九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Expression and Subcellular Localization of Mammalian Formin Fhod3 in the Embryonic and Adult Heart

神尾, 明君
九州大学医学系学府医学専攻循環器外科学分野・生化学分野

https://doi.org/10.15017/25188

出版情報：九州大学, 2012, 博士（医学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

哺乳類 formin 相同蛋白質 Fhod3 の
胎仔および成体心筋における
発現と細胞内局在

九州大学医学系学府医学専攻

循環器外科学分野・生化学分野

神尾明君

要旨

Formin ファミリー蛋白質は、FH2 ドメインを介してアクチン線維の重合に重要な役割を果たす。哺乳類 formin 相同蛋白質 Fhod3 は心臓に強く発現しており、成体の心臓における Fhod3 の mRNA は、非筋型の Fhod3 アイソフォームには存在しない 3 つのエクソン(エクソン 11、12、および 25)を含んでいる。新生仔培養心筋細胞では、Fhod3 はサルコメアの中央部に局在しサルコメア形成に関与すると考えられているが、成体の心臓では異なる局在を示す可能性も報告されている。本研究では、それぞれ Fhod3 の異なる領域を認識する 3 種類の抗体を用いて免疫蛍光染色法を行い、Fhod3 が胎仔および成体いずれの心臓においてもサルコメアの中央部に近接した 2 本のバンドとして局在することを示した。これらのバンドは M 帯(サルコメアの中央部でミオシン線維を架橋する)に隣接するが、Z 帯(サルコメアの境界を形成する)からは離れており、これは培養心筋細胞で観察された局在と同様であった。免疫蛍光染色法と免疫電顕法を用いた詳細な解析により、Fhod3 はアクチン線維の矢尻端ではなく、より辺縁の、アクチン線維とミオシン線維が重なり合う領域に局在している事が明らかになった。さらに、マウス胎仔心臓でも上記 3 つのオルタナティヴエクソンを含む Fhod3 の mRNA アイソフォームが特異的に発現していること、また Fhod3 のサルコメアでの特徴的な局在にはエクソン 11,12 が不可欠である一方、エクソン 25 によってコードされる領域はこの局在に必要でないことが判明した。さらに、エクソン 25 によってコードされる領域は触媒活性を持つ FH2 ドメイン内に存在しているにも関わらず、in vivo および in vitro のいずれにおいても Fhod3 のアクチン重合活性に必須でないと考えられた。

背景

横紋筋の収縮単位であるサルコメアは、アクチンからなる thin filament とミオシンからなる thick filament の正確で調和のとれた配列と統合から生み出される (1)。アクチン繊維の長さは一定であり、サルコメアαアクチニンによってその反矢じり端が Z 帯に固定されている。Z 帯はサルコメアの境界線を形成する。アクチン線維の矢じり端はトロポモデュリン(Tmod)によってキャッピングされており、ミオシン線維(サルコメア中央部の M 帯で架橋されており、ミオシン線維を含む領域は明帯として知られている)の格子構造に滑り込む。この非常に整然と並んだアクチン線維は従来考えられていたような静的なものであなく、サルコメアの形成と維持の過程において動的に形成されている(2-4)。しかし、サルコメアにおけるアクチン線維形成およびターンオーバーの詳細な機構は未だ不明である(5)。近年、いくつかのアクチン関連蛋白質がサルコメア形成におけるアクチン動態の主要な制御因子として報告されている。例えば、心筋細胞における Tmod 関連タンパク質ライオモディン(6)や、横紋筋における巨大なアクチン結合タンパク質ネブリンなどである(7)。FH2 ドメインを介してアクチン線維重合を制御する formin タンパク質(8,9)の一員である Fhod3 もまた、サルコメアにおけるもう一つの主要なアクチン動態制御因子の候補と考えられており、培養心筋細胞において Fhod3 を欠失させると、サルコメア形成が見られなくなることが分かっている(10)。

マウスの FHOD3 遺伝子は 28 個のエクソンを含んでいる(図 1 参照)。これまでに報告されている通り(11)、エクソン 11 およびエクソン 12 は心臓で発現する Fhod3 の mRNA には存在しているが、腎臓と脳で発現する mRNA ではスプライシングにより存在しない。最近 Iskratsch らは、成体の心臓および骨格筋で発現する Fhod3 の mRNA にはさらに別のエクソンであるエクソン 25 が含まれることを報告した(12)。この横紋筋に特異的なエクソンは酸性残基が豊富な 8 つのアミノ酸配列をコードしており(T(D/E)$_5$XE と呼ばれる)、FH2 ドメイン内で C 末端側の終末に存在している。これらのエクソンの有無が心臓の発達段階によって異なるかどうかは明らかではない。

これまでに、私の所属するグループによる、ラット新生仔培養心筋細胞を用いた実験では、Fhod3 はサルコメアの中央部に M 帯によって隔てられた２本のバンドとして局在

しており、これらのバンドはZ帯寄りではなく、M帯に近いという結果が出ている(10)。この特徴的なFhod3のサルコメアでの局在は最近、また別のグループにより同一の細胞を用いて確認されている(12)。エクソン11とエクソン12によりコードされたN末端側の領域を欠くFhod3のアイソフォームを外因性に培養心筋細胞に発現させた場合、サルコメアに局在できないことから、この領域はFhod3の局在に重要な役割を果たすと考えられている(10)。一方、新規に単離された心筋細胞のサルコメアは、in vitro での培養過程において一度壊れてから再構築あるいは新規に構築される(4,13)ため、培養心筋細胞でのFhod3の局在は本来の局在を反映していない可能性もある。最近のIskratschらの報告によれば、培養心筋細胞でのFhod3の局在とは対照的に、成体の心臓ではFhod3はサルコメアの中央部ではなく、主にZ帯に局在するとしている(12)。

今回の研究では、マウス胎仔および成獣の心臓、また成人の心臓から作成した組織切片において、培養心筋細胞と同様に、3種類の独立した抗Fhod3抗体が全てFhod3をサルコメア中央部に2本のバンドとして認識することを示した。Tmod と Fhod3 の共染色および免疫電顕法による詳細な検討により、Fhod3はアクチン線維の矢じり端ではなく、より辺縁の、アクチン線維とミオシン線維が重なり合う領域に存在することが明らかになった。マウス胎仔心臓におけるFhod3のmRNAも成獣と同様にエクソン11、エクソン12、およびエクソン25を含むこと、またFhod3のサルコメアでの特徴的な局在にはエクソン 11,12 が不可欠である一方、この局在はエクソン 25 によってコードされる$T(D/E)_5XE$領域には依存しないことも判明した。さらに、エクソン25によってコードされる領域は触媒活性を持つFH2ドメイン内に存在しているにも関わらず、Fhod3のアクチン重合活性に必須でないと考えられた。

結果

マウス胎仔におけるFhod3アイソフォームの発現

胎仔心臓で発現しているFhod3のアイソフォームを調べるため、まずFhod3のmRNAにエクソン25が含まれているかどうか、特異的なプライマー(図1Bおよび1C)によるRT-PCRを胎生17.5日のマウス胎仔の様々な組織から得られたRNAを用いて行った(図1D)。エクソン25の存在はRT-PCR産物をサブクローニングし、シークエンスを解析することにより確認した(表1)。エクソン25を含むFhod3のmRNAは心臓で強く、骨格筋で弱く発現しており、一方、脳および腎臓から得られたFhod３のmRNAにはエクソン25は含まれていなかった(図1D)。続いて、Fhod3のmRNAにおけるエクソン11とエクソン12のオルタナティヴスプライシングについて検討するため、エクソン11〜12を挟む2

つのプライマー(図 1B)による RT-PCR をマウス胎仔組織から得られた RNA を用いて行った。図 1E に示した通り、エクソン 11 とエクソン 12 は脳および腎臓における Fhod3 の mRNA からはスプライスアウトされており、一方で心臓ではこれら 2 つのエクソンは保たれていた。同様の組織特異的な Fhod3 の mRNA のスプライシングは、マウス成獣でも見られることが分かっている(11,12)。以上より、胎仔心臓でも成獣心臓と同様に、発現している Fhod3 のほとんど全てが、これら 3 つのオルタナティヴエクソン(エクソン 11、12、および 25)を含むアイソフォームであると考えられた。

胎仔心臓における Fhod3 の局在

胎仔心臓での Fhod3 の局在を調べるため、まず、マウス胎仔心臓から単離した培養心筋細胞を用いて、抗 Fhod3(650-802)抗体による免疫蛍光染色を行った。図 2A および B に示す通り、Fhod3 はサルコメア内に 2 本の近接したバンドとして局在していた(サルコメアの境界はαアクチニンにより標識された Z 帯である)。つまり、マウス胎仔心筋細胞における Fhod3 の局在は、ラット新生仔心筋細胞において観察された局在と同一であった(10)。さらに、このサルコメアにおける Fhod3 の特徴的な局在は、胎仔心臓の凍結切片においても、抗 Fhod3(C-20)抗体を用いて観察された(図 2C)。基本的に同様の結果が、その他 2 つの異なる抗体、抗 Fhod3(650-802)および抗 Fhod3(873-974)を用いても得られた。以上より、Fhod3 はマウス胎仔心臓においてサルコメア内に 2 本のバンドとして局在すると考えられた。

成体心臓における Fhod3 の局在

成体心臓のサルコメアにおける Fhod3 の本来の局在を明らかにするため、マウス成獣の心臓より得られたグリセリン心筋を用い、抗 Fhod3(650-802)抗体にて免疫染色を行った(図 3A)。シグナルは弱いものの、グリセリン心筋にて Fhod3 はサルコメア内に局在していることが示された。また、マウス成獣の心臓凍結切片における Fhod3 の局在を調べたところ、図 3B に示す通り、抗 Fhod3(650-802)抗体および抗 Fhod3(873-974)抗体は、サルコメア内に 2 本のバンドとして局在した。この Fhod3 の局在は、胎仔心臓におけるもの(図 2)と根本的に同じであった。抗 Fhod3(C-20)抗体を使用した場合は、かなりの割合で Z 帯への局在が見られた(図 S1)が、この Z 帯へのシグナルは、Fhod3 ノックアウトマウス(論文投稿中)から得られたマウス胎児線維芽細胞のアセトンパウダーで吸着を行うことにより、選択的な減弱が認められた(図 3B 下)。この観察結果により、吸着処理を行わない抗 Fhod3(C-20)抗体は、Z 帯の構成成分と交叉反応を起こす抗体を一部含んでいる事が示唆された。これらの事より、Fhod3 はマウス成獣の心臓において、

Z 帯ではなく主にサルコメアの中央部に局在すると結論づけられた。

さらに、成人心臓における Fhod3 の局在を抗 Fhod3(650-802)抗体を用いて検討するため、非心筋症(重度大動脈弁狭窄症)患者の手術時に得られた左室心筋組織より凍結切片を作成した。この切片において、Fhod3 はサルコメア(抗αアクチニン抗体で標識された Z 帯がその境界である)内に 2 本のバンドとして局在していた(図 3)。よって成人心臓においても、Fhod3 はマウス心臓におけるものと同様の局在様式を示すと考えられた。さらに、Fhod3 の局在を特発性拡張型心筋症および特発性肥大型心筋症の心臓においても検討した。図 3D に示す通り、基本的な Fhod3 の局在様式はこれら心筋症の心臓においても保たれていた。

T(D/E)$_5$XE 領域の Fhod3 局在における役割

ラット新生仔由来の培養心筋細胞に、T(D/E)$_5$XE 領域をコードするエクソン 25 以外の全てのエクソンを含む Fhod3 の mRNA を外因性に発現させると、この mRNA により発現する Fhod3 は、サルコメア内に内因性の心筋型 Fhod3(T(D/E)$_5$XE 領域を含む)と同様の局在を示す(10)。このことは、T(D/E)$_5$XE 領域が Fhod3 の局在に必須ではないことを示唆する。一方、ラット新生仔心筋細胞に T(D/E)$_5$XE 領域を欠失した Fhod3 を外因性に発現させると、大部分の Fhod3 が細胞質で凝集してしまうという報告もある(12)(ただ、その一部は内因性の心筋型 Fhod3 と同様にサルコメア中央部に局在しているようである)。今回、本来の Fhod3 の局在における T(D/E)$_5$XE 領域の役割を明らかにするため、αMHC プロモーターの下流で心臓特異的に T(D/E)$_5$XE 領域を欠失する Fhod3 を発現するトランスジェニックマウスを作成した(図 S2)。3 種類の異なる抗 Fhod3 抗体による免疫組織化学染色により、外因性に発現させた T(D/E)$_5$XE 領域を欠失する Fhod3 は、成獣の心臓でサルコメアの中央部に互いに近接した２本のバンドとして局在することが分かった(図 4A)。この局在は、T(D/E)$_5$XE 領域を含む内因性の心筋型 Fhod3 の本来の局在(図 3)と根本的に同一であり、T(D/E)$_5$XE 領域は Fhod3 のサルコメアにおける本来の局在に必須ではないことが示唆された。

抗 Fhod3 抗体によって標識された２本のバンドは、サルコメアαアクチニンにより標識された Z 帯からは十分に離れている(図 4A)一方で、ミオメシンで標識された M 帯には近接していた(図 4B)。Fhod3 はアクチン線維の矢じり端のキャッピング分子である Tmod が存在する領域付近に局在するが(図 4C)、サルコメアの長軸方向で蛍光強度をラインスキャンしてグラフ化すると、Tmod の 2 本のバンドは、Fhod3 の 2 本のバンドと比較してより近接(すなわち、より Z 帯から遠い)していることが分かった(図 4D)。実際、Z 帯のマーカーであるαアクチニンから Fhod3 までの距離(0.81 ± 0.10 μm)は有意に

αアクチニンからTmodまでの距離(0.96 ± 0.09 μm)よりも短かった。また、Fhod3とTmodの共染色により、Fhod3はアクチン線維の矢じり端のキャッピング分子であるTmodとは共局在しないことが確認された(図4F)。これらの所見より、Fhod3はアクチン線維の矢じり端ではなく、アクチン線維とミオシン線維が重なり合う領域に局在することが示された。

さらに、Fhod3トランスジェニックマウスの心臓から作成した組織切片を用いて免疫電顕を行い、Fhod3のサルコメアにおける超微細構造的な局在について検討した。図4Gに示す通り、抗 Fhod3(650-802)抗体に会合した金コロイドは、サルコメアの中央部でミオシン線維が含まれる暗帯に集積していた。この結果は、Fhod3がアクチン線維とミオシン線維が重なり合う領域に存在するという説を支持するものと考えられた。

Fhod3による in vivo および in vitro でのアクチン重合に対する $T(D/E)_5XE$ 領域の役割

FH2ドメイン内にある $T(D/E)_5XE$ 領域の機能を明らかにするため、Fhod3タンパク質の $T(D/E)_5XE$ 領域の有無によるアクチン重合活性を比較することにした。N末端側を削ったFhod3(Fhod3-ΔN)は、Hela細胞に発現させると恒常的な活性化型として機能し、アクチンストレスファイバーの形成を促すことが知られている(10)。図5Aに示す通り、$T(D/E)_5XE$ 領域を含むFhod3-ΔNと $T(D/E)_5XE$ 領域を含まないFhod3-ΔNは、Hela細胞におけるストレスファイバー形成に同等の活性を示したため、この領域はin vivoでのアクチン重合活性に必須ではないと考えられた。これは、$T(D/E)_5XE$ 領域はFhod3の細胞内でのアクチン重合活性に影響を与えないとする、細胞内でのアクチン線維の定量から得られた、最近の報告とよく合致する(12)。さらに、in vitro でのアクチン重合能を、精製したFhod3タンパク質を用いて検討した(図5B)。in vitroでのアクチン重合実験において、以前の研究で示されている通り(10)、$T(D/E)_5XE$ 領域を欠く Fhod3-ΔNはアクチンの自発的な重合を阻害した(図 5C)。同じ条件下で、$T(D/E)_5XE$ 領域を含むFhod3-ΔN のアクチン重合に対する効果はほぼ同じであった(図 5C)。一方、$T(D/E)_5XE$ 領域の有無に関わらず、I1127Aのアミノ酸残基置換を含むFhod3-ΔN(この変異によりアクチン結合能が失われる(10))はストレスファイバー形成を誘導しなかった(図 5A)。この変異体は in vitro でのアクチン重合に対する効果も失っていた(図 5C)。よって、FH2ドメイン内に存在する $T(D/E)_5XE$ 領域は、in vivoとin vitroのいずれにおいても、Fhod3のアクチン重合活性に必要ではないと考えられた。

考察

今回の研究により、3 つのオルタナティヴエクソン(エクソン 11、12、および 25)によりコードされる領域を含む心筋型の FHod3 は、発達段階にある胎仔の心臓と成熟した成体の心臓のいずれにおいても、主にサルコメアの中央部に 2 本の近接したバンドとして局在する事が示された。Fhod3 のバンドは Z 帯ではなく、むしろ M 帯に接して存在していた(図 2-4)。詳細な免疫組織化学的検査と免疫電顕により、サルコメアにおいて、Fhod3 はアクチン線維の矢じり端ではなく、より辺縁の領域、アクチン線維とミオシン線維が重なり合う領域に局在していることが判明した(図 4)。この Fhod3 のサルコメアにおける特徴的な局在に関して、エクソン 11 とエクソン 12 の不可欠な役割と対照的に、エクソン 25 によりコードされる $T(D/E)_5XE$ 領域は必要ではないと考えられた。$T(D/E)_5XE$ 領域はまた、触媒活性のある FH2 ドメイン内に存在しているにも関わらず、in vivo と in vitro のいずれにおいても、Fhod3 のアクチン重合活性に必須ではないと考えられた(図 5)。

本研究とは対照的に、Iskratsch らによる報告では、Fhod3 は成体の心臓では Z 帯および介在板に局在するとしている(12)。今のところ、この結果の違いの原因は不明であるが、使用した抗 Fhod3 抗体の違いによるものかもしれない。Iskratsch らは Fhod3 の N 末領域(アミノ酸番号 1-339)を抗原とするポリクローナル抗体をアフィニティー精製したものを用いて心臓の Fhod3 を染色している(12)。一方、本研究ではそれぞれアミノ酸番号６５０－８０２、873-974、1,567-1,586 を抗原として作製した３種類の異なるポリクローナル抗体(抗 Fhod3(650-802)抗体、抗 Fhod3(873-974)抗体、抗 Fhod3(C-20)抗体)をアフィニティー精製して使用した。場合によっては、交差反応する抗体を完全に除去するため、アフィニティー精製した抗 Fhod3(C-20)抗体に対して、さらに Fhod3 を欠失する細胞から調製したアセトンパウダーを用いて吸着処理を行った。この処理により、成体心臓のサルコメアにおける Fhod３の局在が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重なり合う領域であることが鮮明となった。これら 2 つの報告の不一致はまた、固定法の違いによるものである可能性もある。Iskratsch らは、凍結切片を冷却アセトンに浸漬することにより固定している(12)が、本研究ではサルコメアの微細構造を保つため、3.7%ホルムアルデヒドの還流固定により組織切片を作製した。さらに、Fhod3 の局在がサルコメアの発達段階に依存して変化する可能性も否定できない。このような現象は、ショウジョウバエの幼虫の体幹の筋肉および成虫の間接飛翔筋における SALS で報告されており、SALS はアクチン線維が伸長している間は矢じり端に局在しているが、最大長まで伸長したアクチン線維の矢じり端からは消失し Z 帯を

挟む別の領域に局在している可能性がある(14)。現在のところ Fhod3 の局在が心臓で変化するという証拠は得られていないが、本研究ではサルコメアの伸長段階での Fhod３の局在に関しては検討を行っていない。

今回の研究で示された通り、エクソン 25 によりコードされる $T(D/E)_5XE$ 領域は、培養心筋細胞だけでなく Fhod3 トランスジェニックマウスの心臓においても、サルコメアでの Fhod3 の特徴的な局在に必要ではなかった。一方で、ラット新生仔心筋細胞において、外因性に発現させた $T(D/E)_5XE$ 領域を欠失した Fhod3 の大部分は細胞質で凝集してしまう(ただ、外因性の Fhod3 の一部は、内因性の心筋型 Fhod3 と同様にサルコメア中央部に局在しているようであるが)という報告もある(12)。$T(D/E)_5XE$ 領域を含む Fhod3 と比較して、$T(D/E)_5XE$ 領域を含まない Fhod3 のアイソフォームは不安定でありながら通常のタンパク質分解経路に乗らないため、特に外因性に高いレベルで発現させた場合に細胞質に凝集する可能性があり得る。$T(D/E)_5XE$ 領域のスレオニン残基はカゼインキナーゼ 2 によりリン酸化されることが示されており、このリン酸化によりオートファゴゾームに移送される Fhod3 の凝集塊の形成が抑制されるという報告がある(12)。

心臓のサルコメアにおいて、Fhod3 はアクチン線維のいずれの端にも局在せず、アクチン線維とミオシン線維が重なり合う領域に局在していた。一方、Fhod3 は他の formin ファミリータンパク質と同様に、FH2 ドメインがアクチン線維の矢じり端に作用することによってアクチン線維の重合を制御すると考えられている(10)。このこととサルコメアにおける Fhod3 の特徴的な局在との機能的な関連は現在のところ不明であり、今後の研究で明らかにしていく必要がある。

実験方法

倫理的声明

ヒトの試料を使用する実験は、ヘルシンキ宣言に基づき、九州大学臨床研究倫理審査委員会の承認を経て行った(承認番号:22-170)。全ての患者に対し、紙媒体による説明と同意取得を行った。全てのマウスを使用する実験は、動物事件の適正な実施に向けたガイドライン(日本学術会議)を厳格に遵守して行った。実験プロトコールは九州大学動物実験委員会の承認を得た(承認番号:A22-005-1)。使用する動物の数と苦痛の軽減に最大限の努力を行った。

プラスミド

エクソン 25 以外の全てのエクソンを含む 1,578 アミノ酸よりなるマウス Fhod3(引用

文献(11)では Fhod2L と命名)をコードする cDNA 断片は、過去に述べられている(11)ように作製した。28 個全てのエクソンを含む 1,586 アミノ酸からなるマウス Fhod3 をコードする cDNA 断片は、RT-PCR によりクローニングした。N 末端の 930 アミノ酸を欠く Fhod3-ΔN の cDNA 断片は、マウス Fhod3 の cDNA 断片(エクソン 25 有りまたは無し)から PCR により作製した。mDia1-FH1FH2(549-1,175)の cDNA 断片は過去に報告されているように作製した(10)。アミノ酸残基置換による変異体は、変異箇所に指向した PCR を行うことにより作製した。cDNA 断片は pEGFP-C1(Clontech)ベクターに組み込んで HeLa 細胞にて N 末 GFP のタグ付き蛋白質として発現させるか、または pEF-BOS ベクターに組み込んで HEK-293F 細胞に N 末 FLAG タグ付き蛋白質として発現させた。全てのコンストラクトのシークエンスを読んで配列が正しい事を確認した。

抗体

Fhod3 特異的なラビットのポリクローナル抗体(抗 Fhod3(650-802)抗体、抗 Fhod3(873-974)抗体、抗 Fhod3(C-20)抗体)は、過去の報告通りに調製した(11)。簡潔に述べると、抗 Fhod3(650-802)抗体および抗 Fhod3(873-974)抗体はそれぞれアミノ酸番号 650-802 または 873-974 からなる GST 融合蛋白質を抗原として作製し、抗 Fhod3(C-20)抗体は Fhod3 の C 末端 20 アミノ酸(1,567-1,586)に対応する合成ペプチドを抗原として作製した。これらの抗体は、それぞれ前述の抗原部位に対応した MBP 融合蛋白質または合成ペプチドをカップリングさせた HiTrap-NHS カラム(Amersham)によりアフィニティー精製を行った。マウス成獣の心臓から作製した組織切片を染色する際、抗 Fhod3(C-20)抗体に対しては、Fhod3 ノックアウトマウス(Acc. No. CDB0598K: http://www.cdb.riken.jp/arg/mutant%20mice%20list.html)から得られたマウス胎仔線維芽細胞のアセトンパウダーを用いて吸着を行った。Fhod3 ノックアウトマウスの詳細に関しては今後発表する予定である。この吸着操作を行わなかった抗 Fhod3(C-20)抗体による免疫蛍光染色の結果を図 S1 に示した。抗 Fhod3(650-802)抗体の特異性については、Fhod3 ノックアウトおよびヘテロの胎生 10.5 日マウス胎児から得られた心臓組織の溶解液(蛋白質 5μg)を用いたウエスタンブロットで確認した(図 S3)。αアクチニンに対するマウスモノクローナル抗体(clone EA-53)は Sigma-Aldrich 社から、ミオメシン-1 に対するヤギポリクローナル抗体(C-16)は Santa Cruz 社から、Tmod1 に対するラビットポリクローナル抗体は ProteinTech Group 社から、Tmod1 に対するマウスポリクローナル抗体は Abnova 社から、Alexa Fluor488 または 594 標識の抗マウス IgG、抗ラビット IgG、抗ヤギ IgG 蛍光二次抗体は Invitrogen 社から、Alexa Fluor555 標識の $F(ab')_2$ 断片抗ラビット IgG 抗体は Cell Signaling Technology 社より、それぞれ購入した。

RT-PCR 解析

Fhod3 の mRNA の発現は、成獣(3 週齢)または胎仔(胎生 17.5 日)の C57BL/6 マウスの組織より TRIzol 試薬(Invitrogen)により抽出した total RNA を用いて、RT-PCR で確認した。プライマーは、報告されているマウスの配列に基づいて設計した(11,12)。エクソン 25 の検出のため、S6:5'-GGGAAGATGATCACTGACTCT-3'(エクソン 25 を欠く Fhod3 の mRNA に特異的なフォワードプライマー)、S7:5'-GACGAGGATGAAGCTGAGTCT-3'(エクソン 25 を含む Fhod3 の mRNA に特異的なフォワードプライマー)、S8: 5'-AGAGGGAAGATGATCACTGAC-3'(両方のアイソフォームに共通のフォワードプライマー)、RV3: 5'-ATCAGTGACACTAGGTGACTC-3'(両方のアイソフォームに共通のリバースプライマー)、の 4 つのプライマーを用いた。PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動した。エクソン 25 のシークエンス解析のため、2 種類のプライマー 5'-cagggatccGTGGAAAACTTTCCGGACAGC-3、5'-cgtgaattcACATGTTCTCATGTTCGGCTGC-3'(cDNA 由来の配列を大文字で示した)を用いて増幅した PCR 産物を pEF-BOS ベクター(15)にサブクローニングした。臓器ごとに 10 以上の異なる挿入配列のシークエンスを確認した。エクソン 11 およびエクソン 12 の検出のため、フォワードプライマー 5'-cagggatccGTCAAACCCTGGTCCAACATC-3'、リバースプライマー 5'-gaactcgagtcaCCTGAACGAGGATGTGAGAAG-3'を用いて PCR を行った(cDNA 由来の配列を大文字で示した(11)。

マウス

αMHC プロモーター(16)の下流でエクソン 25 以外の全てのエクソンを含む Fhod3 を発現するトランスジェニックマウスを、C57BL/6 系統を背景として作製した。6 つの異なる生殖ラインが得られ、それぞれ心臓にて異なる Fhod3 の発現レベルを示したが、若齢期の死亡、その他の異常は認められなかった。これらのラインのうち、最も少ない Fhod3 タンパク質の発現を示す(図 S2)ライン#4 の hemyzigotes を免疫蛍光染色に使用し、最も多い Fhod３タンパク質の発現を示すライン#6 の hemyzigotes を免疫電顕に使用した。全てのマウスは九州大学の SPF 施設にて飼育した。マウスを使用する全ての手法は、動物事件の適正な実施に向けたガイドライン(日本学術会議)を厳格に遵守して行った。実験プロトコールは九州大学動物実験委員会の承認を得た(承認番号:A22-005-1)。使用する動物の数と苦痛の軽減に最大限の努力を行った。

ヒト組織切片の作製

肥大したヒト左室心筋組織は、重度の大動脈弁狭窄症により心不全に陥った患者の手術時に採取した。心筋症の左室心筋組織は、２名の特発性拡張型心筋症および特発性肥大型心筋症の患者の手術時に採取した。心筋組織の、明らかな線維化のない部分を用いて免疫蛍光染色を行った。ヒトの組織を用いた解析は、ヘルシンキ宣言に基づき、九州大学臨床研究倫理審査委員会の承認を経て行った(承認番号:22-170)。全ての患者に対し、紙媒体による説明と同意取得を行った。切除したヒト心筋組織片は液体窒素で冷却しておいたイソペンタン中で凍結した。凍結切片(厚さ 5μm)を 3.7%ホルムアルデヒドで固定し、免疫蛍光染色を行った。

マウス組織切片の作製

3～4 週齢の C57BL/6 マウスおよびトランスジェニックマウスをペントバルビタール(50mg/Kg)の腹腔内投与により深麻酔とした。心臓を露出し、5ml の PEM バッファー(1 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$, 100 mM PIPES, pH6.9)に 20 mM KCl を添加したものを左心室より注入し、その後 10 ml の 3.7%ホルムアルデヒドを含有する PBS(137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, 1.47 mM KH_2PO_4, pH 7.4)を注入した。選択的に冠循環を潅流するため、潅流前に上行大動脈を血管鉗子で遮断し、右心房を切開しておいた。胎仔の切片作製に関しては、計画妊娠を行った母マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、胎生 15.5～16.5 日の胎仔を子宮から摘出し、低体温による麻酔(17)を行った。実体顕微鏡のもとで胎仔の心臓を露出した。上行大動脈を遮断し、右心房を切開したのち、キャピラリーチューブを用いて 20mM KCl を含む PEM バッファーを 1 ml 注入し、続いて 3.7%ホルムアルデヒド 3ml で潅流した。固定された心臓をマウスより摘出し、細片に切り分け、同じ固定液に 4℃で 90 分間浸漬した。その後、心臓組織を PBS で洗浄し、30%スクロースに浸し４℃にて一晩脱水を行い、OCT コンパウンド(Sakura)に包埋した。このブロックを-80℃で凍結し、クライオスタット(Thermo Scientific HM550)を用いて 5μm の厚さで切片を作製した。切片は風乾し、染色するまで-80℃に保存しておいた。

マウス胎仔心筋細胞の初代培養

Goshima による方法(18)に若干の変更を加え、C57BL/6 マウスの胎仔心臓より、心筋細胞の初代培養を行った。簡略に述べると、胎生 14.5～15.5 日のマウス胎仔より心臓を摘出し細片化したのち、コラゲナーゼ typeⅡ(300 単位/ml, Worthington CLS2)による 10 分間の消化を 37℃で 3 回行った。非筋細胞を除くため、得られた細胞を 10%ウシ胎仔血清入り DMEM 培地を用いて 90mm 培養皿にて 70 分間培養した。接着しなかった細胞

を回収し、10%ウシ胎仔血清入り DMEM 培地にて培養した。

免疫蛍光染色

切片を 0.1% Triton X-100 入りの PBS で洗浄し、ブロッキングバッファー(3%ウシ血清アルブミンおよび 2%ヤギ血清を含む PBS)により室温で 2 時間ブロッキングした。0.1% Triton X-100 入りのブロッキングバッファーで希釈した一次抗体を 4℃で一晩反応させ、0.1% Triton X-100 を含む PBS で洗浄したのち、蛍光色素標識二次抗体を 37℃で 1 時間反応させた。F-アクチンを染色する場合は、この際 Alexa-647-phalloidin(Invitrogen)も混ぜた。組織切片で Fhod3 を染色する際は、抗ラビット IgG 抗体の $F(ab')_2$ 部分を使用した。培養心筋細胞は 3.7%ホルムアルデヒドで固定し、過去の報告通りに染色した(10)。図 2C、図 3B、図 3C、図 4(A-D)は LSM510 共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss MicroImaging)を用いて画像取得し、図 2A、図 2B、図 3A、図 5A は Axiocam HRm camera(Carl Zeiss MicroImaging)を取り付けた Axiovert 200 顕微鏡(Carl Zeiss MicroImaging)にて画像取得した。

免疫電顕

超薄切片の免疫電顕法は、Tokuyasu の方法(19)に若干の変更を加えて行った。簡潔に述べると、Fhod3 を発現するトランスジェニックマウスの心臓を還流固定し細片に切り分け、4%パラホルムアルデヒドと 0.4%グルタールアルデヒドを含有する 0.1M カコジル酸バッファーに 4℃で 60 分間浸漬した。PBS で洗浄したのち、組織を 2.3M スクロースに 4℃で一晩漬けて氷晶形成を予防し、液体窒素中で凍結した。超薄切片(厚さ 100 nm)を Leica EM UC7/FC7 を用いて作製し、切片を 100 mesh formvar/carbon-coated のニッケルグリッドに載せた。洗浄の後、グリッドを 3%ウシ血清+2%ヤギ血清でブロッキングし、抗 Fhod3(650-802)抗体と一晩反応させ、続いて 10 nm の金コロイド標識抗ラビット IgG 抗体(EY lab)と 2 時間反応させた。洗浄し、グリッドを 2.5%グルタールアルデヒドで後固定し、2%ポリビニルアルコールと 0.2%ウラニル酢酸を混合したものに包埋した。切片は Tecnai-20 透過型電子顕微鏡(FEI Corp.)を用いて観察し、画像は Eagle 2k HR デジタルカメラ(FEI Corp.)により取得した。一次抗体による標識が特異的であることは、一次抗体を加えなかったコントロール実験により確認した。

In Vivo でのアクチン重合実験

Hela 細胞に対して Lipofectamine(Invitrogen)を用いて、Fhod3-ΔN(wt)(アミノ酸番号 931-1,586)の $T(D/E)_5XE$ 領域を含むものと含まないもの、また Fhod3-ΔN(I1127A)の

$(D/E)_5XE$ 領域を含むものと含まないものを遺伝子導入し、3 時間培養した。10%ウシ胎仔血清入り DMEM 培地を加えたのち、さらに 13 時間培養した。PBS で洗浄し、細胞を 3.7%ホルムアルデヒドで 15 分間固定し、0.1% Triton X-100 を含む PBS で 4 分間透過処理、3%ウシ血清アルブミンを含む PBS で 60 分間固定した。F-アクチンの染色に関しては、Texas Red-X phalloidin(Invitrogen)を使用した。画像は Axiocam HRm camera(Carl Zeiss MicroImaging)を取り付けた Axiovert 200 顕微鏡(Carl Zeiss MicroImaging)を用いて取得した。

In vitro でのアクチン重合実験

アクチン重合実験に用いる Fhod3 および mDia1 タンパク質は過去の報告通りに調製した(10)。簡潔に述べると、FreeStyle HEK-293F 細胞(Invitrogen)に Fhod3 または mDia1 の cDNA を組み込んだ発現ベクターを遺伝子導入した。遺伝子導入された細胞を lysis バッファーで破壊し、溶解液を抗 FLAG 抗体(M2)付きのアガロース(Sigma-Aldrich)で沈降させた。タンパク質を FLAG-peptide(200μg/ml)入り X バッファー(2 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 0.1 mM $CaCl_2$, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, and 10 mM Hepes, pH 7.9)で溶出し、下記のごとくアクチン重合実験に使用した。ヒトのプロフィリン I はグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質として大腸菌に発現させ、グルタチオン-セファロース 4B(GE Healthcare)で精製し、PreScission プロテアーゼ(GE Healthcare)で切断した。ピレン-アクチン重合実験は X バッファー中で以前の報告通りに行った(10)。簡潔に述べると、G-アクチン(10%がピレン標識)を G バッファー(0.2 mM $CaCl_2$, 0.2 mM ATP, 0.2 mM DTT, and 5 mM Tris-HCl, pH 8.0)中で調製した。重合反応は、2μM アクチン(10%がピレン標識)、2μM プロフィリン I、50nM Fhod3-ΔN または mDia1-FH1FH2(アミノ酸番号 549-1,175)を含む 100μl の X バッファー中で行った。アクチン以外の全ての反応物をあらかじめ X バッファー中で混ぜ合わせておき、アクチンを添加することにより反応を開始させた。蛍光強度の変化(励起波長 365nm、蛍光波長 407nm)をマルチプレートリーダー EnSpire (Perkin Elmer)で測定した。

ウエスタンブロット解析

ウエスタンブロット解析は過去に報告されている通りに行った(10,11)。簡潔に述べると、マウスの心臓を 4℃のプロテアーゼインヒビターを含む(Sigma-Aldrich)lysis バッファー(10% glycerol, 135 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 20 mM Hepes, pH 7.4)中でホモジナイズし、超音波破砕した。溶解液を SDS-PAGE にかけ、polyvinylidene difluoride membrane (Millipore)にトランスファーした。メンブレンを抗 Fhod3(C-20)抗体で標識

し、ECL-plus (GE Healthcare)で発光させ、可視化した。

引用文献

1. Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. (2002) Striated muscle cytoarchitecture: An intricate web of form and function. Annu Rev Cell Dev Biol 18: 637–706.
2. Littlefield RS, Fowler VM. (2008) Thin filament length regulation in striated muscle sarcomeres: Pointed-end dynamics go beyond a nebulin ruler. Semin Cell Dev Biol 19: 511–519.
3. Sparrow JC, Schöck F. (2009) The initial steps of myofibril assembly: Integrins pave the way. Nat Rev Mol Cell Biol 10: 293–298.
4. Sanger JW, Wang J, Fan Y, White J, Sanger JM. (2010) Assembly and dynamics of myofibrils. J Biomed Biotechnol 2010: 858606.
5. Ono S. (2010) Dynamic regulation of sarcomeric actin filaments in striated muscle. Cytoskeleton (Hoboken) 67: 677–692.
6. Chereau D, Boczkowska M, Skwarek-Maruszewska A, Fujiwara I, Hayes DB, et al. (2008) Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells. Science 320: 239–243.
7. Takano K, Watanabe-Takano H, Suetsugu S, Kurita S, Tsujita K, et al. (2010) Nebulin and N-WASP cooperate to cause IGF-1-induced sarcomeric actin filament formation. Science 330: 1536–1540.
8. Chesarone MA, DuPage AG, Goode BL. (2010) Unleashing formins to remodel the

actin and microtubule cytoskeletons. Nat Rev Mol Cell Biol 11: 62–74.

9. Campellone KG, Welch MD. (2010) A nucleator arms race: Cellular control of actin assembly. Nat Rev Mol Cell Biol 11: 237–251.
10. Taniguchi K, Takeya R, Suetsugu S, Kan-o M, Narusawa M, et al. (2009) Mammalian formin Fhod3 regulates actin assembly and sarcomere organization in striated muscles. J Biol Chem 284: 29873–29881.
11. Kanaya H, Takeya R, Takeuchi K, Watanabe N, Jing N, et al. (2005) Fhos2, a novel formin-related actin-organizing protein, probably associates with the nestin intermediate filament. Genes Cells 10: 665–678.
12. Iskratsch T, Lange S, Dwyer J, Kho AL, dos Remedios C, et al. (2010) Formin follows function: A muscle-specific isoform of FHOD3 is regulated by CK2 phosphorylation and promotes myofibril maintenance. J Cell Biol 191: 1159–1172.
13. Sanger JW, Mittal B, Sanger JM. (1984) Formation of myofibrils in spreading chick cardiac myocytes. Cell Motil 4: 405–416.
14. Bai J, Hartwig JH, Perrimon N. (2007) SALS, a WH2-domain-containing protein, promotes sarcomeric actin filament elongation from pointed ends during drosophila muscle growth. Dev Cell 13: 828–842.
15. Mizushima S, Nagata S. (1990) pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. Nucleic Acids Res 18: 5322.
16. Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, Robbins J. (1991) Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. J Biol Chem 266: 9180–9185.
17. Kulandavelu S, Qu D, Sunn N, Mu J, Rennie MY, et al. (2006) Embryonic and neonatal phenotyping of genetically engineered mice. ILAR J 47: 103–117.
18. Goshima K. (1973) A study on the preservation of the beating rhythm of single myocardial cells in vitro. Exp Cell Res 80: 432–438.
19. Tokuyasu KT. (1986) Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry.

J Microsc 143: 139–149.

図の説明

図 1.

(A)マウス Fhod3 遺伝子のエクソン構造。オルタナティヴスプライシングを受けるエクソンは灰色のボックスで表示した。(B)Fhod3 のドメイン構造を図示。オルタナティヴスプライシング領域は黒のボックスで示し、矢印で RT-PCR 解析にて用いたプライマーを表示した。(C)C 末の FH2 ドメインにおけるオルタナティヴスプライシングにより得られる 2 つのアイソフォームに特異的に設計されたプライマー。プライマー‘S6’と‘S7’はそれぞれ、T(D/E)$_5$XE 領域(黒のボックス)をコードするエクソン 25 を含む Fhod3 の mRNA と含まない mRNA に特異的である。プライマー‘S8’は両方のアイソフォームに共通である。(D)マウス胎仔での組織特異的な T(D/E)$_5$XE 領域の発現。特異的なプライマー(B および C を参照)を用いた RT-PCR 産物をアガロースゲル電気泳動した。“sk. muscle”は骨格筋を意味する。(E)エクソン 11 およびエクソン 12 を欠くスプライシングバリアントの組織特異的な発現。RT-PCR 産物(B を参照)をアガロース電気泳動した。

図 2.

(A)マウス胎仔心筋細胞を用いて、内因性 Fhod3(緑)およびαアクチニン(赤)に対して免疫蛍光二重染色を行った。Fhod3 染色にはポリクローナル抗 Fhod3(650-802)抗体を使用した。スケールバーは 5 μm。(B)免疫染色したマウス胎仔心筋細胞の 1 本の心筋線維を拡大表示した。(C)マウス胎仔心臓の組織切片を用いて、内因性 Fhod3(赤)およびαアクチニン(緑)に対して免疫蛍光二重染色を行った。Fhod3 染色には、抗

Fhod3(C-20)(上段)、抗 Fhod3(650-802)(中段)、抗 Fhod3(873-974)(下段)のポリクローナル抗体を使用した。スケールバーは 2 μm。

図 3.

(A)マウス成獣の心臓から得られたグリセリン心筋を用いて、内因性 Fhod3(赤)およびαアクチニン(緑)に対して免疫蛍光二重染色を行った。Fhod3 染色にはポリクローナル抗 Fhod3(650-802)抗体を使用した。スケールバーは 5 μm。(B) マウス成獣の心臓組織切片を用いて内因性Fhod3(赤)およびαアクチニン(緑)に対して免疫蛍光二重染色を行い、さらにファロイジン染色を加えた(重ね合わせ画像には表示していない)。Fhod3 染色には、抗 Fhod3(650-802)(上段)、抗 Fhod3(873-974)(中段)、抗 Fhod3(C-20)(下段)のポリクローナル抗体を使用した。ここで使用した抗 Fhod3(C-20)抗体は、Fhod3 ノックアウトマウスより得られたマウス胎仔線維芽細胞のアセトンパウダーで吸着処理を行ってある。詳細は、「実験方法」を参照。スケールバーは 2 μm。(C)ヒト左心室組織切片を用いて、内因性 Fhod3(赤)およびαアクチニン(緑)に対して免疫蛍光二重染色を行った。Fhod3 染色にはポリクローナル抗 Fhod3(650-802)抗体を使用した。スケールバーは 2 μm。(D)2 名の特発性拡張型心筋症患者(#1 および#2)および特発性肥大型心筋症患者より採取した左心室組織切片を用いて、内因性 Fhod3(赤)およびαアクチニン(緑)に対して免疫蛍光二重染色を行った。Fhod3 染色にはポリクローナル抗 Fhod3(650-802)抗体を使用した。スケールバーは 2 μm。

図 4.

(A)T(D/E)$_5$XE 領域を欠く Fhod3 タンパク質を心臓特異的に過剰発現するトランスジェニックマウス成獣の心臓組織切片を用いて、Fhod3(赤)およびαアクチニン(緑)に対して免疫蛍光二重染色を行い、さらにファロイジン染色を加えた。Fhod3 染色には、抗 Fhod3(C-20)(上段)、抗 Fhod3(650-802)(中段)、抗 Fhod3(873-974)(下段)のポリクローナル抗体を使用した。スケールバーは 2 μm。(B)Fhod3 トランスジェニックマウス成獣の心臓組織切片を用いて、Fhod3(緑)およびミオメシン(赤)に対して免疫蛍光二重染色

を行った。Fhod3 染色にはポリクローナル抗 Fhod3(650-802)抗体を使用した。スケールバーは 2 μm。(C)Fhod3 トランスジェニックマウス成獣の心臓組織切片を用いた免疫染色像の、心筋繊維 1 本の拡大像を示す。切片は抗αアクチニン抗体(緑)、ファロイジン(青)、抗 Fhod3 または抗 Tmod 抗体(赤)で染色した。Fhod3 染色には、抗 Fhod3(650-802)(最上段)、抗 Fhod3(873-974)(2 段目)、抗 Fhod3(C-20)(3 段目)のポリクローナル抗体を使用した。スケールバーは 2μm。(D)蛍光強度をサルコメアの長軸方向にラインスキャンした。 抗αアクチニン抗体(緑)、抗 Fhod3 抗体または抗 Tmod 抗体(赤)の蛍光強度のプロファイルを C で示した免疫蛍光染色像から作製した。(E)Z 帯と Fhod3 の距離および、Z 帯と Tmod の距離。免疫蛍光染色像にて、Fhod3 または Tmod の蛍光強度のピークとαアクチニンの蛍光強度のピークとの距離を計測した。箱髭図は 25 パーセンタイル(下のライン)、中央値(真ん中のライン)、75 パーセンタイル(上のライン)、また箱の上下ラインからのずれが四分位数範囲の 1.5 倍以内で最も遠い計測値(ウィスカー)を示す。*ウェルチの T 検定による P 値< 0.001。(F) Fhod3 トランスジェニックマウス成獣の心臓組織切片を用いた免疫染色像の、心筋線維 1 本の拡大像を示す。切片を抗 Fhod3 抗体(赤)、抗 Tmod1 抗体 (緑)、また phalloidin (青)にて染色した。Fhod3 染色にはポリクローナル抗 Fhod3(650-802)抗体を使用した。(G) 微細構造における Fhod3 の局在。Fhod3 トランスジェニックマウスから作製した超薄切片を抗 Fhod3(650-802)抗体で標識し、金コロイド標識二次抗体で検出した。

図 5.

(A)エクソン 25 によりコードされる $T(D/E)_5XE$ 領域の in vivo でのアクチン重合に与える影響。HeLa 細胞に、FH2 ドメインの $T(D/E)_5XE$ 領域を含む、あるいは含まない Fhod3-ΔN (wt) (アミノ酸番号 931-1,586)をコードするプラスミド、または $T(D/E)_5XE$ 領域を含む、あるいは含まない Fhod3-ΔN (I1127A) をコードするプラスミドを遺伝子導入した。細胞を固定し、GFP の蛍光(緑)で可視化し、ファロイジンで染色した(赤)。スケールバーは 10 μm。 (B) アクチン重合実験で使用した精製タンパク質の SDS-PAGE 解析。精製タンパク質を 10% SDS-PAGE にかけ、クマシーブルーで染めた。マーカータンパク質の位置は kDa として表示した。(C) Fhod3 の in vitro アクチン重合における $T(D/E)_5XE$ 領域の効果。2μM の G-アクチン(10%がピレン標識)を 50 nM の

Fhod3-T(D/E)$_5$XE(+)-ΔN (wt)、または Fhod3-T(D/E)$_5$XE(+)-ΔN (I1127A)、または Fhod3-T(D/E)$_5$XE(-)-ΔN (wt)、または mDia1-FH1FH2 (アミノ酸番号 549-1,175)と 2 μM プロフィリン I の存在下に反応させた。

図 S1.　マウス成獣心臓における Fhod3 の局在

マウス成獣の心臓組織切片を吸着処理なしの抗 Fhod3(C-20)抗体(赤)およびモノクローナル抗αアクチニン抗体(緑)にて 2 重染色、さらにファロイジンを用いて染色した。スケールバーは 2μm。

図 S2.　Fhod3 トランスジェニックマウスにおける心臓での Fhod3 の発現

3 週齢のトランスジェニックマウス(Tg)または非トランスジェニックマウス(Non-Tg)から得られた心臓組織の溶解液(タンパク量 5μg)を用い、抗 Fhod3(C-20)抗体にてウエスタンブロット解析を行った。

図 S3.　アフィニティー精製したポリクローナル Fhod3 抗体の特異性

胎生 10.5 日の Fhod3 ノックアウトマウス胎仔または Fhod3 ヘテロマウス胎仔から得られた心臓組織の溶解液(タンパク量 5μg)を用い、抗 Fhod3(650-802)抗体および抗 GAPDH 抗体にてウエスタンブロット解析を行った。

表 1. オルタナティヴスプライシングによる Fhod3 アイソフォームの発現

	Heart		Skeletal muscle		Brain		Kidney	
Variant type	**Adult**	**Embryo**	**Adult**	**Embryo**	**Adult**	**Embryo**	**Adult**	**Embryo**
$T(D/E)_5XE$ (–)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1 (8)	N.D.*	10 (100)	N.D.	15 (100)
$T(D/E)_5XE$ (+)	10 (100)	9 (90)	10 (100)	11 (92)	N.D.	0 (0)	N.D.	0 (0)

エクソン 25 を挟む特異的なプライマー(図 1B 参照)により増幅された RT-PCR 産物をサブクローニングし、シークエンスを解析した。カッコ内の数字は、各々の臓器におけるいずれかのアイソフォームの割合を示す。

* N.D. : 未検

Figure 1 (Kan-o et al.)

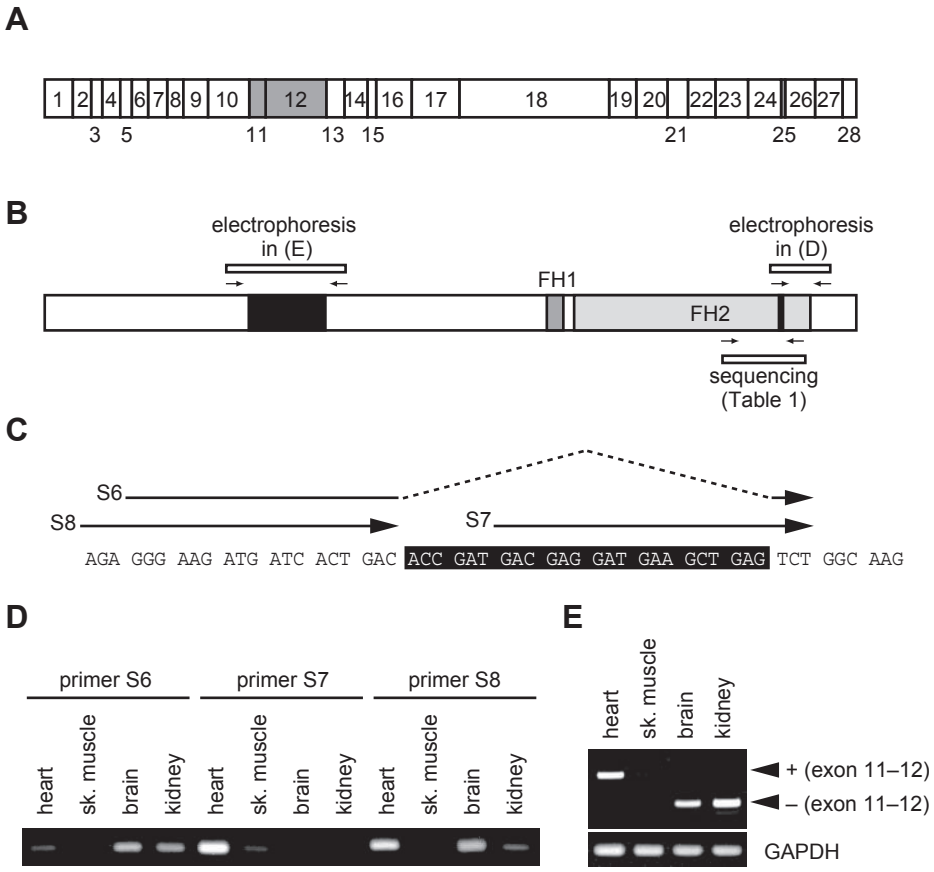

Figure 2 (Kan-o et al.)

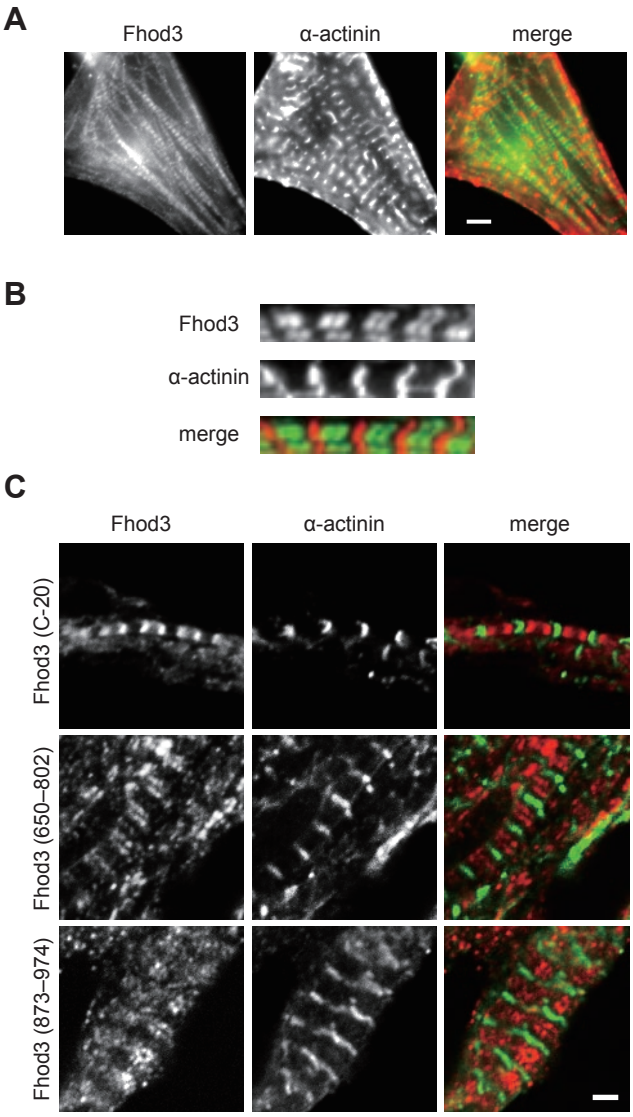

Figure 3 (Kan-o et al.)

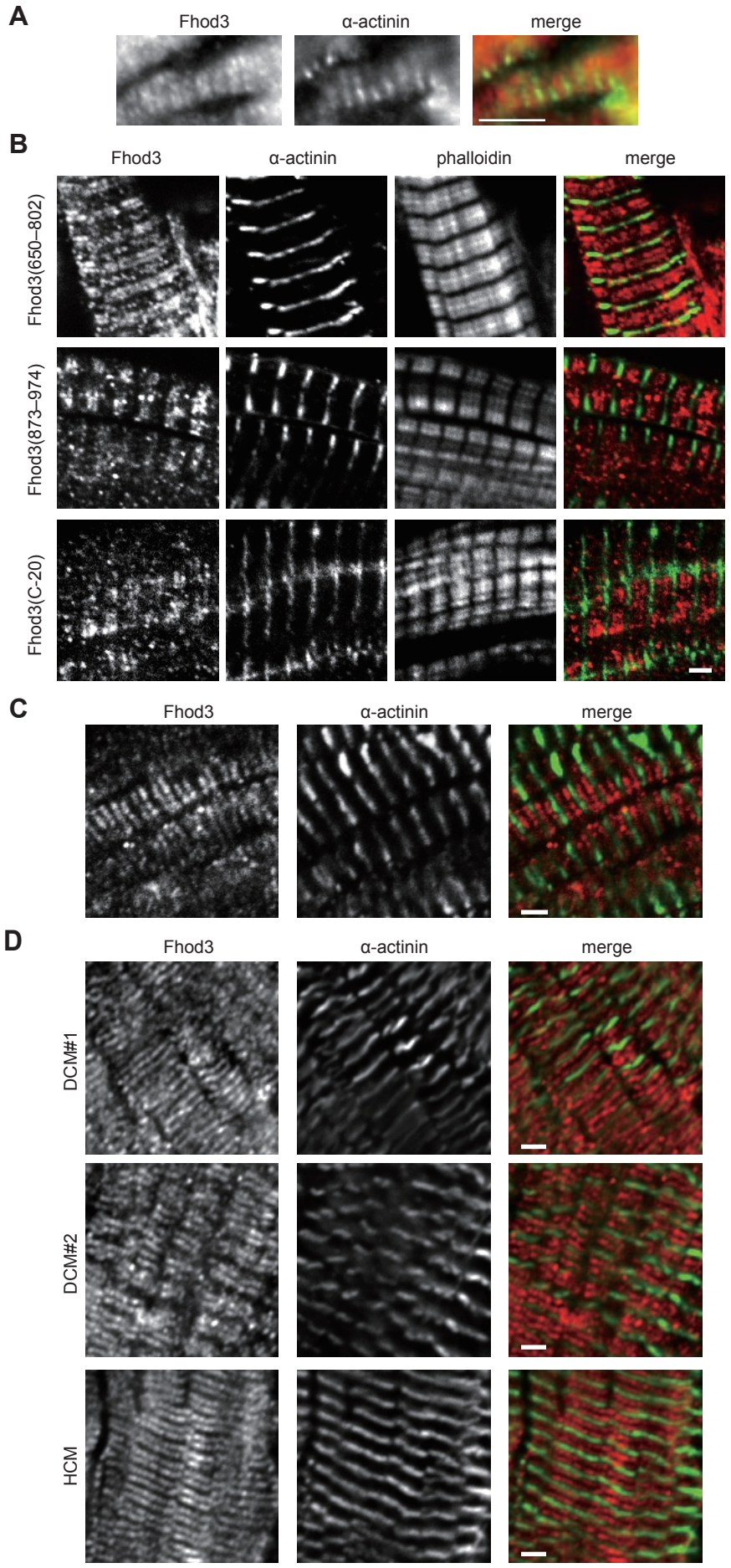

Figure 4 (Kan-o et al.)

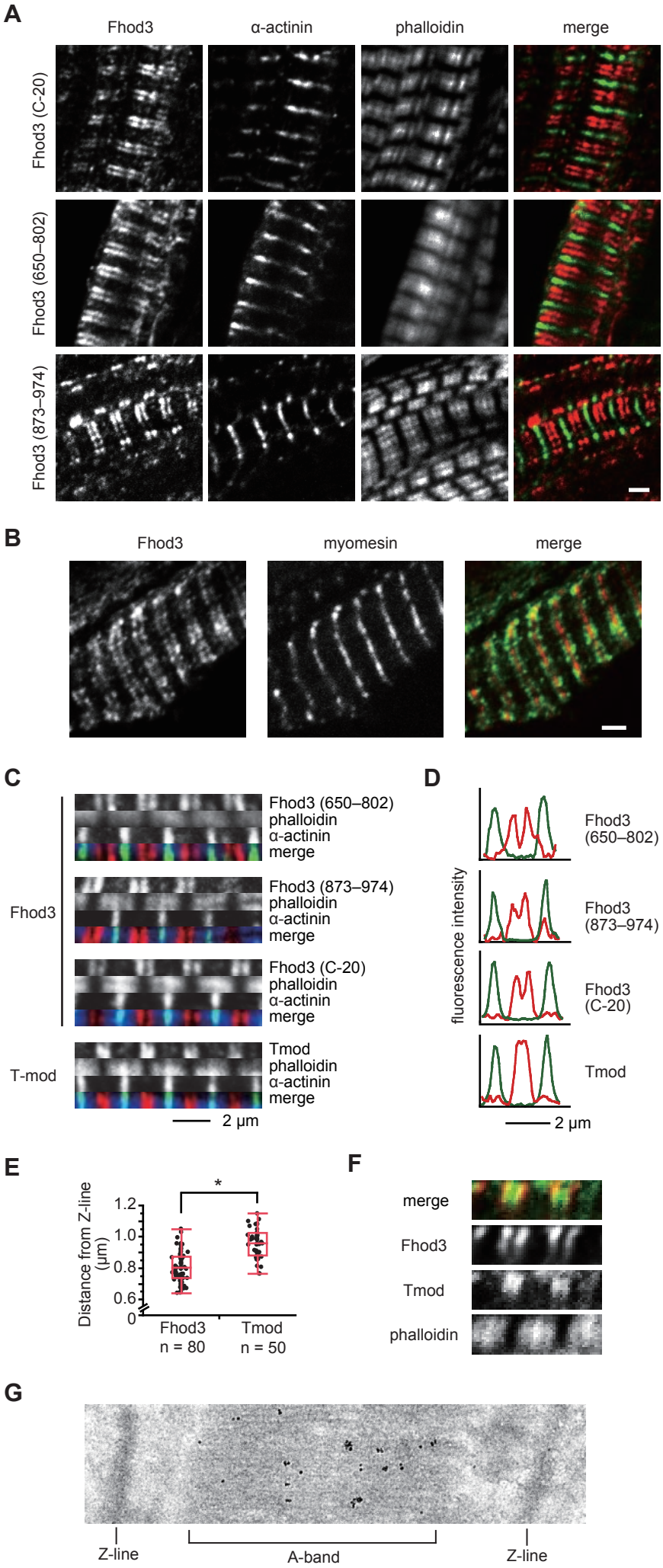

Figure 5 (Kan-o et al.)

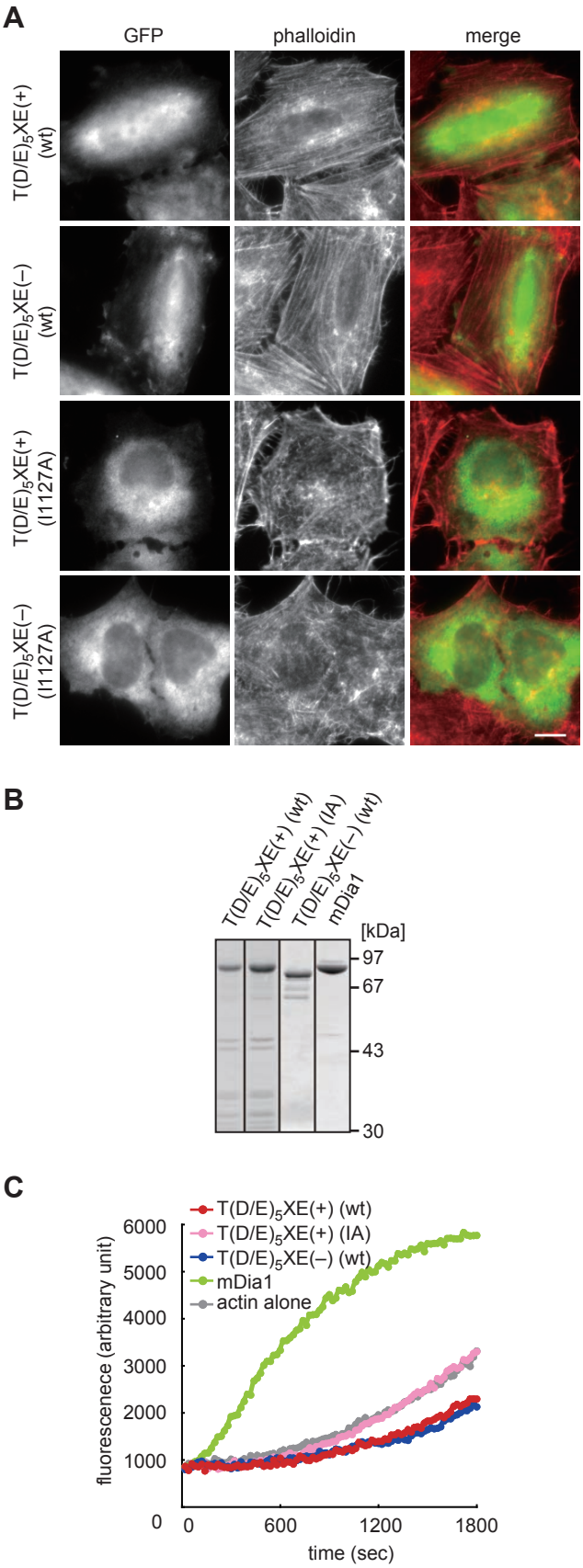

Figure S1 (Kan-o et al.)

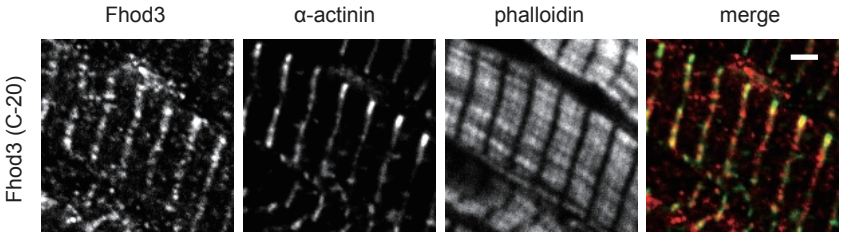

Figure S2 (Kan-o et al.)

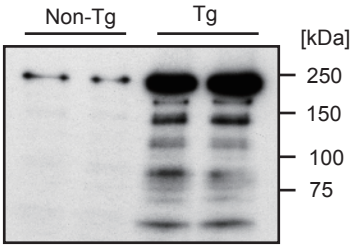
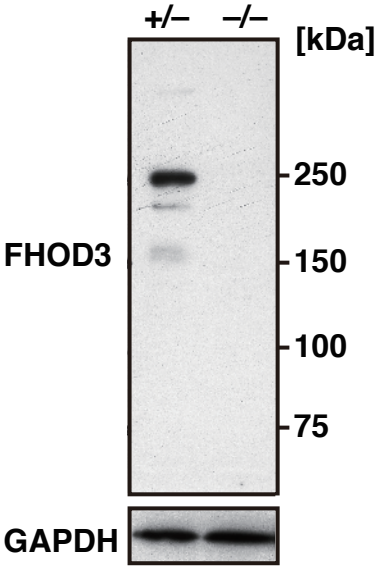
Figure S3 (Kan-o et al.)