

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月17日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570153

研究課題名（和文） 新しい弾性配列を持つタンパク質とその役割

研究課題名（英文） Function of new elastic protein

研究代表者

木村 澄子（KIMURA SUMIKO）

千葉大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：50093232

研究成果の概要（和文）：環形動物、棘皮動物など様々な無脊椎動物に存在するコネクチン様タンパク質のアミノ酸配列を決定した。そこには脊椎動物コネクチンには見られない特徴的な構造が存在した。特に、環形動物 4000 K タンパク質に存在する 47 アミノ酸のリピート領域は、非常に細長い構造をしていた。これは同じアミノ酸数でも長い距離を担える事を示し、ゴカイ体壁筋のサルコメアが脊椎動物横紋筋に比べて 2.5 倍も長い事と関係していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Connectin is an elastic protein in vertebrate striated muscle. Invertebrates also possess various connectin-like proteins, one of which is a connectin-like 4000 kDa protein that is present in the obliquely striated muscle of Annelida. We have determined the nucleotide sequence of the gene which encodes a connectin-like 4000 kDa protein in the body wall muscle of *Neanthes* sp. We discovered a sequence in which a unit of 47 amino acids was repeated 11 times. After preparing the recombinant protein, we performed analytical ultracentrifugation and measured CD spectrum to estimate its secondary structure content. The sedimentation velocity experiment revealed that the protein had an extremely asymmetric shape, and 48% of the whole structure assumed beta-structure. It was thus demonstrated that this protein could cover a longer distance than other ordinary proteins with the same size.

The fact that the connectin-like 4000 kDa protein of the obliquely striated muscle of Annelida has a distinct structure with the 47-amino acid repeat sequence may be related to the resting length of a sarcomere in the Annelida obliquely striated muscle, which is about twice as long as that in the vertebrate striated muscle.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：高分子量タンパク質・無脊椎動物・生体分子・超遠心分離法・弾性タンパク質

1. 研究開始当初の背景

弾性タンパク質コネクチン(タイチン)は、脊椎動物および無脊椎動物両者の横紋筋に存在し、筋肉の構造を維持する役割をしている。コネクチンの弾性を担っている領域は、PEVKの4つのアミノ酸が全体の70%を占めるPEVK領域のみであると現在はいわれている。しかし申請者は、無脊椎動物であれば新しい弾性モチーフを持つタンパク質が存在するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

無脊椎動物の筋肉から弾性モチーフを持つ新しいタンパク質を探し出し、その性質と作用を調べる。

3. 研究の方法

(1) 材料:環形動物ゴカイの体壁筋(斜紋筋)、棘皮動物ウニの咀嚼筋(平滑筋) および軟体動物カサガイ (*Lottia dorsuosa*) の平滑筋を使用した。

(2) ゴカイのコネクチン様タンパク質の塩基配列は、体壁筋から cDNA library を作製後、抗体スクリーニングにより部分配列を得て、その5'および3'方向へのwalkingにより決定した。

(3) ゲノム配列からのコネクチン様タンパク質の探索と塩基配列の決定

ゲノム配列は、*Strongylocentrotus purpuratus*(アメリカムラサキウニ)および*Lottia gigantea*(ナスビカサガイ)の公開されているゲノムデータベースを利用した。コネクチン様タンパク質の探索は、ゲノムデータベースからヒトコネクチンのN末端側700アミノ酸とC末端付近のkinaseドメインのアミノ酸配列を用いてBLAST検索した。共通してヒットした領域について、イムノグロブリン(Ig)やフィブロネクチン(Fn3)などのドメイン検索をもとに、エクソン-イントロン予測を行なった。その後、RT-PCRによりエクソン部分を決定した。

(4) 繰り返し配列領域の組み換えタンパク質の調製と精製

GST融合タンパク質として発現させた後、Glutathione Sepharose 4Bを用い、GSTを切断して精製した。その溶出画分はイオン交換クロマトグラフィーにより、さらに精製を行なった。

二次構造の予測は、円偏光二色性スペクトルを測定し、CONTINLLプログラムにより解析した。

4. 研究成果

(1) ゴカイ斜紋筋のコネクチン様 4000 K タンパク質

環形動物ゴカイ体壁筋(斜紋筋)のcDNA libraryを用いて、これまで得られていた4000Kの配列をもとに3'及び5' walkingを行ない、62,865 bp、分子量にして233万の全配列を決定した。この4000K配列は、Igドメインの連続構造を持つことや、IgとFn3ドメインのスーパーリピート構造を持つ点で脊椎動物コネクチンと類似していた。しかし一方で、スペクトリンドメインを持つこと、47個のアミノ酸のリピータ構造を持つこと、IgドメインとPEVK領域のリピータ構造を持つこと、Fn3ドメインのみの連続構造を持つことなど、これまでのコネクチン様タンパク質では見つからないゴカイ斜紋筋4000K特有の構造が存在することが分かった(図1)。

なお、この4000K配列のN末端およびC末端の組み換えタンパク質に対する抗体を作製し、その抗体が4000Kに反応したことから、スクリーニングにより得られた配列は4000Kのものであることが確認できた。

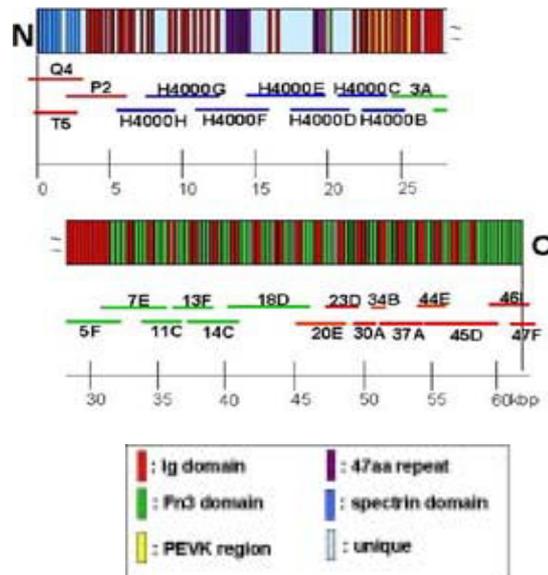


図1. ゴカイ 4000 K タンパク質のドメイン構造

(2) ゴカイ 4000 K タンパク質に存在する 47 アミノ酸繰り返し配列の性質

ゴカイ斜紋筋のコネクチン様 4000 K タンパク質には、グルタミン、グルタミン酸、バリンに富む、47個のアミノ酸が11回繰り返された特徴的な領域が存在した。この領域の性質を知るため、二次構造予測と超遠心分析による解析を行なった。その結果、 α ヘリックス12%、 β 構造48%、ランダム構造40%の二次構造であり、超遠心分析で沈降係数は

2.0、摩擦係数は 2.54 であったことから、非常に細長い構造をしていることが分かった。

(3) ザリガニ I-コネクチンに存在する 68 アミノ酸繰り返し配列の性質

節足動物のコネクチン様タンパク質である I-コネクチンには、セリン、グルタミン酸、リシンに富む 68 個のアミノ酸が 41 回繰り返す SEK リピートが存在する。このうち 5 リピート分について組み替えタンパク質を精製し、二次構造予測を行なった。その結果、ランダムコイルが 77%を占めることが分かった。次に超遠心分析を行なった結果、沈降係数は 1.3、摩擦比は 3.0 であり、非常に細長い繊維状の形態をしていることが示された。

上記の結果から、ゴカイの斜紋筋やザリガニのハサミ閉筋に存在するコネクチン様タンパク質には、同じアミノ酸数であっても長い距離を担うことができるアミノ酸の繰り返し配列が存在していることが明らかになった。このことは、環形動物の斜紋筋や節足動物横紋筋のサルコメア長が脊椎動物横紋筋に比べて 2.5~3.5 倍も長いことと関係していると考えられる。

(4) ウニ咀嚼筋のコネクチン様タンパク質

棘皮動物ウニのゲノムデータベースを利用して、コネクチン様タンパク質の配列を推定した。次にウニ咀嚼筋(平滑筋)から cDNA を調製し、推定した配列を基に RT-PCR により配列を決定した。その結果、約 80 kbp (推定分子量約 298 万) が明らかになった。ドメイン構造の予測から、Fn3 のタンデムリピートを持つと共に、長い PEVK 領域が存在するなど、脊椎動物の横紋筋とは異なるドメイン構造であった(図 2 上)。また、PEVK 領域には、37 アミノ酸と 70 アミノ酸から成る 2 種類の繰り返し領域が存在していた。

(5) カサガイのコネクチン様タンパク質

軟体動物であるカサガイのゲノムデータベースを用いてコネクチン様タンパク質遺伝子を探し、エクソン-イントロン予測を行なった。これを基にカサガイ平滑筋から調製した cDNA を使用して RT-PCR を行ない、54 kbp (推定分子量約 202 万) の配列を決定した。このドメイン構造は、C 末端側に長い Fn3 のタンデムリピートを持つことや、PEVK 領域が長いことなど、サイズは異なるものの、ウニ平滑筋のコネクチン様タンパク質のドメイン構造と類似していた(図 2 下)。また、PEVK 領域には、45 アミノ酸の繰り返し領域が存在した。

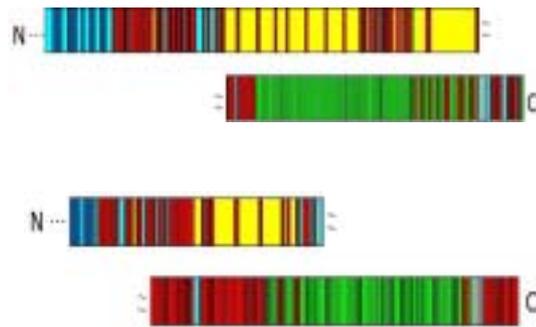


図 2 . ウニとカサガイ コネクチン様タンパク質のドメイン構造。上：ウニ、下：カサガイ

棘皮動物と軟体動物で明らかになったように、脊椎動物の平滑筋にはほとんど発現していないコネクチンが、似て非なるドメイン構造を持って、無脊椎動物の平滑筋に存在していることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Bao, Y., Kake, T., Hanashima, A., Nomiya, U., Kubokawa, K. and Kimura, S. Actin capping proteins, CapZ (β -actinin) and tropomodulin in amphioxus striated muscle. *Gene*, Vol. 510 (1), 78-86 (2012) 査読有.

DOI: 10.1016/j.gene.2012.07.081

Yamashiro, S., Gokhin, S.D., Kimura, S., Nowak, B.R., Velia M. Fowler, M.V., Tropomodulins: Pointed-end capping proteins that regulate actin filament architecture in diverse cell types. *Cytoskeleton* (Hoboken, N.J.), Vol. 69 (6), 337-370 (2012) 査読有.

DOI: 10.1002/cm.21031

Hanashima, A., Ogasawara, M., Nomiya, Y., Sasaki, T., Bao, Y., Kimura, S., Genomic- and protein-based approaches for connectin (titin) identification in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Methods*, Vol. 56(1), 18-24 (2012) 査読有.

DOI: 10.1016/j.ymeth.2011.12.010

Ohtsuka, S., Hanashima, A., Kubokawa, K., Bao, Y., Tando, Y., Kohmaru, J., Nakaya, H., Maruyama, K. and Kimura, S., Amphioxus connectin exhibits merged structure as invertebrate connectin in I-band region and vertebrate connectin in A-band region., *J. Mol. Biol.*, Vol. 409 (3), 415-426 (2011) 査読有.

DOI: 10.1016/j.jmb.2011.04.010

Chitose, R., Watanabe, A., Asano, M., Hanashima, A., Sasano, K., Bao, Y.,

Maruyama, K. and Kimura, S. (2010) Isolation of Nebulin from Rabbit Skeletal Muscle and Its Interaction with Actin. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010: 108495. Epub. 2010 May 12. 査読有.

DOI: 10.1155/2010/108495

Yamaguchi, M., Takemori, S., Kimura, M., Tanishima, Y., Nakayoshi, T., Kimura, S., Ohno, T., Yagi, N., Hoh, F.Y. J., Umazume, Y., Protruding masticatory (superfast) myosin heads from poorly aligned thick filaments of dog jaw muscle revealed by X-ray diffraction., *J. Biochem.*, Vol. 147 (1), 53-61 (2010) 査読有.

DOI: 10.1093/jb/mvp143

Takano, K., Watanabe-Takano, H., Suetsugu, S., Kurita, S., Tsujita, K., Kimura, S., Karatsu, T., Takenawa, T., Endo, T., Nebulin and N-WASP cooperate to cause IGF-1-induced sarcomeric actin filament formation., *Science*, Vol. 330, 1536-1540 (2010) 査読有.

DOI: 10.1126/science.1197767

[学会発表] (計 20 件)

Sasano, K., Kurasawa, M., Hanashima, A., Bao, Y., Nakauchi, Y., Kimura, S. Sequential analysis of Planarian connectin-like protein. 第 50 回日本生物物理学会年会、2012 年 9 月 22 日、名古屋
Nomiya, Y., Kanamaru, S., Arisaka, F., Kimura, S. 47 amino acids repeat of connectin-like 4000K-protein in obliquely striated muscle of Annelida. 第 50 回日本生物物理学会年会、2012 年 9 月 22 日、名古屋

Bao, Y., Hanashima, A., Sodeyama, F., Kimura, S. Connectin-like protein in molluscan striated muscle. 第 50 回日本生物物理学会年会、2012 年 9 月 22 日、名古屋

中谷浩之、金丸周司、有坂文雄、木村澄子、I-コネクチンの弾性繰り返し領域の構造解析、日本動物学会 第 83 回大会、2012 年 9 月 13 日、大阪

佐々木智子、松浦哲、花島章、野宮唯、木村澄子、ウニのコネクチン様タンパク質、日本動物学会 第 83 回大会、2012 年 9 月 13 日、大阪

春山綾菜、花島章、木村澄子、刺胞動物のコネクチン様タンパク質、日本動物学会 第 83 回大会、2012 年 9 月 13 日、大阪

野宮唯、木村澄子、環形動物ゴカイ斜紋筋のコネクチン様タンパク質、日本動物学会 第 83 回大会、2012 年 9 月 13 日、大阪

花島章、木村澄子、脊椎動物のゲノム中におけるコネクチン遺伝子数の変遷、日本動物学会 第 83 回大会、2012 年 9 月 13 日、大阪

佐々木智子、野宮唯、花島章、包玉龍、小笠原道生、木村澄子、ホヤのコネクチン様タンパク質、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 21 日、旭川

野宮唯、木村澄子、環形動物ゴカイ斜紋筋の 4000K タンパク質、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 21 日、旭川

日高暢也、浜岡知哉、花島章、木村澄子、カイメン、ヒドラのコネクチン様タンパク質、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 21 日、旭川

包玉龍、花島章、袖山文彰、木村澄子、セイウカサガイ平滑筋のコネクチン様タンパク質、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 21 日、旭川

佐々野耕平、花島章、包玉龍、中内祐二、木村澄子、扁形動物ナミウズムシ *Dugesia japonica* のコネクチン様タンパク質、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 21 日、旭川

Bao, Y., Kake, T., Hanashima, A., Kubokawa, K., Tando, Y., Kimura, S. Amphioxus striated muscle has beta-actinin and tropomodulin. The 9th International Conference on Bioinformatics (InCoB'10), Sept. 27, 2010, Tokyo, Japan.

Ohtsuka, S., Hanashima, A., Kubokawa, K., Tando, Y., Kimura, S. The connectin-like protein gene of amphioxus striated muscle. The 9th International Conference on Bioinformatics (InCoB'10), Sept. 27, 2010, Tokyo, Japan

松浦哲、花島章、包玉龍、木村澄子、ウニコネクチン様蛋白質のドメイン構造、日本動物学会第 80 回大会、2010 年 9 月 25 日、東京

包玉龍、木村澄子、ホタテ貝のコネクチン様タンパク質、日本動物学会第 80 回大会、2010 年 9 月 25 日、東京

Sasano, K., Hanashima, A., Nakauchi, Y., Kimura, S., Searching for connectin-like proteins in Platyhelminthes. 第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 20 日、仙台

Nakaya, H., Hiura, K., Kimura, S. Binding region of I-Connectin and Projectin in Crayfish Claw Closer Muscle. 第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 20 日、仙台

木村澄子、(招待講演) 筋肉の弾性タンパク質コネクチンのタンデムリピート、蛋白質科学会、2010 年 6 月 18 日、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 澄子 (KIMURA SUMIKO)
千葉大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：50093232

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし