

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440084

研究課題名(和文) 平面内極性の制御分子DAAM1による細胞間接着F-アクチンの制御機構の解析

研究課題名(英文) Effects of DAAM1, a PCP effector, on F-actin regulation at cell-cell junctions

研究代表者

西村 珠子 (Nishimura, Tamako)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・訪問研究員

研究者番号：40415261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞の細胞間接着は頂端部接着複合体と接着側面部により構成されているが、接着側面部の制御機構についてはこれまで明らかでなかった。我々は、forminファミリーのアクチン重合制御分子DAAM1が接着側面部に分布し、DAAM1ノックダウンにより接着側面部の運動性亢進、細胞層の異常形成、および3次元培養体からの細胞の逸脱が起こることを見出した。またこの接着側面部の運動性亢進には、Rac-WAVE2複合体-Arp2/3複合体が関与することも見出した。従って、接着側面部には元来WAVE2複合体に依存した運動性があるが、DAAM1がこれに競合的に作用することにより、接着構造が安定化されると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Epithelial junctions comprise two subdomains, the apical junctional complex (AJC) and the adjacent lateral membrane contacts (LCs), that span the majority of the junction. The AJC is lined with circumferential actin cables, whereas the LCs are associated with less-organized actin filaments whose roles are elusive. We found that DAAM1, a formin family actin regulator, accumulated at the LCs, and its depletion caused dispersion of actin filaments at these sites. DAAM1 loss enhanced the motility of LC-forming membranes, leading to their invasion of neighboring cell layers, as well as disruption of polarized epithelial layers. We found that components of the WAVE complex and its downstream targets were required for the elevation of LC motility caused by DAAM1 loss. These findings suggest that the LC membranes are motile by nature because of the WAVE complex, but DAAM1-mediated actin regulation normally restrains this motility, thereby stabilizing epithelial architecture.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アクチン DAAM1 WAVE2 接着側面部

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は、互いに接着して組織を形成するとともに、運動または変形して組織の形を適切に変化させる。上皮細胞層の頂端側にある細胞間接着部位は、接着分子カドヘリン等から成る Adherens Junction (AJ) と、それを裏打ちする F-アクチンベルトから成る。AJ の F-アクチンは接着構造の形成・維持に関与すると共に、細胞が運動・変形する際には構造変化や収縮を起こす。しかしながら、その制御機構はまだ完全には明らかでない。

私たちは、脳・脊髄の前駆体である神経管の形成時に、神経上皮細胞層 AJ の F-アクチンが収縮し、細胞層の陥入を惹起する機構について研究してきた。そして、神経上皮細胞層 AJ の F-アクチンが背腹軸方向に収縮することが神経管形成に重要であり、またその分子機構として、平面内極性 (PCP) の制御分子 *Celsr1* が極性分布し、PCP シグナル系を介して ROCK を背腹軸方向に活性化することを発見した。その過程で、PCP 制御分子の 1 つである DAAM1 が、上皮細胞層の AJ に分布していることを見出した。DAAM1 はアクチン重合を制御する formin family に属するため、AJ に局在する F-アクチン形成を直接制御している可能性が高いと考えられる。しかしながら、AJ における DAAM1 の分子機能についてはこれまで明らかでなかった。

2. 研究の目的

本研究は、PCP シグナル系制御分子でかつ formin family のアクチン重合制御分子でもある DAAM1 が、AJ における F-アクチン制御を介して、上皮細胞層の維持および変形にどのような役割を果たしているかを明らかにすることを目的とする。

DAAM1 は、神経上皮細胞層を含め種々の上皮細胞層で AJ に局在が認められる。また予備実験により、DAAM1 が AJ 構成分子と相互作用すること、また DAAM1 を培養上皮細胞でノックダウンすると、AJ の F-アクチンベルトが減弱することを見出していた。

そこで、培養上皮細胞を用いて、まず DAAM1 の AJ への局在メカニズムを明らかにする。次に、DAAM1 が F-アクチンベルトや様々な AJ 制御分子に与える影響について調べ、細胞接着の形成・維持への関与について明らかにする。さらにライブイメージングを行い、F-アクチンベルトや AJ 分子の挙動における DAAM1 の影響を詳細に観察する。そして最終的には *in vivo* の系を用いて、PCP シグナル系における DAAM1 依存的な F-アクチン制御機構の関与を調べる。

3. 研究の方法

予備的検討で AJ における内在性 DAAM1 の分布が明確に検出された乳腺上皮細胞株 EpH4 細胞を主に検討に用いた。

AJ における DAAM1 の F-アクチン制御メカニズムを解明するため、まず、培養上皮細胞

を用いて DAAM1 の AJ への局在機構について検討した。次に、DAAM1 が F-アクチンおよび AJ 構成・制御分子の分布に与える影響について検討した。またライブイメージングにより、F-アクチンプロブや E-カドヘリン分子の挙動に対する DAAM1 の動的役割を調べた。

DAAM1 の AJ への局在機構について

DAAM1 の種々の deletion mutants を作製して培養上皮細胞で発現して免疫染色を行い、AJ への局在に必要なドメインを同定した。また、培養細胞の過剰発現系での免疫沈降により、DAAM1 と AJ 分子との相互作用を調べた。さらに、E-カドヘリンをノックダウンした際に、DAAM1 の AJ への局在が抑制されるかを調べた。

DAAM1 が AJ の F-アクチンおよび AJ 分子に与える影響について

DAAM1 をノックダウンした際の、種々の細胞間接着分子への影響を調べた。また、DAAM1 の F-アクチンおよび AJ 構成分子の動態への影響をライブイメージングにより調べた。F-アクチンは Lifeact-EGFP で、AJ 分子は E-カドヘリン-EGFP でラベルを行い、DAAM1 のノックダウンを行った際の影響を観察した。

DAAM1 の細胞層の形成・維持における生理的役割について

DAAM1 shRNA を恒常的に発現する細胞株を作製した。この DAAM1 ノックダウン細胞を transwell で 2 週間培養し、細胞層形成への影響を調べた。また、マトリゲル中で 3 次元培養を行い、スフェロイド形成への影響を調べた。さらに、正常細胞と DAAM1 ノックダウン細胞を混合培養した際の影響も調べた。

4. 研究成果

上皮細胞の細胞間接着に局在する F-アクチンは、細胞層の運動や変形に重要であるが、その制御機構は完全には明らかでない。我々は、神経管形成時において、神経上皮細胞層 AJ の F-アクチンが極性収縮する際に、formin の一種である DAAM1 が関与することを見出した。DAAM1 は種々の培養上皮細胞で AJ に分布が認められたものの、その役割については未解明であった。そこで本研究では、DAAM1 による上皮細胞 AJ の F-アクチン制御の可能性について検討を行った。

乳腺上皮細胞株 EpH4 細胞の内在性 DAAM1 を染色したところ、細胞間接着に分布していた。その局在機構について deletion 解析を行ったところ、N 末端領域で分布することが分かった。そこで、DAAM1 の N 末端領域を発現した細胞を用いて、免疫沈降物の MS 解析を行ったところ、カドヘリンカテニン複合体を含む種々の AJ 構成分子との相互作用が検出された。また、E-カドヘリン細胞内領域および β -catenin の GST タンパクを発現・精製し、DAAM1-N 末端領域を発現した細胞の破砕物と反応させたところ、DAAM1 が E-カドヘリンの細胞内領域と相互作用することがわかった。さらに、細胞で E-カドヘリ

ンをロックダウンしたところ、Nectin1により細胞間接着が形成された部分においても、DAAM1の分布が抑制されることが分かった。

次に、細胞間接着におけるDAAM1の分布をより詳細に調べたところ、細胞間接着の側面部に特異的に分布していることが分かった。DAAM1をロックダウンすると、接着頂端部におけるF-アクチン分布はほとんど変化しなかったものの、側面部におけるF-アクチン分布が特異的に減少した。また、DAAM1ロックダウン細胞でE-カドヘリンの分布を調べたところ、接着側面部のE-カドヘリンが基底側に著しく広がって分布していることが分かった。

そこで、F-アクチンプローブLifeact-EGFPを発現した細胞でライブイメージングを行ったところ、DAAM1をロックダウンすると側面部F-アクチンが活発に動くようになることが分かった。また、E-カドヘリン-EGFPを発現した細胞でライブ観察を行ったところ、DAAM1ロックダウンにより側面部E-カドヘリンも活発に動くことが分かった。

これらの現象がDAAM1のアクチン重合活性に依存しているかを確認するため、DAAM1ロックダウン細胞に、野生型DAAM1またはアクチン重合活性を欠くDAAM1変異体を発現したところ、野生型DAAM1ではF-アクチンおよびE-カドヘリン分布がレスキューされたのに対し、アクチン重合変異体ではレスキューされなかった。従って、これらの現象はDAAM1のアクチン重合活性に依存することがわかった。

DAAM1は低分子GタンパクRhoAの結合により活性化することが知られている。そこでRhoAをロックダウンした結果、DAAM1ロックダウン細胞と同様に接着側面部のF-アクチンの低下とE-カドヘリンの基底部への分布、並びに側面部F-アクチンおよびE-カドヘリンの活発な動きが認められた。これらのフェノタイプは、DAAM1の活性型変異体の発現によりレスキューされたことから、RhoAはDAAM1の上流で接着側面部の安定化を制御していると考えられた。ただし、RhoAをロックダウンすると頂端部F-アクチンの分布量も低下したことから、RhoAは頂端部および側面部の両方でF-アクチンを制御していると考えられた。

そこで次に、DAAM1の生理的重要性を調べる目的で、DAAM1 shRNAをステーブルに発現したDAAM1ロックダウン細胞株を作製した。まず、DAAM1の細胞層形成への影響を調べるため、コントロール細胞およびDAAM1ロックダウン細胞をトランスウェルで2週間培養したところ、DAAM1ロックダウン細胞では接着側面部へのF-アクチンおよびE-カドヘリンの集積がみられず、核の位置がコントロール細胞のように頂端面に寄っておらずバラバラであり、かつ頂端部の面積が大小様々な、異常な細胞層が形成された。従ってDAAM1は細胞層の形成に重要であることがわかった。

また、細胞をマトリゲル中で3次元培養したところ、コントロール細胞では細胞同士が緊密に接着した球状のスフェロイドが形成されたのに対し、DAAM1ロックダウン細胞では細胞間の接着がゆるく、かつ細胞がスフェロイドの側底部からマトリゲル中に逸脱する様子が頻繁に観察された。従って、DAAM1は細胞層の安定形成にも重要であることが判明した。

一方、コラーゲンゲル上で培養した細胞にmembrane-EGFPを発現し、コンフルエントまで培養してからライブイメージングを行ったところ、DAAM1ロックダウン細胞は接着側面部から頻繁に突起を出す活性を出していることがわかった。さらに、コントロール細胞とDAAM1ロックダウン細胞の混合培養を行ったところ、特に隣接細胞が正常細胞の場合に、DAAM1ロックダウン細胞からの突起形成が促進されることも分かった。従って、DAAM1ロックダウンにより、接着側面部からの突起形成が促進されることが示唆された。

そこで、DAAM1ロックダウンにより側面部からの突起形成が引き起こされるメカニズムを追求した。まず、ラメリポディアの形成に関与することが知られるRacに着目し、DAAM1ロックダウン細胞にRac阻害剤を反応させたところ、接着側面部の動きがほぼ停止することが分かった。そこで、Racにより活性化されラメリポディアの形成に関与することが知られるWAVE2複合体の分布を調べたところ、構成分子がいずれも接着側面部に分布することがわかった。そこでDAAM1とWAVE2をダブルロックダウンしたところ、接着側面部の基底部への広がりおよび活発な動きが抑制されることが分かった。

さらに、WAVE2複合体と相互作用してラメリポディア形成および細胞移動に関与すると報告されているlamellipodinの分布を調べたところ、接着側面部に分布し、DAAM1とのダブルロックダウンにより接着側面部の広がりが抑制されることがわかった。一方、WAVE2複合体の下流で枝分かれアクチンの重合に関与するArp2/3複合体にも着目し、Arp2/3複合体の阻害剤をDAAM1ロックダウン細胞に反応させたところ、接着側面部の基底部への広がりおよび活発な動きが抑制された。従って、DAAM1ロックダウンに伴う接着側面部の突起形成には、Rac-WAVE2複合体-Arp2/3複合体およびlamellipodinが関与すると考えられた。

以上の結果から、DAAM1は上皮細胞の接着側面部に分布し、アクチン重合を促進することで、Rac-WAVE2複合体-Arp2/3およびlamellipodinを介した接着側面部の活発な動きを抑制し、細胞間接着を安定化や、細胞層の形成に関与することが推測された。

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2件)

Tamako Nishimura, Shoko Ito, Hiroko Saito, Sylvain Hiver, Kenta Shigetomi, Junichi Ikenouchi and Masatoshi Takeichi
DAAM1 stabilizes epithelial junctions by restraining WAVE complex-dependent lateral membrane motility
Journal of Cell Biology, 215(4):559-573 (2016) (査読有り)
DOI: 10.1083/jcb.201603107

西村珠子、竹市雅俊
「折れ曲がる - ニワトリの神経管形成を例に」
実験医学, 33 (3): 399-404 (2015) (査読なし)

〔学会発表〕(計3件)

西村珠子、竹市雅俊
Formin分子DAAM1は細胞間接着側面部におけるWAVE複合体依存性運動を抑制することにより上皮構造を安定化する
第68回日本細胞生物学会大会、2016年6月17日、京都テルサ(京都府京都市)

西村珠子、竹市雅俊
平面内極性関連因子DAAM1は上皮細胞側面部でのアクチン繊維及びカドヘリンの制御を介し細胞層を安定化する
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、2015年12月3日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Tamako Nishimura and Masatoshi Takeichi
DAAM1 stabilizes epithelial lateral contacts through regulation of F-actin and E-cadherin.
Gordon Research Conference on Cell contacts and Adhesion、2015年7月1日、Proctor Academy (Andover, NH, USA)

〔図書〕(計1件)

Tamako Nishimura
Making the neural plate to fold into a tube.
New Principles in Developmental Processes, Springer, 123-136 (2014) (査読なし)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.cdb.riken.jp/news/2016/researches/1226_12474.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 珠子 (NISHIMURA, Tamako)
国立研究開発法人理化学研究所・多細胞シ
ステム形成研究センター・訪問研究員
研究者番号: 40415261

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし