したのは201反射が強く111反射が弱い領域である。つまり、タンパク分子が(-)の領域から(+)に移動すれば、111反射の相補的な増強が説明できる(計算には3次元的な配置を考慮に入れている)。この移動はトロポニンの動きでも説明できるけれど、非現実的な動きをしなければ2つの領域間を移動することができない。それに対して、既にアクチンに結合しているミオシンが振れるような動作をすれば(図の左下方向にある不定形の物体)、容易に2つの領域間を移動することができる。トロポニン分子は38.7nmの周期に2個しかないのに対し、ミオシンの頭部は14.5nmの周期に8個あるため、強度変化の大きさも説明しやすい。

以上から、“伸張による活性化”のタイミングに一致して見られる111反射の顕著な増強は既にアクチンに結合したミオシンの伸張による変形を反映して、これが“伸張による活性化”

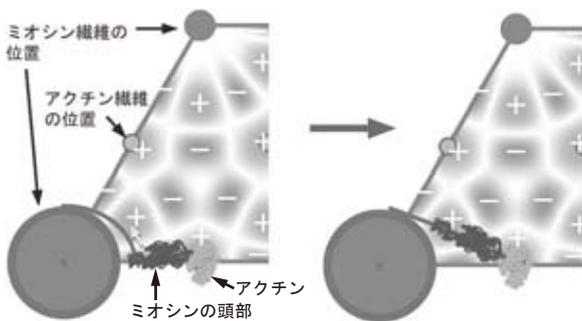


図8 実験結果を説明するモデル
筋原繊維の断面(図1d)の、単位胞(最小繰り返し単位)の一部を示す。この中でタンパク質が(-)のエリアから(+)
のエリアへ移動すると111反射の増強と201反射の減少(図7
では省略)が起こる。このタンパク質の移動は、アクチン
(下側の淡色の不定形の構造)に既に結合したミオシンの頭部
(濃色の不定形の構造)が振れるような動きを考えると
容易に説明することができる。文献3)より改変

の引き金になっている可能性が高い。すなわち、アクチンに結合して力発生の準備段階にあるミオシンが伸張により変形を受けることで力発生を開始することが“伸張による活性化”の分子機構であると推定される。

疲労して張力の低下した脊椎動物の骨格筋を引き伸ばすと非常に大きな力を出して抵抗するが、この伸張による活性化も同様の分子機構で起こっているという論文が発表されている¹⁰⁾。つまり昆虫飛翔筋も、脊椎動物骨格筋と同様の分子機構によって引っ張りによる張力増強を行っているということになる。昆虫飛翔筋は、飛翔筋にしかない特異的なタンパク質を利用するのではなく、脊椎動物にもある一般的な筋肉の性質を利用することによって“伸張による活性化”を実現したと考えられるのである。

7 終わりに

最初に述べたように“伸張による活性化”は

程度の差こそあれ種々の筋肉に広く見られる現象である。心筋は فرانクスターリングの法則と呼ばれ、血液流入量が増えて引き伸ばされると、その分だけ収縮力を増して流入した血液を全て拍出する性質がある。“伸張による活性化”はこの性質にも寄与するといわれている。今回の研究で脊椎動物の筋肉との共通性が明らかになったことで、昆虫飛翔筋は脊椎動物の骨格筋や心筋の働きをよりよく理解するためのモデル材料として役立つしていくことと思われる。

またシンクロトロン放射光を用いたX線回折法は、今後とも様々な実験材料について、非侵襲的に内部の分子の動きを観察するのに適した方法として発展していくだろう。

ここで紹介した研究は、日本学術振興会(No. 23612009)による科学研究費補助金の助成を受け、SPring-8の利用研究課題として行われた。

参考文献

- 1) Sotavalta, O., *Biol. Bull.*, **104**, 439-444 (1953)
- 2) Dickinson, M., *Curr. Biol.*, **16**, R309-R314 (2006)
- 3) Iwamoto, H. and Yagi, N., *Science*, **341**, 1243-1246 (2013)
- 4) Wray, J.S., *Nature*, **280**, 325-326 (1979)
- 5) Agianian, B. et al., *EMBO J.*, **23**, 772-779 (2004)
- 6) Bullard, B. and Pastore, A., *J. Muscle. Res. Cell Motil.*, **32**, 303-313 (2011)
- 7) Dickinson, M. et al., *Nature*, **433**, 330-333 (2005)
- 8) Tregear, R.T. et al., *Biophys. J.*, **74**, 1439-1451 (1998)
- 9) Iwamoto, H. and Yagi, N., *Biophys. J.*, **100**, 11a-12a (2011)
- 10) Iwamoto, H., *Biophys. J.*, **68**, 243-250 (1995)