

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 29 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590335

研究課題名(和文)足場分子アフアディンが持つ多面的細胞機能を制御する分子機構

研究課題名(英文)Pleiotropic effects of afadin, an scaffold molecule, on regulation of cellular functions

研究代表者

扇田 久和 (OGITA, Hisakazu)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：50379236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：アフアディンは、細胞接着の形成・維持以外にも、細胞運動や細胞の極性形成の制御など多面的な細胞機能を有することが見出されていたが、そのメカニズムについてはほとんど不明であった。本研究において、アフアディンのDILドメインおよびこのドメインに結合する分子ADIPが、細胞運動とその際の細胞極性形成に必須であり、これらの現象には低分子量Gタンパク質Racの活性化が重要であることを明らかにした。また、心筋細胞または内皮細胞特異的なアフアディン欠失マウスを作製し、アフアディンは心肥大の進展や、リンパ管内皮の形態形成に深く関わっていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Afadin has pleiotropic cellular functions including cell adhesion, cell migration and cell polarization. However, its molecular mechanisms in these phenomena, especially cell migration and polarization, remain elusive. In this research project, the DIL domain of afadin was found to play pivotal roles in the formation of cell polarity during cell migration. The DIL domain binding molecule ADIP crucially mediated the activation of small G protein Rac. Afadin conditional knockout mice specifically in cardiomyocytes or endothelial cells were generated successfully. From the experiments using these mice, afadin was involved in the progression of cardiac hypertrophy and in the regulation of lymphatic vessel morphology.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：細胞医化学

## 1. 研究開始当初の背景

アフアディンは細胞接着分子ネクチンの細胞内領域に結合し、ネクチンの足場分子として細胞間接着の形成に重要な役割を果たしている (Ogita et al. *Int Rev Cytol.* 2008)。その分子機構として、細胞間接着が形成される過程の初期には、接着部位の近傍でチロシンキナーゼ c-Src や低分子量 G タンパク質 Rap1、Rac、Cdc42 が活性化され、アクチン細胞骨格が再編成される。これらのシグナル分子の活性化制御にアフアディンが関与しており、細胞接着の形成・維持においてアフアディンは不可欠な分子の一つである。

一方、アフアディンは細胞接着以外にも細胞の運動、生存、極性といった様々な基本的細胞機能を制御する多面的な作用を持つことも見出されている。しかし、その分子機構についてはほとんど明らかになっていない。ところで最近、細胞運動に関して、細胞接着との間に密接なクロストークがあると考えられるようになってきており、そのクロストークの分子機構については、現在、世界的にも注目されている重要な研究領域である。アフアディンは細胞運動と細胞間接着両方の制御に関わっており、同様に、低分子量 G タンパク質などの分子についても両細胞現象に必要であることが見出されている。一方、多くの異なる分子が細胞運動、細胞間接着それぞれに個別に関わっていることも事実であり、また、両細胞現象に関わる同一分子についてもその時空間的な活性化や挙動についてはそれぞれ異なっていることがある。このように、細胞間接着と細胞運動については相同性と相違性があるがそれらの作用機序についてはほとんど分かっておらず、この作用機序の解明については重要な課題と言える。

また、アフアディンノックアウトマウスは胎生初期 (胎生 8.5 日) に致死となることから (Ikeda et al. *J Cell Biol.* 1999)、アフアディンは個体形成において重要な分子であるものの、胎生初期致死であるため、逆に、各臓器におけるアフアディンの作用機序については十分に解析できていない。アフアディンが持つ多面的細胞機能を *in vivo* レベルで解明するためには、コンディショナルノックアウトマウスを用いた検討が必要である。

## 2. 研究の目的

アフアディンが持つ多面的細胞機能の制御機構を明らかにするため、以下の 2 項目を

中心に解析を行った。

(1) 細胞の運動、生存、極性などの基本的な細胞機能の中でも、細胞運動とその際の極性形成における機序について、アフアディンが果たす役割とその分子機構を明らかにすること。

(2) 臓器特異的なアフアディン欠失マウス (コンディショナルノックアウトマウス) を作製し、それらのマウスを用いて生体内でのアフアディンの多面的な細胞機能を明らかにすること。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞運動とその際の極性形成におけるアフアディンの役割とその分子機構

① NIH3T3 細胞を使用し、細胞運動刺激として 30 ng/ml 血小板由来増殖因子 (PDGF) を投与した。一定の方向から刺激できるよう  $\mu$ -Slide VI (Ibidi 社製) チャンバースライドを使用した。

② 運動方向における細胞の形態変化 (極性形成) を、細胞のアクチン線維を染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (ニコン社製) で観察した。

③ 細胞運動の程度は、ボイデンチャンバー (ポアサイズ 8  $\mu$ m) を用いて計測した。

④ アフアディンをノックダウンした NIH3T3 細胞および、アフアディンの各ドメイン (図 1) を欠失したものを発現した NIH3T3 細胞を作製した。



図 1 アフアディンの各ドメイン

(2) アフアディンコンディショナルノックアウトマウスを用いた解析

Cre/loxP システムを用いてアフアディンコンディショナルノックアウトマウスを作製した。具体的には、アフアディン遺伝子の第 2 エキソン両側に loxP を有する Afadin-flox マウスと、心臓特異的または内皮細胞特異的に Cre を発現する Myh6-Cre マウスまたは Tie2-Cre マウスとをそれぞれ掛け合わせることで、心筋細胞特異的または内皮細胞特異的にアフアディンを欠失したマウスを作製した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 細胞運動とその際の極性形成におけるアファディンの役割とその分子機構

NIH3T3 細胞を PDGF で刺激すると、刺激方向に向かって、特徴的な形態である運動先導端を形成し、その方向への運動能が上昇した。逆に、アファディンをノックダウンした NIH3T3 細胞においては、運動先導端の形成が著明に抑制され、ボイデンチャンバーアッセイにおける細胞運動も有意に低下した。したがって、アファディンは細胞運動およびその際の細胞極性の形成を促進していることが見出された。

アファディンノックダウン NIH3T3 細胞に、アファディンのそれぞれのドメインを欠失させたアファジン変異体を導入することで、PDGF 刺激による運動先導端形成や細胞運動がどのように回復するかを解析した。アファジン変異体が導入された細胞が分かるように、それぞれのアファジン変異体には N 末端側に GFP を付加した。この解析の結果、F-アクチン結合領域、PDZ ドメイン、PR ドメインをそれぞれ欠失させたアファディンを導入した細胞では、野生型アファディンを導入した細胞と比較して変化は見られなかった。しかし、RA ドメインまたは DIL ドメインを欠失させたアファディンを導入した細胞では、野生型アファディンを導入した細胞と比較して、運動先導端形成および細胞運動は有意に低下した (図 2)。このことより、アファディンの RA ドメイン、DIL ドメインは、PDGF による運動先導端形成および細胞運動に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

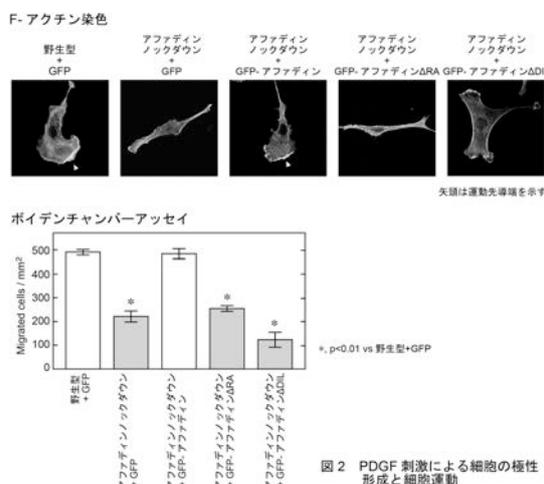


図 2 PDGF 刺激による細胞の極性形成と細胞運動

RA ドメインは、一般に低分子量 G タンパク質 Ras または Rap1 が結合する領域である。アファディンの RA ドメインには Ras はほと

んど結合しないが、活性化した Rap1 はよく結合する。そこで、アファジン RA ドメインが PDGF 刺激による細胞運動において、どのように作用しているか検討した。PDGF 刺激により、PDGF 受容体が活性化するとアダプター分子 Crk が PDGF 受容体に結合した。Crk は Rap1 の活性化因子 C3G の活性化を促進することで Rap1 を活性化する。このようにして活性化した Rap1 がアファジン RA ドメインに結合して、アファジン PDGF 受容体が集積する運動先導端部位へとリクルートすることが分かった。

DIL ドメインは、アファジンに結合する ADIP 分子が付着する部位である。また、今回の検討により、ADIP は低分子量 G タンパク質 Rac の活性化因子 Vav2 と結合することを見出した。活性化した Rac はアクチン線維の再編成を引き起こし、細胞縁部でラメリポディアと呼ばれる細胞突起形成を促進することが知られている。実際、アファジンと結合できない ADIP 変異体を細胞に導入すると、PDGF 刺激下での Rac の活性化は抑制され、運動先導端形成や細胞運動も抑制された (図 3)。以上の検討により、アファジンは、細胞接着に関わる低分子量 G タンパク質と相互作用して、細胞運動およびその際の細胞極性形成を制御するメカニズムが明らかとなった。

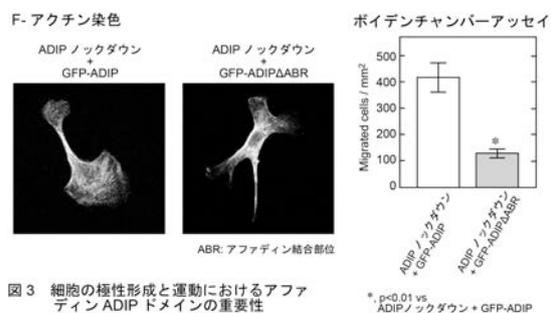


図 3 細胞の極性形成と運動におけるアファジン ADIP ドメインの重要性

##### (2) アファジンコンディショナルノックアウトマウスを用いた解析

###### ① 心筋細胞特異的アファジン欠失マウスの解析

心筋特異的アファジン欠失マウスは、メンデルの法則に従って産出され、生育過程および外観において、コントロールマウスとの差は認められなかった。また、心臓の外観、心臓エコーによる心機能評価およびヘマトキシリン-エオジン染色による心筋の顕微鏡観察においても、心筋特異的アファジン欠失マウスとコントロールマウスとの間で有意な差は認められなかった。凍結切片を用いた免疫染色では、コントロールマウスでア

ファディンは介在板部位に存在していたが、心筋特異的アファディン欠失マウスでは介在板でのアファディンの染色は全く見られなくなった (図 4)。

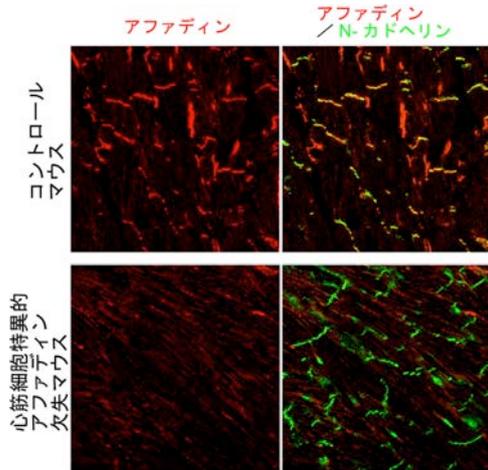


図 4: 心筋の免疫染色写真

次に、アンジオテンシン II を持続投与 (400 ng/min/kg) することで血圧を上昇させ、心負荷をかける実験を行った。2 週間アンジオテンシン II を持続投与すると、コントロールマウス、心筋特異的アファディン欠失マウス共に、同様に血圧が上昇した。心臓エコーによる心機能評価では、両マウス間で有意な差は見られなかった。しかし、心筋細胞の肥大の程度は、心筋特異的アファディン欠失マウスで有意に抑制された (図 5)。すなわち、アファディンは心肥大の促進に関わっている可能性が示唆された。

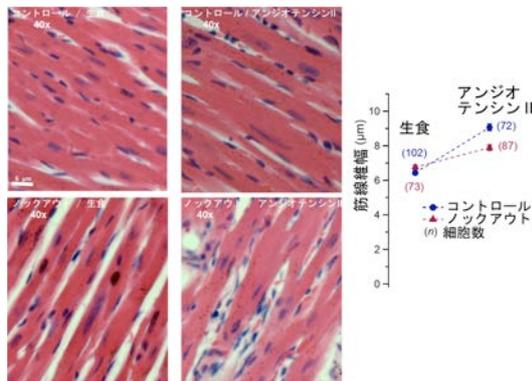


図 5: 心筋のヘマトキシリン-エオジン染色写真

## ②内皮細胞特異的アファディン欠失マウスの解析

心筋特異的アファディン欠失マウスと異なり、内皮細胞特異的アファディン欠失マウスは、胎児期に著明な浮腫を来し、ほとんどが胎生致死となった (図 6)。胎生期 14.5 日目のアファディン欠失マウスにおける脈管系の形態では、リンパ管の内皮細胞間接着は破綻し、リンパ管形成に大きな異常が見られた (図 7)。一方、血管形成はほぼ正常であっ

た。また、リンパ管内皮細胞において分化の異常は見られなかった。

コントロールマウス 内皮細胞特異的アファディン欠失マウス

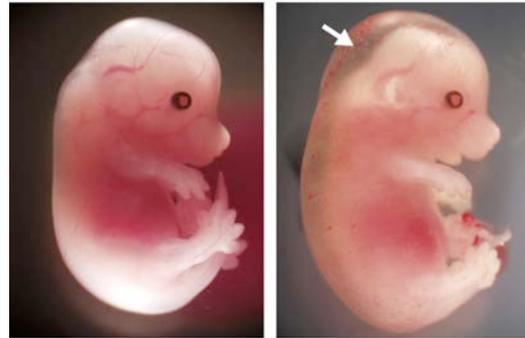


図 6: 胎仔マウス外観 (胎生期 14.5 日目)

白矢印は、著明な浮腫を示す

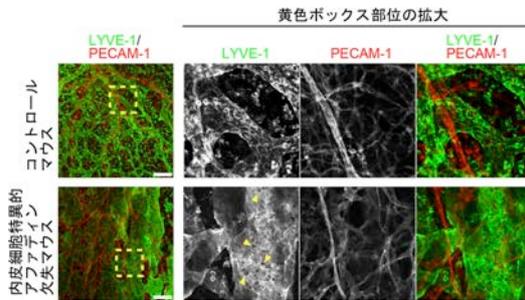


図 7: リンパ管の様態 (胎生期 14.5 日目)

アファディンの欠失が血管内皮細胞ではなく、リンパ管内皮細胞優位に影響を及ぼすメカニズムを明らかにするため、ヒト新生児微小血管内皮細胞 (HMVEC-B) とヒト新生児微小リンパ管内皮細胞 (HMVEC-L) を用いてさらに検討を行った。これらの細胞においてノックダウンによりアファディンの発現を抑制すると、HMVEC-L のみに細胞の萎縮と細胞間接着の破綻が見られ、細胞間接着マーカーである VE-カドヘリンの染色シグナルも減弱していた。また、アファディンをノックダウンした HMVEC-L では、細胞の萎縮に関わる細胞周囲のアクチン線維束が増大しており、低分子量 G タンパク質 RhoA の活性は、アファディンをノックダウンした HMVEC-B と比較して、著明に増加していた。逆に、アファディンをノックダウンした HMVEC-L にドミナントネガティブ RhoA を導入して RhoA 活性を阻害すると、細胞の形態が正常化した。以上の結果より、アファディンは、リンパ管内皮細胞の RhoA の活性レベルを厳密に調節することにより、内皮細胞間の細胞接着を維持させ、胎児期のリンパ管形成を制御していると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Majima T, Takeuchi K, Sano K, Hirashima M, Zankov DP, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Miyoshi J, Ogita H. An Adaptor Molecule Afadin Regulates Lymphangiogenesis by Modulating RhoA Activity in the Developing Mouse Embryo. *PLoS One*. 2013; 8: e68134. 査読あり  
DOI: 10.1371/journal.pone.0068134
- ② Hatoh T, Maeda T, Takeuchi K, Ogikubo O, Uchiyama S, Otsuka T, Ohkubo I, Ogita H. Domain 5 of high molecular weight kininogen inhibits collagen-mediated cancer cell adhesion and invasion in association with  $\alpha$ -actinin-4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 427: 497-502. 査読あり  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.09.079
- ③ An LP, Maeda T, Sakaue T, Takeuchi K, Yamane T, Du PG, Ohkubo I, Ogita H. Purification, molecular cloning and functional characterization of swine phosphatidylethanolamine-binding protein 4 from seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 423: 690-696. 査読あり  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.016
- ④ Fukumoto Y, Kurita S, Takai Y, Ogita H. Role of Scaffold Protein Afadin Dilute Domain-interacting Protein (ADIP) in Platelet-derived Growth Factor-induced Cell Movement by Activating Rac Protein through Vav2 Protein. *J Biol Chem*. 2011; 286: 43537-43548. 査読あり  
DOI: 10.1074/jbc.M111.308858
- ⑤ Kurita S, Ogita H, Takai Y. Cooperative role of the nectin-nectin and nectin-afadin interactions in the formation of the nectin-based cell-cell adhesion. *J Biol Chem*. 2011; 286: 36297-36303. 査読あり  
DOI: 10.1074/jbc.M111.261768

[学会発表] (計 17 件)

- ① Pang Xiaoling, Toshinaga Maeda, Keisuke Takeuchi, Hisakazu Ogita. Regulation of macrophage apoptosis by

lipoprotein-associated phospholipase A2 through the caspase-7 and Akt pathways. 日本循環器学会 2014 年 3 月 22 日・東京

- ② 真島崇、扇田久和 アダプター分子アフアディンによる単量体 GTP アーゼ RhoA を介したリンパ管形成の制御機構 日本血管生物医学会 2013 年 9 月 27 日・豊中
- ③ Keisuke Takeuchi, Takashi Majima, Jun Miyoshi, Hisakazu Ogita. An Adaptor Protein Afadin Regulates Lymphatic Vessel Development by Modulating RhoA Activation. American Heart Association 2012 年 11 月 6 日・Los Angeles, USA.
- ④ 竹内圭介、前田利長、扇田久和 高分子キニノーゲン・ドメイン 5 とアクチニン-4 との相互作用によるがん細胞の細胞接着阻害機構 (Domain 5 of high molecular weight kininogen attenuates cell adhesion of cancer cells in association with actinin-4) 日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 20 日・札幌
- ⑤ 福元友梨、扇田久和、栗田宗一、水谷清人、高井義美 足場タンパク質 ADIP による Vav2 と Rac を介する細胞運動制御 日本生化学会大会 2011 年 9 月 24 日・京都

[図書] (計 1 件)

- ① 扇田久和 細胞間接着破綻 がんの浸潤・転移—臨床と基礎— 2011, 150-161. 南山堂

[その他]

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqbioch2/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

扇田 久和 (OGITA, Hisakazu)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 50379236