

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20590285

研究課題名（和文） 筋原繊維形成のためのアクチン重合  
～その分子機構と筋組織の発生・維持における役割～

研究課題名（英文） The regulation of actin assembly during myofibrillogenesis

研究代表者

武谷 立 (TAKEYA RYU)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：50335981

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞医化学

## 1. 研究計画の概要

筋組織はヒトの個体の約半分を占め、その機能すなわち収縮能は、運動・姿勢制御から呼吸、循環といった生命機能の本質部分を担っている。筋収縮はアクチンとミオシンの相互作用により生ずるが、これらの繊維が規則正しく整列した筋節（サルコメア）と、それが連なった筋原繊維（myofibril）の形成過程の分子機構には不明な点が多い。特に、サルコメア中のアクチン繊維（thin filament）は、単量体アクチンが重合して形成されているが、このアクチン重合が、どのように制御されているかはあまり分かっていない。

細胞内のアクチン重合は、多様なアクチン調節因子により厳密に制御されている。すなわち、単量体結合蛋白質などによりその自発的な重合が抑制されている一方で、重合核形成因子などによって時空間的に限られた条件下で促進される。研究代表者はこれまでに、アクチンの重合制御因子として formin 相同蛋白質 FHOD を単離して機能解析を進めてきた。本研究では、筋原繊維形成におけるアクチン重合の分子機構に関して、FHOD を中心にその重合機構が筋発生過程や筋組織維持において果たす役割を解明したいと考えて、研究を進めている。

## 2. 研究の進捗状況

(1) 初代心筋培養細胞における FHOD3 の役割

FHOD3 の心筋における発現と局在を詳細に検討するとともに、RNA 干渉法により内因性 FHOD3 をノックダウンし、その効果を検討した結果、以下のことを明らかにした。

① ラット新生仔初代心筋培養細胞において、内因性及びアデノウイルスで導入した外因

性 FHOD3 はともに、サルコメア・パターンをとってアクチン線維の一端に局在する。

② 初代心筋培養細胞で FHOD3 を RNAi 法によりノックダウンすると、アクチン線維形成の低下とサルコメア形成の阻害が観察された。

③ FHOD3 をノックダウンした培養心筋細胞に、RNAi で抑制されない配列をもつ FHOD3 をアデノウイルスで導入したところ、サルコメア形成不全がレスキューされた。

④ FHOD3 をノックダウンした培養心筋細胞に、アクチン結合能を持たない FHOD3 変異体（RNAi で抑制されない配列をもつ）をアデノウイルスで導入しても、サルコメア形成不全はレスキューされなかった。

以上より、心筋培養細胞におけるサルコメア形成に、Fhod3 のアクチン結合能が必須の役割を果たすことが明らかになった。

(2) FHOD3 ノックアウトマウスの作出と解析

FHOD3 の発現部位と時期を正確に知るためにマーカー遺伝子に置き換えた FHOD3 ノックアウトマウスの作出を進めた。その結果、F1 世代のヘテロ変異マウスを得、これらの兄妹交配によりホモ欠失マウスを得て、その表現型解析を進めている。

(3) FHOD の *in vitro* アクチン核化・重合能の検討

精製蛋白質を用いた *in vitro* での FHOD によるアクチン重合活性の測定を目指して、FHOD の蛋白質発現系の改良、ならびに重合能測定系の確立を進めた。その結果、哺乳類培養細胞を用いた発現系を確立し、ピレンで蛍光ラベルしたアクチンを用いた蛍光光度

計によるアクチン核化・重合能の測定が可能となった。実際に FHOD3 の *in vitro* の重合能を測定したところ、ある状況下では FHOD3 がアクチン重合を阻害的に制御していることが明らかとなった。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

FHOD が筋原繊維形成におけるアクチン重合に必須の役割を果たすことを、培養細胞を用いて明らかにしたと同時に、発生における役割を明らかにするためのノックアウトマウス解析も予定通りに進行しているため。

### 4. 今後の研究の推進方策

*in vitro* のアクチン重合活性に関して、当初は単純に重合促進因子として作用すると予想していたが、ある状況下では FHOD3 がアクチン重合をむしろ阻害的に制御するという結果が得られている。このことは、当初予測されたメカニズムよりも複雑な重合制御機構の存在を示唆している。この制御機構の解明は、革新的な研究展開を生み出すことが期待されるため、さらに詳細に検討を進めていく。

マウスを用いた個体レベルの実験に関しては、当初の計画以上に進展している部分もあり、このまま継続する。

### 5. 代表的な研究成果

(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. Maehara Y, Miyano K, Yuzawa S, Akimoto R, Takeya R, Sumimoto H. (2010) A conserved region between the TPR and activation domains of p67phox participates in activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, 285, 31435-31445.

2. Taniguchi K, Takeya R, Suetsugu S, Kan-O M, Narusawa M, Shiose A, Tominaga R, Sumimoto H. (2009) Mammalian formin Fhod3 regulates actin assembly and sarcomere organization in striated muscles. *J. Biol. Chem.*, 284, 29873-29881.

3. Taura M, Miyano K, Minakami R, Kamakura S, Takeya R, Sumimoto H. (2009) A region N-terminal to the tandem SH3 domain of p47phox plays a crucial role in the activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Biochem. J.*, 419, 329-338.

4. Shono T, Yokoyama N, Uesaka T, Kuroda J, Takeya R, Yamasaki T, Amano T, Mizoguchi

M, Suzuki SO, Niuro H, Miyamoto K, Akashi K, Iwaki T, Sumimoto H, Sasaki T. (2008) Enhanced expression of NADPH oxidase Nox4 in human gliomas and its roles in cell proliferation and survival. *Int. J. Cancer*, 123, 787-792.

5. Takeya R, Taniguchi K, Narumiya S, Sumimoto H. (2008) The mammalian formin FHOD1 is activated through phosphorylation by ROCK and mediates thrombin-induced stress fibre formation in endothelial cells. *EMBO J.*, 27, 618-628.

[学会発表] (計 4 件)

1. 谷口 賢一郎, 武谷 立, 末次 志郎, 神尾 明君, 成澤 慈, 塩瀬 明, 富永 隆治, 住本 英樹. (12/9-12/12, 2009) Regulation of actin assembly and sarcomere organization in cardiomyocytes by the formin homology protein Fhod3. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜.

2. 武谷 立, 谷口 賢一郎, 住本 英樹. (5/16-5/17, 2009) formin 相同蛋白質 FHOD3 の筋細胞における生理的役割. 平成 21 年度日本生化学会九州支部例会, 福岡.

3. 成澤 慈, 武谷 立, 住本 英樹. (5/16-5/17, 2009) formin 相同蛋白質 FHOD3 の活性制御機構の解明. 平成 21 年度日本生化学会九州支部例会, 福岡.

4. Ryu Takeya, Kenichiro Taniguchi, Shuh Narumiya, Hideki Sumimoto. (12/9-12/12, 2008) The formin-homology protein Fhos/FHOD: Mechanisms of action and physiological functions. BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会), 神戸. シンポジウム「細胞骨格の創造から機能発現まで」

[その他]

特記事項なし