

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460371

研究課題名(和文)サルコメアにおける心拍動依存的な恒常性維持機構とその破綻

研究課題名(英文)Contractility-dependent regulation of homeostasis in the sarcomere

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：サルコメアにおけるアクチン動態制御を担うフォルミン蛋白質Fhod3を、時期特異的に心臓で欠損する遺伝子改変マウスを作出して解析した結果、出生期および成獣期においてFhod3が心筋の肥大応答に關与することを明らかにした。さらに、心筋症の原因遺伝子として知られる心筋ミオシン結合蛋白質CとFhod3が直接結合すること、この両者の結合が心筋ミオシン結合蛋白質C欠損による心筋症様病態の発現に深く關わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Fhod3 is a cardiac member of the formin family proteins that play pivotal roles in the regulation of the actin dynamics. In the present study, we have generated conditional knock-out mice where Fhod3 is deleted at different stages, and found that Fhod3 is required for cardiac development and the maintenance of the normal cardiac function of the heart. In addition, we discovered a direct molecular link between Fhod3 and cMyBP-C, a thick myosin filament-associated protein that modulates myocardial contraction via cross-bridge arrangement. Since Fhod3 adversely affected cardiac function in the absence of cMyBP-C, the interaction appears to serve to control the Fhod3-mediated actin turnover at the cross-bridge region.

研究分野：分子細胞生化学

キーワード：アクチン 細胞骨格 心臓 サルコメア 心筋症 フォルミン

## 1. 研究開始当初の背景

アクチンとミオシン両線維が規則正しく整列したサルコメア構造をもつ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、また、いかに恒常性を維持しているのか、に関しては依然不明な点が多い。

一方で、非筋細胞にも横紋筋細胞と同様に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、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ほどの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る。近年、これらの収縮装置を形成するアクチン線維が、フォルミン蛋白質と呼ばれるアクチン重合制御因子によって構築されることが明らかとなってきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、横紋筋の収縮装置「サルコメア」において、心筋特異的なフォルミン蛋白質である Fhod3 が果たす役割を明らかにすることで、サルコメアの構築とその恒常性維持において、アクチン重合制御機構が果たす意義とその制御シグナルの解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) トランスジェニックマウスを用いた Fhod3 のアクチン結合能の生理的意義の解析

我々はこれまでに Fhod3 ホモ欠損マウスが胎生 11.5 日までに心不全兆候を伴って死亡することから、Fhod3 が心臓の発生に必須であることを明らかにしたが、Fhod3 がどのように機能しているかは不明であった。その分子機構を明らかにするために、アクチンと結合出来ない変異型 Fhod3 を心臓特異的に発現するトランスジェニックマウスを作出して解析を行った。

### (2) Fhod3 コンディショナルノックアウトマウスの作出とその表現型解析

上述の通り、Fhod3 ホモ欠損マウスが心不全兆候を伴って胎生期に死亡することから、Fhod3 が心臓の発生に必須であることは明らかとなったが、同欠損マウスでは最終的に分化した心臓が形成されないために、成体の成熟した心筋サルコメアにおける Fhod3 の役割は不明であった。そこで、時期特異的に Fhod3 を欠損させることができるコンディショナルノックアウトマウスを作出して解析を行った。

### (3) Fhod3 結合タンパク質の同定とその生理的意義の解析

Fhod3 が作用する分子機序を明らかにす

るために、サルコメア内で Fhod3 と結合する蛋白質を探索し、その結合の生理的意義を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) トランスジェニックマウスを用いた Fhod3 のアクチン結合能の生理的意義の解析

アクチンと結合出来ない変異型 Fhod3 を胎生期の心臓に特異的に発現するトランスジェニックマウスを作出して、胎生期における Fhod3 のアクチン結合能の役割を検討した。当該マウスは、Fhod3 ホモ欠損マウスと同様に、心筋サルコメアの形成不全により心臓が形成されずに胎生期に致死となったことから、Fhod3 のアクチン結合能は胎生期の心臓形成に必須であることが明らかとなった(論文③)。

さらに、野生型 Fhod3 を胎生期の心臓に特異的に強発現するトランスジェニックマウスも作出し、これを用いて心臓形成過程におけるサルコメア内の Fhod3 の局在様式を、各種マーカー蛋白質との比較により詳細に検討した。その結果、1) 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、2) 心臓の発生過程において Fhod3 は、サルコメア内のアクチン線維の周期的な配置の完成に関わる可能性を見出した(論文③)。

### (2) Fhod3 コンディショナルノックアウトマウスの作出とその表現型解析

Cre-loxP システムを用いて、出生期および成獣期に心臓特異的に Fhod3 蛋白質を欠損するコンディショナルノックアウト(cKO)マウスをそれぞれ作出し、その形態的・機能的解析を行った。

出生期 cKO マウスは、著明な心肥大とサルコメア構造の破綻を伴って生後 2 週間前後で死亡したことから、Fhod3 によるアクチン重合制御は一旦完成した心筋サルコメアにおいてもその維持に必須であることが示された(論文②)。

一方で、成獣期 cKO マウスは致死とならず、軽度の心拡大と心機能の低下を認めたものの、サルコメア構造の破綻は認めなかった。しかしながら  $\alpha 1$  アドレナリン受容体刺激に対して、成獣期 cKO マウスはコントロールマウスと比較して、より高度な心肥大と心機能の低下を認めた(論文②)。以上より、Fhod3 によるアクチン重合制御機構は、出生期および成獣期の心臓において、心筋の肥大応答に関与することが示唆された。

### (3) Fhod3 結合タンパク質の同定とその生理的意義の解析

Fhod3 が心筋サルコメア内でどのように作用するのか、その分子機序を明らかにするために、Fhod3 結合蛋白質を免疫沈降法によ

り分離し、質量分析法によって同定した。その結果、心筋症の原因遺伝子として知られる心筋ミオシン結合蛋白質C(cMyBP-C)をFhod3結合蛋白質として同定した(論文①)。さらにFhod3がcMyBP-Cとの直接結合を介してサルコメア内の特定領域に局在すること、この両者の結合がcMyBP-C欠損による心筋症様病態の発現に深く関わる可能性を見出した(論文①)。本研究成果は、心筋症の病態理解にも新たな視座を与えるものである。

#### 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 Matsuyama S, Kage Y, Fujimoto N, Ushijima T, Tsuruda T, Kitamura K, Shiose A, Asada Y, Sumimoto H, Takeya R. Interaction between cardiac myosin-binding protein C and formin protein Fhod3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 115, E4386-E4395, 2018. 査読有
- ② Ushijima T, Fujimoto N, Matsuyama S, Kan-o M, Kiyonari H, Shioi G, Kage Y, Yamasaki S, Takeya R, Sumimoto H. 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, 2018. 査読有
- ③ Fujimoto N, Kan-o M, Ushijima T, Kage Y, Tominaga R, Sumimoto H, Takeya R. Transgenic Expression of the Formin Protein Fhod3 Selectively in the Embryonic Heart: Role of Actin-Binding Activity of Fhod3 and Its Sarcomeric Localization during Myofibrillogenesis. *PLoS One*. 11, e0148472, 2016. 査読有
- ④ 武谷 立. 心筋サルコメアの形成とその維持機構. 宮崎県医師会医学雑誌. 40, 1-6, 2016. 査読無
- ⑤ 柳田俊彦, 根本隆行, 武谷 立. 薬理学ロールプレイ: Case & Communication based approach によるアクティブラーニング. 日本薬理学雑誌 146, 115-118, 2015. 査読無
- ⑥ 武谷 立. 心筋の収縮装置「サルコメア」の形成の分子機構. 生存科学 26, 299-305, 2015. 査読無

[学会発表] (計 28 件)

- ① 武谷 立. 心筋症とアクチン動態. 第4回日本心筋症研究会シンポジウム4「心筋症発症の分子機序」. 奈良市(2018.6)

- ② Matsuyama S, Kage Y, Fujimoto N, Ushijima T, Kan-o M, Sumimoto H, Takeya R. Physical and functional interaction of formin Fhod3 with sarcomeric proteins in the heart. The joint annual meeting of 70th JSCB and 51st JSDB. 東京都(2018.6)
- ③ 松山翔, 鹿毛陽子, 武谷 立. 心筋症の病態形成におけるフォルミン蛋白質の役割. 2018 年生体運動研究合同班会議. 東京都(2018.1)
- ④ 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). 神戸市(2017.12)
- ⑤ 下城奈央, 武谷 立, 安永卓生. 電子線トモグラフィ法を用いたフォルミン蛋白質 Fhod3 によるサルコメア構築機構の解明. 日本顕微鏡学会第60回記念シンポジウム. 宮崎市(2017.12)
- ⑥ 根本隆行, Hikmawan Wahyu Sulistomo, 武谷 立. 神経細胞におけるアクチン細胞骨格制御因子 Fhod3 の機能解析. 第70回日本薬理学会西南部会. 鹿児島市(2017.11)
- ⑦ 武谷 立, 牛島智基, 藤本智子, 松山翔, 神尾明君, 清成寛, 塩井 剛, 鹿毛陽子, 山崎晶, 住本英樹. マウス心臓の出生後発達と心機能維持におけるフォルミン蛋白質 Fhod3 の役割. 第69回日本細胞生物学会大会. 宮城県仙台市(2017.6)
- ⑧ 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. 宮崎市(2017.5)
- ⑨ 武谷 立, 牛島智基, 藤本智子, 神尾明君, 鹿毛陽子, 住本英樹. マウス心臓の発達と機能維持におけるフォルミン蛋白質 Fhod3 の役割. 第90回日本薬理学会年会. 長崎市(2017.3)
- ⑩ 根本隆行, Hikmawan Wahyu Sulistomo, 武谷 立. マウス脳におけるアクチン重合因子 Fhod3 の発現. 第90回日本薬理学会年会. 長崎市(2017.3)
- ⑪ 武谷 立, 牛島智基, 藤本智子, 神尾明君, 鹿毛陽子, 松山 翔, 住本英樹. フォルミン蛋白質 Fhod3 による心臓の構造と機能の維持. 2017 年生体運動研究合同班会議. 神戸市(2017.1)
- ⑫ 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. 宮崎市(2016.10)
- ⑬ Hikmawan Wahyu Sulistomo, Takayuki Nemoto, Yohko Kage, Ryu Takeya. Mammalian formin Fhod3 plays pivotal role in the brain development. 第9回トランスポーター研究会九州部会. 宮崎市(2016.10)
- ⑭ 武谷 立, 藤本智子, 神尾明君, 牛島智基, 鹿毛陽子, 住本英樹. マウス心筋サルコメアの形

- 成と維持におけるアクチン重合制御因子 Fhod3 の役割.第 69 回日本薬理学会西南部会.松山市(2016.11)
- ⑮根本隆行,Hikmawan Wahyu Sulistomo,武谷立.大脳皮質におけるフォルミン蛋白質 Fhod3 の発現解析.第 69 回日本薬理学会西南部会.松山市(2016.11)
- ⑯Ryu Takeya, Tomoki Ushijima, Noriko Fujimoto, Meikun Kan-o, Yohko Kage, Hideki Sumimoto.Role of the Actin Polymerization Factor Fhod3 in Development and Maintenance of the Heart. IGER International Symposium on “Now in actin study: Motor protein research reaching a new stage”.名古屋市(2016.12)
- ⑰牛島智基,藤本智子,神尾明君,鹿毛陽子,武谷立,住本英樹.マウス心発生および心機能維持における formin 蛋白質 Fhod3 の役割.第 39 回日本分子生物学会年会.横浜市(2016.11)
- ⑱武谷立,牛島智基,藤本智子,神尾明君,鹿毛陽子,松山 翔,住本英樹.心臓の発達と恒常性維持におけるアクチン重合機構の役割.2016 年度生理学研究所研究会.福岡市(2016.10)
- ⑲武谷立,藤本智子,牛島智基,松山 翔,鹿毛陽子.アクチン重合制御因子 Fhod3 による胎生期心筋サルコメアの形成制御.2016 年生体運動合同班会議.京都市(2016.1)
- ⑳藤本智子,牛島智基,神尾明君,武谷立,住本英樹.心筋サルコメア形成過程における formin 蛋白質 Fhod3 の局在と機能.第 38 回日本分子生物学会年会.第 88 回日本生化学会大会合同大会.神戸市(2015.12)
- ㉑武谷立.アクチン重合制御因子 Fhod の活性化と生理機能.第 39 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.別府市(2015.9)
- ㉒武谷立,神尾明君,藤本智子,牛島智基,住本英樹.心筋サルコメアの形成における formin 蛋白質 Fhod3 の役割.第 67 回日本細胞生物学会大会.東京都(2015.6)
- ㉓武谷立.細胞骨格による細胞の形態と機能の制御.平成 27 年度日耳鼻宮崎県地方部会年次総会学術講演会.宮崎市(2015.5)
- ㉔根本隆行,豊嶋典世,吉永砂織,柳田俊彦,丸田豊明,澤口 朗,武谷立.アルツハイマー病における脳由来インスリン発現低下メカニズム.第 88 回日本薬理学会年会.名古屋市(2015.3)
- ㉕藤本智子,神尾明君,武谷立,住本英樹.マウス心発生における formin 相同蛋白質 Fhod3 の役割.第 37 回日本分子生物学会年会.横浜市(2014.11)
- ㉖根本隆行,豊嶋典世,吉永砂織,丸田豊明,柳田俊彦,澤口 朗,武谷立.アミロイドβによる海馬ニューロンのインスリン発現低下メカニズム.第 67 回日本薬理学会西南部会.北九州市(2014.11)
- ㉗藤本智子,神尾明君,武谷立,住本英樹.

- 拡張型心筋症に関連する formin 蛋白質 Fhod3 の心筋サルコメア形成における役割.第 67 回日本胸部外科学会定期学術集会.福岡市(2014.9)
- ㉘武谷立.細胞骨格ダイナミクスから捉える心疾患の分子病態メカニズム.第 14 回宮崎心血管内分泌代謝研究会.宮崎市(2014.9)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 強心薬及び強心薬のスクリーニング方法  
 発明者: 武谷立, 松山 翔  
 権利者: 宮崎大学  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2017-97531  
 出願年月日: 平成 29 年 5 月 16 日  
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[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