

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790211

研究課題名（和文） 血管内皮管腔形成における EGFL7 タンパク質の機能の解析

研究課題名（英文） The Role of EGFL7 in Tube Formation of Vascular Endothelial Cells

研究代表者

神本 高宏（KAMIMOTO TAKAHIRO）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：50444526

研究成果の概要：

血管内皮管腔形成の分子機構を解明する目的で、血管内皮細胞に発現し管腔形成への関与が示唆されている EGFL7 タンパク質について、特異的な分子間相互作用の観点から解析を行った。EGFL7 タンパク質が、Notch リガンドに直接結合することにより、Notch 受容体の活性化を負に制御することを見出した。また、蛍光タンパク質再構成法を用いた新規のスクリーニング法により、未知の結合タンパク質の同定を行った。

交付額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合 計       |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,800,000 | 0       | 1,800,000 |
| 2008 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総 計     | 3,200,000 | 420,000 | 3,620,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞・組織 発生・分化 蛋白質 移植・再生医療 循環器・高血圧

## 1. 研究開始当初の背景

血管網の形成は、ほぼ全ての臓器の形成に伴って必須の過程であり、初期発生時のみならず成体においても組織再生などにおいて活発に行われ得る生理現象である。さらに、虚血疾患や癌など現代の主要死因を占める疾患の病

態にも密接に関わっており、血管の新生を制御する分子機構の解明は薬剤標的として臨床応用の上でも重要な意味を持つ。

血管の形成機序は次のように分類されている。

1) 血管内皮前駆細胞の集合塊から管腔構造を持った原始血管叢が形成される脈管形成 (vasculogenesis)、2) 血管内皮細胞の発芽や嵌入

によって血管網が形成される血管新生 (angiogenesis)、さらに内皮細胞の外周を取り巻く平滑筋細胞である周囲細胞との相互作用による血管壁の安定化などである。従来の考え方では、1)のような脈管形成は初期発生に限られた現象であり、成体における新生血管の形成は主に2)の血管新生によるものであると捉えられてきた。しかし成体においても、特に虚血組織や固形癌への血管の誘導に際して、骨髄から末梢血へ動員された造血系幹細胞による脈管形成が生理的・病態的に重要な役割を果たすことが明らかにされつつある。また、脈管形成は間葉系前駆細胞から内皮細胞への分化を伴う現象であるが、血管新生においても内皮細胞がいったん極性を失い運動性を獲得することで発芽や嵌入が起こっており、間葉系細胞への系統転換および新生血管での内皮細胞への再転換が行われていると考えられる。周囲細胞による支持や相互作用を介した血管の成熟化は、生理的に機能する安定した血管構造の形成には欠かせないが、内皮細胞は周囲細胞の動員に先んじてあるいは支持なしに管腔構造を形成することができる。

脈管形成・血管新生は、ともに前駆細胞や内皮細胞が外環境に応じて細胞極性・細胞運動を制御しながら組織化していく過程である。様々な幹細胞の運命決定を司る hedgehog, Notch, Wnt シグナル経路や、アクチン線維による細胞運動を制御する WASP ファミリーや Rho ファミリーを始め、細胞の極性や運動に一般的に用いられている因子群が、脈管形成・血管新生にも重要な役割を果たしていることが示されている。しかしこうした因子においては、その生理機能が多彩であるほど特定の機能に関与する際の分子機構の解明は困難であり、他の因子との相互作用や依存関係を注意深く検討しなければならない。機能抑制により血管形成異常をもたらす遺伝子群は数多く見出されているが、それぞれの因子

の血管形成への寄与、特に内皮細胞による管腔構造の形成の分子機構については未だに不明の点が多い。管腔構造は、血管の機能において最低限必要な構造単位であり、多細胞生物の器官の基本形として、その形成過程に共通のモデルが存在し得るかが関心を集めている (Lubarsky B, 2003 Cell 112:19)。

## 2. 研究の目的

EGFL7 は、ゼブラフィッシュの血管に特異的に発現する遺伝子の網羅的探索により見出され、その発現抑制により大小全ての血管において管腔形成が起こらなくなることが示された遺伝子である (Parker LH, 2004 Nature 428:754)。このときの血管内皮細胞は既に十分な数が正常な位置に索状に集合し、動脈・静脈の特異的マーカーの発現を含めて分化の進んだ段階であることから、管腔形成のみに異常を生じていることが示唆された。EGFL7 は血管内皮細胞に特異的な発現分布を示す遺伝子として脊椎動物に保存されている。EGFL7 タンパク質の分泌経路・細胞表面での局在の解析および特異的な結合因子の探索によって、EGFL7 の血管管腔形成における機能の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) EGFL7 と Notch リガンドとの相互作用解析

#### 1 発現ベクターの作成

マウス脳あるいは血管内皮細胞より抽出した total RNA を用いて cDNA を合成し、今回用いた遺伝子を PCR により増幅するためのテンプレートとして用いた。適切な制限酵素部位を付加したプライマーを用いてコーディング領域を増幅し、蛍光タンパク質などの融合タグがカルボキシル末端側に付加されるように発現ベクターへのサブクローニングを行った。メガプライマーPCR 法により点変異導入を行った。

## 2 レトロウイルス発現ベクターによる遺伝子導入

パッケージング細胞 PLAT-E に、レトロウイルスベクターを Lipofectamine2000 により遺伝子導入し、24-48 時間後の培養上清を回収した。さらに 0.45  $\mu$ m フィルターを通してろ過したものを、パッケージングされたレトロウイルス粒子を含む上清として用い、ポリブレン 8  $\mu$ g/ml を添加した培地中で標的細胞に感染させた。感染後 48 時間以降に、薬剤耐性あるいは蛍光タンパク質の発現に基づいて安定発現株の選択を行った。

## 3 共培養レポーターアッセイ

マウス Notch1 受容体を安定発現する CHO 細胞と、Notch シグナルの下流転写因子である RBP-J $\kappa$  結合配列をタンデムに連結したレポーターコンストラクトを用いて、Dual Luciferase Assay による Notch シグナル活性化の測定を行った。Notch 受容体の刺激には、Notch リガンドを安定発現する NIH3T3 細胞との共培養を 48 時間行った。

### (2) 蛍光タンパク質再構成法による発現スクリーニング

蛍光タンパク質 Venus のアミノ末端側 1-173 残基 (VN173) およびカルボキシル末端側 155-238 残基 (VC155) を、それぞれカルボキシル末端融合タグとして発現可能なレトロウイルスベクターを作成した。これらのタグには、免疫沈降・ウェスタンブロッティングを行うための HA および Myc タグを付加しており、また融合タンパク質とタグとの間の立体構造上の自由度を増すためのリンカー配列を挿入した。

VC155 をカルボキシル末端融合タグとして持つ発現ライブラリを作成するために、マウス脳より total RNA を抽出し、mRNA の精製を行ったものをテンプレートとして、Random Hexamer プライマーを用いて cDNA を合成した。cDNA 断片の末端に EcoRI アダプターを付加した後、サイズ

分画カラムにかけて短い断片を除き、VC155 をタグとして持つレトロウイルス発現ベクターの EcoRI 部位に挿入し、ライブラリを作成した。

EGFL7 のカルボキシル末端側に VN173 を融合タグとして持つレトロウイルス発現ベクターを用い、NIH3T3 細胞で安定発現株を作成した。この細胞に、上記ライブラリをパッケージングしたレトロウイルス粒子を感染させた。Venus の蛍光が回復した細胞群を BD FACSAria セルソーターで回収し、単一クローン化して解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) EGFL7 と Notch リガンドとの相互作用解析

EGFL7 は N 末端に分泌シグナル配列を持つ約 270 アミノ酸残基からなる分泌タンパク質であり、成熟タンパク質としてはアミノ末端より EMI (Extracellular Matrix Interacting) ドメイン、2 つの EGF 様ドメイン、コイルドコイル領域から成る。各ドメインの役割として、コイルドコイル領域が EGFL7 の自己多量体形成を司っていること、また EMI ドメインにより EGFL7 は分泌タンパク質であるにも関わらず細胞内または細胞表面に留まり、培地中への拡散が妨げられていることを確認した。さらに EMI ドメインおよび EGF 様ドメインについて、PSI-BLAST 検索により見出される保存されたアミノ酸残基の相同性や特徴的な糖鎖修飾配列などから、EGFL7 が Notch シグナル経路に影響する分子群の特徴を有することが示唆された。

そこで、EGFL7 タンパク質が Notch 受容体および Notch リガンドタンパク質と相互作用するかを検討した。EGFL7 と同様に血管内皮細胞において発現する Notch1 受容体、Notch リガンドである Jagged1, DLL1, DLL4 について、共沈実験において EGFL7 との結合が認められ、EGFL7 の EMI ドメインの変異体ではこの結合が抑制されることを見出した (図1)。EGFL7 は分泌タンパク質であることから、Notch 受容体あるいは Notch リガンドタンパク質

の細胞外ドメインと、分泌経路中あるいは細胞外で結合していると考えられる。

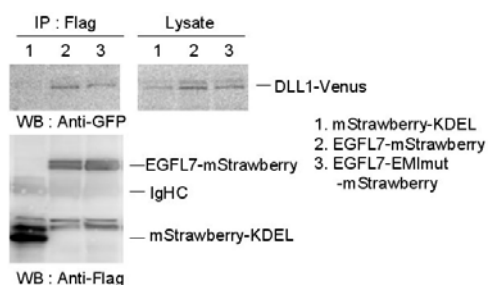


図1

蛍光タンパク質を用いた生細胞観察により、EGFL7 は DLL1, DLL4 と細胞内の顆粒状構造においてよく共局在することが観察された(図2)。後期エンドソームマーカーである Rab7 との共局在から、この顆粒状構造は後期エンドソームであると考えられる。また、EGFL7 の EMI ドメインの変異体では小胞体への蓄積が見られ共局在は少なくなっており、共沈実験の結果と一貫するものと考えられた。

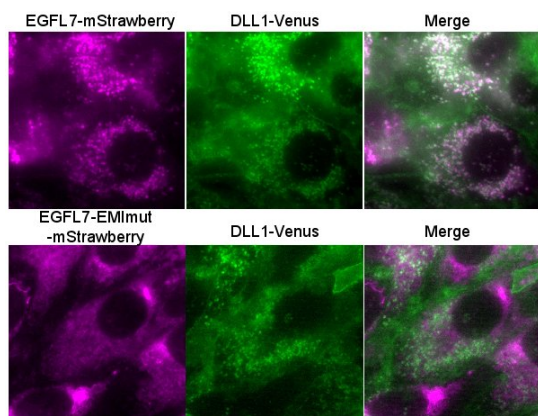


図2

EGFL7 と Notch リガンドとの間の結合と共局在が観察されたことから、EGFL7 が Notch リガンドによる受容体の活性化に与える影響を検討した。共培養レポーターアッセイにおいて、受容体発現細胞およびリガンド発現細胞のそれぞれに EGFL7 を発現させた場合の影響を観察した。Notch 受容体発現細胞で EGFL7 を発現させた際には、わずかに活性の上昇が見られた(図3)。Notch リガンド発現細胞で EGFL7 を発現させた場合、Jagged1 による活性化は増強し、DLL1,

DLL4 による活性化は抑制されていた(図4)。

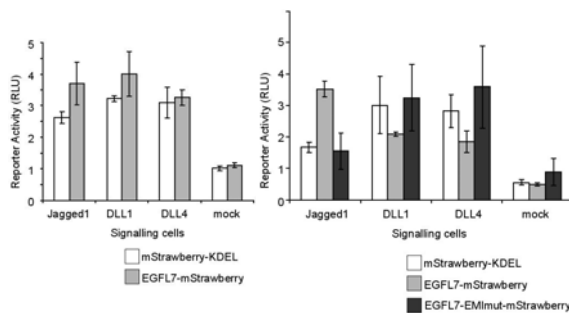


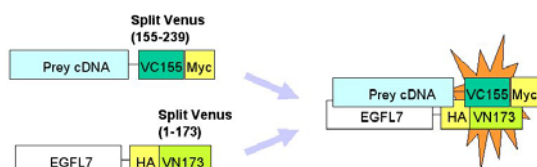
図3

図4

上記の EGFL7 と Notch リガンドとの細胞内顆粒状構造における共局在は、DLL1, DLL4 については顕著であるものの、Jagged1 についてはあまり認められず、それぞれのリガンド活性に対する異なる影響の一因となっていることが考えられた。EGFL7 の発現が、Notch リガンド発現細胞において Jagged1 優位のシグナルを発するよう活性調節を行っている可能性が示されたことから、共培養による分化誘導実験系などで今後その効果を検討する。

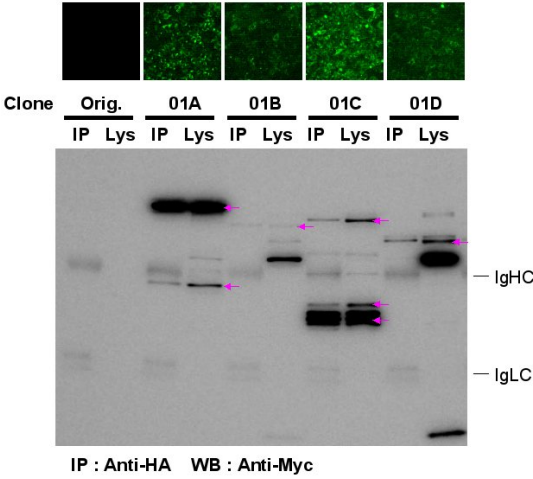
## (2) 蛍光タンパク質再構成法による発現スクリーニング

EGFL7 の関与する分子機構の候補を探索するために、新規の結合タンパク質の同定を試みた。蛍光タンパク質再構成法 (Bimolecular Fluorescence Complementation; BiFC) は、蛍光タンパク質を前半と後半に分割してそれぞれを異なる分子にタグとして連結し、連結した分子同士の相互作用によりタグ同士が近接した場合に蛍光が回復する、という実験手法である。これを既存のレトロウイルスベクターによる発現ライブラリスクリーニングの実験系に応用した。



蛍光タンパク質 Venus の前半部 (VN173) をタグとして連結した EGFL7 に対して、後半部 (VC155) をタグとして連結したライブラリ配列より、

蛍光を回復可能なクローンのスクリーニングを行った(図5)。数種類得られたクローンについて、共沈実験による確認を行ったところ、蛍光の回復したクローンでは実際に EGFL7 との結合が認められた(図6)。これらのクローンについて、引き続き解析を行っている。



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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神本 高宏 (KAMIMOTO TAKAHIRO)  
大阪大学・微生物病研究所・助教  
研究者番号: 50444526

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし