

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18570146

研究課題名（和文） 非横紋筋に発現するコネクチン様タンパク質

研究課題名（英文） Connectin-like protein expressed in non striated muscle

研究代表者

氏名（ローマ字）：木村 澄子（KIMURA Sumiko）

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：50093232

研究成果の概要：横紋筋にしか存在しないと思われている弾性タンパク質コネクチンを、横紋筋以外から探し出した。ムラサキイガイ平滑筋に推定分子量約 400 万のバンドを見出し、無脊椎動物コネクチン抗体 2 種類が反応することを示した。環形動物ゴカイ斜紋筋の分子量約 400 万のタンパク質については、塩基配列 21.3 kbp を決定し、新しいリピート構造や弾性を示す新規配列を持つことを明らかにした。さらに張力測定によって、このタンパク質が弾性に富むことも示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	690,000	4,290,000

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：弾性タンパク質、コネクチン、タイチン、PEVK、平滑筋、横紋筋

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物横紋筋のサルコメアには、Z線からM線までを1分子でつなぐ弾性タンパク質「コネクチン（タイチン）」が存在し、そのスプリングのような弾性でA帯をサルコメアの中央に維持させ、筋肉が収縮と弛緩を繰り返しても乱れることの無い構造を保つ役割をしている。その弾性を担っている領域のアミノ酸配列は、PEVKの4つのアミノ酸で全体の70%を占めるPEVK領域である。長い間「脊椎動物の横紋筋にしか存在しない」と言われてきたコネクチンであるが、近

年、申請者らの研究とゲノムの解読によって、節足動物（ザリガニ・ショウジョウバエ）と線形動物（*C. elegans*）からコネクチンに似た配列が見つかり、無脊椎動物の横紋筋にもコネクチン様タンパク質が存在することが明らかになった。さらに、このコネクチン様タンパク質には、PEVK配列の他に、脊椎動物には存在しないsemi-PEVKともいべき配列が存在していた。このsemi-PEVK領域の融合タンパク質を作製して1分子計測により調べた結果、持続長 0.38 nm という非常にやわら

かい性質を持つことがわかった。これらのことから、現在、脊椎動物・無脊椎動物両者の横紋筋にのみ存在する PEVK 配列と semi-PEVK 配列が弾性を示す配列であるといわれている。しかし、弾性を示す PEVK や semi-PEVK 配列は、横紋筋以外にも存在しているのではないかと考え、研究を行った。

2. 研究の目的

本研究は、PEVK 配列およびその類似配列を持つタンパク質を横紋筋以外から探し出し、その一次構造と伸縮機能および生体内での役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 電気泳動およびイムノプロットテスト

筋組織または融合タンパク質は、SDS 溶液中で熱変性させ、電気泳動に用いた。イムノプロットは、ニトロセルロース膜に転写後にブロッキングを行い、一次抗体に続いて HRP 標識二次抗体を反応させて発色を行った。

(2) cDNA library の作製

ゴカイ体壁筋から Total RNA を調製後、Poly A RNA を調製し、cDNA 合成を行った。Poly A RNA を鋳型とした逆転写プライマーにはランダムヘキサマーを用い、合成した cDNA をサイズフラクションカラム にかけて後、大きなフラグメントを含む画分のみを選び、ZAP vector に組み込み、ゴカイ体壁筋 cDNA library としてスクリーニングに用いた。

(3) 抗原の調製

GST 融合タンパク質のタグを切り離して溶出した抗原タンパク質を SDS 電気泳動した後、目的のバンドのみを切り出し、電気泳動的にタンパク質を抽出した。抽出液から透析によって SDS を除き抗原とした。

(4) 抗体の作製

精製した目的のタンパク質を等量の不完全アジュバンドとよく混合し、総抗原量約 1 mg をウサギに皮下注射して抗体を作製した。イムノプロットにより、十分な抗体価が得られたことを確認した。

(5) 抗体の精製

ゴカイ 4000K 組み換えタンパク質を用いてメンブレンアフィニティーにより抗体精製を行った。

(6) 一分子計測

GST 融合タンパク質はタグをつけたまま溶出し、透析によってグルタチオンを除いたも

のを測定に用いた。アフィニティーカラム精製したタンパク質濃度は 11 μM、GST のみのサンプルをコントロールとし、測定はワシントン州立大学の Henk Granzier 教授に依頼した。

4. 研究成果

(1) ムラサキイガイ平滑筋に存在するコネクチン様タンパク質

平滑筋として生理学的な研究に用いられているムラサキイガイ前足糸牽引筋とカキ平滑筋全抽出物を、2-6%濃度勾配ゲルを用いた SDS 電気泳動によって分離すると、移動度からそれぞれ分子量がおおよそ 400 万と 350 万とみられるバンドが確認された (図 1)。ニトロセルロース膜に転写し、I-コネクチン抗体を用いたイムノプロットを行ったところ、ムラサキイガイ 4000K タンパク質には SP2 と SEKC の 2 種類の抗体が、カキ 3500K タンパク質には SEKC が反応した (図 2)。そこでこれらのタンパク質はコネクチン様タンパク質であると考え、便宜上ムラサキイガイ 4000K、カキ 3500K と名づけた。

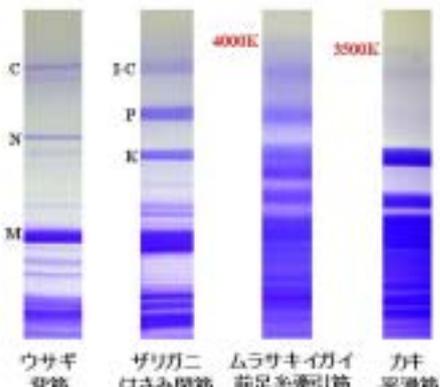


図1. 二枚貝平滑筋のSDS電気泳動像

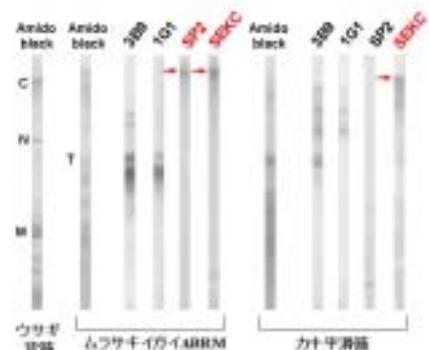


図2. ムラサキイガイ4000K、カキ3500Kのコネクチン抗体との反応性

C : connectin, N : nebulin, M : myosin heavy chain
I-C : I-connectin, P : projectin, K : kettin, T : twitchin

一次構造の探索

ムラサキイガイ 4000K の一次構造を決定するため、4000K に反応する 2 種類の I-コネクチン精製抗体を用いて、ムラサキイガイ cDNA ライブラリーのイムノスクリーニングを行った。SEKC ではおよそ 250 万クローン、SP2 では 280 万クロンのスクリーニングを行ったが、4000K のポジティブクローンを拾うことはできなかった。拾えない原因は精製抗体の反応性が弱いことにあると考え、ムラサキイガイ 4000K に対して新しい抗体の作製を数回試みたが、できた抗体はムラサキイガイ平滑筋に存在する多くのタンパク質に非特異的に反応する等となり、現在までにスクリーニングに用いる抗体はできていない。

(2) ゴカイ斜紋筋 4000K の一次構造

無脊椎動物には横紋筋の他に斜紋筋と呼ばれるタイプの筋肉が存在する。環形動物であるゴカイ体壁筋を SDS 電気泳動後イムノブロットすると、コネクチン抗体と免疫交叉性を持つ巨大タンパク質が存在している。その移動度から 4000K と名づけ、分子内に弾性領域を持つかどうかを調べるため、一次構造の決定から研究を進めた。

4000K の塩基配列の決定

作製したゴカイ体壁筋 cDNA ライブラリーを用いて、4000K 抗体によるイムノスクリーニングおよび 3' と 5' walking を行った。その結果、21.3 kbp (780 kDa) の配列を決定することができた (図 3)。

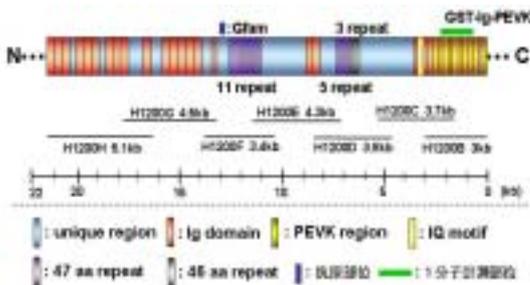


図3. 4000Kのドメイン構造

部位特異的抗体の作製

配列が本当に 4000K の配列であるかどうかを確かめるために、配列の中間部位付近に特異的な抗体 Gfam (24 kDa) を作製した。抗原 (Gfam) によりアフィニティー精製した抗体を用いてゴカイ体壁筋に対してイムノブロットを行った結果、4000K にのみ反応を示した。このことから今回決定した配列は 4000K の配列であることが確かめられた。

一次構造の解析

4000K の一次構造を解析した結果、以下のような特徴が明らかになった。

C 末端側に約 70 残基からなる PEVK セグメントと Ig ドメインが交互に繰り返された配列が見られた。この PEVK セグメントのアミノ酸組成は、PEVK の 4 種のアミノ酸割合が合計で 92% と非常に高かった。また、PEVK セグメント内には 6 つのアミノ酸からなる非常によく保存されたリピートが存在していた。さらに N 末端側には多数の Ig ドメインが見られ、それ以外の大部分は他のタンパク質と相同性の低いユニークなものだった。しかし、ユニーク配列を解析したところ、47 アミノ酸からなるリピートが 2 種類 (11 リピートと 5 リピート)、46 アミノ酸からなるリピートが 1 種類 (3 リピート) 存在していることがわかった。これらのリピートについて、それぞれ BLAST を用いてホモロジー検索を行ったが、有意な相同性を持ったタンパク質は見つからなかった。これらの結果から、ゴカイ斜紋筋の 4000K はコネクチンに特徴的な配列を持つと共に新規配列も持っていることが明らかになった。

融合タンパク質の一分子計測

Ig ドメインと PEVK 領域をそれぞれ 3 つずつ持つ部位 (図 3 の GST-Ig-PEVK、図 4 右がサンプルの電気泳動像) の性質を調べるため、一分子計測を行った。図 4 が示すように、前半はなだらかに上昇しているが横軸約 50nm のあたりから Ig ドメインによると思われる 2 つの連続したピークが見られた。一方、前半のなだらかな上昇は、Ig ドメインよりも先に伸びきっていることから PEVK によるものと考えられる。4000K の Ig ドメインと脊椎動物コネクチンの Ig ドメインとのアミノ酸の相同性は 20% 程度と低いにも関わらず、unfolding force はさほど変わらない値を示した。また、Ig ドメインよりも先に伸びていることや弱い力でも伸びきっていることから、4000K の PEVK 領域も弾性に富む配列であることがわかった。

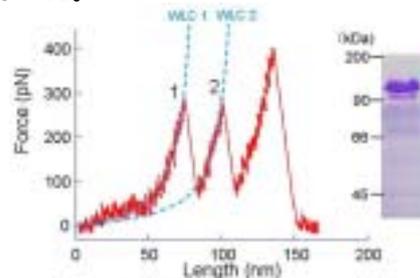


図4. 融合タンパク質の一分子計測

5. 主な発表論文等

(1) [雑誌論文] (計6件)

Hanashima, H., Kubokawa, K. and Kimura, S. Structure of the Amphioxus Nebulin Gene and Evolution of the Nebulin Family Genes. *Gene* in press (2009) 査読有

Hanashima, H., Kubokawa, K. and Kimura, S. Characterization of amphioxus nebulin and its similarity to human nebulin. *J. Exp. Biol.* 212: 668-672 (2009) 査読有

Noguchi, H., Takemori, S., Kajiwara, J., Kimura, M., Maruyama, K. and Kimura, S. Chicken breast muscle connectin: passive tension and I-band region primary structure. *J. Mol. Biol.* 370: 213-219 (2007) 査読有

Hosoda, A., Sato, N., Nagaoka, R., Abe, H. and Obinata, T. Activity of cofilin can be regulated by a mechanism other than phosphorylation/dephosphorylation in muscle cells in culture. *J Muscle Res Cell Motil.* 28:183-194 (2007) 査読有

Takata, H., Uchiyama, S., Nakamura, N., Nakashima, S., Kobayashi, S., Sone, T., Kimura, S., Lahmers, S., Granzier, H., Labeit, S., Matsunaga, S. and Fukui, K. A comparative proteome analysis of human metaphase chromosomes isolated from two different cell lines reveals a set of conserved chromosome-associated proteins. *Genes Cells* 12: 269-284 (2007) 査読有

Yamashiro, S., Abe, H. and Mabuchi, I. IQGAP2 is required for the cadherin-mediated cell-to-cell adhesion in *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol.* 308:485-93 (2007) 査読有

(2) [学会発表] (計9件)

花島章、木村澄子 「ネブリンC末端と -アクチニンの結合」、日本動物学会第79回大会、2008年9月5日、福岡

黒澤元、南澤博人、木村澄子 「ホタテ貝横紋筋に存在する高分子量タンパク質の研究」、日本動物学会第79回大会、2008年9月5日、福岡

Hanashima, A., Kubokawa, K. and Kimura, S. Sequence of the C-terminal region of amphioxus nebulin and its binding proteins. Gordon research conferences: Muscle & Molecular Motors, June 2008, New London, NH, USA

Hiura, K. and Kimura, S. Binding of I-Connectin and Projectin in Crayfish Claw Closer Muscle. 第60回日本細胞生物学会大会、2008年6月29日、横浜

Hanashima, A., Kubokawa, K. and Kimura, S. Sequence of the C-terminal region of amphioxus nebulin and its binding proteins.

第60回日本細胞生物学会大会、2008年6月29日、横浜

木村澄子 「スキンドファイバーから弾性タンパク質コネクチンへ」、筋の構造と機能のシンポジウム(日本生理学会)、2008年3月24日、東京

Hatakeyama, S., Izawa1, N., Zhu, Y.I., Granzier, H. and Kimura, S. 'Single molecule measurement of elasticity of connectin-like 1200K-protein in obliquely striated muscle of a polychaete (Annelida).' 日本生物物理学会第45回年会、2007年12月21日、横浜

Kimura, S., Kimura, M. and Takemori, S. 'Primary structure of connectin and passive tension generation in striated muscle. Cardiac and skeletal myofibrils studied with cutting edge techniques -the beautiful source of muscle force.' The 84th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 22, 2007, Osaka

Hatakeyama, S., Izawa1, N., Zhu, Y.I., Granzier, H. and Kimura, S. Single molecule measurement of elasticity of connectin-like 1200K- protein in obliquely striated muscle of a polychaete (Annelida) 日本生物物理学会第44回年会、2006年11月13日、沖縄

(3) [図書] (計2件)

木村澄子 (2008) 弾性タンパク質(編・猪飼, 伏見, 卜部, 上野川, 中村, 浜窪) タンパク質の事典, 朝倉書店, (分担執筆) p517-519.

木村澄子 (2006) 生物進化の分子マップ: コネクチンの比較生物学, 生体の科学, 57: p490-491.

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・准教授
研究者番号: 50093232

(2) 研究分担者 (平成18年度~19年度)

阿部 洋志 (ABE HIROSHI)
千葉大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 00222662

(3) 連携研究者

なし