

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24年 4月25日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770185

研究課題名（和文） Nebulin 複合体による新規のアクチン重合核形成機構とその生理的役割

研究課題名（英文） A novel mechanism of actin nucleation by nebulin complex and its physiological role

研究代表者

高野 和儀（TAKANO KAZUNORI）

千葉大学・大学院融合科学研究科・助教

研究者番号：60466860

研究成果の概要（和文）：アクチン線維は細胞のかたちづくりや、横紋筋に含まれる収縮構造である筋原線維の形成に必要である。しかし、骨格筋が肥大する際に起こる筋原線維形成の機構はこれまで不明であった。本研究では、nebulin 複合体による Z 線での新たなアクチン線維形成の機構を解明しただけでなく、生理的な骨格筋肥大において、このアクチン線維形成が必要であることを明らかにした。また本研究により、心疾患につながる心筋肥大においても、この新たなアクチン重合核形成機構が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Actin filament is required for cell shape and formation of myofibril, which is contractile apparatus in striated muscle. However, the mechanism how myofibril is built during skeletal muscle hypertrophy remains obscure. In this study, not only it revealed a novel mechanism of actin filament formation at the Z-band by nebulin complex, but also the mechanism was essential for physiological skeletal muscle hypertrophy. Furthermore, this study suggested a possibility that the novel mechanism of actin filament formation might be involved in cardiac hypertrophy leading to heart failure.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2011 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞骨格・運動

1. 研究開始当初の背景

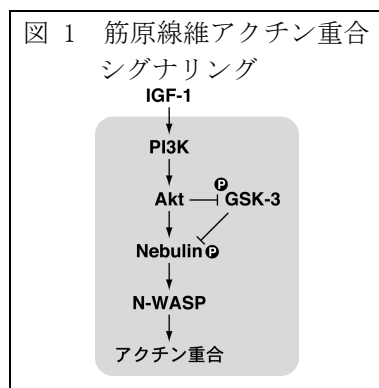
〈アクチン重合核形成と筋原線維形成〉

アクチン細胞骨格は細胞の形態、運動、分裂など多様な機能を担っている。細胞内のアクチン重合には核形成因子による重合核の

形成が必要である。非筋細胞のアクチン重合にかかわる核形成因子として、これまでに Arp2/3 複合体と formin が知られていたが、さらに最近、Spire, Cobl, Lmod などが同定され、大いに注目されている (Chesarone and Goode, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2009)。一

方、横紋筋の筋原線維はアクチン線維とミオシン線維が整然と配列した構造である。筋肥大において筋原線維のアクチン線維はZ線から形成されることを研究代表者は解明したが、このアクチン線維形成の分子機構や核形成因子はこれまで不明であった。

インスリン様増殖因子 (IGF-1) により骨格筋の肥大が誘導されるが、この過程では筋原線維形成が不可欠である。研究代表者はこの点に着目して、IGF-1 による筋原線維のアクチン線維形成のシグナル伝達機構の解明に取り組み、次のことがらを明らかにした。骨格筋の筋原線維のZ線には、非筋細胞において Arp2/3 複合体を活性化してアクチン重合を引き起こす N-WASP が局在していた。IGF-1 が作用しないと、GSK-3 が nebulin (Neb) のC末端をリン酸化した。リン酸化された Neb には N-WASP が結合できず、アクチン重合が起こらなかった。しかし IGF-1 が作用すると、PI3 キナーゼ (PI3K)-Akt シグナリングが活性化され、Akt により GSK-3 がリン酸化されて不活性化された。すると Neb のC末端はリン酸化されないため、N-WASP の Pro-rich ドメインが Neb の SH3 ドメインに結合し、N-WASP は Z 線に局在化した。N-WASP の作用によりアクチンは Z 線から重合し、アクチン線維が形成された (図 1)。



<新たなアクチン重合核形成の機構>

これまでの概念では、N-WASP は Arp2/3 複合体に結合して活性化し、枝分かれしたアクチン線維を形成する (Takenawa and Suetsugu, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007)。しかし筋原線維のアクチン線維は枝分かれのない直線状の線維である。また、筋原線維には Arp2/3 複合体は存在していないにも関わらず、この筋肥大におけるアクチン線維形成は N-WASP ノックダウンにより抑制された。したがって、次に N-WASP がどのようにして Arp2/3 複合体を介さずに直線状のアクチン線維を形成するかについて解明する必要があった。N-WASP にはアクチンモノマーを結合する WASP homology 2 (WH2)/verprolin-homology (V) ドメインが2つ並んでいる。また Neb にはアクチン結合モジュールが連続して 185 個

並んでいる。このため、N-WASP の WH2/V ドメインに結合した 2 個のアクチンモノマーと、Neb のアクチン結合モジュールに結合したアクチンモノマーが重合核を形成すれば、Arp2/3 複合体を介さずに直線状のアクチン線維を形成する可能性があると考えられた。

一方、Neb は nebulin (心筋特異的に発現) や Lasp1, Lasp2 (おもに非筋細胞に発現) とともに nebulin ファミリーを形成している (Panaviene and Moncman, *Cell Tissue Res.*, 2007)。これらはいずれも複数のアクチン結合モジュール、リン酸化を受ける Ser や Tyr に富んだリンカー領域、および C 末端の SH3 ドメインをもつ。SH3 ドメインは N-WASP の Pro-rich ドメインと結合するので、いずれのメンバーも N-WASP と複合体を形成して核形成因子として機能している可能性が考えられた。またこの複合体形成がリンカー領域のリン酸化により制御されている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

上述の結果に基づき、次のように新たな重合核形成機構とその生理的機能を解明する。

(1) N-WASP と Neb の複合体が、筋原線維形成におけるアクチン重合核形成因子として機能し、アクチン重合を引き起こすことを実証する。

(2) N-WASP と nebulin ファミリーの nebulin が複合体を形成し、共同して核形成をして、アクチン重合を引き起こすことを明らかにする。またリンカー領域のリン酸化が N-WASP との相互作用を制御しているかどうかを明らかにする。

(3) N-WASP と nebulin による核形成とアクチン重合が、心筋においてどのような機能を果たしているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) N-WASP と Neb の複合体が、核形成因子として機能してアクチン重合を引き起こすことを明らかにするため、ピレン標識アクチン重合アッセイと全反射顕微鏡 (TIRFM) を用いた経時的解析を行った。また、N-WASP の核形成に関与する領域を明らかにするため、N-WASP の WH2/V ドメインなどに変異を導入して同様の実験を行った。N-WASP は完全長のタンパク質を、Neb は C 末端領域を GST 融合タンパク質として精製した。それぞれのタンパク質に付加した GST タグは切断してアッセイに用いた。

(2) N-WASP と nebulin がそれぞれ複合体を形成することを明らかにするため、pull-down アッセイと免疫共沈アッセイを行った。なお、また、それぞれのタンパク質のドメイン

ン欠変異体を用いた結合実験により、N-WASPとnebulinの複合体形成様式を解明し、Nebと比較した。複合体形成がリンカー領域のリン酸化により調節されていることを解明するため、変異体の作製に取り組んだ。さらに、複合体形成により核形成因子として機能し、アクチン重合が起こることを(1)と同様に解析した。

(3) N-WASP-nebulin 複合体が心筋の筋原線維のアクチン線維形成にはたらいているかどうかを明らかにするため、nebulin siRNAを発現するベクターを構築した。また、EGFP-アクチンをマウス心臓に導入した。マウス心臓への遺伝子導入にはアデノウイルス系、またはエレクトロポレーション法を用いた。免疫共沈アッセイに用いるnebulin特異的抗体の作製も行い、生理的条件下でN-WASPとnebulinの複合体形成を検出した。

4. 研究成果

(1) N-WASP-Neb 複合体によるアクチン重合核形成機構

まず、NebがN-WASPと協調して引き起こすアクチン重合機構を明らかにする目的で、TIRFMによるアクチンフィラメントの動態解析を行った。その結果、Nebとの結合に必要なPro-rich領域やWH2/Vドメインを含むC末端領域を欠損させたN-WASPは、Nebとの協調作用が破綻することが明らかになった。また、Nebのアクチン結合モジュール単独でも濃度依存的にアクチン重合核形成の促進作用を認めたが、N-WASP単独ではこの作用はなかった。したがって、骨格筋ではZ線以外にアクチンモノマーの集積を認められないため、これまでの結果から、N-WASPはNebと結合することによりWH2/Vドメインを介してアクチンモノマーをZ線に局在させ、筋原線維形成に必要なZ線からのアクチン重合核形成をNebと協調して調節している可能性が考えられる。

(2) N-WASPとnebulinの複合体形成とアクチン重合

一方、心臓においても同様の機構がはたらいている可能性を検討する目的で、心筋特異的nebulinファミリーであるnebulinについて種々の発現ベクターを構築し、nebulin(FL)、nebulin(deltaN-term)、nebulin(deltaSH3)、nebulin(SH3)をCOS-1細胞に発現させてpull-downアッセイと免疫共沈アッセイを行った。その結果、nebulinのSH3ドメインとN-WASPが結合することを見出した。逆に、N-WASP(FL)、N-WASP(Pro)はnebulinと結合したが、N-WASP(deltaPro)はnebulinと結合しなかった。したがって、nebulinとN-WASPと

の複合体形成様式はNebと同様に、SH3ドメインとPro-rich領域の直接結合であることが示された。さらに、骨格筋と同様にマウス心筋においても、N-WASPはnebulinのSH3ドメインが存在するZ線に局在した。そこで、nebulinがNeb同様にN-WASPと協調してアクチン線維形成にかかわる可能性を検討したところ、完全長の組換えnebulinはN-WASPと結合してアクチン重合を促進した。また、nebulinのリンカー領域がリン酸化されるのか、また、Nebと相同のSer残基がリン酸化されるのかは、変異体の作製が終了次第、解析を進めていく方針だが、少なくともnebulinはNeb同様に、IGF-1により脱リン酸化が誘導された。以上の解析から、nebulinはNeb同様にシグナル依存的にN-WASPと結合し、筋原線維Z線からのアクチン重合核形成にかかわる可能性が示された。

(3) N-WASP-nebulinファミリー複合体の生理的な役割

N-WASP siRNAを用いたマウスモデルの解析により、N-WASPの機能はIGF-1による骨格筋肥大に必要不可欠であった。したがって、骨格筋の筋原線維形成に必須であるアクチン線維形成には、研究代表者が明らかにした新規のアクチン重合核形成機構が重要であることが示された。一方、心筋肥大とそれに引き続き起こる心筋症を誘導することが知られているangiotensin-IIを刺激することにより、nebulinとN-WASPが免疫共沈することを明らかにした。したがって、N-WASPとnebulinファミリーとの結合とその役割は、普遍的に筋肥大を引き起こすものと推察される。また、心筋におけるアクチン重合解析を行うために、マウス心臓への遺伝子導入系を検討したところ、エレクトロポレーション法よりもアデノウイルス系の方が非常に効率良く導入された。現在はアデノウイルス系を用いて心臓におけるRNAi実験等を遂行中である。さらに、EGFP-アクチンをマウスの心臓に発現させてアクチン線維形成を可視化したところ、骨格筋と同様に、アクチンモノマーはN-WASPが局在するZ線から取り込まれた。したがって、生体内における横紋筋の筋原線維Z線は普遍的にアクチン重合の場であることが明らかになった。

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4件)

① Senju, Y., Itoh, Y., Takano, K., Hamada, S., and Suetsugu, S. (2011) Essential roles of PACSIN2/syndapin-II in caveolae

membrane sculpting. *J. Cell Sci.* 124: 2032-2040. DOI: 10.1242/jcs.086264 (査読有り)

② 高野和儀, 渡邊-高野晴子, 遠藤剛. (2011) Nebulin と N-WASP の複合体が IGF-1 による筋原線維のアクチン線維形成を担う. *実験医学* 29: 1273-1276. (査読無し)

③ 高野和儀, 遠藤剛. (2011) ライフサイエンス新着論文レビュー <http://first.lifesciencedb.jp/archives/1887>

④ Takano, K., Watanabe-Takano, H., Suetsugu, S., Kurita, S., Tsujita, K., Kimura, S., Karatsu, T., Takenawa, T., and Endo, T. (2010) Nebulin and N-WASP cooperate to cause IGF-1-induced sarcomeric actin filament formation. *Science* 330: 1536-1540. DOI: 10.1126/science.1197767 (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

① 高野和儀, 渡邊-高野晴子, 竹縄忠臣, 遠藤剛『骨格筋と心筋におけるアクチン重合核形成と伸長の分子機構』第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 23 日 京都国際会館

② 遠藤剛, 高野和儀『筋収縮と筋再生・筋肥大を担う筋原線維のアクチン線維形成機構』第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 21 日 京都国際会館

③ 高野和儀, 竹縄忠臣, 遠藤剛『Nebulette と N-WASP は心筋筋原線維のアクチン線維形成にかかわっている』第 63 回日本細胞生物学会大会 2011 年 6 月 28 日 北海道大学

④ 高野和儀, 渡邊-高野晴子, 末次志郎, 竹縄忠臣, 遠藤剛『Nebulin と N-WASP は協同して新規のアクチン重合核形成因子としてはたらく』第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同学会 (BMB2010) 2010 年 12 月 7 日 神戸ポートアイランド

⑤ 高野和儀, 渡邊-高野晴子, 末次志郎, 竹縄忠臣, 遠藤剛『Nebulin と N-WASP は IGF-1 による筋原線維アクチンフィラメント形成に関与する』第 62 回日本細胞生物学会大会. 2010 年 5 月 19 日 大阪国際会議場.

[その他]

ホームページ等

○ 研究室ホームページ

<http://life.s.chiba-u.jp/endo/hp/index.html>

○ 新聞記事

http://life.s.chiba-u.jp/endo/hp/neb_Nw_newspaper.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 和儀 (TAKANO KAZUNORI)

千葉大学・大学院融合科学研究科・助教

研究者番号: 60466860

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()