

平成22年 5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19570067

研究課題名（和文） 筋収縮制御とサルコメア心筋症に関わるC-タンパク質の  
新たな分子機能の解明

研究課題名（英文） A novel function of myosin-binding protein-C

研究代表者

佐藤成樹（NARUKI SATO）

千葉大学・大学院融合科学研究科・講師

研究者番号：40261896

研究成果の概要（和文）：C-タンパク質は横紋筋特異的なミオシン結合タンパク質で、C端側領域でミオシン線維の安定化に寄与する。本研究は心筋型、速筋型、遅筋型C-タンパク質のN端側領域を大腸菌発現系で作製し、F-アクチンとの相互作用を調べた。その結果、速筋型>心筋型>遅筋型の順に結合が強かった。また、速筋型と心筋型はアクトミオシンATPase活性を抑制することを明らかにした。このことから、C-タンパク質はN端側領域でミオシンとアクチンに結合することで筋収縮の制御を行うという、新しい機能モデルを示すことができた。

研究成果の概要（英文）：Myosin-binding protein-C (MyBP-C/C-protein) is one of the major myosin-binding proteins in vertebrate striated muscles and consists of three isoforms. It has been demonstrated that MyBP-C interacts with LMM and connectin/titin at the C-terminus, and with the S2 segments of myosin at the N-terminus. It is also known that MyBP-C binds to actin filaments and modulates the actin-activated ATPase of myosin. However, actin-binding region of MyBP-C has not yet been fully clarified. In this study, we prepared recombinant N-terminal fragments of cardiac, fast and slow MyBP-C in an E. coli expression system. Co-sedimentation assay showed that each fragment bound to F-actin. In addition, the fast and the cardiac fragment of MyBP-C inhibited the actomyosin ATPase activity. It suggests that MyBP-C regulates actin-myosin interaction during muscle contraction at the N-terminal side.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：C-タンパク質，筋収縮，ミオシン，アクチン，トロポニン，筋肉

### 1. 研究開始当初の背景

サルコメアは筋肉の収縮運動の基本単位で、そこには収縮の担い手であるアクチンフィラメントとミオシンフィラメントが規則正しく配置され、フィラメントを繋ぎ止める構造（Z線）や、構造を支える弾性タンパク質（コネクチン）が基本骨格として存在する。さらに、種々のアクチン結合タンパク質やミオシン結合タンパク質などのサルコメア構成因子が修飾することでサルコメアの秩序だった構築が制御される。サルコメアは精巧にできた細胞器官の1つであり、このような細胞の機能を担う構造体の形成と維持、それを基盤とする収縮の仕組みを解明することは、生理機能の発現及び制御の分子機構、また細胞の形づくりという視点で極めて重要な意味を持つ。一方、肥大型心筋症は心筋が肥大し拡張障害を引き起こす病気で、その原因遺伝子としてサルコメア構成因子が同定され、「肥大型心筋症はサルコメア病であり、サルコメア構成タンパク質の異常がサルコメアの構造や収縮機能の異常を引き起こし、その代償として肥大がおこる」と考えられる。しかしサルコメア構成タンパク質の変異による心肥大の発症メカニズムに関しては未だ不明な点が多く、まさに、これからの研究が必要である。

### 2. 研究の目的

C-タンパク質（MyBP-C）は横紋筋に発現する主要なミオシン結合タンパク質で、コネクチンと結合しつつミオシンフィラメントのまわりをタガのように巻くことで、その束の形成と安定化に寄与すると考えられていた。近年、心筋型C-タンパク質が家族性肥大型心筋症の原因遺伝子であることが明らかになり、心筋の機能維持における重要性が世界的に注目されている。研究代表者は、加齢に伴いマウス心房に変異体C-タンパク質が、正常なC-タンパク質の代わりに特異的に発現することを同定した。この変異体を強制発現すると筋原繊維構造に異常が引き起こされることも明らかにした（Sato N. et al., Mol. Biol. Cell. 2003）。一般に高等動物では老化に伴い心機能の低下が認められる。C-タンパク質の変異が心筋症の原因となることを考えると、老化に伴い異常なC-タンパク質が発現することは大変興味深い。また、心筋型C-タンパク質のN端側領域にアクチン結合部位があることを見いだした。これらの

ことは従来考えられていた、「C-タンパク質はサルコメアの安定化や維持」に必要なだけでなく、新たに「アクチンとミオシンに結合して筋収縮の制御をする」重要な多機能タンパク質であることを示唆した。しかしC-タンパク質の詳細な機能については未だ不明な点が多く、筋疾患との関連や心臓の老化を理解する上でもその解析は極めて重要である。そこで本研究はC-タンパク質のN端側領域に焦点をあてサルコメア構造の安定・維持の分子機構とその機能発現としての筋収縮の制御機構を解析し、肥大型心筋症の発症メカニズムや加齢による心機能の低下のメカニズムに関しての基礎研究とすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) C-タンパク質とアクチンの結合様式と収縮制御における役割の解明：

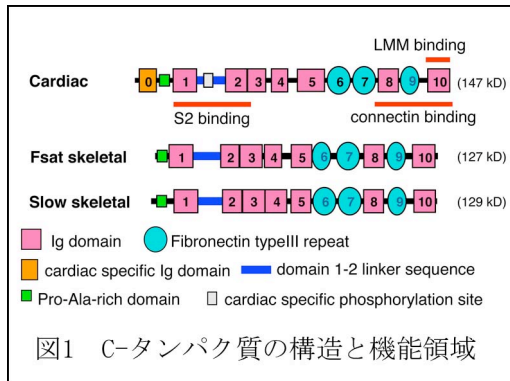
脊椎動物においてC-タンパク質には心筋型、速筋型、遅筋型の3種類のアイソフォームが存在する。研究代表者は心筋型C-タンパク質のN末端側半分領域にアクチン結合部位が存在することを明らかにしている。そこで本研究では初めに、速筋型と遅筋型のC-タンパク質N末端側半分領域をHis-tagを付加した組み換え体タンパク質として大腸菌発現系を用いて作製した。さらに、心筋型と骨格筋型のN端側領域をさらに断片化した組み換え体タンパク質も大腸菌発現系を用いて作製した。これらの組み換え体を用いてアクチン線維との共沈実験などでアクチン結合への機能的な最小単位を決定した。さらにC-タンパク質によるサルコメア収縮制御機構を分子レベルで解明するために、組み換え体タンパク質を用いてアクチン-ミオシンATPase活性を測定することでアクチン-ミオシン相互作用へのC-タンパク質が与える影響を解析した。

(2) ニワトリ心筋型C-タンパク質バリエーションの発現様式の解析：

ニワトリ心筋型C-タンパク質には特異的なリン酸化部位を持つものと、持たない二つのバリエーションが存在する。このリン酸化部位のペプチドを抗原として特異的な抗体を作成し、この抗体と両方のバリエーションを認識する抗体を用いて骨格筋と心筋の発生段階における両者の発現様式を解析した。

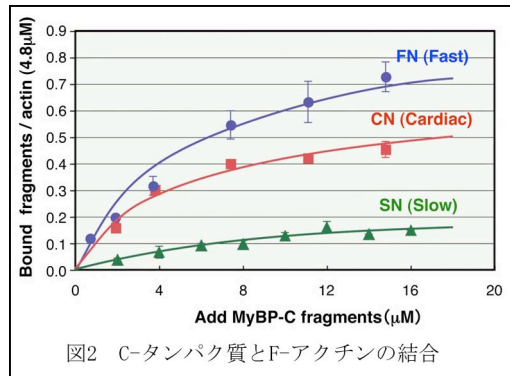
#### 4. 研究成果

(1) C-タンパク質はC端側のドメイン10でLMMに、ドメイン8-10でコネクチンに結合する。一方、N端側ドメイン1-2でミオシンS2に結合する(図1)。



C-タンパク質のN端側領域の機能を明らかにするため、本研究ではニワトリ心筋型(type I)ドメイン0-4、マウス速筋型ドメイン1-4、マウス遅筋型ドメイン1-4をHis-tag融合組み換え体として大腸菌発現系で作製し、His-trapカラムを用いて精製した。

次に、各組み換え体とF-アクチンとの結合を、F-アクチンとの共沈実験法により解析した。その結果、心筋型(CN)、速筋型(FN)、遅筋型(SN)の各断片は、単独では遠心後に上清(S)にあり、沈殿(P)しなかった。ところが、F-アクチン共存下では速筋型が最も多く、次に心筋型が沈殿した。遅筋型はあまり沈殿しなかった。この結果は、速筋型>心筋型>遅筋型の順にアクチン線維との結合が強いことを示した。この結果をまとめたものが、図2である。



さらに、scatchard plot 解析を行った結果から、心筋型、速筋型、遅筋型のN端側領域はF-アクチンに対してそれぞれモル比0.6、0.8、0.2で結合が飽和し、その解離定数Kd(micro M)は1.8、1.1、9.3であることがわかった。

(2) C-タンパク質のアクチン結合部位をより詳細に決定するため、心筋型C-タンパク質はドメイン0-1(C0-C1)、ドメイン1-2

(C1-C2)、ドメイン2-4(C2-C4)の領域にHis-tagを融合した組み換え体タンパク質を作製した。速筋型C-タンパク質はドメイン1(F1)、ドメイン1-2(F1-F2)、ドメイン1-4(FN)からドメイン1の一部とリンカー配列の一部を除いたFNΔF1をHis-tag融合組み換え体タンパク質として作製した。

これらの組み換え体とF-アクチンの結合

心筋型C-タンパク質		アクチン結合能
CN (590aa, 66kD)	0 1 2 3 4	○
C0-C1 (245aa, 26kD)	0 1	△
C1-C2 (299aa, 27kD)	1 2	○
C2-C4 (231aa, 25kD)	2 3 4	×
速筋型C-タンパク質		
FN (516aa, 58kD)	1 2 3 4	○
F1 (182aa, 20kD)	1	×
F1-F2 (319aa, 36kD)	1 2	○
FNΔF1 (380aa, 43kD)	1 2 3 4	○

図3 心筋型と速筋型C-タンパク質のF-アクチン結合領域の同定

をF-アクチンとの共沈実験とHis-tag pull down assayにより解析した。その結果、図3に示したように心筋型はN末端側のドメイン1からリン酸化領域を含むリンカー領域を経てドメイン2の間の領域がアクチン結合部位の候補になった。速筋型はドメイン1とドメイン2の間のリンカー部位からドメイン2の一部を含む95アミノ酸の領域が結合部位であることがわかった。これらのことから、トロポニンIのアクチン結合部位と同一性を持つ領域がC-タンパク質のアクチン結合部位であることが予想された。

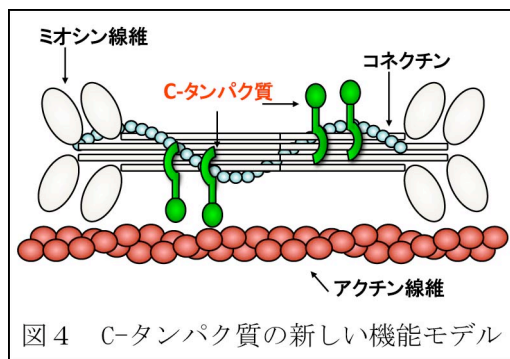
(3) C-タンパク質のアクチン結合に関してその生理的意味を明らかにするために、N端側組み換え体タンパク質がアクトミオシンATPase活性に及ぼす影響を検討した。その結果、遅筋型のフラグメントはアクチンとミオシンのみからなる場合(コントロール)とほとんど違いが無く、アクトミオシンATPase活性に影響を与えなかった。一方、速筋型C-タンパク質のN端側領域はアクトミオシンATPase活性を50%以上抑制した。このような抑制効果は心筋型でも見られた。

共沈実験からアクチン線維に対する結合が、遅筋型に比べて速筋型と心筋型で強いことから、速筋型と心筋型のC-タンパク質はN端側領域でアクチンと強固に結合することで、アクチン-ミオシン相互作用を抑制していると考えられる。

心筋型C-タンパク質のアクチン結合領域

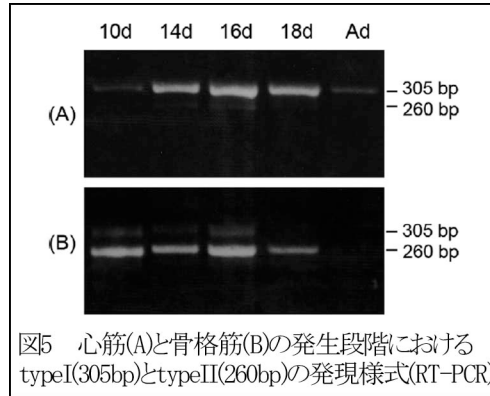
がドメイン1-2のリンカー領域で、そこには心筋型特異的なリン酸化領域が含まれることから、心筋ではC-タンパク質のリン酸化によりアクチン-ミオシン相互作用が制御されている事が示唆される。一方、速筋型C-タンパク質のアクチン結合領域もドメイン1-2のリンカー領域だが、リン酸化部位が無いことより、骨格筋において速筋型は恒常的にアクチン-ミオシン相互作用に影響を与えることが示唆された。

本研究の結果から、従来のモデルで示されていた、C-タンパク質はコネクチンと結合しミオシン線維束をタガのように巻くことでその束の形成と安定化に寄与するだけでなく、N 端側領域でミオシンとアクチンに結合することで筋収縮の制御を行うという、新しい機能モデルを示すことができた (図4)。

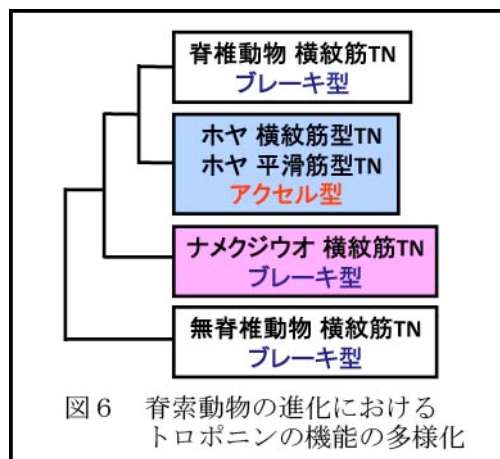


(4) 心筋型C-タンパク質には、ドメイン1と2の間に A-kinase によってリン酸化される心筋型特異的なリン酸化領域が存在する。以前研究代表者らは、ニワトリの心筋型C-タンパク質では、この領域中で最も重要なアミノ酸配列(P-seq)を持つ type I バリエントと持たない type II バリエントが存在する事を報告した(Yasuda et al., J Mol Cell Cardiol. 1995)。P-seq を持つことで type I はリン酸化の制御を受けるが、type II は制御を受けない。本研究は、特異的なリン酸化領域を持つことでリン酸化の制御を受ける type I と、P-seq を持たないためリン酸化の制御を受けない type II の二つのバリエントの心筋及び骨格筋の初期筋原繊維形成過程における発現様式を明らかにするため、type I 特異的な抗体を作製した。この type I 特異的な抗体と両方のバリエントを認識する抗体を併用することで間接蛍光抗体法と免疫ブロットを行った。その結果、type I バリエントは発生過程を通して心臓に発現しており、心房と心室の両方の筋原繊維に局在していた。一方、type II バリエントは心筋ではほとんど発現せず、発生中の初期骨格筋に特異的に発現していることがわかった。この結果は RT-PCR によっても確認できた(図5、Saruta et al.,

Zoological Sci. 2010)。



(5) トロポニン3は TnT、TnC、TnI の3成分からなる筋収縮の主要な制御因子である。一般的に脊椎動物では横紋筋にのみ存在し、収縮のブレーキとして働く。しかし、原索動物マボヤでは平滑筋にも存在し、収縮のアクセルとして働くことがわかってきた。本研究は原索動物から脊椎動物における収縮制御機構を明らかにするために、カタユレイボヤとナメクジウオのトロポニン3成分の遺伝子を単離し、組み換え体を作製して機能を解析した。その結果カタユレイボヤでは骨格筋と平滑筋のトロポニンが共にアクセル型の機能を示し尾索類ホヤで一般的な特性であることがわかった。一方、ナメクジウオは脊椎動物と同様にブレーキ型の特性を持つことが明らかになった。遺伝子による系統解析の結果と合わせて、頭索類のトロポニンが脊椎動物トロポニンの祖先型で、尾索類トロポニンは進化の過程でユニークな機能特性を獲得したことがわかった(図6、Dennisson et al., Zoological Sci. 2010 印刷中)。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

① Functional Characteristics of Amphioxus Troponin in Regulation of Muscle Contraction. Dennisson J, Tando Y, Sato N, Ogasawara M, Kubokawa K, Obinata T. Zoological Science (2010, in press) (査読あり)

② Differential expression of two cardiac myosin-binding protein-C isoforms in developing chicken cardiac and skeletal muscle cells. Saruta K, Obinata T, Sato N. Zoological Science. 2010.27, 1-7. (査読あり)

③ Comparative study of protochordate troponin in the regulation of muscle contraction. Oshiro K, Dennisson J, Tando Y, Sato N, Obinata T. Proceedings of the 9th International Congress on Cell Biology ICCB2008. Medimond, Italy. 2009. April. 79-83 (査読なし)

④ Identification of cardiac-specific myosin light chain kinase. Chan JY, Takeda M, Briggs LE, Graham ML, Lu JT, Horikoshi N, Weinberg EO, Aoki H, Sato N, Chien KR, Kasahara H. Circulation Research. 2008. 102, 571-580 (査読あり)

⑤ TBP-interacting protein 120B (TIP120B)/cullin-associated and neddylation-dissociated 2 (CAND2) inhibits SCF-dependent ubiquitination of myogenin and accelerates myogenic differentiation. Shiraishi S, Zhou C, Aoki T, Sato N, Chiba T, Tanaka K, Yoshida S, Nabeshima Y, Nabeshima Y, Tamura TA. Journal of Biological Chemistry. 2007. 282: 9017-28. (査読あり)

⑥ Activity of cofilin can be regulated by a mechanism other than phosphorylation/dephosphorylation in muscle cells in culture. Hosoda A, Sato N, Nagaoka R, Abe H, Obinata T. Journal of Muscle Research and Cell Motility. 2007, 28, 183-94. (査読あり)

[学会発表] (計7件)

① 佐藤成樹. 脊索動物の進化とトロポニンの機能的多様化. 日本動物学会第80回大会, 2009年9月.

② Sato N. N-terminal domains of myosin-binding protein-C are involved in binding to actin filaments in an isoform-dependent manner. The 9th International Congress on Cell Biology & The 20th Annual Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, 2008, October.

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 成樹 (SATO NARUKI)

千葉大学・大学院融合科学研究科・講師

研究者番号: 40261896

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

山本 啓一 (YAMAMOTO KEIICHI)

千葉大学・大学院融合科学研究科・教授

研究者番号: 70053361

伊藤 光二 (ITO KOHJI)

千葉大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 50302526