

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 21 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：22570072

研究課題名（和文）脊椎動物におけるnebulinスーパーファミリーの生理機能の進化

研究課題名（英文）functional evolution of nebulin superfamily in vertebrates

研究代表者

寺崎 朝子 (Asako TERASAKI)

千葉大学・大学院融合科学研究科・講師

研究者番号：30311616

研究成果の概要（和文）：本研究は多様化した nebulin スーパーファミリーの脊椎動物における生理的な役割を明らかにするために、脊椎動物で出現した *lasp-1*・*lasp-2*・*nebulin* の生化学的な性質を明らかにしつつ、細胞・組織・個体における機能を筋肉と神経を中心に調べた。その結果、鳥類や哺乳類で報告されていた *lasp-1* と *lasp-2* の組織分布の違いが魚類でも確認され、初期胚における発現時期も異なることも示された、また、哺乳類と鳥類では *lasp-1* と *lasp-2* の神経細胞内での局在に共通点と相違点があることが明らかとなった。特に *lasp-2* の *deletion construct* や *siRNA* を用いた実験から、*lasp-2* が神経細胞の形態や運動を制御していることが示された。さらに、哺乳類と鳥類のグリア細胞の膜輸送・細胞接着・細胞突起の形成に *lasp-2* が関与していることも明らかとなった。*GFP* 融合タンパク質の導入や免疫染色から *lasp-2* の機能は哺乳類と鳥類では共通であることも推定された。

研究成果の概要（英文）：Nebulin superfamily proteins such as *lasp*, *lasp-1*, *lasp-2*, *nebulin*, *nebulin*, *nebulin*, and *N-RAP* have similar domain structures (*nebulin* repeats, LIM domain and SH3 domain) and are thought to be generated from the same ancestral gene. This study tried to reveal their functional evolution in nerve and muscle tissues in vertebrates. We found tissue distribution of *lasp-1* and *lasp-2* were different in zebra fish. Localization of *lasp-1* and *lasp-2* were different in primary neurons of chicken and rat and *siRNA* of *lasp-2* and dominant negative constructs of *lasp-2* resulted morphological abnormality in filopodia in the primary neurons. *Lasp-2* play roles in vesicle transport, cell-substrate attachment and peripheral astrocyte process in glial cells of chicken and rat.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2300000	690000	2990000
2011年度	700000	210000	910000
2012年度	700000	210000	910000
年度			
年度			
総計	3700000	1110000	4810000

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：nebulin, 分子進化

1. 研究開始当初の背景

鳥類のnebulin リピートを持つタンパク質

(nebulin スーパーファミリー) には **lasp-1**、**lasp-2**、**nebulette**、**N-RAP**、**nebulin** の 5 種が存在し、全てがアクチン結合活性を持つ。

Nebulin スーパーファミリーのドメイン構造や遺伝子構造には類似点が多いことから、申請者は分子進化に着目して解析を進めてきた (Terasaki et al., 2006 = 申請者業績)。

線虫など無脊椎動物の **nebulin** スーパーファミリーは **lasp** のみだが、原索動物では **lasp** (Terasaki et al., 2008 = 申請者業績) と **nebulin** (Hanashima et al., 2009) が存在し、魚類では **lasp-1** と **lasp-2** が出現する。

申請者は各生物で **nebulin** スーパーファミリー遺伝子のシンテニー (染色体上の周辺遺伝子の相同性) を比較し、ほとんどの **nebulin** スーパーファミリーは祖先型 **lasp** から遺伝子重複によって生じたことを明らかにした (投稿準備中)。また、鳥類や哺乳類では **lasp-2** 遺伝子の **exon** に **nebulette** の **exon** が割り込んでいることから、**nebulette** は遺伝子挿入によって生じた **lasp-2** のアイソフォームであることを明らかにした (Terasaki et al., 2006)。

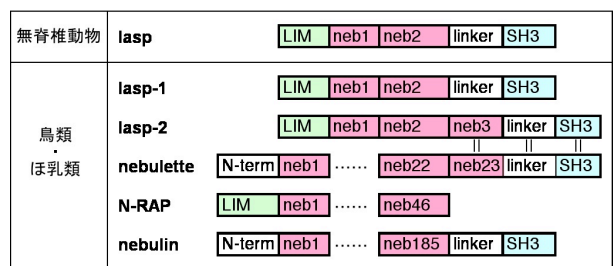
さらに、魚類ではこのような **lasp-2** 遺伝子内への **exon** の挿入は見られないことから、魚類には **nebulette** が存在しないことも示した (2008年動物学会)。原索動物や脊椎動物の **nebulin** は骨格筋特異的に発現し、サルコメアの I 帯でアクチンを安定化するという共通した役割を持っていることが古くから調べられている。鳥類や哺乳類の **N-RAP** も骨格筋の筋腱接合部や心筋の介在板でサルコメアの末端の構造を維持していることが明らかになっている。これに対して脊椎動物の **lasp-1**・

lasp-2・**nebulette** の研究の歴史は浅く、生物種を越えて共通する機能が十分に解析されていない。

哺乳類の **lasp-1** は非筋組織に広く発現し、ラメリポディア形成や細胞接着・エンドサイトーシスに参与する (Grunewald et al., 2008)。鳥類の **lasp-2** は神経系組織で高発現し、神経細胞の運動に参与するとともに横紋筋の Z 線にも局在する (Terasaki et al., 2004、Ziesennis et al, 2008 = 申請者業績)。しかし、鳥類や哺乳類で **lasp-1** と **lasp-2** の局在を同時に解析した例は無く、魚類の **lasp-1** と **lasp-2** は全く解析されていない。

Lasp-2 が発現している筋組織や神経系組織の構造は、脊椎動物と原索動物では大きな違いが見られる。原索動物の心臓は袋状だが、脊椎動物は心室と心房から成る。原索動物の中枢神経は未分化だが、脊椎動物では高度に分化し (大脳・中脳・間脳・小脳)、大脳皮質も進化に伴って複雑化している (Abdel-Mannan et al., 2008)。

このような筋組織や神経系組織の発達に伴い、**nebulin** スーパーファミリーは多様化してきたことが推測される。



原索動物			硬骨魚類			鳥類			ほ乳類		
lasp	中枢神経 神経節・神経索	lasp-1	大脳								(成長円錐・スバイン?)
			横紋筋								
	その他組織	lasp-2	大脳								細胞接着部位・ラメリポディア
			横紋筋								
その他組織	広く発現	nebulette	心臓	存在せず							骨格筋と心筋の Z 線・心筋の介在板
			N-RAP	横紋筋	存在せず?						
nebulin	横紋筋	I 帯	nebulin	骨格筋							骨格筋特異的に発現し、I 帯に局在

2. 研究の目的

本研究は多様化した **nebulin** スーパーファミリーの脊椎動物における生理的な役割を明らかにするために、脊椎動物で出現した **lasp-1・lasp-2・nebulette**の機能を筋肉と神経を中心に調べる。解析には **nebulette** を持たない魚類（ゼブラフィッシュ）と、**nebulin** スーパーファミリーが全て揃っている鳥類（ニワトリ）・哺乳類（マウス）を用いる。

A. 組織発現と組織内局在：魚類・鳥類・哺乳類では **lasp-1** と **lasp-2** の発現する組織に共通性が見られるか？**Nebulette** を持たない魚類の心臓では**lasp-2**が機能を代替するのか？

B. 生化学的な性質：**lasp-1**と**lasp-2** のアクチン結合活性や、アクチン以外の結合タンパク質は異なるのか？

C. 細胞における機能：**lasp-1**と**lasp-2** が同時に発現している鳥類や哺乳類の脳では神経細胞における機能が異なるのか？

D. 組織や個体における機能：**lasp-1・lasp-2・nebulette** の発現抑制や **dominant negative mutant** の導入によって心臓や脳の形成異常や機能異常が起きるか？

E. 機能相補性：**lasp-1・lasp-2・nebulette** の機能は魚類・鳥類・哺乳類で全く同じなのか？

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュで **lasp-1** と **lasp-2** が発現する組織を確認し、ニワトリ・マウスでは **lasp-1** と **lasp-2** が同時に発現している大脳で両者の組織内分布を比較する。並行して生化学的な性質の違いを調べ、細胞レベルでの機能解析を進めることで、組織や細胞における局在との関連を推定する。最後に **lasp-1・lasp-2・nebulette** の個体レベルでの発現抑制実験や機能相補実験で脊椎動物に共通する機能を検証する。

4. 研究成果

A. **lasp** ファミリーの組織発現と組織内局在：

ゼブラフィッシュ胚における **lasp-1** は胚全体に母性 mRNA として分布し、**epiboly** 期に **hatching gland**になる部位に発現が見られ、体節形成期には脳と目で発現が強いことが観察された。**Lasp-2** の母性 mRNA は検出されず、原腸陥入期に神経組織に発現が見られ、体節形成期には脳と目で発現が見られるなど、違いのあることが明らかになった。

B. **lasp** ファミリーの生化学的な性質：

ニワトリの **lasp-1** と **lasp-2** にアクチン結合の親和性に差は見られず、トロポミオシンとの競合も無いことが共沈実験で確認されたことから、アクチン以外の結合タンパク質の違いについて解析中である。

C. **lasp** ファミリーの細胞における機能：

魚類・鳥類・哺乳類の脳組織とも神経細胞の他にグリア細胞（アストロサイト・オリゴデンドロサイト・ミクログリア）が含まれることから、**lasp-1** および **lasp-2** の局在を大脳組織や末梢神経由来の初代培養細胞およびアストロサイトで観察した。

ニワトリ感覚神経細胞では **lasp-1・lasp-2** ともフィロポディアではアクチン束に沿ったドット状の局在を示したが、**T-zone** における局在に差が見られる他、**lasp-1** は成長円錐の辺縁部に **lasp-2** より強く集積し、両者の機能に共通点と相違点があることが推測された。

ヒト **lasp-2** に対する抗体や GFP-ヒト **lasp-2** を新たに作成し、ラット海馬由来の神経細胞の成長円錐でも **lasp-2** がニワトリ感覚神経細胞と同様の局在を示すことを確認した。さらに、ラット海馬由来の神経細胞では神経ネットワークの形成に重要な役割を果た

すスパインにも **lasp-2** が局在することが示された。

ニワトリ大脳由来のアストロサイトおよびラット由来のアストロサイトにおける **lasp-2** の挙動を免疫染色や **GFP-lasp-2** の導入で観察したところ、**lasp-2** はアストロサイトと神経細胞や血管との接着に関与するアクチンフィラメントの豊富な構造である **peripheral astrocyte process** に含まれるだけでなく、細胞と基質の接着部で **lasp-2** と **zyxin** が共局在することや、**lasp-2** の一部は細胞内の膜輸送と思われる構造に存在しアクチンフィラメントと思われる構造の上を運動していることが示された。

ニワトリ神経細胞とニワトリアストロサイトのどちらにおいても、**lasp-2** の局在にはアクチン結合ドメイン (Nakagawa et al., 2009 = 申請者業績) が必須であることが **deletion construct** で確認された。

さらに、ニワトリ培養神経細胞にニワトリ **lasp-2** に対する **siRNA** やニワトリ **lasp-2** の **deletion construct** を導入すると成長円錐の形態や運動に異常が見られ、詳細な画像解析から、成長円錐のフィロポディアにおけるアクチン系細胞骨格の変化が運動性の変化に影響していることが推測された。

D. 組織や個体における機能：

個体レベルでの過剰発現・発現抑制に関しては現在検討中である。

E. 機能相補性：

ヒトとニワトリの **GFP-lasp-2** を相互に入れ替えて初代培養神経細胞に導入しても **lasp-2** に特徴的な挙動を示したことから、両者は機能的に相補することが確認された。魚類との比較は現在検討中である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 14 件)
主著者として発表 3 件、
学生と共著で発表 11 件

Terasaki AG, Kaneko J, Otaki Y, Nakayama A, Akiyama H, Kamiguchi H
Lasp-2 in chicken DRG neurons
日本細胞生物学会第 64 回大会 神戸国際会議場 2012 年 5 月

寺崎朝子・兼子純平・中田志保子・大瀧雄三・中山綾子
アクチン結合タンパク質 **lasp-2** の神経細胞やグリア細胞における局在
生体運動班会議 筑波大学 2012 年 1 月

Terasaki AG, Kiyatake T, Nakayama A, Nakae H, McCann RO
Molecular evolution of lasp family proteins
日本細胞生物学会第 63 回大会 北海道大学
2011 年 6 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺崎 朝子 (Asako TERASAKI) 千葉大学・融合科学研究科・講師
研究者番号：30311616

(2) 研究分担者

勝山 裕 (Yu Katsuyama) 神戸大学・医学(系)研究科(研究院)助教
研究者番号：10359862

(3) 連携研究者

上口 裕之 (Hiroyuki Kamiguchi) 独立行政法人理化学研究所・チームリーダー
研究者番号：10233933

秋山 博紀 (Hiroki Akiyama) 独立行政法人理化学研究所・リサーチアソシエイト
研究者番号：40568854