

## 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 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22770065

研究課題名（和文）

筋弾性タンパク質コネクチンによる太いフィラメントの長さ調節機構の解明

研究課題名（英文）

The mechanism for length regulation of thick filament by muscle elastic protein connectin

研究代表者

花島 章 (HANASHIMA AKIRA)

千葉大学・大学院理学研究科・特任研究員

研究者番号：70572981

研究成果の概要（和文）：

筋弾性タンパク質コネクチンに結合する新しいタンパク質を同定した。解析の結果、このタンパク質は、横紋筋の太いフィラメントの端と筋-神経接合部に局在していた。そして、このタンパク質の遺伝子は 25 個のエキソンから構成され、5 種類のスプライシングアイソフォームを作り出すことが明らかとなった。さらに、このタンパク質の結合タンパク質、分解関連タンパク質を同定した。また、ヒトやショウジョウバエを含む多様な動物に存在することを見出した。

研究成果の概要（英文）：

We found a novel protein that binds to muscle elastic protein connectin. Our analysis indicates this protein locates at the edge of myosin filament and neuron-muscular junction on striated muscles, and the gene of this protein includes twenty-five exons and produces five splicing isoforms. Additionally, we identified the binding proteins and a break-down protein of novel protein, and also found the existence of this protein in various animals including human and Drosophila.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：コネクチン、横紋筋

## 1. 研究開始当初の背景

横紋筋の太いフィラメントの長さ (1.6 $\mu$ m,

ミオシン 294 分子) はミオシンの自己集合で決まるとい説が提唱されており、現在の最

も有力な説となっている。確かに、あるイオン強度の条件下ではミオシンフィラメントの長さが試験管内でおおよそ揃う時もある。しかし、正確にそろえることは非常に難しく、正確さを決める未知の調節システムが存在するのではないかと思われる。そのため、筋弾性タンパク質コネクチンが分子定規としてミオシンフィラメントの長さを決めるという説(コネクチン分子定規仮説、Whiting et al. 1989) が提唱された。この説は、サルコメアの Z 線から M 線までを 1 分子で繋ぐコネクチンの 3 つの領域 (Z 線のタンパク質と結合する Z 線領域、バネの役割を果たしている I 帯領域、太いフィラメントと結合する A 帯領域) のうち、A 帯領域の構造が太いフィラメント内のミオシンフィラメントや C タンパク質の周期性と一致している (Labeit and Kolmerer. 1995) ことを根拠としている。しかし、はっきりとしたことは明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

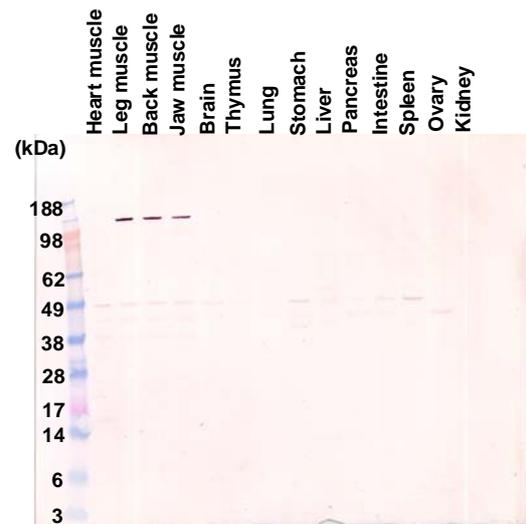
申請者はコネクチンを分子定規としてミオシンが重合した後、その重合を止める未知のタンパク質が存在する可能性を考えた。そこで、定規の端に結合し、ミオシン末端に影響を与える未知タンパク質の探索を行うことで、コネクチンによる太いフィラメントの長さ調節機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

コネクチンの太いフィラメント末端領域に結合する未知のタンパク質を探索 (Y2H スクリーニング) し、実際にミオシンフィラメント末端に局在しているものを選別 (免疫蛍光顕微鏡観察) し、全一次構造決定、遺伝子構造決定、スプライシングアイソフォームの同定等を行った後、各種機能解析を行う。

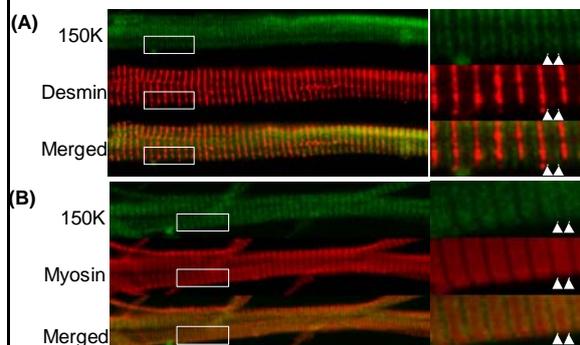
## 4. 研究成果

コネクチンの太いフィラメント末端領域に結合するタンパク質を Y2H スクリーニングで探索した。その結果、コネクチンと関連があると考えられる未知のタンパク質 (150K) を得た。このタンパク質の C 末端に対して抗体を作製し、マウスの各組織の全抽出物に対してウェスタンブロットを行ったところ、骨格筋の 150KDa タンパク質に反応が見られた (図 1)。



(図 1) 150K 抗体でのウェスタンブロット

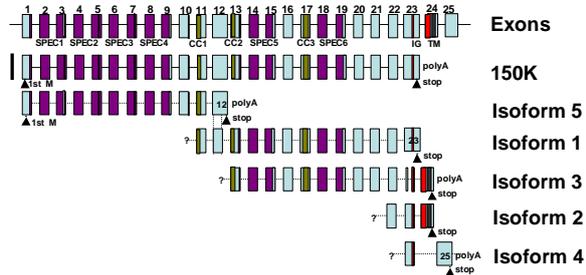
さらに骨格筋を免疫蛍光抗体法で染色したところ、サルコメアの AI ジャンクション近傍の太いフィラメント末端付近に反応が見られた (図 2)。



(図 2) 150K の免疫蛍光顕微鏡観察

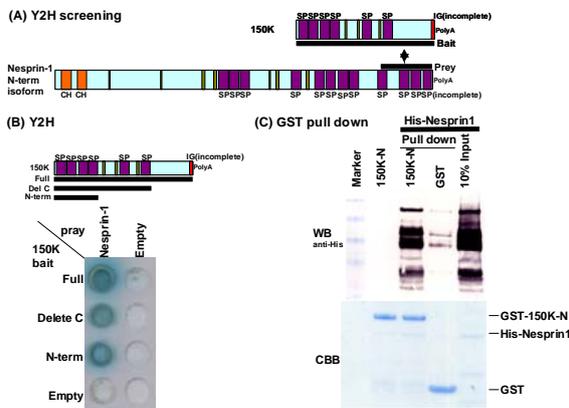
続いて、その一次構造決定、遺伝子構造解析、スプライシングアイソフォームの同定を

行ったところ、150K 遺伝子は 25 個のエクソンから構成され、5 種類のスプライシングアイソフォームを作り出すことが明らかとなった (図 3)。



(図 3) 150K のアイソフォーム

次に、GFP を融合した 150K を骨格筋に導入したところ、サルコメア内の他、筋-神経接合部 (NMJ) に局在が観察された。また、150K に結合するタンパク質を Y2H スクリーニングで探索したところ、様々な結合タンパク質の候補が得られた。その中でも、特にサルコメアの AI ジャンクション領域近傍と NMJ に局在するタンパク質である Nesprin-1 に焦点を当てて解析を行い、Y2H の他、pull down 法でも結合することを確かめた (図 4)。



(図 4) 150K の結合タンパク質

そして、このタンパク質が脱神経した骨格筋で代謝タンパク質 MuRF1 により分解されることをノックアウトマウスを用いた解析により明らかにした。さらには、150K がヒトのみならず、ショウジョウバエを含む多様な動物に存在し、そのドメイン構成は保存され

ていることを見出した。従って本研究により、骨格筋のサルコメアと神経系には新規タンパク質 150K が存在することが明らかとなった。

## 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 5 件)

- ① Rudolf R, Bogomolovas J, Strack S, Choi K, Khan MM, Wagner A, Brohm K, Hanashima A, Gasch A, Labeit D, Labeit S. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor turnover by MuRF1 connects muscle activity to endo/lysosomal and atrophy pathways. *AGE*. In press. 査読有  
DOI: 10.1007/s11357-012-9468-9
- ② Bao Y, Kake T, Hanashima A, Nomiya Y, Kubokawa K, Kimura S. Actin capping proteins, CapZ (beta-actinin) and tropomodulin in amphioxus striated muscle. *GENE* 510: 78-86 (2012). 査読有  
DOI: 10.1016/j.gene.2012.07.081
- ③ 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*. 56: 18-24 (2012). 査読有  
DOI: 10.1016/j.ymeth.2011.12.010
- ④ \*Ohtsuka S, \*Hanashima A, Kubokawa K, Bao Y, Tando Y, Kohmaru J, Nakaya H, Maruyama K, Kimura S. Amphioxus Connectin Exhibits Merged Structure as Invertebrate Connectin in I-Band Region and Vertebrate Connectin in A-Band Region. *J Mol Biol*. 406: 415-426 (2011) (\*共同筆頭著者). 査読有  
DOI: 10.1016/j.jmb.2011.04.010

- ⑤ Chitose R, Watanabe A, Asano M, **Hanashima A**, Sasano K, Bao Y, Maruyama K, Kimura S. Isolation of Nebulin from Rabbit Skeletal Muscle and Its Interaction with Actin. *J Biomed Biotech*. 2010: 108495 (2010). 査読有  
DOI: 10.1155/2010/108495

[学会発表] (計 18 件)

- ① 佐々野耕平、○倉沢正義、**花島章**、包玉龍、中内祐二、木村澄子「プラナリアのコネクチン様タンパク質の配列」『日本生物物理学会第 50 回年会』、1PS013、名古屋、2012 年 9 月 22 日、(ポスター発表)
- ② ○包玉龍、**花島章**、袖山文彰、木村澄子「軟体動物横紋筋のコネクチン様タンパク質」『日本生物物理学会第 50 回年会』、1PS011、名古屋、2012 年 9 月 22 日、(ポスター発表)
- ③ ○**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』、1A1545、大阪、2012 年 9 月 13 日、(口頭発表)
- ④ ○西川彰、浜岡知哉、小笠原道生、**花島章**、木村澄子「ホヤ心筋ネブリンの一次構造解析」『日本動物学会第 83 回大会』、1A1500、大阪、2012 年 9 月 13 日、(口頭発表)
- ⑤ ○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』、1A1430、大阪、2012 年 9 月 13 日、(口頭発表)
- ⑥ ○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』、1A1415、大阪、2012 年 9 月 13 日、(口頭発表)
- ⑦ ○**Hanashima A**, Bao Y, Kimura S. “ Genomic- and Protein-Based Approaches for Connectin-Like Protein Identification in Amphioxus and Ascidian.” BIT’ s 3rd World DNA and Genome day. Xi’ an, China, April 28, 2012. (招待講演)
- ⑧ ○包玉龍、**花島章**、松浦哲、木村澄子「無脊椎動物平滑筋のコネクチン様タンパク質」『第 49 回生体運動研究合同班会議』、No.10、筑波、2012 年 1 月 6 日、(口頭発表)
- ⑨ 日高暢也、○木村澄子、**花島章**「カイメン、ヒドラのコネクチン様タンパク質の探索」『日本動物学会第 82 回大会』、1P161、旭川、2011 年 9 月 21 日、(ポスター発表)
- ⑩ ○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』、1P141、旭川、2011 年 9 月 21 日、(ポスター発表)
- ⑪ ○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』、1P140、旭川、2011 年 9 月 21 日、(ポスター発表)
- ⑫ ○佐々野耕平、**花島章**、大塚聡、松浦哲、幸丸純貴、木村澄子「コネクチン様タンパク質の多様性」『第 48 回生体運動研究合同班会議』、No.10、大阪、2011 年 1 月 7 日、(口頭発表)
- ⑬ ○ Bao Y, Kake T, **Hanashima A**, Kubokawa K, Tando Y, Kimura S. "Amphioxus striated muscle has beta-actinin and tropomodulin." International Conference on Bioinformatics, #134, Tokyo, Japan, Sep 26, 2010. (ポスター発表、査読付)
- ⑭ Ohtsuka S, **Hanashima A**, Kubokawa K, Tando Y, ○ Kimura S. "The connectin-like protein gene of amphioxus striated muscle." International Conference on Bioinformatics, #131, Tokyo, Japan, Sep 26, 2010. (ポスター発表、査読付)
- ⑮ ○包玉龍、黒澤元、**花島章**、木村澄子「ホタテ貝横紋筋のコネクチン様タンパク質」『日本動物学会第 81 回大会』、3F1615、東京、2010 年 9 月 25 日、(口頭発表)
- ⑯ ○松浦哲、**花島章**、包玉龍、木村澄子「ウニ コネクチン様タンパク質のドメイン構造」『日本動物学会第 81 回大会』、3F1600、東京、2010 年 9 月 25 日、(口頭発表)
- ⑰ ○佐々野耕平、**花島章**、中内祐二、木村澄子「プラナリアのコネクチン様タンパク質の探索」『日本生物物理学会第 48 回年会』、2P162、仙台、2010 年 9 月 21 日、(ポスター発表)
- ⑱ ○包玉龍、掛武威、**花島章**、木村澄子「頭索動物ナメクジウオのトロポモジュリンの同定」『第 62 回日本細胞生物学会大会』2P006、大阪、2010 年 5 月 21 日、(ポスター発表)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

花島 章 (HANASHIMA AKIRA)  
千葉大学・大学院理学研究科・特任研究員  
研究者番号：70572981

### (2)研究分担者 なし

### (3)連携研究者 なし