

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11793

研究課題名（和文）骨格筋サルコメアにおける収縮依存的なアクチン・ターンオーバー

研究課題名（英文）Mechanism of actin turnover in skeletal muscle cells

研究代表者

鹿毛 陽子（Kage, Yohko）

宮崎大学・医学部・助手

研究者番号：30776688

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：横紋筋の収縮装置サルコメアがどのようにして収縮するのか？はこれまでの長年の研究によって解き明かされてきたのに対して、本装置がどうやって恒常性を保っているか、に関しては未だ不明な点が多い。本研究では、サルコメア内のアクチン線維形成に関わるマシナリーに注目し、本マシナリーが骨格筋や他の臓器のアクトミオシン収縮装置の維持にどのように関わるかを検討した結果、本マシナリー構成因子であるフォルミン蛋白質が臓器や組織特異的な機能を通じてアクトミオシン相互作用を制御している可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化が進行する日本にとって、加齢に伴う筋量や筋力の低下、すなわち「サルコペニア」は深刻な社会問題である。サルコペニアは、横紋筋の収縮単位であるサルコメアの恒常性が内的・外的な要因によって維持できなくなることで発症すると考えられているが、その恒常性維持機構は未だよく分かっていない。本研究は、横紋筋サルコメアの形成・維持の制御機構の理解を通じて、サルコペニア進展の分子機構の解明に貢献するだけでなく、制御機構を標的とした新規治療法の創出につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Although many years of research have elucidated how the sarcomere, the contractile apparatus of striated muscles, contracts, much remains unknown about how this apparatus maintains homeostasis. In this study, we focused on the actin polymerization machinery in sarcomeres and examined how it is involved in the maintenance of the actomyosin contractile apparatus in skeletal muscle and other organs. We found the possibility that the formin protein, a key component of this machinery, may regulate actomyosin interaction through organ- and tissue-specific functions.

研究分野：分子細胞栄養学

キーワード：サルコメア アクチン ミオシン

## 1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは高齢化が進行する日本において、深刻な健康問題となっている。例えば四肢体幹の筋肉、口腔・咽頭の筋肉、胸郭・横隔膜の筋肉のサルコペニアが進行すれば、それぞれ寝たきり、摂食嚥下障害、呼吸障害を来し、いずれは呼吸不全から死へ至る。このように、サルコペニアによる骨格筋萎縮と機能低下は社会的にもきわめて重要であるにもかかわらず、サルコペニアの発症機序には未だに不明な点が多い。近年、がんに対しては研究の著しい進歩により原因に基づいた分子標的治療が可能となったのとは対照的であり、サルコペニアの分子病態の解明および治療標的の探索は、喫緊の課題である。

サルコペニアの発症・進展プロセスには、蛋白質分解システムの異常、タンパク質合成と分解のアンバランスや骨格筋幹細胞の機能不全など様々な要因が関わっているが、その最終共通経路として「サルコメア構造の維持」が位置している。サルコメアは、アクチン線維とミオシン線維が規則正しく整列した構造を持つ横紋筋の収縮単位である。本装置の収縮メカニズムは、これまでの長い間の研究によって解明されてきたのに対して、その構造がどのようにして維持されているか、には依然不明な点が多く残されている。

## 2. 研究の目的

申請者らはこれまでに、フォルミン蛋白質と呼ばれるアクチン重合因子が、心筋サルコメアにおけるアクチン重合を介して、心筋サルコメアの形成・維持に必須の役割を果たすことを明らかにしてきた( )。本研究では、これら心筋サルコメアにおける理解をベースに、同じ横紋筋である骨格筋のサルコメアにおける恒常性維持においてフォルミン蛋白質が果たす役割を明らかにすると同時に、サルコメア以外でのアクトミオシン制御における生理的意義の検討を目的とした。

## 3. 研究の方法

上述の目的を達成するために、以下の2つの方法により研究を推進した。

### (1) 心筋におけるフォルミン蛋白質 Fhod1 の役割

マウス Fhod1 遺伝子を欠失した Fhod1 ノックアウト(KO)マウスを作出して、野生型マウスと比較することにより、マウス個体における Fhod1 の生理的な役割を検討した。

### (2) 神経組織におけるフォルミン蛋白質 Fhod3 の役割

マウス Fhod3 遺伝子を神経組織特異的に欠失した Fhod3 コンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作出して、野生型マウスと比較することにより、マウス神経組織における Fhod3 の生理的な役割を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 心筋におけるフォルミン蛋白質 Fhod1 の役割

心臓に強く発現するフォルミン蛋白質 Fhod3 は、心臓の発生ならびにその機能の維持に重要な役割を担っている( )。Fhod3 のホモログである Fhod1 も、近年、心筋細胞で発現しているとの報告が相次いでなされたが( )、心臓における Fhod1 の役割は未だ不明であった。そこで、心臓における Fhod1 の生理的役割を明らかにするために、今回我々はマウスの Fhod1 遺伝子のエクソン1をレポーター遺伝子 lacZ によって置換することで、Fhod1 ノックアウト(KO)マウスを作出した。ホモ接合体の Fhod1KO マウスは外観上正常であり、特異的な症候を示さなかった。

組織サンプルの lacZ 染色によって Fhod1 の発現を検討したところ、Fhod1 を強く発現する肺で強く染色されたのに対して、これまでの報告に反して心臓では Fhod1 の発現が検出されなかった。この結果と一致して、3種類の異なる抗 Fhod1 抗体を用いたウエスタンブロット解析においても、Fhod1 の心臓における発現は検出下限値以下であった。

KO マウスの心臓は、肉眼的・組織学的に異常を示さず、心不全等のストレス条件下で誘導される胎児心筋遺伝子群の発現も上昇していなかった。さらに、Fhod1KO マウスでは、他のフォルミン蛋白質の発現が代償的に増加することもなかった。

以上の結果より、Fhod1 は例えば心臓にわずかな量の Fhod1 が発現していたとしても、マウスの心臓の正常な発生と機能には必要ないことが示された( )。

### (2) 神経組織におけるフォルミン蛋白質 Fhod3 の役割

心臓に強く発現するフォルミン蛋白質 Fhod3 は、上述の通り、心臓の発生ならびにその機

能の維持に重要な役割を担う( )一方で、Fhod3 は胎生期の後脳の神経上皮に一過性に発現し、神経板の形態形成に重要な役割を果たしている( )。しかしながら、Fhod3KO マウスは胎生期に致死となるため、出生後の神経組織における Fhod3 の役割は不明であった。そこで、今回マウス Fhod3 遺伝子を神経組織特異的に欠失した Fhod3 コンディショナルノックアウト(ck0) マウス作出して、野生型マウスと比較することにより、マウス神経組織における Fhod3 の生理的な役割を検討した。

免疫組織化学的および生化学的解析により、Fhod3 は生後マウス的大脑皮質のなかでも、II/III 層および V 層という限られた領域の興奮性神経錐体細胞に特異的に発現し、シナプス後スパインに集積していることが明らかになった。Fhod3 を神経組織特異的に欠失させても、脳の肉眼的・組織学的外観に異常は認められなかったが、Fhod3 が発現する領域内の錐体細胞の樹状突起スパインには形態的な異常が見られた。Fhod3 欠損マウス的大脑皮質から調製した神経細胞の初代培養においては、スパインの形態異常は Fhod3 プロモーターが活性化している一部の細胞においてのみ検出され、Fhod3 プロモーターが陰性の錐体細胞には見られなかった。したがって、Fhod3 は、錐体細胞の特定の亜集団においてのみ、細胞種特異的に樹状突起スパインの形態形成に重要な役割を果たすことが明らかになった( )。

神経錐体細胞の樹状突起は、樹状突起スパインと呼ばれる多数の小さな多形突起で覆われており、この樹状突起スパインの形や大きさは、神経細胞の発達やシナプス可塑性の過程でダイナミックに変化することが知られている。樹状突起スパインの形状変化は、シナプス伝達の変化と密接に関連していることから、これらのスパインの形状変化は、学習と記憶の分子基盤の重要な要素であると考えられているが、このような形態変化のベースとなるアクチン細胞骨格の動的な組み立てに関して、様々なタイプの神経細胞でどのように制御されているかは不明であった。今回の発見は、Fhod3 がスパインの活動依存的なアクチンフィラメントの再編成の制御因子の候補の1つであることを示唆しており、今後、神経細胞の発達やシナプス可塑性において、特定の神経細胞の樹状突起における Fhod3 によるアクチン重合制御の詳細な分子メカニズムの解明が期待される。

#### <引用文献>

- Matsuyama S, Kage Y, Fujimoto N, Ushijima T, Tsuruda T, Kitamura K, Shiose A, Asada Y, Sumimoto H, Takeya R. (2018) Interaction between cardiac myosin-binding protein C and formin Fhod3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E4386-E4395.
- 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, 29873-81.
- Kan-O M, Takeya R, Abe T, Kitajima N, Nishida M, Tominaga R, Kurose H, Sumimoto H. (2012) Mammalian formin Fhod3 plays an essential role in cardiogenesis by organizing myofibrillogenesis. *Biol Open*, 1, 889-96.
- Ushijima T, Fujimoto N, Matsuyama S, Kan-O M, Kiyonari H, Shioi G, Kage Y, Yamasaki S, Takeya R, Sumimoto H. (2018) The actin-organizing formin protein Fhod3 is required for postnatal development and functional maintenance of the adult heart in mice. *J Biol Chem*, 293, 148-162.
- Al Haj A, Mazur AJ, Radaszkiewicz K, Radaszkiewicz T, Makowiecka A, Stopschinski BE, Schönichen A, Geyer M, Mannherz HG. (2015) Distribution of formins in cardiac muscle: FHOD1 is a component of intercalated discs and costameres. *European Journal of Cell Biology*, 94, 101-113.
- Dwyer J, Pluess M, Iskratsch T, Dos Remedios CG, Ehler E. (2014) The formin FHOD1 in cardiomyocytes. *Anatomical Record*, 297, 1560-1570.
- Sanematsu F, Kanai A, Ushijima T, Shiraishi A, Abe T, Kage Y, Sumimoto H, Takeya R. (2019) Fhod1, an actin-organizing formin family protein, is dispensable for cardiac development and function in mice. *Cytoskeleton*, 76, 219-229.
- Sulistomo HW, Nemoto T, Yanagita T, Takeya R. (2019). Formin homology 2 domain-containing 3 (Fhod3) controls neural plate morphogenesis in mouse cranial neurulation by regulating multidirectional apical constriction. *J Biol Chem.*, 294, 2924-2934.
- Sulistomo HW, Nemoto T, Kage Y, Fujii H, Uchida T, Takamiya K, Sumimoto H, Kataoka H, Bito H and Takeya R. (2021) Formin homology 2 domain-containing 3 (Fhod3) controls neural plate morphogenesis in mouse cranial neurulation by regulating multidirectional apical constriction. *Cerebral Cortex*, 31, 2205-2219.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sulistomo Hikmawan Wahyu, Nemoto Takayuki, Kage Yohko, Fujii Hajime, Uchida Taku, Takamiya Kogo, Sumimoto Hideki, Kataoka Hiroaki, Bito Haruhiko, Takeya Ryu	4. 巻 31
2. 論文標題 Fhod3 Controls the Dendritic Spine Morphology of Specific Subpopulations of Pyramidal Neurons in the Mouse Cerebral Cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 2205 ~ 2219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cercor/bhaa355	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fumiyuki Sanematsu, Ami Kanai, Tomoki Ushijima, Aki Shiraishi, Takaya Abe, Yohko Kage, Hideki Sumimoto, Ryu Takeya	4. 巻 76
2. 論文標題 Fhod1, an actin-organizing formin family protein, is dispensable for cardiac development and function in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytoskeleton	6. 最初と最後の頁 219-229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cm.21523	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kotaro Hidaka, Toyoaki Maruta, Tomohiro Koshida, Mio Kurogi, Yohko Kage, Satoshi Kouroki, Tetsuro Shirasaka, Ryu Takeya, Isao Tsuneyoshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Extracellular signal-regulated kinase phosphorylation enhancement and NaV1.7 sodium channel upregulation in rat dorsal root ganglia neurons contribute to resiniferatoxin-induced neuropathic pain: The efficacy and mechanism of pulsed radiofrequency therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 Refer to DOI
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/17448069221089784	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Toyoaki Maruta, Kotaro Hidaka, Satoshi Kouroki, Tomohiro Koshida, Mio Kurogi, Yohko Kage, Seiya Mizuno, Tetsuro Shirasaka, Toshihiko Yanagita, Satoru Takahashi, Ryu Takeya, Isao Tsuneyoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Selective optogenetic activation of NaV1.7-expressing afferents in NaV1.7-ChR2 mice induces nocifensive behavior without affecting responses to mechanical and thermal stimuli	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0275751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0275751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hikmawan Wahyu Sulistomo, 根本隆行, 鹿毛陽子, 武谷立
2. 発表標題 神経細胞の形態制御におけるフォルミン蛋白質Fhod3の役割
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂田鋼治, 鹿毛陽子, 武谷立
2. 発表標題 フォルミン蛋白質Fhod3の心筋症病因変異がもたらす機能変化
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hikmawan Wahyu Sulistomo, 根本隆行, 鹿毛陽子, 藤井哉, 尾藤晴彦, 武谷立
2. 発表標題 フォルミン蛋白質Fhod3による大脳皮質錐体細胞の樹状突起スパインの形態制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鹿毛陽子, Hikmawan Wahyu Sulistomo, 武谷立
2. 発表標題 アクチン重合制御因子フォルミン蛋白質のマウス大脳皮質における発現
3. 学会等名 第73回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鹿毛陽子, Hikmawan Wahyu Sulistomo, 武谷立
2. 発表標題 マウス大脳皮質におけるフォルミン蛋白質の発現パターン
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂田鋼治, 松山翔, 鹿毛陽子, 石川哲憲, 北村和雄, 森本幸生, 武谷立
2. 発表標題 サルコメアのアクチン制御機構への介入による心機能調節
3. 学会等名 第129回日本循環器学会九州地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ヒクマワン ワフユ スリストモ, 根本隆行, 鹿毛陽子, 藤井哉, 尾藤晴彦, 武谷立
2. 発表標題 マウス大脳皮質の樹状突起スパインの形態形成におけるフォルミン蛋白質Fhod3の役割
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 實松史幸, 牛島智基, 鹿毛陽子, 住本英樹, 武谷立
2. 発表標題 マウス心臓におけるフォルミン蛋白質Fhod1の発現とその役割
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 實松史幸, 金井亜未, 牛島智基, 鹿毛陽子, 住本英樹, 武谷立
2. 発表標題 マウス心臓形成と心機能におけるフォルミン蛋白質Fhod1の役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関