

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590337

研究課題名(和文)サルコメアの形成・維持におけるアクチン重合機構の役割と制御

研究課題名(英文)Actin filament assembly during myofibrillogenesis

研究代表者

武谷 立 (Takeya, Ryu)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：50335981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心臓に強く発現するアクチン重合制御因子Fhod3の欠損マウスを作成し、ホモ欠損マウスでは胎生8.5日以降の筋原線維の成熟を伴う心筋発達が損なわれる結果、胎生11.5日までに心不全によって死亡することを見出した。これらの結果は、アクチン重合制御因子Fhod3によるアクチン細胞骨格の制御が、筋原線維の形成を通じて心臓形成に必須の役割を果たすことを示している。

研究成果の概要(英文)：Fhod3 is a cardiac member of the formin family proteins that play pivotal roles in actin filament assembly. In the present study, we show that Fhod3 KO mice appear normal up to embryonic day (E) 8.5, but fail to develop further and died by E11.5 with aborted development of myofibrils. These findings indicate that actin dynamics, regulated by Fhod3, participate in sarcomere organization during myofibrillogenesis and thus play a crucial role in heart development.

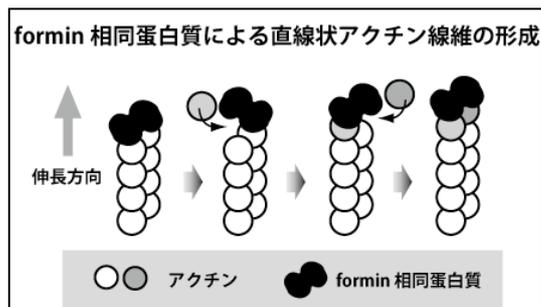
研究分野：分子細胞薬理学

キーワード：サルコメア アクチン 心筋 筋原線維 発生・分化 細胞・組織 循環器

1. 研究開始当初の背景

筋細胞は、アクチンとミオシン両線維の相互作用によって力を生み出す。この両線維が規則正しく整列したサルコメア構造をとる横紋筋は、効率的に強い収縮力を得ることが可能であり、運動から呼吸・循環といった生命機能の本質部分を担っている。この横紋筋の収縮メカニズムはこれまでにほぼ明らかにされてきたのに対し、サルコメアがどのようにして形成されるのか、に関しては依然不明な点が多い。

非筋細胞にも、筋細胞におけるサルコメアと同様のアクチンとミオシンからなる収縮装置が存在する。細胞分裂時に形成される収縮環や、培養細胞が基質には張り付く際に形成されるストレスファイバーなどである。これらはサルコメアのような規則正しい構造は形成しないが、直線状のアクチン線維とこれに相互作用するミオシンからなっている。近年、これらの収縮装置を形成する直線状のアクチン線維が、フォルミン蛋白質と呼ばれる一群のアクチン調節蛋白質によって構築されることが明らかとなってきた。



フォルミン蛋白質は、上図に示す通り、それ自身が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に結合したままプロセッシブに移動するという独特の性質をもっており、この結果、直線状のアクチン線維を形成することができる。既に述べたように、フォルミン蛋白質の一部のメンバーは収縮環やストレスファイバーの形成に関わることが明らかとなっているが、他の多くのメンバーの生理機能は依然不明であった。

我々は、このフォルミン蛋白質の1つのサブファミリーFhod (Fhod1 および Fhod3) を単離して機能解析を進めてきた結果、Fhod1 が血管内皮細胞におけるストレスファイバーの形成に関わることを明らかにした (Takeya et al. JCS 2003, Takeya et al. EMBO J 2008)。一方、Fhod3 は横紋筋に限局的に発現すること (Kanaya, Takeya et al. Genes Cells 2005) などから、筋サルコメアを形成する直線状のアクチン線維の形成に Fhod3 が関与する可能性を考え、ラット初代心筋培養細胞で RNA 干渉法により Fhod3 をノックダウンしたところ、サルコメア構造が破綻することを見出した (Taniguchi, Takeya et al. JBC 2009)。

2. 研究の目的

上述の背景をもとに、細胞レベルでのサルコメア形成に必須のアクチン重合制御因子である Fhod3 の欠損マウスを作出し、その表現型解析を通じて横紋筋発生における Fhod3 の役割を個体レベルで明らかにすることで、アクチン重合制御機構がサルコメア構築において果たす役割とその制御シグナルの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) Fhod3 の心臓における発現と局在様式の検討

①マウスの成獣ならびに胎仔心筋における Fhod3 の発現を RT-PCR 法により解析した。
②マウスの成獣ならびに胎仔心筋における Fhod3 の局在様式を、3種類の自作抗体を用いた免疫組織化学法により解析した。

(2) Fhod3 遺伝子改変マウスの作出

①Fhod3 KO マウスの作出
Fhod3 遺伝子の第1エクソンをマーカー遺伝子 LacZ で置換したコンベンショナル・ノックアウト (KO) マウスを作出した。
②Fhod3 トランスジェニックマウスの作出
心筋に強く発現する α ミオシン重鎖 (α -MHC) プロモーターの下流に Fhod3 の cDNA を挿入した直鎖状 DNA を、C57BL/6 系統マウスの受精卵にマイクロインジェクションして、 α -MHC プロモーターの制御下に Fhod3 を発現するトランスジェニックマウスを作出した。

(3) Fhod3 KO マウスの表現型解析

Fhod3 コンベンショナル KO マウスを、LacZ 染色、組織学的解析、免疫組織化学染色、および電子顕微鏡観察等により解析した。

(4) Fhod3 トランスジェニックマウスによるレスキュー実験

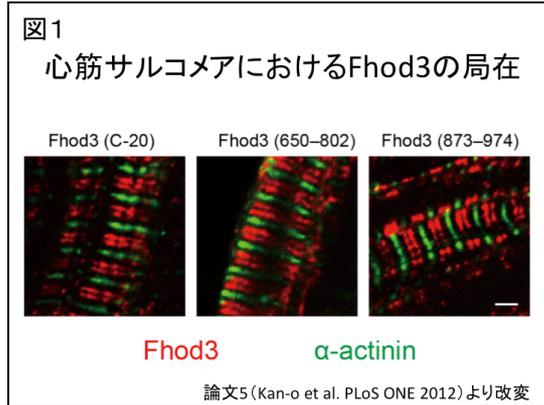
Fhod3 KO マウスを Fhod3 トランスジェニックマウスと交配することで、Fhod3 をホモ欠損した Fhod3 トランスジェニックマウスを得、野生型の同腹仔と比較検討した。

4. 研究成果

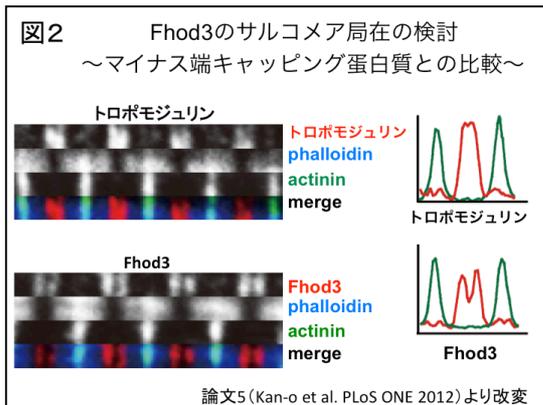
(1) Fhod3 は胎仔期より心筋サルコメアの特定の領域に局在する

まず RT-PCR 法により、マウス胎仔期の心筋に Fhod3 が発現していることを明らかにした。次に、抗原部位が異なる3種類の抗 Fhod3 自作抗体を用いて、胎仔期および成獣期におけるサルコメアへの局在を検討した。その結果、Fhod3 はサルコメアの中央部に、二本のダブレットバンドとして局在してい

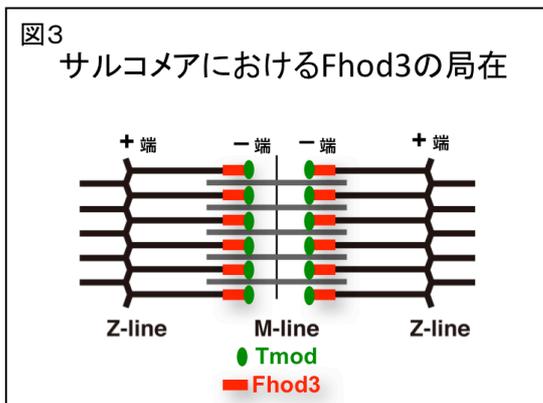
た。この局在様式は Fhod3 トランスジェニックマウスでも同様であった (図 1)。



サルコメア中のアクチン線維の向きは一定であり、プラス端はサルコメア両端の Z 線に固定され、マイナス端はサルコメアの中央部に向かっていていることを考慮すると、Fhod3 はアクチン線維のマイナス端近くに局在していることになる (図 3 参照)。Fhod3 は *in vitro* ではアクチン線維のプラス端に結合するが、心筋組織内では逆にマイナス端に結合するのかもしれないと考えられた。そこで、マイナス端のキャッピング蛋白質であるトロポモジュリンと共染色すると、Fhod3 はトロポモジュリンのバンドとは一致せず、やや外側に局在していた (図 2)。

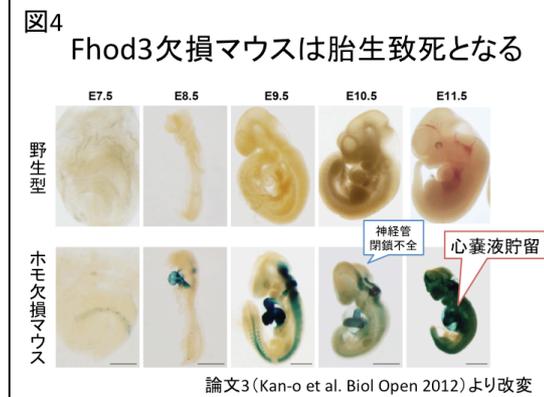


以上より、Fhod3はアクチン線維のプラス端でもマイナス端でもなく、アクチン線維とミオシン線維が重複する領域に局在していると結論づけた (図 3)。

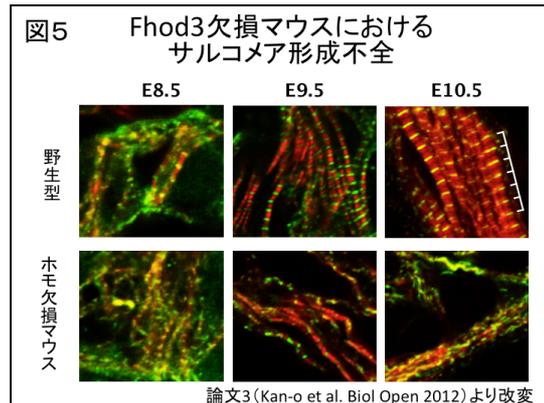


(2) Fhod3 KO マウスは、サルコメア形成不全により胎生致死となる

Fhod3 ホモ欠損マウスは、胎生 8.5 日まではほぼ正常に発育し、その時点で一旦は心拍動を開始した。しかしながら、その後の心筋組織の発達が損なわれており、胎生 11.5 日までに心不全症状である「心嚢液貯留」を呈して死亡した (図 4)。



免疫組織化学法により筋原線維を観察すると、胎生 8.5 日においては野生型と差がないが、その後のアクチン線維の増生を伴う筋原線維の成熟が完全に障害されており (図 5)、

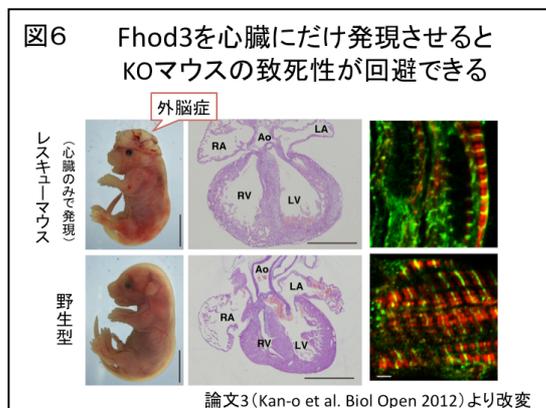


Fhod3 ホモ欠損マウスは筋原線維の形成不全により胎生致死となることが示された。

(3) Fhod3 KO マウスの心臓形成不全は、心臓特異的に Fhod3 を発現することでレスキューできる

上述の通り Fhod3 ホモ欠損マウスは胎生 11.5 日まで致死となるが、心不全症状である「心嚢液貯留」を呈すると同時に、神経管の閉鎖不全を伴っていた (図 4 参照)。この神経組織での表現型が、胎生期の致死性に関与している可能性を完全には否定できない。そこで、心臓での Fhod3 の機能が致死の原因となっていることを明らかにするために、Fhod3 トランスジェニックマウスによる Fhod3 欠損マウスの機能的回復 (レスキュー) 実験を行った。外来性の Fhod3 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスと内因性 Fhod3 をヘテロ欠損するマウスと交配させることにより、内因性 Fhod3 を完全に欠損して外来性 Fhod3 だけを発現するレスキューマウスを作成した。レスキューマウスはホ

モ欠損マウスが致死となる胎生 11.5 日以降も成長し、出生直前の胎生 18.5 日まで生存していた。このマウスは外脳症を呈していたが、心臓は4つの心房心室をもった正しい構造であった。また、免疫組織染色でも、一部に正常に発達している心筋サルコメア構造が観察された(図6)。



以上より、心臓での Fhod3 欠損が胎生致死の原因であることが証明された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5件)

- ① Arimura T, Takeya R, Ishikawa T, Yamano T, Matsuo A, Tatsumi T, Nomura T, Sumimoto H*, Kimura A*. Dilated cardiomyopathy-associated FHOD3 variant impairs the ability to induce activation of transcription factor SRF. *Circ. J.*, 77, 2990–2996 (2013) 査読・有
- ② Yamamoto A, Takeya R, Matsumoto M, Nakayama K, Sumimoto H*. Phosphorylation of Nox1 at threonine-341 regulates its interaction with Noxa1 and the superoxide-producing activity of Nox1. *FEBS J.*, 280, 5145–5159 (2013) 査読・有
- ③ Kan-o M, Takeya R, Abe T, Kitajima N, Nishida M, Tominaga R, Kurose H, Sumimoto H*. Mammalian formin Fhod3 plays an essential role in cardiogenesis by organizing myofibrillogenesis. *Biol. Open*, 1, 889–896 (2012) 査読・有
- ④ Koga M*, Nakashima T, Matsuo S, Takeya R, Sumimoto H, Sakai M, Kageura H. High cell-autonomy of the anterior endomesoderm viewed in blastomere fate shift during regulative development in the isolated right halves of four-cell stage *Xenopus* embryos. *Develop. Growth Differ.*, 54, 717–729 (2012) 査読・有
- ⑤ 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 8件)

- ① 神尾明君、藤本智子、武谷 立、住本英樹 マウス胎仔心筋のサルコメア形成における formin 相同蛋白質 Fhod3 のアクチン結合能の役割 第 65 回日本細胞生物学会大会、愛知県名古屋市、2013 年 6 月 19～21 日。
- ② Takeya R. Role of Fhod3-mediated actin assembly in myofibrillogenesis during cardiac differentiation. International Workshop on Stem Cell Differentiation: The Influence of Biomaterials and Biomechanics. 中国・上海、2013 年 6 月 3～6 日。
- ③ 武谷 立 生命機能を支える機能性蛋白質の制御機構と作用機序 ～活性酸素生成酵素 Nox とアクチン重合制御因子 Fhod の研究から～ 最先端酵素学セミナー 徳島県徳島市、2013 年 2 月 23 日。
- ④ 武谷 立、神尾明君、阿部高也、北島直幸、西田基宏、富永隆治、黒瀬 等、住本英樹 formin 蛋白質 Fhod3 はマウス心臓形成におけるサルコメア形成に必須である 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡県福岡市、2012 年 12 月 11～14 日。
- ⑤ 武谷 立、神尾明君、阿部高也、北島直幸、西田基宏、富永隆治、黒瀬 等、住本英樹 formin 蛋白質 Fhod3 は心臓形成における筋原線維形成に必須のアクチン調節因子である 第 85 回日本生化学会大会、福岡県福岡市、2012 年 12 月 14～16 日。
- ⑥ Takeya R, Kan-o M, Abe T, Kitajima N, Nishida M, Tominaga R, Kurose H, Sumimoto H. 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、兵庫県神戸市、2012 年 5 月 28～31 日。
- ⑦ 神尾明君、武谷 立、田ノ上禎久、富永隆治、住本英樹 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、神奈川県横浜市、2011 年 12 月 13～16 日。
- ⑧ 神尾明君、武谷 立、田ノ上禎久、富永隆治、住本英樹 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，京都府京都市，2011年9月21～24日。

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0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 0件）

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

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/pharmacology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武谷 立 (TAKEYA RYU)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号：50335981

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：