

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07390

研究課題名(和文)上皮管腔形成におけるRacGAP因子FilGAPの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of FilGAP in epithelial tubulogenesis

研究代表者

太田 安隆(Ohta, Yasutaka)

北里大学・理学部・教授

研究者番号：90192517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：嚢胞にHGFを添加すると糸状の突起構造が進展した。嚢胞でのFilGAPの発現をsiRNAで抑制すると糸状突起の形成が促進し、FilGAPを過剰発現させると阻害された。FilGAPの疑似リン酸化型変異体FilGAP(ST/D)を嚢胞で過剰発現させるとROCK阻害剤Y27632存在下でも糸状突起の形成が阻害された。嚢胞にHGFを添加して形成された管腔にY27632を添加すると細胞が遊離し管腔構造が破壊された。ところがFilGAP(ST/D)はY27632存在下でも管腔構造を安定的に維持した。以上からFilGAPはリン酸化によって管腔構造の安定化に関与していることが本研究から明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮管腔形成は、腎臓、肺、消化管など多くの器官の基本構造であり、その形成機構の解明はきわめて重要である。本研究から、管腔形成におけるFilGAPの役割の一端が明らかになった。FilGAPは動物組織の中で腎臓に高濃度に発現している。MDCK細胞も腎臓由来の細胞であり、本研究成果を腎臓の組織構築や様々な腎疾患のメカニズムの解明に役立てることが期待できる。Rho GTPaseは、上皮管腔形成だけでなく、血管などの内皮管腔構造の形成にも重要な働きをしている。本研究から得られた知見は、上皮、内皮を含めた管腔形成の理解に役立てることができる。

研究成果の概要(英文)：The cyst generates extension followed by cell chains and tubules in response to hepatocyte growth factor (HGF). The Rho GTPases play essential roles for tubulogenesis. FilGAP is highly expressed in kidney. Knock-down of FilGAP by siRNA increased the number of extensions in response to HGF, whereas over-expression of FilGAP decreased the number of the extensions. FilGAP is phosphorylated and activated in cells. Over-expression of phospho-mimic FilGAP (ST/D) mutant blocked formation of the membrane extensions induced by HGF in the presence of Y-27632. On the other hand, treatment of the tubules with Y27632 induced scattering of the cells, but FilGAP (ST/D) blocked cell scattering and promoted lumen formation. Moreover, FilGAP seems to stabilize cell-cell interaction through targeting E-cadherin at cell-cell junctions. Taken together, our study suggests that FilGAP may suppress formation of extensions whereas stabilize tubule formation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：small GTPase Rho Rac 細胞接着 管腔形成 細胞間相互作用 細胞運動 E-カドヘリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 上皮管腔組織は、腎臓、肺、消化管など様々な器官の構築に欠かせない組織である。上皮管腔は、細胞外液性因子や、細胞外マトリックスとの接着による刺激を受けると、複雑な細胞内情報伝達経路を介して形成されるが、その制御機構は不明な点が多い(1-3)。

(2) これまでの研究で、管腔形成において Rho ファミリー-small GTPase が深く関わっていることが明らかになっている。特に、MDCK 細胞の管腔形成においては、RhoA とその下流因子ミオシンのリン酸化と活性化が重要であることが分かっている。しかし、RhoA の下流でミオシン以外の因子が管腔形成に関っているのか、Rac の活性が管腔形成にどのように関与しているかも不明であった(4-7)。

2. 研究の目的

本研究は small GTPase Rac を特異的に不活化する因子 FilGAP が、動物細胞の上皮管腔形成をいかに制御しているかを明らかにすることを目的とする。MDCK 上皮細胞は、細胞外マトリックス中で培養すると嚢胞を形成する。この嚢胞に肝細胞増殖因子 HGF を添加すると、内腔をもった管腔が形成される。管腔形成には複数の small GTPase を介した複雑な細胞内情報伝達系による細胞間接着、細胞運動、細胞極性の制御が必要であるが、分子機構の多くが不明である。本研究では、FilGAP がいかに上皮管腔形成の制御に関与しているか分子レベルで明らかにすることを目的にしている。

3. 研究の方法

(1) 細胞は、イヌ腎臓由来の上皮細胞 MDCK を用いた。MDCK 細胞をマトリゲル中で 3 次元培養を行い嚢胞(cyst)を形成させた。できた嚢胞をコラーゲンゲル中に移し、HGF を添加させることで、管腔形成を誘導させた。

(2) FilGAP の機能を調べるために、siRNA で発現抑制をおこなった。また、FilGAP のリン酸化の意義は、疑似リン酸化型変異体 FilGAP(ST/D)を発現させ ROCK キナーゼの特異的阻害剤 Y27632 を点火させ検討した。

(3) 細胞内での分子の局在は間接蛍光抗体法を用いた。細胞運動は、タイムラプス顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) FilGAP は HGF 添加による糸状突起の形成を抑制する。

最初に、嚢胞形成における FilGAP の発現量の変動を調べた。マトリゲル中で MDCK 細胞を培養し嚢胞を形成させると培養開始 6 日目には FilGAP の発現量が培養初日に比べておよそ 10 倍まで増加した。しかし、siRNA で FilGAP の発現を抑制しても正常な嚢胞が形成されたことから、嚢胞の形成自体には FilGAP は必須ではないことが示唆された。

次に、管腔形成における FilGAP の役割を解析した。コラーゲン中で嚢胞に HGF を添加すると 24 時間でアクチン繊維に富んだ糸状の突起構造の進展が観察される。FilGAP の発現を siRNA で抑制すると糸状突起の数と長さが時羽化した。このことから FilGAP は糸状突起の形成に抑制的に機能していることが示唆された。

FilGAP は、細胞内でリン酸化されることで活性化される。また、Rho-ROCK の下流でリン酸化されることがわかっている。そこで FilGAP のリン酸化が HGF 添加による糸状突起の形成に与える影響を調べた。野生型 FilGAP を過剰発現させると糸状突起の形成が抑制された。さらに疑似リン酸化型変異体 FilGAP(ST/D)の方がより顕著に糸状突起の形成を阻害した。これから FilGAP はリン酸化を介して糸状突起の形成を抑制していることが示唆された。

(2) FilGAP は HGF 添加による細胞鎖の形成に必要である。

嚢胞に HGF 添加後 2 日ほどすると嚢胞から細胞鎖が形成される。FilGAP の発現を siRNA で抑制すると細胞が嚢胞から遊離し細胞鎖の形成が阻害されることがわかった。同様に、嚢胞を Y27632 で処理すると細胞鎖の形成が阻害された。これに対して疑似リン酸化型変異体 FilGAP(ST/D)を過剰発現させると Y27632 存在化でも細胞鎖を形成させることがわかった。以上から、FilGAP は細胞鎖の形成に必要な因子であることが明らかになった。

(3) HGF 添加による管腔形成における FilGAP の役割

嚢胞に HGF 添加後 3 日で管腔が形成される。疑似リン酸化型変異体 FilGAP(ST/D)を過剰発現させるとコントロールに比べてより成熟した管腔が形成された。タイムラプス顕微鏡による観察から FilGAP(ST/D)を発現した細胞は、コントロールより速い速度でより長く移動することが明らかになった。

嚢胞に HGF 添加 2 日後に Y27632 を加えると形成途中の管腔から細胞が遊離し管腔構造が崩壊

する。ところが FilGAP(ST/D)を過剰発現させると y 27632 を作用させても安定した管腔が維持されることがわかった。以上から FilGAP は管腔構造の素的化に関与していることが示唆された。

(4) FilGAP は E カドヘリンを介して細胞間接着の安定化に関与している。

E カドヘリンは上皮細胞間の接着に重要な働きをしている。そこで、管腔形成における E カドヘリンの局在が FilGAP によって制御されているかどうか検討した。E カドヘリンの細胞間接着部での局在は、FilGAP(ST/D)の過剰発現で変化しなかった。しかし、ROCK 阻害剤 Y27632 を添加するとコントロールでは E カドヘリンの細胞間接着部位での局在が減少したのに対して、FilGAP(ST/D)過剰発現細胞では管腔先端部での細胞間接着部位での E カドヘリンの局在化が Y27632 の影響を受けなかった。以上から FilGAP は E カドヘリンの細胞間接着部位での局在を介して管腔構造の安定化に関与していることが示唆された。

本研究から、FilGAP は管腔形成の後期において細胞間接着の安定化の維持に働き、細胞運動を制御していることが明らかになった。管腔形成ではミオシンモータータンパク質が重要な働きをしていることがわかっているが、本研究から RacGAP 因子 FilGAP も重要な働きをしていることが明らかになった。

「引用文献」

- [1] L.E. O'Brien, M.M. Zegers, K.E. Mostov, Opinion: Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (2002) 531-537.
- [2] S. Sigurbjornsdottir, R. Mathew, M. Leptin, Molecular mechanisms of de novo lumen formation, *Nat Rev Mol Cell Biol* 15 (2014) 665-676.
- [3] I. Bernascone, M. Hachimi, F. Martin-Belmonte, Signaling Networks in Epithelial Tube Formation, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9 (2017).
- [4] H. Miao, C.H. Nickel, L.G. Cantley, L.A. Bruggeman, L.N. Bennardo, B. Wang, EphA kinase activation regulates HGF-induced epithelial branching morphogenesis, *J Cell Biol* 162 (2003) 1281-1292.
- [5] J. Tushir, C. D'Souza-Schorey, ARF6-dependent activation of ERK and Rac1 modulates epithelial tubule development, *EMBO J.* 26 (2007) 1806-1819.
- [6] D.M. Bryant, K.E. Mostov, From cells to organs: building polarized tissue, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2008) 887-901.
- [7] W. Yu, L.E. O'Brien, F. Wang, H. Bourne, K.E. Mostov, M.M. Zegers, Hepatocyte growth factor switches orientation of polarity and mode of movement during morphogenesis of multicellular epithelial structures, *Mol Biol Cell* 14 (2003) 748-763.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takuya Zuinen, Koji Tsutsumi, Yasutaka Ohta	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 FilGAP regulates distinct stages of epithelial tubulogenesis 【掲載確定】	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.04.187	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 隨念卓也 堤弘次 太田安隆
2. 発表標題 FilGAPはRho/ROCKの下流で細胞運動と細胞接着の制御を介して上皮管腔形成の成熟に関与する
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 隨念卓也 堤弘次 太田安隆
2. 発表標題 上皮管腔形成におけるFilGAPの機能解析
3. 学会等名 細胞生物学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学理学部生物科学科細胞生物学講座ホームページ
<https://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/seibutsu/kino/Home.html>
 北里大学理学部生物科学科細胞生物学講座ホームページ
<https://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/seibutsu/kino/Home.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	堤 弘次 (Tsutsumi Koji) (50569853)	北里大学・理学部・助教 (32607)	
研究分担者	斉藤 康二 (Saito Koji) (70556901)	北里大学・理学部・講師 (32607)	