

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22年 4 月 28 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17079009

研究課題名（和文） G 蛋白質シグナルによる物質輸送ダイナミズムのイメージング解析

研究課題名（英文） G protein-regulated trafficking analyzed by bio-imaging

研究代表者

望月 直樹 (MOCHIZUKI NAOKI)

国立循環器病センター研究所・循環器形態部・部長

研究者番号：30311426

研究成果の概要（和文）：低分子量 GTP 結合蛋白質（G 蛋白質）は、細胞内情報伝達を制御する分子として不可欠である。細胞の形態や蛋白質・脂質の移動も制御している。分子の挙動・移動の分子メカニズムは、生きた細胞をイメージングすることによって理解できると考えた。低分子量 G 蛋白質 Rap1 による細胞間接着分子の vascular endothelial cadherin(VEC)分子の制御機構について、イメージングを駆使して研究し、Rap1 が VEC の安定化に重要であることを突き止めた。

研究成果の概要（英文）：Small GTPases are essential for intracellular signaling and regulate cytoskeleton and vesicular trafficking containing proteins and lipids. We assumed that molecular mechanism how the trafficking is regulated can be clarified only by imaging using living cells. We have investigated Rap1-regulated signal and demonstrated that VE-cadherin stabilization at the cell-cell contacts is controlled by Rap1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,100,000	0	9,100,000
2006年度	13,600,000	0	13,600,000
2007年度	13,600,000	0	13,600,000
2008年度	13,600,000	0	13,600,000
年度	13,600,000	0	13,600,000
総計	63,500,000	0	63,500,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学、細胞生物学

キーワード：低分子量G蛋白、情報伝達、輸送、VE-cadherin、Rap1

1. 研究開始当初の背景

(1) Rap1 の Ras との拮抗作用以外の機能 Rap 独自の機能が続いて明らかにされてきている。また、本申請者は Rap1 結合蛋白質 RAPL が微小管に結合していることを見出し、

細胞遊走に Rap1-RAPL が深くかかわることを見つけた。この原因として(i)微小管のダイナミクスを調節する（微小管の伸展を制御する可能性）(ii) 微小管上の分子輸送を制御する可能性を考えた。本研究ではこの Rap1-

微小管上の RAPL が細胞運動時に、細胞の retracting 領域から前進部分への物質の移動にかかわるのではないかと考えた。

(2) Rap1 が細胞間接着を制御することをつきとめる実験を行っている際に、①vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) 分子の細胞内へのエンドサイトーシスを抑制することあるいは、②VE-cadherin 分子のエンドソームから細胞膜へのリサイクリング ③ゴルジ器官からのエキソサイトーシスのいずれかもしくはこれらが協調して VE-cadherin の輸送を調節している結果を得ている。VE-cadherin 分子を細胞接着部位に能動的に輸送した結果として次々に細胞間接着が形成されていく可能性が考えられた。

(3) R-Ras ファミリー分子は Ras ファミリーのなかでも線虫から哺乳類まで存在し、Ras 分子とエフェクターが同じであると考えられているが、特異的な作用が明らかにされていない。インテグリンによる細胞接着を増強すると考えられているがそのメカニズムも不明である。本申請者は R-Ras 分子が、モーター分子である Myosin IX に強く結合するという結果を得ている。Myosin IX 分子は構造から単頭ミオシンと考えられているが、その分布や機能についても報告が殆どない。アクチンと結合することは本質的な生物学的現象と予想できるが、R-Ras と結合した Myosin IX がモーター分子としてどのように機能するかは、非常に興味を持たれる。

2. 研究の目的

上記背景をもとに「低分子量 GTP 結合蛋白質 Rap1, R-Ras の物質輸送の調節機構バイオイメージングであきらかにする」ことを目的に研究計画を立てた。

(1) Rap1 が微小管制御をすることにより、微小管に沿って動く分子の調節をするメカニズムを分子イメージングによって検討することを目的とした。Rap1 の微小管調節因子(エフェクター分子)を明らかにすることで如何にして微小管機能と分子移動を調節するかを明らかにする。

(2) Rap1 がゴルジ器官からのエキソサイトーシスを制御するか否かを明らかにする。エンドソームに蓄積される VE-cadherin が如何にして、細胞間接着部位の VE-cadherin に移動するかを明らかにすることを目的とした。

(3) R-Ras とミオシンの結合が如何にして分子・物質輸送を調節するのか、そのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Rap1 に結合する Rassf ファミリー分子の細胞内動態の検討を行う：とくに細胞運動における、細胞接着分子と微小管との関係について調べる。Rassf ファミリーは Rassf1, Rassf2, Rassf3, RAPL/NORE1 がこれまで同定されているが、Rassf1 は微小管を強く変形させるのに対して、Rassf3, RAPL はしなやかな微小管を保持して微小管に局在している。このため RAPL に着目してその機能の詳細を RAPL-EGFP による挙動の観察を行い微小管制御機構を調べる。

(2) Rap1 による VE-cadherin 分子の輸送の検討：細胞間接着部位へ移動するか否かを検討する。このためには、cadherin 分子の Ca²⁺スイッチによる局在変化を GTP-Rap1 の存在下でみるか RapGAP を発現させた GDP-Rap1 の条件で見ることが必要である。さらに、これまで FRET プローブを細胞に導入したときに、内因性の Rap1 の活性化が細胞内部で見られていたが、この意義は明らかでなかった。本研究計画では、この Rap1 の細胞内部での活性化がエクソサイトーシスに関係すると考え、golgi に RapGAP を局在化させたときの分子輸送を調べる。また、エクソサイトーシスは GFP タグ付き VE-cadherin 分子の移動を Ca²⁺スイッチでみる。

(3) R-Ras 活性化可視化プローブの作製：Rap1 の可視化プローブと同様に、YFP-R-Ras-RA domain (Myosin IX)-CFP からなるキメラ分子を作製する。分子内 FRET を検出するシステムは既に確立しており、本プローブが機能すると予想している。まず、細胞運動・細胞接着における R-Ras 活性化のモニターングが行えるかどうかを調べる。そして、R-Ras の活性化と、Myosin IX の細胞内局在変化がリンクするか検討する。

4. 研究成果

(1) VE-cadherin の C 末端に GFP タグを付加して(VE-cadherin-GFP)、生きた血管内皮細胞でその挙動を観察したところ、VE-cadherin 接着の乖離とともに、VE-cadherin が細胞内に取り込まれさらにエンドソームに局在していくことを明らかにした。Rap1 活性化による VE-cadherin の細胞間安定化機構を VE-cadherin-GFP の挙動を解析することで明らかにした(図1)。

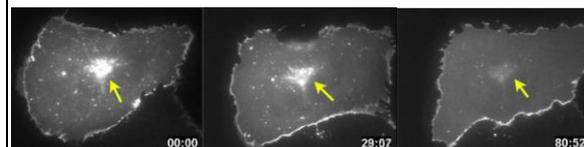


図1. cAMP-Epac-Rap1 によるエンドソームからの VE-cadherin の移動。エンドソームに蓄積した VE-cadherin-GFP (→) が細胞内 cAMP の増加により細胞間接着部位に移行する(細胞は蛍光像なので囲まれているように見える明視野では細胞は囲まれている)

①このエンドゾームから細胞膜への再移動が cAMPの細胞内の増加により促進されることを明らかにした。cAMPはEpacを介して Rap1を活性化することから Rap1が VE-cadherin のリサイクリングを調整していることが示唆された。

② Rap1を介したエンドゾームからのリサイクリングのメカニズムの候補として Rab5の活性化因子 RINファミリー分子と Rap1との結合を検討した。Rap1が RINと結合することを免疫沈降法と GST-RIN(Ras結合ドメイン)のプルダウン法で確認できた。

③ エンドゾームで Rap1が活性化されることが VE-cadherinのエンドゾームからの輸送に重要であるか？あるいは細胞膜上で Rap1が活性化されても輸送が促進されるのかを調べた。Rap1の活性化因子である C3G, Epac, PDZ-GEF1のグアニンヌクレオチド交換活性部位と FKBPの融合蛋白質を細胞内に発現させるシステムを先ず構築した。さらに膜移行シグナルのミリスチン酸化 FRBを細胞膜に発現させて、rapamycin依存性に FRB-FKBPを結合させることすなわち GEFドメインを細胞膜に強制的に移行させ、Rap1を活性化させたときの VE-cadherinの輸送を検討した。Rap1が活性化したことは、細胞膜の伸展が観察されることで確認できた。エンドゾームからの VE-cadherinの輸送も Rapamycin添加によって促進されることから Rap1の細胞膜上での活性化が重要であることを突き止めた。いずれの GEFによってもこの作用を認めることから Rap1の活性化が重要であることがわかった。興味深いことに、Racの活性化つまり膜進展が起きる作用でも VE-cadherinのエンドゾームからの輸送が促進された。以上の結果から、新たな膜形成機構(膜伸展)がおきると物理的な感知機構によって、膜形成のために細胞内部から細胞膜表面分子の輸送が促進されることが示唆された。

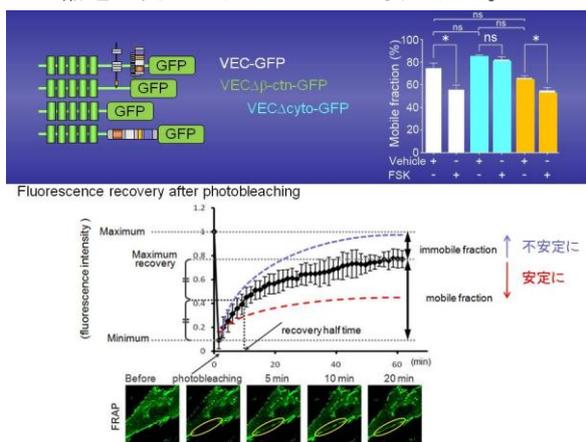


図 2. FRAP 解析による cAMP-Epac-Rap1 による VE-cadherin の細胞間接着での挙動の検討。VE-cadherin が Forskolin (FSK) 刺激により細胞間接着部位で mobility が低下していること、つまり安定化されていることがわかった。

④ VE-cadherinの細胞膜での安定化機構をイメージングによって明らかにする目的で VE-cadherinのFRAP (Fluorescence Recovery after Bleaching)実験を行った。VE-cadherin-GFPが、刺激のない培養条件では90%近くがmobile fractionであるのに対して、cAMPでは70%がmobile fractionになることからcAMPが VE-cadherinのダイナミズムをresetさせて、より安定化VE-cadherin接着を起していることもわかった。さらにVE-cadherinの細胞内ドメインがVE-cadherinの輸送(ダイナミズム)に重要であることを細胞内欠変異体や、PECAM-1との細胞内ドメインスイッチ変異体を作製して明らかにすることができた(図2)。

(2)物質輸送に関する物質輸送に関わる分子ソーティングネキシンファミリー(SNX)のなかで SNX27というのがRas結合ドメイン(RAドメイン)を有している。このRAドメインにRasファミリーG蛋白質(R-Rasを含む)が結合するか否かをスクリーニングした。これまでのこのRAドメインに結合するのはRasファミリー分子と予想されていたが、Ras, Rap1, R-Ras, RheBはSNX27には結合しないことがわかった。

(3) Rap1-RAPLの微小管におけるシグナル調節系の意義を検討した。Rap1は、細胞-基質間接着部位で活性化しており、この活性化型 Rap1に微小管結合分子 RAPLが結合することにより、微小管を細胞間接着部に誘導することで物質輸送を制御することを明らかにした。

(4) R-Rasとミオシンの相互作用と、輸送に関する研究は、本領域の根岸研究室が詳細に検討されていたので、我々は cAMP-Epac-Rap1に関する情報伝達系に注力して研究を行った。

(5) われわれは、細胞間接着に着目して低分子量 G 蛋白質 Rap1 の機能を検討してきた。cAMPだけでなく、Angiopoietin-1 (Ang1)も受容体 Tie2の活性化を細胞間接着部位で起こることを発見した。

Ang1による Tie2の活性化は主に Aktを介した細胞生存シグナルを惹起する。Ang1刺激により Rap1の活性化も起こすことから細胞間接着の増強作用を VE-cadherinを介して調節している可能性も示唆された。ただし、Ang1による Tie2の細胞間接着への局在化には VE-cadherinは必要ではないことは突き止めている。従って、Ang1-Tie2の活性化シグナルによって VE-cadherinの接着が如何にして増強するのかを明らかにすることは今後の課題である。

一得られた成果の国内外における位置づけとインパクト—

本研究により、血管内皮細胞間接着における cAMP-Epac-Rap1 シグナルによって制御される接着の安定化機構を明らかにした。まずは、細胞間接着の解離による VE-cadherin のエンドソームの蓄積がおきることを見つけた。さらに、細胞内 cAMP の増加による VE-cadherin のエンドソームから細胞間接着部位への移行の促進も認められた。cAMP-Epac-Rap1 は、VE-cadherin をアクチン細胞骨格系にリンクさせることを促進することも見出した。VE-cadherin のアクチンへのリンクは、 α -catenin を介していることも証明した。classical cadherin は、static に catenin-アクチンと複合体を形成すると言われていた。しかし、数年前に Nelson 等のグループが dynamic モデルを提唱して、static model とは異なると報告した。われわれの結果は、古典的な cadherin-catenin-アクチンの複合体を示唆する結果となった。これは、VE-cadherin と他の classical cadherin (E-cadherin, N-cadherin) との相違の可能性もある。また、E-cadherin 接着依存性のシグナルか？細胞内部の Rap1 の活性化からのシグナルの違いによる可能性もある。今後これらの点を明確にする必要がある。

図3に示すように、VE-cadherin を介した細胞間接着の安定化は cAMP-Epac-Rap1 によって制御されることがわかった。本研究では VE-cadherin に焦点をあててイメージングによりその動態を解析することで低分子量G蛋白質 Rap1 の機能を解明することができた。

vesicle trafficking については、細胞間接着蛋白だけでなく、細胞-基質間接着分子、細胞内情報伝達分子 (受容体や、リガンド) も

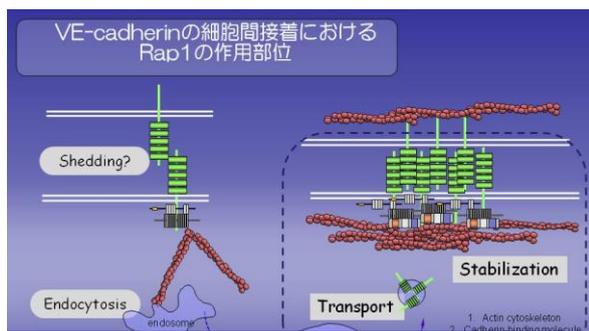


図3. cAMP-Epac-Rap1 による VE-cadherin 細胞間接着調節のまとめ。点線で囲まれたシグナル調節が cAMP-Epac-Rap1 系によっておこなわれることを明らかにした。

関係しており、非常に重要な分野である。今後も Rap1 による trafficking の調節機構は、他の trafficking 調節低分子量 G 蛋白 (Arf family 分子、Rab family 分子) の機能の解

明とともに重要であると考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計20件)

- ① Noda K, Zhang J, Fukuhara S, Kunimoto S, Yoshimura M, Mochizuki N. Vascular Endothelial-Cadherin Stabilizes at Cell-Cell Junctions by Anchoring to Circumferential Actin Bundles through α - and β -Catenins in Cyclic AMP-Epac-Rap1 Signal-activated Endothelial Cells. **Mol Biol Cell**. 21:584-96, 2010
- ② Masuda M, Mochizuki N. Structural characteristics of BAR domain superfamily to sculpt the membrane. **Semin Cell Dev Biol**. 21: 391-398, 2010
- ③ Fukuhara S, Sako K, Noda K, Zhang J, Minami M, Mochizuki N. Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. **Histol Histopathol**. 25:387-96, 2010
- ④ Murakami A, Takasugi H, Ohnuma S, Koide Y, Sakurai A, Takeda S, Hasegawa T, Sasamori J, Konno T, Hayashi K, Watanabe Y, Mori K, Sato Y, Takahashi A, Mochizuki N, Takakura N. Sphingosine 1-Phosphate Regulates Vascular Contraction via SIP3 Receptor: Investigation Based on a New SIP3 Receptor Antagonist. **Mol Pharmacol**. 77: 704-713, 2010
- ⑤ Mochizuki N. Vascular integrity mediated by vascular endothelial cadherin and regulated by sphingosine 1-phosphate and angiopoietin-1. **Circ. J.** 73: 2183-2191, 2009
- ⑥ Kawahara A, Nishi T, Hisano Y, Fukui H, Yamaguchi A, and Mochizuki N. The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. **Science** 323: 524-527, 2009
- ⑦ Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, Urano T, Zhu HJ, Tsukano H, Tazume H, Kaikita K, Miyashita K, Iwawaki T, Shimabukuro M, Sakaguchi K, Ito T, Nakagata N, Yamada T, Katagiri H, Kasuga M, Ando Y, Ogawa H, Mochizuki N, Itoh H, Suda T, Oike Y. Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. **Cell Metab** 10: 178-188, 2009
- ⑧ Mori M, Nakagami H, Koibuchi N, Miura K, Takami Y, Koriyama H, Hayashi H, Sabe H, Mochizuki N, Morishita R, Kaneda Y. Zyxin mediates actin fiber reorganization in epithelial-mesenchymal transition and contributes to endocardial morphogenesis. **Mol. Biol. Cell** 20:

- 3115-3124, 2009
- ⑨ Miura K, Nam JM, Kojima C, Mochizuki N, Sabe H. EphA2 Engages Git1 to Suppress Arf6 Activity Modulating Epithelial Cell-Cell Contacts. **Mol. Biol. Cell** 20: 1949-1959, 2009
- ⑩ Sako K, Fukuhara S, Minami T, Hamakubo T, Song H, Kodama T, Fukamizu A, Gutkind JS, Koh GY, Mochizuki N. Angiopoietin-1 Induces Kruppel-like Factor 2 Expression through a Phosphoinositide 3-Kinase/AKT-dependent Activation of Myocyte Enhancer Factor 2. **J. Biol. Chem.** 284: 5592-5601, 2009
- ⑪ Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HK³, Kodama T, Shibuya M, Takakura N, Koh GY, and Mochizuki N. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. **Nat. Cell Biol.** 10: 513-526, 2008
- ⑫ Koyama T, Nakaoka Y, Fujio Y, Hirota H, Nishida K, Sugiyama S, Okamoto K, Yamauchi-Takahara K, Yoshimura M, Mochizuki S, Hori M, Hirano T, Mochizuki N. Interaction of scaffolding adaptor protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 negatively regulates IGF-I-dependent myogenic differentiation via the ERK1/2 signaling pathway. **J. Biol. Chem.** 283:24234-24244, 2008
- ⑬ Nakaoka Y, Nishida K, Narimatsu K, Kamiya A, Minami T, Sawa H, Okawa K, Fujio Y, Koyama T,¹ Maeda M, Sone M, Yamasaki S, Arai Y, Koh GY, Kodama T, Hirota H, Otsu K, Hirano T, Mochizuki N. Gab family proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function through transmitting neuregulin-1/ErbB signaling. **J Clin. Invest** 117:1771-1181, 2007
- ⑭ Makita N, Behr E, Shimizu W, Horie M, Sunami A, Crotti L, Schulze-Bahr E, Fukuhara S, Mochizuki N, Makiyama N, Itoh H, Christiansen M, McKeown P, Miyamoto K, Kamakura S, Tsutsui H, Schwartz PJ, George Jr AL, Roden DM. Single Common Mutation in the Cardiac Sodium Channel Gene *SCN5A* with Diverse Clinical Phenotypes. **J. Clin. Invest.** 118: 2219-2229, 2008
- ⑮ Seguchi O, Takashima S, Yamazaki S, Asakura M, Asano Y, Shintani Y, Wakeno M, Minamino T, Kondo H, Furukawa H, Nakamaru K, Naito A, Takahashi T, Ohtsuka T, Kawakami K, Isomura T, Kitamura S, Tomoike H, Mochizuki N, Kitakaze M. A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. **J Clin. Invest** 117; 2812-2824, 2007
- ⑯ Yoshizaki H, Mochizuki N, Gotoh Y, Matsuda M. Akt-PDK1 Complex Mediates EGF-induced Membrane Protrusion through Ral Activation. **Mol Biol Cell** 18,119-128, 2007
- ⑰ Masuda M, Takeda S, Sone M, Ohki T, Mori H, Kamioka Y, Mochizuki N. Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. **EMBO J.** 25: 2889-2897, 2006
- ⑱ Kogata N, Arai Y, Pearson JT, Hashimoto K, Hidaka K, Koyama T, Somekawa S, Nakaoka Y, Ogawa M, Adams RH, Okada M, Mochizuki N. Cardiac ischemia activates vascular endothelial cadherin promoter in both preexisting vascular cells and bone marrow cells involved in neovascularization. **Circ Res.** 98: 897-904, 2006
- ⑲ Fukuhara S, Sakurai A, Yamagishi A, Sako K, Mochizuki N. Vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell adhesion regulated by a small GTPase, Rap1. **J Biochem. Mol. Biol.** 39: 132-139, 2006
- ⑳ Sakurai A, Fukuhara S, Yamagishi A, Sako K, Kamioka Y, Masuda M, Nakaoka Y, Mochizuki N. MAGI-1 is required for Rap1 activation upon cell-cell contact and for enhancement of VE-cadherin-mediated cell adhesion. **Mol. Biol. Cell** 17: 966-976, 2006
- [学会発表] (計 20 件)
- ① Noda K, Cho E, Fukuhara S, Mochizuki N. a cyclic AMP-Epac-Rap1 pathway induces formation of circumferential actin bundles, which stabilize junctional VE-cadherin through a/b-catenins. 49th ASCB, Dec 8, 2009, San Diego.
- ② Noda K, Cho E, Fukuhara S, Mochizuki N. A Rap1 small GTPase enhances VE-cadherin-dependent cell adhesion by inducing actin bundling at cell-cell contacts. 第 8 2 回生化学会、2009 年 10 月 22 日、神戸
- ③ 野田一臣、張江暉、福原茂朋、桜井貴子、望月直樹。低分子量 G タンパク質 Rap1 は細胞間接着部位におけるアクチン線維の束化を介して VE-cadherin 接着を増強する。第 31 回分子生物学会、2008 年 12 月 9 日、神戸
- 他 1 7 件
- [図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：スフィンゴシン1-リン酸の新規トランス
ポーター分子

発明者：望月直樹、川原敦雄、西毅、山口明
人

権利者：国立循環器病センター、大阪大学

種類：特許

番号：特願 2008-245177

出願年月日：2008年9月25日

国内外の別：国内

研究者番号：10362518

(H19-H20)

三浦 浩一 (MIURA KOUICHI)

国立循環器病センター研究所・循環器形態
部・室員

研究者番号：20360349

(H20-H21)

(3)連携研究者

なし

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/nvcv/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

望月 直樹 (MOCHIZUKI NAOKI)

国立循環器病センター研究所・循環器形態
部・部長

研究者番号：30311426

(2) 研究分担者

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

(H17-H21)

増田 道隆 (MASUDA MICHITAKA)

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：00190364

(H17-H21)

藤田 寿一 (FUJITA HISAKAZU)

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：30212187

(H17)

川原 敦雄 (KAWAHARA ATSUO)

国立循環器病センター研究所・循環器形態
部・室長