

令和元年6月20日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08627

研究課題名(和文)アクチン重合分子Fhod1のマウス個体レベルにおける機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of formin protein Fhod1 in mouse

研究代表者

實松 史幸 (Sanematsu, Fumiyuki)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80381094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アクチンの核化・重合促進因子であるformin蛋白質FhodにはFhod1とFhod3の2つが存在する。Fhod3は胎児期の心臓発生に関与していることが知られているが、そのホモログであるFhod1は心機能への関与は明らかではなかった。我々はFhod1欠損マウスを作出し、野生型およびFhod1欠損マウスを用いて、心臓におけるFhod1の発現ならびに心機能への関与を検討した。その結果、Fhod1は心臓において発現が極めて少なく、また発現していたとしても心機能にはほぼ関与していないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでFhod3が心発生と心機能維持に必須であることを我々は明らかとしてきた。一方、Fhod1は心筋に発現して機能しているという報告もあったが、本研究によってFhod1は心臓において発現が極めて少なく、また発現していたとしても心機能にはほぼ関与していないことを我々は新たに見出した。心臓におけるアクチン核化・重合因子の果たす役割の研究を通して、心筋の収縮力調節機構を正しく理解することで、心不全といった病態機構の原因解明の糸口につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：The formin family proteins nucleate and elongate actin filament, thereby functioning in diverse cytoskeletal processes. Fhod3, one of the cardiac formin proteins, plays a crucial role in development and functional maintenance of the heart. On the other hand, the role of Fhod1, a protein closely-related to Fhod3, has still remained elusive. To clarify the physiological role of Fhod1, we generated Fhod1 knockout mice by replacement of exon 1 of the Fhod1 gene with a lacZ reporter gene. Both in histological LacZ staining and in immunoblot analysis, expression level of the Fhod1 protein in the heart was below the lower limit of detection. Fhod1 knockout mice did not show any defects in gross and histological appearance of the heart. Thus, Fhod1 appears to be unnecessary for normal development and function of the mouse heart, even if a marginal amount of Fhod1 is expressed in the heart.

研究分野：細胞骨格

キーワード：心筋

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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、細胞のダイナミックな形態変化に必要な蛋白質であり、特に細胞の運動においては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」とよばれる単量体と「F-アクチン」とよばれる多量体(アクチン線維)の状態が存在することが知られており、このふたつの状態が行き来することで細胞のダイナミックな変化を引き起こす。F-アクチンが作られるためには、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 蛋白質や Arp2/3 複合体などが知られている。そのうち、formin 蛋白質はアクチンに結合して核化・重合促進のための機能ドメインである FH2(formin homology 2)ドメインが働くことでアクチン線維プラス端方向へ伸長させる役割を果たし、細胞におけるストレスファイバーなどの直線状のアクチン構造物の形成に関与していると考えられている。しかし、formin 蛋白質の個体における生理的な役割は不明な点が多く、さらに詳細な解析が必要であった。

2. 研究の目的

formin 蛋白質は哺乳類細胞において 15 種類の存在が確認されており、その中の Fhod サブファミリーには Fhod1 と Fhod3 の 2 つが存在する。申請者らはこれまでに、心臓に発現する Fhod3 が、心筋サルコメア内のアクチン線維形成を担うこと(Taniguchi et al., JBC 2009)、心拍動下のアクチン線維形成を通じて心臓の発生に必須であること(Kan-o et al., Biol Open 2012)、さらに、出生後の心臓においても、心機能の維持ならびに負荷への肥大応答に必要であることを明らかにしてきた(Matsuyama et al., PNAS 2018; Ushijima et al., JBC 2018 他)。他方、Fhod1 については、細胞内のアクチン線維の形成に関与していること(Takeya and Sumimoto, JCS 2003)、ROCK kinase の下流で Fhod1 が活性化されて機能していること(Takeya et al., EMBOJ 2008)を明らかにしてきた。しかしながら、個体レベルでの Fhod1 の機能は不明な点も多い。我々は Fhod1 のマウス個体レベルでの機能解析をすすめるため、Fhod1 ノックアウトマウスを作出することとし、個体を解析することで、Fhod1 の新しい機能を探索したいと考えた。

3. 研究の方法

(1) Fhod1 特異的抗体を用いた各臓器での発現解析

各臓器での Fhod1 の発現を検討するため、野生型のマウスより各種臓器をホモジナイザーで破碎、蛋白質抽出をおこない、Fhod1 蛋白質の N 端部分、DAD ドメイン部分、C 末端部分を抗原とした 3 種類のウサギ抗 Fhod1 抗体を用いてイムノプロットを行った。

(2) Fhod1 ノックアウトマウスの作出と表現型解析

Fhod1 遺伝子座に LacZ 遺伝子を挿入した ES 細胞の相同組換え体を胚に注入して、得られたキメラマウスを交配した後、F1 世代ヘテロ欠損マウスを得た。その後、これらの兄妹交配によりホモ欠損マウスまで作出をおこなった。マウスにおける Fhod1 の遺伝子型の判別のために、サザンブロッティングおよび PCR 法を用いた。作出したノックアウトマウスを長期間飼育し、野生型とノックアウトマウス間での生存曲線の差異があるかを検討した。また、ヘテロ/ホモ欠損マウスによる各臓器における Fhod1 の発現解析のために X-gal 染色法を用いた。

(3) Fhod1 ノックアウトマウスにおける心機能の解析

心臓の組織を HE 切片観察することで形態を検討すると共に、心体重比の比較および心エコー解析により、心機能評価をおこなった。また、リアルタイム PCR 法を用いて、心不全マーカー(ANP, BNP, β -MHC)の発現量を野生型とノックアウト間で比較して、心機能状態を解析した。

(4) 心筋構成蛋白質の局在観察

心筋におけるサルコメア構造及び介在板構造を観察するため、サルコメア構成蛋白質(actin, α -actinin)、介在板構成蛋白質(Vinculin, N-cadherin, Connexin43)の抗体を用いて免疫染色を行った。また、心筋における Fhod1 及び Fhod3 の局在を知るため、それぞれの特異的抗体を用いて、免染を行った。その後、共焦点レーザー顕微鏡を用いてそれぞれの局在を野生型とノックアウトマウス間で比較観察した。

(5) ノックアウトマウスにおける他 formin 分子の発現変化

Fhod1 ノックアウトマウス的心機能に異常が見られなかったことから、心臓に存在している他の formin 蛋白質(Daam1, Fhod3, mDia1)の発現が亢進することで心機能を代償している可能性が想定されたため、リアルタイム PCR 法を用いてこれらの formin 蛋白質について発現

量の変化を調べた。

4. 研究成果

(1) Fhod1 特異的抗体を用いた各臓器での発現解析

我々の研究室で作製した抗原領域が異なる Fhod1 特異的抗体 3 種類を用いて、マウス個体内における Fhod1 の発現部位をイムノプロットング法により検討した。その結果、肺、脾臓、骨髄、胸腺において Fhod1 の発現が検出された一方、心臓において発現は検出されなかった。

(2) Fhod1 ノックアウトマウスの作出と表現型解析

我々は Fhod1 のマウス個体レベルでの機能解析を進めるため、Fhod1 遺伝子座に LacZ 遺伝子を挿入した Fhod1 ノックアウトマウスを作成した。作出した Fhod1 ノックアウトマウスと野生型マウスにおいて外見上明らかな差はなく、生存曲線においても有意な差は見られなかった。次に、マウス個体内における Fhod1 の発現細胞の探索を X-gal 染色法を用いて行った。その結果、肺、脾臓ではシグナルは見られたものの心臓においてシグナルは検出されなかった。過去、Fhod1 は心筋細胞で発現して介在板に局在している (Dwyer et al., AR 2014; Al Haj et al., EJCB 2015) との報告があったが、本研究では心臓に Fhod1 の発現が認められなかった。心臓における Fhod1 の発現量が我々の検出限界以下である可能性もあることから、心臓における Fhod1 の役割を検討するため、Fhod1 遺伝子破壊の効果を評価しようと考えた。これより、野生型マウスとノックアウトマウス間での心機能の差を明らかにしたいと考え、以降心機能の解析に焦点を絞ることとした。

(3) Fhod1 ノックアウトマウスにおける心機能の解析

Fhod1 ノックアウトマウスで心機能異常が起こっている可能性を考え、心体重比、組織学的解析及び心エコー解析を行ったが、いずれも野生型との差異は見られなかった。心臓の機能的異常により発現が亢進すると知られている、心不全マーカー (ANP, BNP, β -MHC) の転写量においても野生型とノックアウトマウスの間でいずれも有意な差は認められなかった。これより、Fhod1 の欠損は心臓の形態異常や機能障害は起こさないことが明らかとなった。

(4) 心筋構成蛋白質の局在観察

心筋における収縮装置であるサルコメア構造を詳細に観察するため、野生型およびノックアウトマウスの心臓組織を用いて、免疫染色を行った。その結果、サルコメア構造には異常は認められなかった。次に、Fhod1 は介在板に局在しているとの過去の報告を元に介在板に着目して解析を行った。その結果、介在板構成蛋白質である Vinculin, N-cadherin の局在は異常は認められなかった。また、介在板への Fhod1 の局在を観察するため、3 種類の Fhod1 抗体を使って免疫染色を行ったが、いずれも介在板への局在は認められなかった。さらに、介在板における Gap junction の構成蛋白質である Connexin43 の局在を観察した。通常、Connexin43 は介在板に局限しているが、心筋疾患時はその局在が分散することが知られている。野生型およびノックアウトマウスで Connexin43 の局在を比較したところ、それらの間に差は認められなかった。これらの結果より、野生型およびノックアウトマウス間において、サルコメア及び介在板の構造と機能には差がないと考えた。

(5) ノックアウトマウスにおける他 formin 分子における発現の変化

ノックアウトマウスでは顕著な心機能異常が見られないことから、心臓に発現することが知られている他の formin 蛋白質 (Daam1, Fhod3, mDia1) の発現が亢進して Fhod1 の機能を代償している可能性を考え、リアルタイム PCR 法にて発現量の解析を行ったが、野生型とのノックアウトマウス間での転写量の差は見られなかった。これより、他の formin 分子が Fhod1 欠損における心機能を代償しているわけではないと考えられた。

以上より、Fhod1 は心臓において発現量は極めて少なく、また発現していたとしても心機能にはほぼ関与していないと結論づけた (Sanematsu et al., Cytoskeleton 2019)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. Sanematsu F, Kanai A, Ushijima T, Shiraishi A, Abe T, Kage Y, Sumimoto H, Takeya R. Fhod1, an actin-organizing formin family protein, is dispensable for cardiac

development and function in mice. *Cytoskeleton (Hoboken)* (査読有り), 76(2):219-229, 2019; doi: 10.1002/cm.21523.

2. Ushijima M, Uruno T, Nishikimi A, Sanematsu F, Kamikaseda Y, Kunimura K, Sakata D, Okada T, Fukui Y. The Rac Activator DOCK2 Mediates Plasma Cell Differentiation and IgG Antibody Production. *Front Immunol.* (査読有り), 9:243, 2018; doi: 10.3389/fimmu.2018.00243.
3. Tomino T, Tajiri H, Tatsuguchi T, Shirai T, Oisaki K, Matsunaga S, Sanematsu F, Sakata D, Yoshizumi T, Maehara Y, Kanai M, Cote JF, Fukui Y, Uruno T. DOCK1 inhibition suppresses cancer cell invasion and macropinocytosis induced by self-activating Rac1^(P29S) mutation. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有り), 497(1):298-304, 2018; doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.073.
4. Yamazaki S, Tanaka Y, Araki H, Kohda A, Sanematsu F, Arasaki T, Duan X, Miura F, Katagiri T, Shindo R, Nakano H, Ito T, Fukui Y, Endo S, Sumimoto H. The AP-1 transcription factor JunB is required for Th17 cell differentiation. *Sci Rep.* (査読有り), 7(1):17402. 2017; doi: 10.1038/s41598-017-17597-3.
5. Tajiri H, Uruno T, Shirai T, Takaya D, Matsunaga S, Setoyama D, Watanabe M, Kukimoto-Niino M, Oisaki K, Ushijima M, Sanematsu F, Honma T, Terada T, Oki E, Shirasawa S, Maehara Y, Kang D, Côté JF, Yokoyama S, Kanai M, Fukui Y. Targeting Ras-Driven Cancer Cell Survival and Invasion through Selective Inhibition of DOCK1. *Cell Rep.* (査読有り), 19(5):969-980., 2017; doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.016.
6. Shiraishi A, Uruno T, Sanematsu F, Ushijima M, Sakata D, Hara T, Fukui Y. DOCK8 Protein Regulates Macrophage Migration through Cdc42 Protein Activation and LRAP35a Protein Interaction. *J Biol Chem.* (査読有り), 292(6):2191-2202., 2017; doi: 10.1074/jbc.M116.736306.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 實松史幸、金井亜未、鹿毛陽子、牛島智基、住本英樹、武谷立
フォルミン蛋白質 Fhod1 の発現細胞の同定と機能解析。
第 42 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、佐賀、8 月 29-31 日、2018 年
2. 實松史幸、金井亜未、鹿毛陽子、牛島智基、住本英樹、武谷立
マウス心臓におけるフォルミン蛋白質 Fhod1 の機能解析
生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)、神戸、12 月 8 日、2017 年
3. 金井亜未、實松史幸、牛島智基、武谷立、住本英樹
フォルミン蛋白質 Fhod1 のマウス心臓における生理的役割
平成 29 年度日本生化学会九州支部例会、宮崎、5 月 13 日、2017 年
4. 武谷立、實松史幸、根本隆行、鹿毛陽子、松山翔、Hikmawan Wahyu Sulistomo
アクチン重合制御因子 Fhod1 および Fhod3 の生理的機能
第 9 回トランスポーター研究会九州部会、宮崎、10 月 1 日、2016 年

〔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：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
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)研究分担者

研究分担者氏名：武谷 立
ローマ字氏名：Takeya, Ryu
所属研究機関名：宮崎大学
部局名：医学部 薬理学
職名：教授
研究者番号（8桁）：50335981

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。