

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770185

研究課題名 (和文) 低分子量 G 蛋白質 Rap1 による細胞間接着制御機構とその生体内における役割の解析

研究課題名 (英文) Study on the regulation of endothelial cell-cell adhesions by Rap1 small GTPase and its biological functions

研究代表者

福原 茂朋 (FUKUHARA SHIGETOMO)

国立循環器病センター研究所・循環器形態部・室長

研究者番号：70332880

研究成果の概要：全身の細胞に酸素や栄養を供給する血管の内腔は、血管内皮細胞によって覆われている。内皮細胞は互いに接着し血液が外に漏れないようにバリアーとして機能しているが、炎症時や虚血によって新たに血管が形成されるときにはそのバリアー機能は低下する。本研究では血管のバリアー機能を制御するメカニズムを解明するため、内皮細胞間の接着を制御する Vascular Endothelial (VE)-Cadherin に注目し、その接着活性を調節するシグナル伝達系を解析した。その結果、Rap1 低分子量 G 蛋白質がアクチン細胞骨格系を制御することにより VE-cadherin 接着を増強することが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	540,000	3,840,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞内・細胞間情報伝達

## 1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞は互いに接着し、血液が外に漏れないようなバリアーとしての機能を果たしている。血管内皮特異的な細胞間接着分子 VE-cadherin (Vascular Endothelial Cell Specific-Cadherin) はアドヘレンスジャンクションの形成を介してこのバリアー機能を厳密に制御している。最近の研究から VE-cadherin は単に細胞間の接着を制御するばかりでなく、細胞間接着依存的に細胞外から細胞内へシグナルを伝達するシグナル分子としても機能することが分かってきた

(Outside-In シグナル)。また、逆にその接着活性が細胞内からのシグナル (Inside-Out シグナル) によって正あるいは負の調節を受けることも示唆されている。つまり内皮細胞間接着および血管のバリアー機能はこのような VE-cadherin を介した細胞内・外両方向へのシグナルによって厳密に制御されている。

われわれはこれまでにこの VE-cadherin に関連した細胞内シグナル伝達系について精力的に解析を行い、低分子量 GTP 結合調節蛋白質 (G 蛋白質) に属する Rap1 が VE-cadherin

接着を正に調節することを発見、報告してきた (Fukuhara et al, *J. Biochem. Mol. Biol.*, 39: 132-139, 2006)。アドレノメジュリンやプロスタサイクリンは G 蛋白質共役型受容体を介してサイクリック AMP (cAMP) を産生し血管のバイヤー機能を亢進する。今までそのメカニズムとして cAMP による cAMP 依存性蛋白質リン酸化酵素 PKA の活性化が重要であると考えられていたがわれわれはその経路に加えて cAMP の新規エフェクターである Epac (Rap1 グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF)) を介した Rap1 活性化経路が VE-cadherin 接着活性を強力に亢進することを報告した (Fukuhara et al, *Mol. Cell. Biol.*, 25: 136-146, 2005)。

さらに他のグループによって上皮細胞間接着における Rap1 の役割についても解析がなされ、大阪大学大学院医学系研究科、高井らのグループはイムノグロブリンドメインを有する接着因子 nectin によって Rap1 が活性化され、これにより E-cadherin 接着が形成されることを報告している (Ogita and Takai, *Methods Enzymol.*, 406: 415-424, 2006)。このように本研究開始当初、われわれを含むいくつかの研究グループによって、Cadherin 接着形成における Rap1 の重要性が明らかにされていたが、Rap1 が Cadherin 接着を制御する機構については殆ど理解されていなかった。

## 2. 研究の目的

1 の研究背景を踏まえて、われわれは Rap1 が VE-cadherin 接着を制御する分子メカニズムを解明することを目的に研究を遂行した。具体的には以下の 3 点について焦点を当てて解析を行ってきた。

(1) Rap1 によるアクチン細胞骨格系制御とそれによる VE-cadherin 接着亢進メカニズムについて

これまでにわれわれはアデニル酸シクラーゼの活性化剤であるフォルスコリン (FSK) で内皮細胞を処理し細胞内 cAMP 濃度を上昇させると、細胞間接着部位でアクチン線維の束化が惹起されることを発見した。そこで、この cAMP によるアクチン線維の束化が VE-cadherin 接着をどのように制御しているか解析する。

(2) Rap1 による VE-cadherin 細胞内輸送制御とその VE-cadherin 接着における役割について

Cadherin はカルシウム依存性接着分子であるので細胞外カルシウムを除去すると接着が破壊され、エンドサイトーシスによりエンドゾームに蓄積する。しかし、カルシウムを再度添加するとエンドゾームに局在する Cadherin は接着部位に輸送され接着が再形成される。われわれはこれまでに、FSK 刺激

によってエンドゾームから細胞間接着部位への Cadherin 輸送が促進されることを見つけた。そこで本研究では cAMP による VE-cadherin 細胞内輸送制御機構を解析し、その VE-cadherin 接着における役割について調べる。

(3) 生体内における Rap1 による Cadherin 接着制御の役割について

(1)、(2) の *in vitro* の細胞系で明らかにされた機構が実際に生体内でも機能しているのか解析する。

## 3. 研究の方法

本研究は主にヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC を用いて遂行する。また、*in vitro* の系で明らかになった知見が生体内でも実際に機能しているか検討するため、トランスジェニックマウスを用いた解析を行う。以下に本研究課題を遂行するための主要な研究の方法を示す。

(1) バイオイメージング技術を用いた VE-cadherin 接着制御メカニズムの解析  
生きた細胞における VE-cadherin のダイナミズムを解析するため、VE-cadherin と緑色蛍光蛋白質 (GFP) の融合蛋白質 (VEC-GFP) を作製し、その挙動をバイオイメージング技術により解析する。また、VEC-GFP を用いた Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) 解析により、細胞間接着部位における VE-cadherin の安定性を測定する。

(2) Rap1 活性を時空間的に制御するための系の確立とそれを用いた VE-cadherin 接着制御機構の解析

近年、Inoue らによって開発された Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の活性を時空間的に制御できる系を応用し、Rap1 活性を時空間的に制御できる系を開発する。

(3) 生体内における Rap1 による血管内皮細胞間接着制御の役割の解析  
血管内皮細胞で特異的に活性化型 Rap1 あるいは Rap1 水解促進因子 Rap1GAP を過剰発現するトランスジェニックマウス の解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) cAMP-Epac-Rap1 シグナル伝達系によるアクチン細胞骨格系制御とその VE-cadherin 接着における役割の解析

解析の結果以下の 3 つの知見が得られた。

① 血管内皮細胞で cAMP-Epac-Rap1 シグナルを活性化すると、細胞中央部に局在するストレスファイバーが消失し、逆に内皮細胞間接着部位でアクチン線維の束が形成されることが分かった (図 1)。また、このアクチン線維の束に VE-cadherin が集積すること、そして

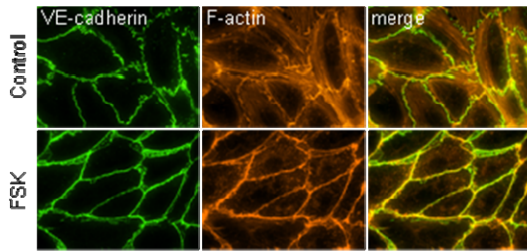


図1 血管内皮細胞においてcAMPを介したRap1の活性化は、細胞間接着部位でアクチン重合を惹起する。血管内皮細胞をフォルスコリンで刺激し、VE-cadherinとF-actinの染色を行った。

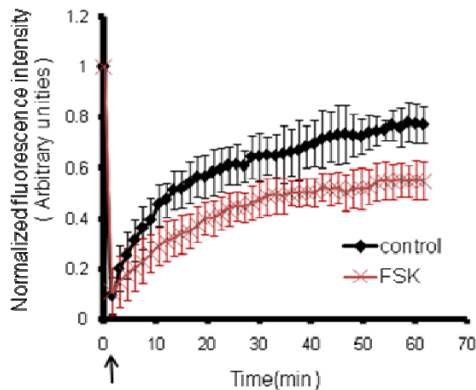


図2 VEC-GFPのFRAP解析。コントロールあるいはFSKで刺激した細胞の細胞間接着部位に局在するVEC-GFPを光退色させた(↑)。その後、光退色させた領域における蛍光の回復を経時的に測定した。コントロール細胞に比べてFSKで刺激した細胞の方が回復する蛍光量少なかったことから、FSK刺激によってVEC-GFPが細胞間接着部位で安定化することが分かった。

このアクチン線の束化は VE-cadherin 接着非依存的に起こることが示された。

②VEC-GFP を用いて FRAP 解析を行ったところ、cAMP-Epac-Rap1 シグナルは、細胞間接着部位でVECを安定化させることが分かった(図2)。また、この現象はアクチン線維重合阻害剤により抑制されたことから、cAMP-Epac-Rap1 シグナルは細胞間接着部位でアクチン線維の束化を形成し、それによりVE-cadherin を細胞間接着部位で安定化させることが分かった。

③ VE-cadherin の細胞内領域を欠損、あるいは  $\beta$ -catenin に置換した VEC-GFP 変異体を用いて FRAP 解析を行ったところ、VE-cadherin が cAMP-Epac-Rap1 シグナルによって細胞間接着部位で形成されたアクチン線維に集積し、そこで安定化するには、 $\beta$ -catenin、 $\beta$ -catenin が必要であることが分かった。

①から③の結果から、cAMP-Epac-Rap1 シグナルは VE-cadherin 接着非依存的に細胞間接着部位でアクチン線維の束化を惹起することが分かった。さらに、VE-cadherin はそのアクチン線維の束に  $\beta$ -catenin、 $\beta$ -catenin を介して結合することで細胞間接着部位で安定化

し、それにより VE-cadherin 接着が増強されることが明らかになった。本研究で得られた成果は、現在論文投稿準備中である。

これまで、細胞間接着部位では Cadherin を介してアクチン線維の束が形成されると考えられていた。また最近 Nelson らのグループは、Cadherin とアクチン線維は直接相互作用しないという知見を報告しており注目されている。本研究では、Rap1 が VE-cadherin 接着非依存的に細胞間接着部位でアクチン線維の束化を惹起すること、またそのアクチン線維に VE-cadherin が  $\beta$ -catenin、 $\beta$ -catenin を介して結合することを明確に証明しており、新たな Cadherin 接着制御機構を提唱している点で非常に意義があると思う。

しかし、Rap1 がアクチン線維の束化を惹起する機構については未だ不明な点が多く、今後の重要な研究課題であると思う。

(2) Rap1 による VE-cadherin 細胞内輸送制御とその VE-cadherin 接着における役割の解析

VEC-GFP を発現した血管内皮細胞を FSK で刺激したところ、細胞内のエンドゾームに局在する VEC-GFP が細胞間接着部位にリクルートされることが分かった。そこで、cAMP が VE-cadherin の細胞内輸送を制御するメカニズムについて解析した。

まず、この疑問を明らかにするため Rapamycin 依存的に相互作用する FRB (rapamycin binding domain of mTOR) と FKBP (FK506-binding protein) を用いて Rap1 活性を時空間的に制御できる系を確立した。FKBP と Epac 1 触媒領域の融合蛋白質 (FKBP-Epac1) および膜移行シグナルを付加した FRB を細胞に発現させ Rapamycin で刺激したところ、FKBP-Epac1 は細胞膜に移行し、細胞膜で特異的に Rap1 の活性化を引き起こした。この系を用いて VEC-GFP の挙動をタイムラプスイメージングにより検討したところ、細胞膜で Rap1 を活性化させると、細胞膜の伸展が惹起され、その膜伸展部位に VEC-GFP 含有小胞がリクルートされることが分かった。

最近 Rap1 が Rho ファミリー G 蛋白質の一つである Rac の GEF に結合し、Rac 活性を調節することが報告されている。上で述べたように細胞膜における Rap1 の活性化が膜の伸展を惹起したことから、Rap1 による VE-cadherin の輸送に Rac が関与する可能性を考え、それを検証した。その結果、細胞膜で Rap1 を活性化したときに見られる VE-cadherin 輸送がドミナントネガティブ

Racによって阻害された。また、細胞膜でRap1を活性化するとそこでRacの活性化も惹起されること、さらにFRB/FKBPの系を用いて細胞膜で特異的にRacを活性化させてもVEC-GFPの輸送が亢進することが分かった。以上の結果から、細胞膜におけるRap1活性化はRacを介してVE-cadherinのエンドゾームから細胞膜への輸送を亢進することが明らかになった。

これまでRap1による細胞内小胞輸送制御機構については殆ど知られておらず、今回得られた知見は非常に重要であると考えられる。今後、細胞膜でのRap1-Racシグナルが如何にして細胞内のエンドゾームにまで伝達されるのかなど、詳細に分子メカニズムを解析していく。

(3) 生体内におけるRap1によるCadherin接着制御の役割の解析

in vitro解析系で示されたRap1によるVE-cadherin接着制御が生体内でも機能しているのか明らかにするために、血管内皮細胞で特異的にRap1活性が亢進あるいは低下したトランスジェニックマウスの解析を行った。具体的には内皮細胞で特異的に機能するTie2プロモーターを下でRap1の活性化変異体RapE63 (Tie2-RapE63、京都大学服部先生との共同研究)あるいはRap1の不活性化因子Rap1GAP (Tie2-Rap1GAP)を発現するトランスジェニックマウスの解析を行った。その結果、予想に反しこれらトランスジェニックマウスは正常に発生し、発育することが分かった。実際にこれらトランスジェニックマウスの血管内皮細胞でRap1活性が亢進あるいは低下しているか確認するため、肺組織からCD31陽性血管内皮細胞をセルソーターにより単離し、これら細胞におけるRap1活性をpull-down法を用いて調べた。その結果、Tie2-RapE63マウスの内皮細胞ではRap1活性の亢進が、Tie2-Rap1GAPマウスの内皮細胞ではRap1活性の低下が確認された。今後、これらトランスジェニックマウスの血管を詳細に調べると共に、炎症や生理的あるいは病的な血管新生を惹起させたときの反応を解析していく。

#### 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8件)

① S. Fukuhara, K. Sako, K. Noda, K. Nagao, K. Miura, N. Mochizuki. Tie2 is tied at the cell-cell contacts and to extracellular matrix by Angiopoietin-1. *Exp. Mol. Med.* 査読有 41: 133-139 (2009).

② K. Sako, S. Fukuhara, M. Takashi, T. Hamakubo, H. Song, T. Kodama, A. Fukamizu,

J. S. Gutkind, G. Y. Koh, N. Mochizuki. Angiopoietin-1 induces Krüppel-Like Factor 2 expression through a phosphoinositide 3-kinase/AKT-dependent activation of myocyte enhancer factor 2. *J. Biol. Chem.* 査読有 284: 5592-5601 (2009).

③ S. Fukuhara, K. Sako, T. Minami, K. Noda, H. Z. Kim, T. Kodama, M. Shibuya, N. Takakura, G. Y. Koh and N. Mochizuki. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat. Cell Biol.* 査読有 10: 513-526 (2008).

④ H. Mukai, M. Kikuchi, S. Fukuhara, Y. Kiso and E. Muneke. Cryptide signaling: amphiphilic peptide-induced exocytosis mechanisms in mast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 375: 22-26 (2008).

⑤ N. Makita, E. Behr, W. Shimizu, M. Horie, A. Sunami, L. Crotti, E. Schulze-Bahr, S. Fukuhara, N. Mochizuki, T. Makiyama, H. Itoh, M. Christiansen, P. McKeown, K. Miyamoto, S. Kamakura, H. Tsutsui, P. J. Schwartz, A. L. George Jr and D. M. Roden. Single common mutation in the cardiac sodium channel gene *SCN5A* with diverse clinical phenotypes. *J. Clin. Invest.* 査読有 118: 2219-2229 (2008).

⑥ N. Yasuda, S. Miura, H. Akazawa, T. Tanaka, Y. Qin, Y. Kiya, S. Imaizumi, M. Fujino, K. Ito, Y. Zou, J. Ge, S. Fukuhara, S. Kunimoto, N. Mochizuki, K. Fukuzaki, T. Sato, H. Nakaya, K. Saku and I. Komuro. Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation. *EMBO Rep.* 査読有 9: 179-186 (2008).

⑦ K. Kamide, Y. Kokubo, S. Fukuhara, H. Hanada, J. Yang, A. Kada, J. Nagura, S. Takiuchi, T. Horio, Y. Kawano, A. Okayama, H. Tomoike and T. Miyata. Protein Tyrosine Kinase 2 $\beta$  as a Candidate Gene for Hypertension. *Pharmacogenet. Genomics.* 査読有 17: 931-939 (2007).

⑧ Y. Yamaguchi, T. Nagase, T. Tomita, K. Nakamura, S. Fukuhara, T. Amano, H. Yamamoto, Y. Ide, M. Suzuki, S. Teramoto, T. Asano, K. Kangawa, N. Nakagata, Y. Ouchi, H. Kurihara.  $\alpha$ -defensin overexpression induces progressive muscle degeneration in mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 査読有 292: C2141-C2149 (2007).

[学会発表] (計8件)

① Shigetomo Fukuhara • Angiostasis and

angiogenesis regulated by angiopoietin-1/Tie2 receptor system · Japan-Mexico Workshop · 2009.2.25 · Mexico city, Mexico.

② 福原茂朋・アンジオポエチン-1/Tie2 受容体シグナルの空間的・機能的制御・第5回宮崎サイエンスキャンプ・2009.2.20・フェニックスシーガイアリゾート宮崎

③ Shigetomo Fukuhara · Angiostasis and angiogenesis regulated by angiopoietin-1/Tie2 signaling · The 6th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology & The 16th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization · 2008.12.5 · 金沢市石川県立音楽堂

④ 福原茂朋・アンジオポエチン-1/Tie2 受容体シグナルによる血管安定化・血管新生制御機構・生理研研究会「イオンチャネル・トランスポーターと心血管機能：学際的取り組みによる新戦略」・2008.11.20・岡崎市自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター

⑤ Shigetomo Fukuhara · Angiostatic and Angiogenic Regulation by Intercellular Trans-associated Tie2 and ECM-anchored Tie2 · 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association · 2008.10.28 · 名古屋国際会議場

⑥ Shigetomo Fukuhara · Angiopoietin-1 Regulates Distinct Signaling Functions through Trans-associated Tie2 at Cell-cell Contacts and Extracellular Matrix-anchored Tie2 at Cell-substratum Contacts · 15th International Vascular Biology Meeting · 2008.6.5 · Sydney, Australia

⑦ 福原茂朋・アンジオポエチン-1によって活性化された Tie2 受容体は細胞間および細胞-基質間接着部位に移動し異なったシグナルを活性化する・第30回日本分子生物学会、第80回日本生化学会合同年会・2007.12.12・横浜パシフィコ横浜

⑧ 福原茂朋・アンジオポエチン-1/Tie2 受容体シグナルの空間的制御とその血管形成における役割・第11回 Molecular Cardiovascular Conference · 2007.9.16 · 北海道キョロリゾート

[図書] (計3件)

① 福原茂朋、望月直樹・羊土社・実験医学 (Current Topics) · 2008 · 2606-2609

② 福原茂朋、望月直樹・羊土社・実験医学増刊 (生細胞を使ったライブイメージングでみえる生命現象) · 2008 · 25-29

③ 福原茂朋、望月直樹・協和企画・循環器病研究の進歩 · 2008 · 63-70

[その他]

本研究課題によって得られた研究成果が、2008年4月21日、日経新聞および2008年4月21日、朝日新聞地方版夕刊で紹介された。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福原 茂朋 (FUKUHARA SHIGETOMO)  
国立循環器病センター研究所・  
循環器形態部・室長  
研究者番号：70332880

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：