

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 5月14日現在

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

研究成果の概要（和文）：

筋肉の収縮はアクチンとミオシンの両線維間の相互作用によって生じるが、これらの線維が規則正しく整列した筋原線維の形成過程には不明な点が多い。筋原線維中のアクチン線維は単量体アクチンが重合して形成されるが、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かった。本研究では、培養心筋細胞を用いて筋原線維形成におけるアクチン重合を担う分子機構を明らかにし、筋組織における役割の解明への基盤を築いた。

研究成果の概要（英文）：

In striated muscle, this actin filaments and thick filaments of myosin are highly organized to form myofibrils. However, little is known about the mechanism for organization of actin filaments in the contractile unit sarcomere. In the present study, we show that the mammalian formin Fhod3 regulates actin assembly and sarcomere organization in striated muscles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,155,900	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	191,908	57,572	249,480
年度			
総計	3,447,808	1,047,572	4,539,480

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

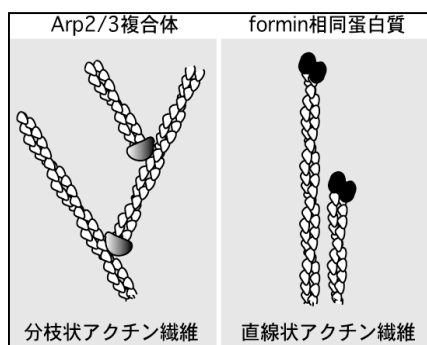
キーワード：細胞医化学

1. 研究開始当初の背景

アクチンは、真核細胞に最も多く含まれる蛋白質の一つであり、細胞内では単量体、

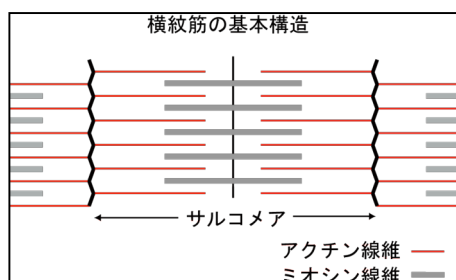
もしくは重合体であるフィラメント（線維）のいずれかの状態で存在し、その状態間を行き来する。単量体アクチンは、細胞内では単量体結合蛋白質などによりその重合が抑制

されており、アクチン線維形成には新たな重合核の形成が必要である。この重合核形成因子として、Arp2/3 複合体および formin 相同蛋白質が知られている (下図)。



Arp2/3 複合体は、歴史的に最初に同定されたアクチン重合核形成因子であり、それ自身が重合核となる上に、既に存在するアクチン線維の側面に結合して枝分かれ構造のアクチン線維をつくることで、葉状仮足におけるアクチンネットワークの形成を担う。これに対して、近年重合核形成因子として明らかになった formin 相同蛋白質は、FH2 (formin homology 2) ドメインで二量体化してアクチン重合核となるとともに、アクチン重合に伴ってそのまま伸長端 (プラス端) に結合したままプロセッサに移動するという独特の性質をもつ。formin 相同蛋白質は、Arp2/3 複合体とは異なり、直線状のアクチン線維を形成し、非筋細胞でのストレスファイバーや糸状仮足、収縮環といった直線状のアクチン構造物の形成を担っている。

横紋筋 (骨格筋および心筋) 細胞の筋原線維は、アクチンとミオシンのフィラメントが規則正しく整列したサルコメアという単位からなる収縮に特化した構造をもつ (下図)。サルコメア構造中のアクチン線維はプラス端が CapZ、マイナス端がトロポモジュリンによってタイトにキャップされた静的



で安定な構造物であると考えられてきたが、近年、両端のキャッピングは比較的動的であり、成熟した筋原線維内でもアクチン線維の両端で分のオーダーのダイナミクスが存在することが示されてきている。このことは、成熟した筋原線維内でもアクチン線維維持のためのアクチン重合システムが機能していることを示すものである。また、筋原線維の新規形成のためにもアクチン重合は必須

のステップであるが、これら筋原線維の形成・維持におけるアクチン重合が何によってどのように制御されているかは不明であった。前述の Arp2/3 複合体は、非筋組織や平滑筋に比べ横紋筋での発現が比較的少なく、また直鎖状のアクチン線維という形態からも formin 蛋白質群がその候補と考えられた。

申請者が単離してその機能解析を行ってきた formin 相同蛋白質 FHOD には、FHOD1/Fhos1 と FHOD3/Fhos2 の二つが存在し、哺乳類 formin 相同蛋白質の7つあるサブグループの一つを形成する (J Cell Sci. 2003;11:4567, Genes Cells, 2005;10:665)。FHOD3 は心筋に強く発現し、サルコメア・パターンをとって筋原線維に局在する (J Cell Sci. 2003;11:4567) ことから、申請者は、心筋での FHOD3 によるアクチン重合が筋原線維形成に関わる可能性を考え、FHOD の筋原線維形成におけるアクチン重合機構解明を中心に、筋組織維持および筋発生段階におけるアクチン重合機構の役割を明らかにしたいと考えるに至った。

2. 研究の目的

筋原線維形成における FHOD3 の役割を、初代心筋培養細胞を用いた RNA 干渉法による内在性 FHOD3 のノックダウン、あるいは活性欠失変異体の導入等により明らかにする。同時に、*in vitro* でのアクチン重合測定系を確立して FHOD3 とその変異体の作用機序と活性化機構に関して検討し、筋原線維形成におけるアクチン重合の制御機構を明らかにする。さらに、マウス個体での FHOD3 の発現様式を検討し、個体レベルでの役割の解明に取り組む。

3. 研究の方法

(1) 初代心筋培養細胞における FHOD3 の役割

本研究では、筋原線維形成における直線状アクチン線維の重合機構の責任分子を明らかにすべく、ラット新生仔初代心筋培養細胞において formin 相同蛋白質 FHOD3 を RNA 干渉法により抑制して筋原線維形成への影響を検討した。

まず、formin 相同蛋白質 FHOD3 に対する siRNA (small interfering RNA) を 4 種類用意し、そのうち 2 種類は、3' 非翻訳領域に設定した。これらの siRNA をラット新生仔初代心筋培養細胞に導入して、サルコメア Z 帯のマーカーである α -アクチニンの局在を観察することでサルコメア形成への影響を検討した。

次に、ノックダウンした細胞への FHOD3 への戻し発現を試みた。使用するラット新生仔初代心筋培養細胞に効率よく FHOD3 遺伝子を導入するために、FHOD3 遺伝子の cDNA をアデ

ノウイルスベクターに組み込んだ。この際に、FHOD3 遺伝子の cDNA の翻訳領域のみを使用することによって、3' 非翻訳領域に設定した siRNA に対して抵抗性を持つようにした。このアデノウイルスを予め感染させた心筋培養細胞に siRNA 導入することで、FHOD3 の蛋白質レベルが低下しないようにした。さらに、FHOD3 の機能ドメインである FH2 ドメイン内の、アクチン分子との結合に関与する保存されたアミノ酸 (Lys-1273 および Ile-1127) に置換を導入した変異体 (K1273D および I1127A) をコードする cDNA をアデノウイルスベクターに組み込んだ。RNAi によるサルコメア構造破壊に対する野生型ならびに変異型 FHOD3 の戻し発現の効果を検討した。

(2) FHOD3 の *in vitro* アクチン重合能測定系の確立

ヒト胎児腎由来細胞株である HEK293 細胞に遺伝子導入して発現させたマウス FHOD3 組換え蛋白質を精製した。

ウサギ骨格筋より調整したアセトンパウダーから、アクチンの重合能を利用して、超遠心と透析により単離・精製したアクチンを、蛍光色素ピレンで標識した。アクチンが重合するとピレンの蛍光強度が増強することを利用して重合度をモニターする実験系に、マウス FHOD3 蛋白質を加えて、FHOD3 の *in vitro* アクチン重合能を検討した。

(3) FHOD3 のマウス心筋における発現解析

野生型マウスを用いて FHOD3 の発現様式を発生段階別に検討するとともに、その細胞内の局在様式を検討した。

4. 研究成果

本研究では、横紋筋の発生・再生の分子機構を明らかにすべく、その筋収縮の基本単位であるサルコメアが形成される際のアクチン重合におけるアクチン調節蛋白質の果たす役割に注目してきた。アクチン調節蛋白質である formin 相同蛋白質 FHOD には、FHOD1/Fhos1 と FHOD3/Fhos2 の二つが存在する。FHOD3 は心筋に強く発現し、サルコメア・パターンをとって筋原線維に局在している。我々は FHOD3 の心筋でのサルコメア・筋原線維形成における役割を知るために、初代心筋培養細胞で FHOD3 をノックダウンしてその効果を検討した。同時に、*in vitro* アクチン重合能の測定系を確立した。その結果、以下の成果が得られた。

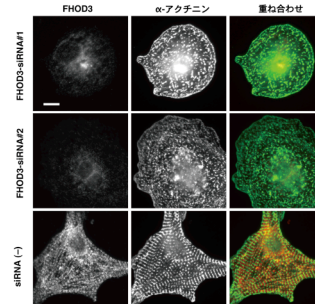
(1) 初代心筋培養細胞における FHOD3 の役割

FHOD3 の心筋における発現パターンと局在部位を免疫染色法により詳細に検討するとともに、RNA 干渉法により内因性 FHOD3 ノッ

クダウンして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、内因性ラット FHOD3 及びアデノウイルスで導入した外因性マウス FHOD3 はともに、サルコ

RNA干渉によるFHOD3ノックダウンでサルコメア構造が破壊される



論文4 (Taniguchi et al. J.Biol.Chem. 2009) より改変

メア・パターンをとってアクチン線維の一端に局在した。

②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 (図)。

③内因性 FHOD3 をノックダウンした心筋培養細胞に、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。

④FHOD3 をノックダウンした心筋培養細胞に、アクチン結合部位にアミノ酸置換を導入した 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。

⑤恒常的活性化型 FHOD3 (活性阻害的な自己分子内結合に関わる C 末領域を欠失している) は、培養細胞に過剰発現すると直線状のアクチン構造物であるアクチンストレスファイバーの形成を誘導する。上述のアクチン結合部位へアミノ酸置換を導入した FHOD3 変異体 (K1273D および I1127A) は、恒常的活性化型 (C 末領域欠失型) でもストレスファイバー形成を誘導出来なかった。

以上より、心筋培養細胞におけるサルコメアの形成に、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となった。

(2) FHOD3 の *in vitro* アクチン重合能の検討

精製組換え蛋白質を用いた *in vitro* での FHOD3 によるアクチン重合活性の測定を目指して、FHOD3 の蛋白質発現系の改良、ならびに重合能測定系の改良を進めた。その結果、哺乳類培養細胞を用いた FHOD3 蛋白質発現系を確立し、蛍光物質ピレンで標識した精製アクチンを用いた蛍光光度計によるアクチン重合能測定系を確立した。これまでに重合促進能がすでに報告されている formin 相同蛋白質 mDia をポジティブコントロールとして、FHOD3 の *in vitro* のアクチン重合活性を測定

したところ、FHOD3はmDiaと比較してアクチン重合をむしろ抑制する結果というが得られた (Taniguchi et al, 2009)。アクチン線維には方向性があり、ある一定のアクチン濃度範囲では、アクチン分子に対する親和性の高いプラス端から伸長し、親和性の低いマイナス端から脱重合する。プラス端からの伸長だけをモニターする条件下では、FHOD3存在下では伸長が抑制されたことから、FHOD3はアクチン線維のプラス端に作用して、アクチン伸長速度を制御するというメカニズムが示唆された (Taniguchi et al, 2009)。

6) FHOD3のマウス心筋における発現様式

FHOD3は胎生期から成体期に至るまでマウス心臓に強く発現し、心筋サルコメア内に周期的に局在していた。さらに、各種マーカー蛋白質との比較等により詳細に観察した結果、FHOD3はアクチン線維の端ではなく、アクチン線維とミオシン線維がオーバーラップする領域に局在することが判明した (Kan-o et al, 2012)。この結果は、上述の*in vitro*解析で観察された、FHOD3はアクチン線維のプラス端に作用するという結果から予測される局在部位とは異なっており、単純にFHOD3がプラス端に作用してアクチン伸長速度を制御するというメカニズムよりも、もっと複雑なアクチン線維の制御機構が存在する可能性が示唆された。

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6件)

- ① Takeya R, Taniguchi K, Narumiya S, Sumimoto H*. The mammalian formin FHOD1 is activated through phosphorylation by ROCK and mediates thrombin-induced stress fiber formation in endothelial cells. *EMBO J.*, 27, 618-628 (2008) 査読有
- ② Shono T*, Yokoyama N, Uesaka T, Kuroda J, Takeya R, Yamasaki T, Amano T, Mizoguchi M, Suzuki SO, Niino H, Miyamoto K, Akashi K, Iwaki T, Sumimoto H, Sasaki T. Enhanced expression of NADPH oxidase Nox4 in human gliomas and its roles in cell proliferation and survival. *Int. J. Cancer*, 123, 787-792 (2008) 査読有
- ③ Taura M, Miyano K, Minakami R, Kamakura S, Takeya R, Sumimoto H*. A region N-terminal to the tandem SH3 domain of p47^{phox} plays a crucial role in the activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Biochem. J.*, 419, 329-338 (2009) 査読有
- ④ Taniguchi K, Takeya R, Suetsugu S, Kan-o M, Narusawa M, Shiose A, Tominaga R,

Sumimoto H*. The mammalian formin Fhod3 regulates actin assembly and sarcomere organization in striated muscles. *J. Biol. Chem.*, 284, 29873-29881 (2009) 査読有

⑤ Maehara Y, Miyano K, Yuzawa S, Akimoto R, Takeya R, Sumimoto H*. A conserved region between the TPR and activation domains of p67^{phox} participates in activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, 285, 31435-31445 (2010) 査読有

⑥ Kan-o M, Takeya R*, Taniguchi K, Tanoue Y, Tominaga R, Sumimoto H*. Expression and subcellular localization of mammalian formin Fhod3 in the embryonic and adult heart. *PLoS ONE*, 7, e34765 (2012) 査読有

[学会発表] (計7件)

1. 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」
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. 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.
5. 神尾 明君, 武谷 立, 田ノ上 禎久, 富永 隆治, 住本 英樹. (9/21-9/24, 2011) formin 相同蛋白質 Fhod3 のマウス胎仔、成獣、およびヒト心筋サルコメアにおける局在第84回日本生化学会大会, 横浜.
6. 神尾 明君, 武谷 立, 田ノ上 禎久, 富永 隆治, 住本 英樹. (12/13-12/16, 2011) formin 相同蛋白質 Fhod3 の心筋サルコメアにおける局在と機能. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜.
7. Ryu Takeya, Meikun Kan-o, Takaya Abe, Naoyuki Kitajima, Motohiro Nishida, Ryuji Tominaga, Hitoshi Kurose, Hideki Sumimoto. (5/29-5/31, 2012) The essential role of mammalian formin FHOD3 in sarcomere

organization during heart development.
第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞
生物学会合同大会，神戸。

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武谷 立 (TAKEYA RYU)

九州大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：50335981