

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670104

研究課題名(和文)シグナル分子・受容体を輸送する普遍的細胞突起の形成機構と形態形成における機能

研究課題名(英文) Cellular protrusions that transport diverse signaling molecules and the receptors: molecular mechanisms of their formation and their functions in morphogenesis

研究代表者

遠藤 剛 (ENDO, Takeshi)

千葉大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30194038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CyNはモルフォゲンやFGFなどの効率のよい細胞間シグナル伝達に働いている細胞突起である。本研究では、CyNがFGFだけでなく、他のさまざまな増殖因子、TGF- β ファミリー蛋白質、サイトカイン、GPCRリガンド、およびShhによっても、RhoDを介して形成されることを明らかにした。これらのシグナル分子のうち、少なくともBMP4については、FGFと同様にRhoDを活性化してCyNを形成した。このRhoDの活性化はSmadシグナリングではなく、non-Smadシグナリングを介していると考えられる。さらにCyNの形成にはdynaminのGTPase活性が必要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：CyN are unique cellular protrusions participating in efficient intercellular signal transduction of morphogens and FGFs. We found that CyN are formed through RhoD by various growth factors including FGF, TGF- β superfamily proteins, cytokines, GPCR ligands, and Shh. Among these signaling molecules, BMP4, as well as FGFs, activated RhoD, which induced CyN formation. The RhoD activation by BMP4 is likely to be mediated by non-Smad signaling but not by Smad signaling. Furthermore, GTPase activity of dynamin was required for CyN formation. Cells stably expressing LIF formed CyN, suggesting that CyN are involved in ligand transport and secretion by producing cells as well as in ligand-receptor transport by target cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞間シグナル伝達 細胞突起 シグナル分子 受容体 RhoD

1. 研究開始当初の背景

増殖因子、サイトカイン、G 蛋白質共役受容体 (GPCR) リガンドをはじめとする細胞外シグナル分子の多くは、拡散して受容細胞の細胞体に到達してから細胞膜上の受容体に結合し、それぞれのシグナル伝達経路を活性化して、細胞機能や生体機能を現すと考えられている (パラクライン様式)。しかし生体内では細胞外にさまざまなシグナル分子が散在しており、受容細胞も多様な受容体を発現しているため、この細胞間シグナル伝達の様式では効率が悪いと考えられる。ショウジョウバエ幼虫の成虫原基においては、モルフォゲンとして働く EGF, FGF, Dpp (BMP ortholog) を受容する細胞から、これらのシグナル分子を分泌する細胞に達する cytonemes (CyN) と呼ばれる細く長い細胞突起が形成されることが示されている。CyN はこれらのリガンドを結合した受容体を受容細胞に運搬して、効率のよい細胞間シグナル伝達を行うことにより、形態形成に働いていると考えられる。しかし CyN は脊椎動物では発見されていない。また CyN 形成の分子機構についてはこれまでまったく不明であった。

私たちは、マウス間葉系細胞株 10T1/2 細胞から近傍の細胞または FGF 源に向かって、アクチン線維を含む長さ 100 μm にも及ぶ細く長い細胞突起が形成されることを見出した (Koizumi et al., 2012)。またこの細胞突起の中を、FGF 受容体を含む小胞が、突起を形成している細胞の細胞体に向かって移動していた。一方、FGF は Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 RhoD を活性化した。活性化 RhoD はアクチン重合核形成因子 mDia3C を活性化することにより、アクチン線維を形成した。このアクチン線維の形成を通してこれらの細胞突起が形成された。これらの細胞突起は、その形態や受容体を運搬するという機能、および化学的固定や物理的ストレスにより崩壊しやすいなどの性質から、CyN に相当するものであると考えられる。細胞突起としては、Rho ファミリー蛋白質の Cdc42 や RhoF などにより形成される糸状仮足 (filopodia) がよく知られている。しかしこれらの既知の細胞突起は、通常長さが 10 μm 以下であり、シグナル分子分泌細胞に向かって形成されたり、その中を受容細胞が移動することは報告されていない。

2. 研究の目的

上述のように、CyN はショウジョウバエ幼虫の成虫原基においては、モルフォゲンとして働く EGF, FGF, Dpp を受容する細胞から、これらを分泌する細胞に向かって形成され、これらのリガンドを結合した受容体を受容細胞に運搬する。またマウス 10T1/2 細胞からは FGF 源に向かって CyN が形成され、CyN 中を FGF 受容体を含む小胞が受容細胞の細胞体に向かって輸送された。そこ

で本研究では、CyN が種々の増殖因子、サイトカイン、GPCR リガンドなど、多様なリガンドの分泌細胞に対して普遍的に形成され、突起を介した細胞体へのリガンド-受容体の輸送がシグナル伝達に不可欠であるかどうかを明らかにすることを目的とした。これにより、CyN が効率のよい細胞間シグナル伝達に普遍的に働くという新たな概念が確立されると考えられる。また細胞突起形成の分子機構を、各リガンド-受容体についてそれぞれ解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養：マウス間葉系細胞株 C3H/10T1/2 (10T1/2) 細胞、およびマウス線維芽細胞株 STO 細胞に LIF 遺伝子を安定発現させて樹立した SNL76/7 (SNL) 細胞は、10% FBS を含む DMEM 中で培養した。
(2) トランスフェクションとシグナル分子による刺激：10T1/2 細胞に GeneJammer を用いて pEGFP-C1/RhoD(wt) または pEGFP-C1/RhoD(G26V) をトランスフェクトした。24 時間後にこれらの細胞を 0.5% FBS を含む DMEM 中に移し、24 時間培養して血清飢餓状態にした。これらの細胞を次の細胞外シグナル分子で 60 分間刺激した。
増殖因子：EGF (100 ng/ml), IGF-1 (100 ng/ml), NGF (100 ng/ml), FGF8 (100 ng/ml), PDGF-B (100 ng/ml), HGF (100 ng/ml).
TGF- β スーパーファミリー：TGF- β 1 (50 ng/ml), BMP2 (300 ng/ml), BMP4 (12.5 ng/ml).
サイトカイン：LIF (10 ng/ml).
GPCR リガンド：isoproterenol (100 ng/ml), AngII (100 ng/ml).
その他：Shh-N (100 ng/ml).

BMP4 刺激によって誘導される Smad1/5/8 のリン酸化による活性化はリン酸化 Smad 1/5/8 抗体を用いたイムノブロットティング (IB) により解析した。

10T1/2 細胞に pEGFP-N1/ALK2(wt), pEGFP-N1/ALK2(R206H), pEGFP-N1/ALK2(Q207D), または pEGFP-N1/ALK2(K235R) をトランスフェクトした。

(3) 蛍光顕微鏡法とライブイメージング：生細胞における CyN を観察する場合には、35-mm glass base dish にまいた細胞を倒立蛍光顕微鏡 (Zeiss Axiovert) または共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV1200) で観察し解析した。10T1/2 細胞に mOrange2-RhoD(G26V) と FGFP 標識した次の蛋白質をトランスフェクションにより共発現させて、各蛋白質の局在と動態を解析した：Lifeact, UtrCH, cofilin 1, Myo10, Rab5, dynamin2. また RhoD (G26V) を発現させた細胞に 5 μM dynasore を作用させて、CyN 形成を解析した。

(4) RT-PCR 10T1/2 細胞から調製した細胞質 RNA から poly(A)+ RNA を単離した。この poly(A)+ RNA から合成した cDNA pool に対し、各シグナル分子に対する受容体のプライマーを用いて RT-PCR を行った。

により、生細胞内でのアクチン線維を検出することができる。最近、ニワトリ胚芽芽では Shh を産生する細胞が CyN を介して Shh を輸送することが示され、この CyN を構成しているアクチン線維は、UtrCH では検出されるが Lifeact では検出されないことが報告された。そこで 10T1/2 細胞に Cdc42(G12V) を発現させて形成された filopodia を構成しているアクチン線維と、RhoD(G26V) を発現させて形成された CyN を構成しているアクチン線維が、Lifeact や UtrCH で検出できるかどうかを調べた。これらの filopodia と CyN を構成しているアクチン線維は Lifeact と UtrCH のいずれによっても検出された。したがって 10T1/2 細胞においては、filopodia と CyN を構成しているアクチン線維の状態は類似していると考えられる。

アクチン線維切断・脱重合蛋白質の cofilin が CyN を構成しているアクチン線維にどのように働いているかを明らかにするために、RhoD(G26V) と cofilin 1 を共発現させた。Cofilin 1 は伸長する CyN の先端に局在していた。この結果から、cofilin 1 はアクチンモノマーを供給することにより、CyN の伸長に働いている可能性が考えられる。

モーター蛋白質 Myo10 は伸長する CyN の先端に局在していた。また CyN 内を先端に向かって移動する Myo10 と、細胞体に向かって移動する Myo10 も観察された。したがって、Myo10 は CyN の伸長に働く蛋白質や細胞小器官の輸送と、細胞体への蛋白質や細胞小器官の輸送に働いている可能性が考えられる。

Rab5 はエンドサイトーシスおよび初期エンドソームの融合に働いており、初期エンドソームのマーカー蛋白質である。Rab5 は CyN 内を細胞体に向かって移動していた。したがって、リガンドを結合した受容体は CyN 内を Rab5 が局在するエンドソームを介して細胞体に輸送されると考えられる。

Dynammin は GTPase 活性をもち、clathrin 被覆小胞をくびり切ることによりエンドソームの形成に働いている。GTPase 活性を欠失した dynamin2(K44A) を発現させると、CyN 形成が阻害された。また dynamin の GTPase 活性阻害剤 dynasore を作用させた場合にも、CyN 形成が阻害された。この結果から、dynammin の GTPase 活性が CyN 形成に必要であることが示された。今後、dynammin がどのような機構で CyN 形成を阻害するかを解明することが重要である。

(4) シグナル分子の産生細胞による CyN の形成

最近、ニワトリ胚芽芽では、Shh を産生する細胞が CyN を形成して Shh を輸送することが示された。またショウジョウバエ幼虫の成虫原基では、Hh を産生する細胞が CyN を形成して Hh を輸送することが示された。

そこで他のシグナル分子を産生する細胞も、CyN を形成してそのシグナル分子を輸送するかどうかを明らかにすることが重要である。LIF を安定発現している SNL 細胞においては、CyN に相当する細胞突起が顕著に形成されることが見出された。また SNL 細胞と 10T1/2 細胞を共培養すると、10T1/2 細胞から SNL 細胞に向かって CyN が伸長していた。この結果から、少なくとも LIF を産生する細胞は、CyN を形成して LIF を輸送・分泌している可能性が示唆された。したがって CyN は、シグナル分子の産生細胞と受容細胞の両者により形成され、効率のよい細胞間シグナル伝達に働いている可能性が考えられる。

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 4 件)

- (1) Watanabe-Takano, H., Takano, K., Hatano, M., Tokuhisa, T., and Endo T.: DA-Raf-mediated suppression of the Ras-ERK pathway is essential for TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial type 2 cells. *PLoS One*, in press (2015). (査読有)
<http://www.plosone.org>
- (2) Endo, T.: Molecular mechanisms of skeletal muscle development, regeneration, and osteogenic conversion. *Bone*, in press (2015). (査読有)
DOI: 10.1016/j.bone.2015.02.028
- (3) Watanabe-Takano, H., Takano, K., Sakamoto, A., Matsumoto, K., Tokuhisa, T., Endo, T.*, and Hatano M.*: DA-Raf-dependent inhibition of the Ras-ERK signaling pathway in type 2 alveolar epithelial cells controls alveolar formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: E2291-E2300 (2014). (査読有)
* Corresponding authors
DOI: 10.1073/pnas.1321574111
- (4) Yamamoto, D. L., Vitiello, C., Zhang, J., Gokhin, D. S., Castaldi, A., Coulis, G., Piaser, F., Filomena, M. C., Eggenhuizen, P. J., Kunderfranco, P., Camerini, S., Takano, K., Endo, T., Crescenzi, M., Luther, P., Lieber, R. L., Chen, J., and Bang, M.-L.: The nebulin SH3 domain is dispensable for normal skeletal muscle structure but is required for effective active load bearing in mouse. *J. Cell Sci.* 126: 5477-5489 (2013). (査読有)
DOI: 10.1242/jcs.137026

[学会発表] (計 14 件)

うち招待講演

- (1) Endo, T.: Signal transduction mechanisms regulating myofibrillogenesis and alveolarization. 2nd International Symposium

on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. (2015.1.23) Tokyo, Japan.

- (2) 遠藤 剛, 高野和儀: 筋収縮および細胞間・細胞内シグナル伝達を担うアクチン線維の形成機構. 第 86 回日本生化学会大会シンポジウム. (2013.9.11) パシフィコ横浜 (横浜市).
- (3) Takano, K., Endo T.: Nebulette and N-WASP participate in cardiac myofibrillar actin filament formation and cardiomyocyte hypertrophy. 第 65 回日本細胞生物学会大会シンポジウム. (2013.6.21) ウィンクあいち (名古屋市).

〔図書〕 (計 2 件)

- (1) Endo, T. and Takano, K.: Actin filament formation in myofibrils and cell protrusions regulated by signal transduction. In *Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling* (Inoue, J. and Takekawa, M., eds.) Springer, Berlin. in press (2015).
- (2) 遠藤 剛, 渡邊-高野晴子, 高野和儀: DA-Raf の癌抑制機能と肺胞形成における役割. *The Lung Perspectives* 特集「肺癌 Up-To-Date」メデイカルレビュー社. Vol. 23, No. 1, pp. 70-75 (2015).

〔その他〕

ホームページ

<http://life.s.chiba-u.jp/telab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 剛 (ENDO, Takeshi)
千葉大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 30194038

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

高野 和儀 (TAKANO, Kazunori)
千葉大学・大学院融合科学研究科・助教
研究者番号: 60466860