

## 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18日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390084

研究課題名（和文） アクチン調節蛋白質 Fhod1 および Fhod3 の生理機能と制御機構の解明

研究課題名（英文） Physiological function and regulatory mechanism of Fhod1 and Fhod3, proteins that regulate actin filaments

研究代表者

住本 英樹 (SUMIMOTO HIDEKI)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：30179303

研究成果の概要（和文）：アクチン線維形成を調節する formin タンパク質ファミリーの1員である Fhod3 は、培養心筋細胞におけるサルコメア（筋収縮を担う「筋原線維」の中の収縮ユニットとして働く）の形成に決定的な役割を果たすこと、そして実際に、マウスにおいて Fhod3 遺伝子を欠失させると、発生初期に心臓の形成異常がおこり出生前に死亡することを示した。このように、Fhod3 は心臓の形成に必須のタンパク質である。

研究成果の概要（英文）：Fhod3, a member of formin family proteins that play pivotal roles in actin filament assembly, plays a crucial role in organization of the sarcomere (the contractile unit of myofibrils) in cultured cardiomyocytes. Indeed Fhod3-gene-deficient mice are embryonic lethal due to defective myofibrillogenesis at an early stage of heart development. Thus Fhod3 is a protein essential for cardiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：細胞骨格・アクチン・formin・Fhod・筋細胞

## 1. 研究開始当初の背景

細胞骨格の主要成分であるアクチンは、細胞の形態の変化・維持あるいは細胞の運動において、極めて重要な役割を担っている。細胞内のアクチンには、「G-アクチン」と呼ばれる単量体と「F-アクチン」と呼ばれる繊維状のポリマー（＝アクチン繊維）の状態とが存在するが、この2つの状態を行き来すること（アクチン繊維の形成と消失）が、細胞のダイナミックな変化を可能にしている。アクチン繊維の形成（アク

チンのポリマー化）がおこるためには、まず重合核ができる必要があり、重合核形成を担う蛋白質として、formin ファミリー蛋白質や Arp2/3 複合体などが知られている。formin ファミリー蛋白質は、FH2 (formin homology 2) ドメインで2量体化するとともに、それぞれがアクチンに結合して重合核を形成し、引き続いて processive にアクチン繊維の伸張を行う蛋白質である（FH2 ドメインはアクチンを次々に添加しながら伸張端 [プラス

端]を移動することになる)。このように、forminファミリー蛋白質は直線状アクチン繊維の形成を引き起こし(一方、Arp2/3複合体は分枝状アクチン繊維の形成のための重合核を形成する)、非筋細胞におけるストレスファイバーや収縮環などの直線状のアクチン構造物の形成に重要と考えられている。しかし、forminファミリー蛋白質の生理的な役割は不明な点が多く、特に直線状アクチン繊維が大量に存在する筋肉細胞での役割は全く分っていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、formin相同蛋白質であるFhod1とFhod3の生理機能(特に筋肉細胞などにおける生理機能)を明らかにし、さらにFhod1とFhod3の制御機構を分子レベルで解明するのが、本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

初代心筋培養細胞などの細胞を用いて、Fhodのin vitroでの機能を、生化学・分子細胞生物学的手法を駆使して解析する。具体的には、Fhod特異的抗体を作製し、Fhodの細胞内での挙動を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観測する。また、RNA干渉法によりFhodをノックダウンしてその効果を検討する。さらに、Fhodのノックアウトマウスを作製し、その表現型の解析することで、Fhodのin vivoでの機能を解明する。

## 4. 研究成果

(1) Fhod1は、種々の臓器に発現しているが、本研究により、私達はFhod1ノックアウトマウスを作製に成功した。現在は、その表現型の解析を精力的に行っているところである。

(2) Fhod3は、心筋および脳と腎臓など限られた臓器で高発現している。私達は以前、心筋に豊富に存在するforminファミリータンパク質であるFhod3がアクチン線維形成を誘導することを示していたが、本研究により、HeLa細胞を用いたin vivo系において「Fhod3によるアクチン線維形成にはアクチン核化活性が必要なこと」を示し、さらに精製したFhod3および精製したG-アクチンを用いたin vitro系において「Fhod3がアクチン線維の反やじり端に結合してアクチン線維の伸張を調節すること」を明らかにした(JBC 284, 29873, 2009)。

(3) ラット新生仔初代心筋培養細胞を用いて、ectopicに発現させたGFPタグ付きFhod3の蛍光顕微鏡による検出、および私達が作製した抗Fhod3抗体による内在性Fhod3の蛍光顕微鏡による検出を行い、「Fhod3がサルコメアの中央部の

アクチン線維に特異的に局在すること」を明らかにした(JBC 284, 29873, 2009)。

(4) ラット初代心筋培養細胞のFhod3をsmall interfering RNAを用いてノックダウンすると、アクチン線維の量が著しく減少するとともに、サルコメア構造の形成が強く抑制されることを示した。さらに、Fhod3ノックダウン心筋細胞に野生型Fhod3を戻すとアクチン線維の量の回復とサルコメア形成が回復すること、また、この回復にはアクチン核化活性が必要であることを示し、「Fhod3によって調節されるアクチン動態が、横紋筋におけるサルコメア形成に決定的な役割をはたすこと」を明らかにした(JBC 284, 29873, 2009)。

(5) adultの心筋と脳/腎臓では選択的スプライシングにより異なるFhod3のisoformが発現しているが、成長段階におけるisoformがどのようになっているかは不明であった。本研究により私達は、マウスを用いてembryoの心筋組織においてもadultと同様に心臓型Fhod3が発現していることを明らかにした(PLoS One 7, e34765, 2012)。

(6) ラット新生仔初代心筋培養細胞で認められた「Fhod3のサルコメア中央部のアクチン線維への特異的な局在」が、心筋組織においても認められるかどうかを解明するために、3種類の異なる抗Fhod3抗体を調製した。これらを用いて光学顕微鏡および電子顕微鏡による測定条件を詳細に検討し、至適条件化での解析を行った。その結果、マウスembryoおよびadultの心筋組織において、Fhod3がサルコメアの中央部のアクチン線維に特異的に局在することを明らかにし、加えてヒト心筋においても同様の局在をすることを示した(PLoS One 7, e34765, 2012)。

(7) Fhod3ノックアウトマウスの作製に成功し、その詳細な解析を行った。その結果、Fhod3遺伝子の欠失により、発生初期に心臓の形成異常がおこり、そのマウスは出生前に死亡することを明らかにした。さらに、Fhod3は神経管の形成においても重要であることを示した(論文revise中)。

## 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19件)

1. Taniguchi K, Takeya R, Suetsugu S, Kan-o M, Narusawa M, Shiose A, Tominaga R, and Sumimoto H. Mammalian formin Fhod3 regulates actin assembly and sarcomere

- organization in striated muscles. *J. Biol. Chem.* 284, 29873-29881 (2009) 査読有.
2. Taniguchi K, Takeya R, Suetsugu S, Kan-o M, Narusawa M, Shiose A, Tominaga R, and Sumimoto H. Mammalian formin Fhod3 regulates actin assembly and sarcomere organization in striated muscles. *J. Biol. Chem.* 284, 29873-29881 (2009) 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 p47phox plays a crucial role in activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Biochem J.* 419, 329-338 (2009) 査読有.
  4. Ogura K, Tandai T, Yoshinaga S, Kobashigawa Y, Kumeta H, Ito T, Sumimoto H, Inagaki F. NMR structure of the heterodimer of Bem1 and Cdc24 PB1 domains from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem.* 146, 317-325 (2009) 査読有.
  5. Miyano K, Koga H, Minakami R, Sumimoto H. The insert region of the Rac GTPases is dispensable for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Biochem J.* 422, 373-382. (2009) 査読有.
  6. Yuzawa S, Miyano K, Honbou K, Inagaki F, and Sumimoto H. The domain organization of p67<sup>phox</sup>, a protein required for activation of the superoxide-producing NADPH oxidase in phagocytes. *J. Innate Immun.* 1, 543-555 (2009) 査読有.
  7. Minakami R, Maehara Y, Kamakura S, Kumano O, Miyano K, Sumimoto H. Membrane phospholipid metabolism during phagocytosis in human neutrophils. *Genes Cells* 15, 409-423 (2010) 査読有.
  8. Nishida M, Suda R, Nagamatsu Y, Tanabe S, Onohara N, Nakaya M, Kanaho Y, Shibata T, Uchida K, Sumimoto H, Sato Y, Kurose H. Pertussis toxin upregulates angiotensin type 1 receptors through Toll-like receptor 4-mediated Rac activation. *J. Biol. Chem.* 285, 15268-15277 (2010) 査読有.
  9. Maehara Y, Miyano K, Yuzawa S, Akimoto R, Takeya R, and Sumimoto H. A Conserved Region between the TPR and Activation Domains of p67phox Participates in Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase. *J. Biol. Chem.* 41, 31435-31445 (2010) 査読有.
  10. Rasmussen I, Pedersen L. H, Byg L, Suzuki K, Sumimoto H, and Vilhardt F. Effects of F/G-actin ratio and actin turn-over rate on NADPH oxidase activity in microglia. *BMC Immunol.* 11, 44 (2010) 査読有.
  11. Okamoto F, Saeki K, Sumimoto H, Yamasaki S, and Yokomizo T. Leukotriene B<sub>4</sub> augments and restores FcγRs-dependent phagocytosis in macrophages. *J. Biol. Chem.* 285, 41113- 41121 (2010) 査読有.
  12. Takemoto D, Kamakura S, Saikia S, Becker Y, Wrenn R, Tanaka A, Sumimoto H, and Scott B. Polarity proteins Bem1 and Cdc24 are components of the filamentous fungal NADPH oxidase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 2861- 2866 (2011) 査読有.
  13. Tabuchi T, Che X.-F, Hiraishi K, Adachi M, Miyano K, Sumimoto H, Tabuchi T, Miyazawa K, and Tomoda A. Selectively induced apoptosis in human neutrophils in the presence of oxidative phenoxazines, 2-amino-4,4 $\alpha$ -dihydro-4 $\alpha$ -7H-phenoxazine-3-one and 2-aminophenoxazine-3-one preceded by decrease of intracellular pH, depolarization of the mitochondria and inhibition of superoxide generation. *J. Pharmacol. Sci.* 117, 139-148 (2011) 査読有.
  14. Yuzawa S, Kamakura S, Iwakiri Y, Hayase J, and Sumimoto H. Structural basis for interaction between the conserved cell polarity proteins Inscuteable and Leu-Gly-Asn repeat-enriched protein (LGN). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 19210-19215 (2011) 査読有.
  15. Miyano K, and Sumimoto H. Assessment of the role for Rho family GTPases in NADPH oxidase activation. *Methods Mol. Biol.* 827, 195-212 (2012) 査読有.
  16. Kawano M, Miyamoto K, Kaito Y, Sumimoto H, Tamura M. Nox1 as a moderate activator of Nox2-based NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys.* 519, 1-7 (2012) 査読有.

17. Nishikimi A, Uruno T, Duan X, Cao Q, Okamura Y, Saitoh T, Saitoh N, Sakaoka S, Du Y, Suenaga A, Kukimoto-Niino M, Miyano K, Gotoh K, Okabe T, Sanematsu F, Tanaka Y, Sumimoto H, Honma T, Yokoyama S, Nagano T, Kohda D, Kanai M, and Fukui Y. Blockade of inflammatory responses by a small-molecule inhibitor of the Rac activator DOCK2. *Chem. Biol.* 19. 488-497 (2012) 査読有.
18. Kan-o M, Takeya R, Taniguchi K, Tanoue Y, Tominaga R, and Sumimoto H. Expression and subcellular localization of mammalian formin Fhod3 in the embryonic and adult heart. *PLoS One* 7, e34765 (2012) 査読有.
19. Stampoulis, P., Ueda, T., Matsumoto, M., Terasawa, H., Miyano, K., Sumimoto, H., and Shimada, I. Atypical membrane-embedded PI(3,4)P<sub>2</sub> binding site on p47<sup>phox</sup> PX domain revealed by NMR. *J. Biol. Chem.* 287, in press (2012) 査読有.

[学会発表] (計 32 件)

1. 宮野 佳, 前原 優一, 湯澤 聡, 住本 英樹. (5/16-5/17, 2009) スーパーオキシド生成酵素 NADPH オキシダーゼの活性化因子 p67<sup>phox</sup> の作用機構の解明. 平成 21 年度日本生化学会九州支部例会, 福岡.
2. 山崎 創, 住本 英樹. (5/16-5/17, 2009) 発現誘導型核タンパク質 IκB-ζ を介した標的遺伝子の発現調節. 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. 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.
5. 住本 英樹. (7/9-7/10, 2009) シンポジウム「外科侵襲下の酸素の役割」外敵侵入に備える NADPH オキシダーゼ. 日本外科代謝栄養学会 第 46 回学術集会, 東京.
6. 湯澤 聡, 宮野 佳, 本坊 和也, 稲垣 冬彦, 住本 英樹. (10/21-10/24, 2009) Role of the domain organization of p67<sup>phox</sup> in Nox2 activation. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸.
7. 宮野 佳, 古賀 博文, 水上 令子, 住本 英樹. (10/21-10/24, 2009) The insert region of the Rac GTPases is dispensable for activation of superoxide<sup>-</sup> producing NADPH oxidases. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸.
8. 山崎 創, 住本 英樹. (10/21-10/24, 2009) Gene regulation by the inducible nuclear protein IκappaB-ζ and NF-κappaB p50 subunit. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸.
9. 住本英樹. (11/27-11/28, 2009) 食細胞による活性酸素生成機構. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「活性酸素のシグナル伝達」, 大阪.
10. 宮野 佳, 古賀 博文, 水上 令子, 住本 英樹. (12/9-12/12, 2009) Rac-dependent activation of superoxide-producing NADPH oxidases does not require its insert region. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜.
11. 山崎 創, 住本 英樹. (12/9-12/12, 2009) Gene Regulation by the Nuclear NF-κappaB-ζ complex in Macrophages and Fibroblasts. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜.
12. 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.
13. 湯澤 聡, 宮野 佳, 本坊 和也, 稲垣 冬彦, 住本 英樹. (12/9-12/12, 2009) The domain organization of p67<sup>phox</sup>, a protein required for activation of the superoxide-producing NADPH oxidase in phagocytes. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜.
14. 住本 英樹. (1/20-1/21, 2010) 食作用時の活性酸素生成酵素 NADPH オキシダーゼの活性化機構. 生理学研究所研究会「食細胞機能のイメージング」, 岡崎.
15. 住本 英樹. (3/23, 2010) レドックスシグナリングと活性酸素生成の調節機構. ワンキャンパスプロジェクト グローバル FU プログラム バイオストレス応答の制御機構研究教育拠点「International Symposium of Life Sciences」, 福岡.
16. 住本 英樹. (4/3, 2010) 活性酸素と病気: NADPH オキシダーゼの役割. 日本臨床検査自動化学会・第 24 回春期セミナー, 福岡.
17. Miyano, K., Sumimoto, H. (6/6-6/11, 2010) Role for the N-terminal

- transmembrane and C-terminal cytosolic moieties of Nox-family NADPH oxidases. Gordon Research Conference (Nox Family NADPH Oxidases) Les Diablerets, the Switzerland.
18. Sumimoto, H. (6/6-6/11, 2010) [invited speaker] Interaction of Nox-family oxidases with p22<sup>phox</sup> and soluble regulatory proteins. Gordon Research Conference (Nox Family NADPH Oxidases). Les Diablerets, the Switzerland.
  19. 宮野 佳, 住本 英樹. (7/22-7/24, 2010) 生体防御に重要な活性酸素生成酵素 NADPH オキシダーゼの活性化機構. 第 2 1 回日本生体防御学会学術総会, 仙台.
  20. 宮野 佳, 住本 英樹. (12/7-12/10, 2010) 活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼ (Nox) ファミリーの活性化における膜貫通領域と細胞質領域の役割. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会), 神戸.
  21. 山崎 創, 住本 英樹. (12/7-12/10, 2010) LPS とグルココルチコイドによる相乗的な遺伝子発現における核タンパク質 I $\kappa$ B- $\zeta$  の役割. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会), 神戸.
  22. 宮野 佳, 住本 英樹. (6/29-7/1, 2011) 食細胞と非食細胞 NADPH オキシダーゼの活性酸素生成活性の制御領域について. 第 2 2 回日本生体防御学会学術総会, 那覇.
  23. Sumimoto, H., and Miyano, K. (7/24-7/29, 2011). Structure and regulation of Nox family NADPH oxidases that deliberately produce reactive oxygen species [invited speaker]. The 17th International Symposium on Flavins and Flavoproteins. Berkeley, USA.
  24. Sumimoto, H., and Miyano, K. (9/6-9/10, 2011) The Nox family NADPH oxidases involved in host defense and signal transduction [invited speaker]. The 13th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology: Symposium "ROS signaling in host-bacteria stress responses". Sapporo, Japan.
  25. 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, 京都.
  26. 早瀬 純也, 鎌倉 幸子, 岩切 優子, 山口 佳洋, 伊崎 智子, 伊藤 隆司, 住本 英樹. (12/13-12/16, 2011) 新規 Par6 結合タンパク質による上皮細胞極性の制御機構. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜.
  27. 岩切 優子, 鎌倉 幸子, 住本 英樹. (12/13- 12/16, 2011) 新規 NuMA 結合タンパク質による分裂期染色体の整列調節機構. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜.
  28. 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.
  29. 湯澤 聡, 鎌倉 幸子, 岩切 優子, 早瀬 純也, 住本 英樹. (12/13-12/16, 2011) 細胞極性関連タンパク質 Inscuteable と LGN との複合体の X 線結晶構造解析. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜.
  30. 山崎 創, 住本 英樹. (12/13-12/16, 2011) 抗菌タンパク質をコードする遺伝子の転写誘導における NF- $\kappa$ B とグルココルチコイド受容体 (GR) の協調作用. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜.
  31. Soh Yamazaki and Hideki Sumimoto. (3/18-3/23, 2012) Transcriptional Regulation by I $\kappa$ B- $\zeta$  and the NF- $\kappa$ B p50 subunit. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Whistler, CANADA.
  32. 住本 英樹. (3/27-3/29, 2012) 感染防御時の好中球による活性酸素生成の分子機構 [招待講演] 第 85 回日本細菌学会総会: ワークショップ「感染防御応答の多次元シグナルネットワーク」, 長崎.
- [図書] (計 1 件)
- Sumimoto H, Minakami R, Miyano K. The Nox Family of NADPH Oxidases that deliberately Produce Reactive Oxygen Species. In Free Radical Biology in Digestive Diseases (Front. Gastrointest. Res., vol. 29, Yoshikawa, T., Suematsu, M., & Naito, Y., eds.) pp. 23-34 (2010).
6. 研究組織
    - (1) 研究代表者  
住本 英樹 (HIDEKI SUMIMOTO)  
九州大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 30179303
    - (2) 研究分担者  
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