

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 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：2011～2013

課題番号：23570089

研究課題名(和文) ミオシン結合タンパク質による新たな筋収縮制御機構の解明

研究課題名(英文) Role of myosin-binding protein-C for muscle contraction

研究代表者

佐藤 成樹 (SATO, Naruki)

千葉大学・融合科学研究科(研究院)・講師

研究者番号：40261896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：C-タンパク質は横紋筋に発現する主要なミオシン結合タンパク質である。本研究により分子のN端側領域でミオシンだけでなく、アクチン線維とも結合することでアクチン-ミオシン相互作用を調節することを明らかにした。また、C-タンパク質が脊椎動物だけでなく、原索動物尾索類のホヤにも存在することも明らかにした。この研究は、脊椎動物の進化の過程で筋収縮の制御がトロポニンだけでなくC-タンパク質も寄与することでシステムの多様化が生じたことを示し、動物の生理機能発現メカニズムに関して新たな知見をもたらした。

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 and has three isoforms (cardiac, fast-skeletal, slow-skeletal) in vertebrate striated muscles.

In this study, I prepared N-terminal domains encoding mouse cardiac MyBP-C (C0 to C3), that of fast-skeletal MyBP-C (F1 to F4) and that of slow-skeletal MyBP-C (S1 to S4) in an E. coli expression system. My results showed that N-terminal domains of three MyBP-C isoforms cross-linked (or bundled) actin filaments and bound to myosin filaments. The N-terminus of fast skeletal MyBP-C also elevated actin-activated myosin A TPase activity significantly. Furthermore, I identified expression of protochordate MyBP-C in cardiac muscle of *Ciona intestinalis*. The *ciona* MyBP-C bound to actin filaments and myosin filaments at the N-terminal and C-terminal region, respectively, as well as vertebrate MyBP-C.

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：動物生理化学 筋収縮制御 ミオシン結合タンパク質 アクチン 原索動物

## 1. 研究開始当初の背景

(1) C-タンパク質(MyBP-C)は分子量130から140 kDの横紋筋に発現する主要なミオシン結合タンパク質で、骨格筋に発現する速筋型と遅筋型、心臓に発現する心筋型の3つのアイソフォームが存在する。これまでの知見では脊椎動物にのみ発現が知られており、原索動物や無脊椎動物における発現は全く不明であった。その機能はミオシン線維とコネクチンと結合することで、筋原繊維の形成と安定化に寄与すると考えられていた。特に、ヒトでは心筋型C-タンパク質が家族性肥大型心筋症の重要な原因遺伝子として注目されており、心筋の機能維持における役割の解明が極めて重要であると認識されている。しかしその分子メカニズムは不明な点が多く、C-タンパク質の異常がどのように心機能の異常を引き起こすのかはわかっていない。

(2) 研究代表者はこれまでに、筋原繊維構造の形成と維持におけるミオシン結合蛋白質の役割を明らかにするため、ニワトリ心筋型、マウス速筋型と遅筋型C-タンパク質の塩基配列を明らかにし、その発現様式と機能を解明した(*J. Mol. Cell Cardiol.* 1995, *Cell Struct. Funct.* 1995, *Muscle and Nerve.* 1999)。また、機能に異常があるC-タンパク質変異体に加齢に伴いマウス心臓に特異的に発現することも明らかにした(*Mol. Biol. Cell.* 2003)。高等動物では一般に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加齢と心不全の関連で大変興味深い。さらに先行研究で、C-タンパク質がN端領域でアクチン線維に結合しアクチン-ミオシン相互作用に影響をあたえることを世界に先駆けて見いだした。これらの研究から従来考えられていたように、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、アクチンとミオシンの両方に結合して筋収縮を調節する筋収縮制御タンパク質であることを提示した。

(3) 脊椎動物横紋筋の筋収縮に関するこれまでの定説では、アクチン線維に結合するCa<sup>++</sup>受容体のトロポニンだけがその調節を担うと考えられている。研究代表者は最近、脊椎動物同様に原索動物頭索類(ナメクジウオ)の横紋筋においても、トロポニンはCa<sup>++</sup>が無い時にアクチン線維とミオシン線維の相互作用を阻害することで筋収縮を抑制調節するブレーキ型の活性を持つことを明らかにした(*Zool. Sci.* 2010)。一方、原索動物尾索類(ホヤ)では、トロポニンはCa<sup>++</sup>が無い時に筋収縮をほとんど抑制せず、Ca<sup>++</sup>がある時に筋収縮を活性化するアクセル型の活性を示すことも明らかにした(*Biochemistry.* 2010)。これらのことから、脊索動物トロポニンの祖先型は抑制型で、こ

の機能特性を頭索類と脊椎動物が引き継ぎ、尾索類は進化の過程で独自の機能を獲得したことを示し、脊索動物では進化の過程で、最も主要な筋収縮制御因子トロポニンの機能が多様化したことを明らかにした。

これらのことから脊椎動物への進化の過程で、トロポニンによる制御様式が多様化だけでなく、C-タンパク質が筋収縮制御に寄与することで、制御機構そのものが多様化していることが示唆された。

## 2. 研究の目的

従来、脊椎動物の横紋筋ではトロポニンのみが筋収縮を制御すると考えられていた。しかし研究代表者の研究により、トロポニン以外のタンパク質、すなわちミオシン結合タンパク質C(C-タンパク質)も、その制御に関与する事が示されつつある。そこで本研究は、

(1) C-タンパク質による筋収縮制御機構の分子メカニズムを解明し、システムの基本構造を明らかにする。

(2) さらにC-タンパク質の起源と機能の多様化を明らかにし、横紋筋の収縮制御機構が脊椎動物への進化に伴いどのように確立され、また多様性を持つに至ったのかを包括的に理解する。

## 3. 研究の方法

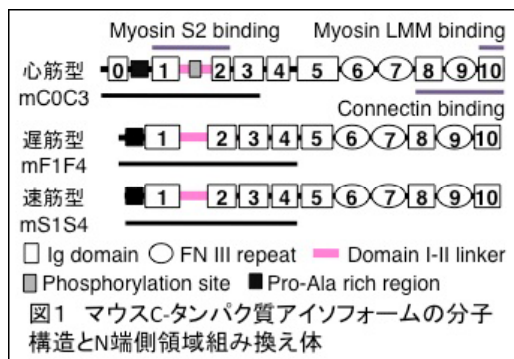
C-タンパク質はC末端側の領域でミオシン(LMM)とコネクチンに結合し、N末端側の領域でミオシン(S2)とアクチンに結合することで、アクトミオシン相互作用を制御すると考えられる。しかし、筋収縮を調節する分子機構の理解を確立するには未だ不明な点が多い。これらを踏まえ、

(1) C-タンパク質による横紋筋収縮制御の分子メカニズムの解明を*in vitro*(組み換え体を用いた生化学的方法)を中心に行う。具体的には、①マウスC-タンパク質の3種類のアイソフォームのN端側領域をさらに断片化させた組み換え体を作成して、共沈実験などによりアクチン結合領域を決定する。②C-タンパク質による収縮制御機構を分子レベルで解明するために、ミオシンモーター活性とアクチン-ミオシン相互作用に対してC-タンパク質が与える影響をN端側約半分子または、より断片化した組換え体タンパク質を用いてアクトミオシンATPase活性を測定し解析する。

(2) C-タンパク質による制御機構が脊椎動物への進化の過程でいつ獲得されたのか、及びその生理特性を明らかにするため、ゲノムデータベースなどを活用して原索動物尾索類(ホヤ)のC-タンパク質の同定を行う。同定後は上述と同様の方法を用いて、これらタンパク質の筋収縮制御への役割を明確にする。

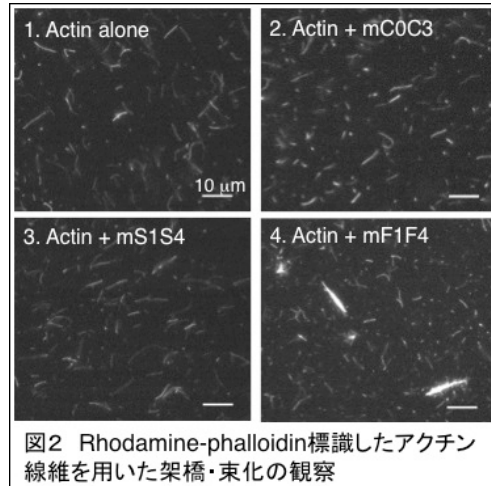
#### 4. 研究成果

(1) マウス C-タンパク質 N 端側領域の組み換え体フラグメントは、心筋型 (mC0C3) がドメイン 0-3 の領域を、速筋型 (mF1F4) および遅筋型 (mS1S4) はドメイン 1-4 の領域を含む組み換え体として大腸菌発現系で作成した (図 1)。また、各フラグメントは精製のために C 末端に His-tag を組み込んだ。この組み換え体を用いて、ウサギ骨格筋より精製したアクチン線維に対して超遠心 (217,000g x 40 min) による共沈法で結合力を解析した。その結果、アクチン 1 モルあたりに対して、mC0C3 は約 0.5 モル、mF1F4 は約 0.7 モル、mS1S4 は約 0.4 モルで結合が飽和することが分かった。Scatchard plot を作製し、解離定数 (Kd) を決定した結果 mC0C3 は 3.6  $\mu$ M、mF1F4 は 1.7  $\mu$ M、mS1S4 は 7.7  $\mu$ M であった。C-タンパク質とアクチン線維の結合様式を検討するため低速遠心 (20,000g x 15 min) による共沈実験をおこなったところ、アクチンに対してモル比 0.25 で加えたとき、mF1F4 は 85% の F-アクチンを沈殿させた。一方、mC0C3 は 20%、mS1S4 は 25% の F-アクチンを沈殿させた。この結果は、C-タンパク質 N 端側領域がアクチン線維を架橋・束化することを示し、特にその活性は速筋型 C-タンパク質が高いことがわかった。さらに、吸光度 350nm による濁度測定と蛍光アクチンを用いた束形成能の顕微鏡観察も、同様に C-タンパク質 N 端側領域がアクチン線維を架橋・束化することを示し、その活性は mF1F4 が最も高く、次いで mC0C3、mS1S4 の順に弱くなること が示された (図 2)。



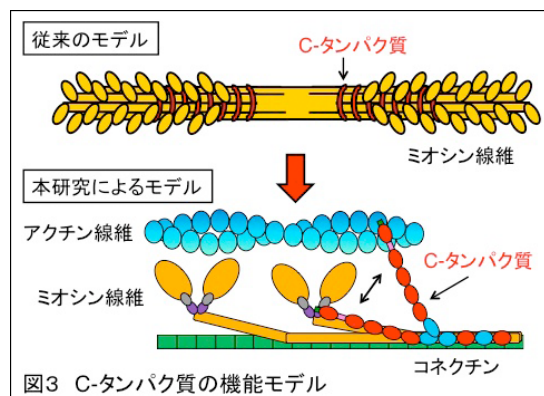
(2) 心筋型 C-タンパク質 N 端側領域のドメイン 1-2 がミオシン S2 と結合することが既に示されている (Gruen and Gautel, 1999)。そこで、他のアイソフォームも同様にミオシン S2 と結合するのかを超遠心 (97,000g x 30 min) による共沈実験で検討した。その結果、心筋型だけでなく C-タンパク質全てのアイソフォームが N 端側領域でミオシン線維と結合し、その結合力は速筋型が最も強いことが示された。

(3) C-タンパク質 N 端側領域のアクチン線維とミオシン線維への結合の生理的意味を



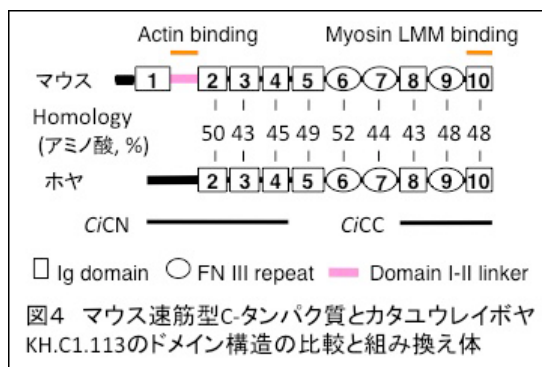
理解するため、actin-activated myosin ATPase 活性 (アクトミオシン ATPase 活性) に C-タンパク質フラグメントが及ぼす影響を調べた。その結果、mF1F4 はアクチンに対してモル比が 0.25 のときにアクトミオシン ATPase 活性をコントロールに対して約 1.7 倍促進し、モル比が 1 になるとアクトミオシン ATPase 活性を約半分に抑制した。mC0C3 は反応系に加える量を増やすにしたがってアクトミオシン ATPase 活性を促進させ、最終的にアクチンとのモル比が 1 のときにアクトミオシン ATPase 活性を約 1.4 倍まで促進した。mS1S4 は反応系に加える量を変化させてもアクトミオシン ATPase 活性にほとんど影響を与えなかった。これらの結果から、速筋型 C-タンパク質の N 端側領域がアクトミオシン相互作用に最も強く影響を与えることが明らかになった。

(4) 速筋型 C-protein の N 端側領域をさらに細分化した組み換え体を作成し、その機能領域を検討した。その結果、ドメイン 1 と 2 の間のリンカー領域がアクチン結合とミオシン結合両方に重要であり、その最小の領域でアクトミオシン ATPase 活性に影響を与えることがわかった。本研究により、C-タンパク質の N 端側領域はミオシン S2 領域またはアクチン線維と結合し、その結合を介してアクトミオシン相互作用を促進することが提示された (図 3)。



(5) これまで、C-タンパク質は脊椎動物に

のみ存在すると考えられていた。横紋筋の収縮制御機構が脊椎動物への進化に伴いどのように確立され、多様性を持つに至ったのかを理解するため、本研究では C-タンパク質の起源を探索した。我々脊椎動物と近縁の原索動物尾索類に焦点を当て、Ghost Database を活用したゲノムデータ解析により、カタユレイボヤ (*Ciona intestinalis*) に C-タンパク質と類似したドメイン構造のタンパク質をコードする遺伝子 KH.C1.113 を見つけた。この遺伝子がコードするタンパク質は、分子量 120-130 kD で、6 個の Ig ドメインと 3 個の FN タイプ III リピートから構成されていた (図 4)。EST データから KH.C1.113 の転写産物は、alternative splicing により 3 つの variant (v1-v3) が存在することが予測された。



(6) カタユレイボヤ遺伝子 KH.C1.113 の翻訳産物が、脊椎動物 C-タンパク質と同様の機能を持つのかを調べるため、KH.C1.113 v3 の cDNA クローンを *C. intestinalis* genomic and cDNA resources (京都大学) より供与を受けた。この cDNA を用い、N 末端からドメイン 4 を含む N 末端側組み換え体フラグメント (CiCN) と、ドメイン 8 から 10 までを含む C 末端側組み換え体フラグメント (CiCC) を大腸菌発現系で作成した。各組み換え体には精製のため His-tag を付加した。

(7) CiCC とウサギ骨格筋より調製したミオシン線維の結合を超速心法 (50,000g x 30 min) により検討した結果、両者の結合が確認でき、ミオシンフィラメントの安定化を促すことも明らかになった。このことから KH.C1.113 の翻訳産物は一次構造の類似だけでなく、機能的にミオシン結合タンパク質であることが証明された。また CiCN がアクチン線維と結合し、その結合様式は東化・架橋であることも明らかにした。さらに、KH.C1.113 v3 の cDNA をニワトリ心筋初代培養細胞および骨格筋初代培養細胞に遺伝子導入した結果、翻訳産物が筋細胞の A 帯に内在のニワトリ C-タンパク質と共局在することを明らかにした (図 5)。以上の結果より、KH.C1.113 はカタユレイボヤの C-タンパク質遺伝子で、脊椎動物 C-タンパク質と同様に、N 末端側領域でアクチン線維と結合し、

C 末端側領域がミオシン結合能を持つことが示された。

(8) カタユレイボヤにおける C-タンパク質の発現部位を明らかにするため、抗カタユレイボヤ C-タンパク質抗体を作製した。カタユレイボヤ心臓抽出物に対してイムノブロットを行ったところ、SDS-PAGE ではアミノ酸配列から推定される分子量と異なり、見かけの分子量が 170 kD になることがわかった。この結果は質量分析による解析からも支持された。間接蛍光抗体法により、カタユレイボヤ心臓における C-タンパク質の局在を調べたところ、サルコメアにおいて M 線をはさんで局在していることが明らかとなった。これは、脊椎動物 C-タンパク質に特徴的な局在様式と同様であった。以上の結果から、C-タンパク質は脊椎動物だけではなく無脊椎動物であるカタユレイボヤにも発現していることが世界で初めて明らかとなった。

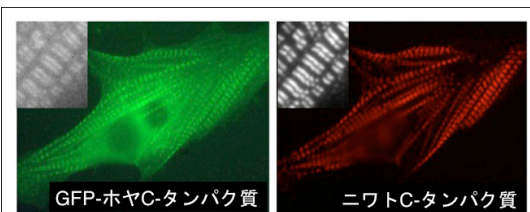


図5 カタユレイボヤC-タンパク質はニワトリ C-タンパク質と心筋細胞のサルコメアA帯で共局在する

## 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 3 件)

1. Sea lily muscle lacks a troponin-regulatory system but contains paramyosin.

Obinata T, Amemiya S, Takai R, Ichikawa M, Toyosima YY, Sato N.

Zoological Science. 2014. 31,122-128

(doi: <http://dx.doi.org/10.2108/zsj.31.122>)

査読あり

2. Cofilin is required for organization of sarcomeric actin filaments in chicken skeletal muscle cells.

Miyauchi-Nomura S, Obinata T, Sato N.

Cytoskeleton (Hoboken). 2012. 69, 290-302

(doi: 10.1002/cm.21025.) 査読あり

3. Comparative studies on troponin, a Ca<sup>2+</sup>-dependent regulator of muscle contraction, in striated and smooth muscles of protochordates.

Obinata T, Sato N.

Methods. 2012. 56, 3-10

(<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.09>)

.026) 査読あり

〔学会発表〕(計 8件)

1. 若槻真隆、大日方昂、佐藤成樹 C-protein N 端領域がアクチン相互作用に及ぼす影響 第 84 回日本動物学会大会 2013 年 9 月 26 日 岡山
2. 三森あい、大日方昂、高井亮介、佐藤成樹 プラナリアトロポニンの発現部位の解析 第 84 回日本動物学会大会 2013 年 9 月 26 日 岡山
3. 大日方昂、佐藤成樹、高井亮介、雨宮昭南 ウミユリ綱トリノアシ筋の蛋白質の特徴 第 84 回日本動物学会大会 2013 年 9 月 26 日 岡山
4. 若槻真隆、大日方昂、佐藤成樹 マウス C-protein N 端領域のアイソフォーム間における機能の比較 第 65 回日本細胞生物学会大会 2013 年 6 月 19 日 名古屋
5. 飯田真也、大日方昂、佐藤成樹 カタユウレイボヤ C-protein の機能解析 第 83 回日本動物学会大会 2012 年 9 月 13 日 大阪
6. 若槻真隆、大日方昂、佐藤成樹 マウス C-protein N 端領域のアイソフォーム間における機能の比較 第 83 回日本動物学会大会 2012 年 9 月 13 日 大阪
7. 大日方昂、佐藤成樹 筋収縮制御タンパク質トロポニンの新展開、非横紋筋における役割と機能の多様性 第 82 回日本動物学会大会(招待講演) 2011 年 9 月 21 日 旭川
8. 永田奈保子、飯田真也、大日方昂、佐藤成樹 カタユウレイボヤ C-protein (Myosin-binding protein-C) の同定 第 82 回日本動物学会大会 2011 年 9 月 21 日 旭川

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://life.s.chiba-u.jp/bio/>

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

( )

研究者番号：