

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21221

研究課題名(和文)細胞極性制御タンパク質Morg1の胎生期発達における役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of the roles of the cell polarity protein Morg1 in embryonic development

研究代表者

早瀬 純也 (Hayase, Junya)

九州大学・医学研究院・特別研究員 (PD)

研究者番号：40621686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物の臓器の管腔を形成する上皮細胞や、血管内腔を形成する内皮細胞は、apical膜とbasolateral膜という性質の異なる膜ドメインを有し、栄養物の吸収や老廃物の排泄など個体維持に必須の役割を果たす。この膜ドメインの非対称性には、極性制御タンパク質複合体であるPar6-aPKC複合体やRho family 低分子量Gタンパク質が必要である。最近、申請者は新規な細胞極性制御タンパク質としてMorg1を同定し、マウス発生過程に必須であることを見出した。本研究では、Morg1が発生過程において血管形成に必要であること、及びRhoA GEFであるGEF-H1と結合することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Epithelial cells and endothelial cells in multicellular organisms that form lumens of organs or vascular lumens, respectively, have distinct apical and basolateral membrane domains, which play crucial roles in maintaining the body through absorbing nutrients and excreting wastes. The membrane domain asymmetry, which is called apico-basal polarity, is dependent on the polarity complex Par6-aPKC complex and the Rho family small GTPase. Recently, we identified the novel polarity protein Morg1, which was found to be essential for embryonic development in mice. The present study clarified that Morg1 plays essential roles in vasculogenesis during embryonic development and physically interacts with GEF-H1, a RhoA-specific guanine-nucleotide exchange factor.

研究分野：生化学

キーワード：Morg1

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物を構成する臓器の管腔もしくは血管内腔を形成する上皮細胞や内皮細胞は、管腔に接する apical 膜 (頂端膜) と体内環境に接する basolateral 膜 (側基底膜) という性質の異なる膜ドメインを有し、栄養物の吸収や供給、もしくは老廃物の排泄など、個体維持に必須の役割を果たす。このように上皮細胞や内皮細胞が機能するためには、体外環境に接する apical 膜と体内環境に接する basolateral 膜の非対称な分布、すなわち細胞極性 (apico-basal polarity) が必要であ

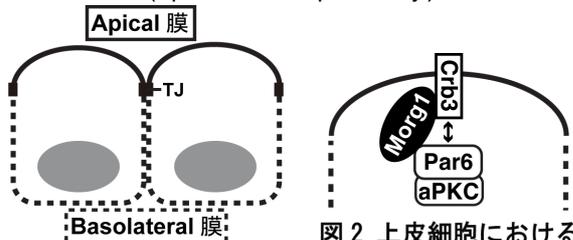


図1 上皮細胞の構造

図2 上皮細胞における Morg1 の作用機構

る(図1)。また、極性を有する細胞は上皮細胞や内皮細胞に限らず、走化性物質に向かって遊走する好中球 (front-rear polarity) や、一本の長い軸索を持つニューロン (neuronal polarity) など非対称な形態を持ち、それぞれ特有の細胞極性を持つ。これらの細胞極性は一見全く異なるにも関わらず、制御するタンパク質群は共通しており、その中でも Par6 (*partitioning defective-6*) および atypical protein kinase C (aPKC; PKC ζ 及び PKC ι) からなる進化的によく保存された複合体、すなわち Par6-aPKC 複合体が必要不可欠である。上皮細胞では Par6-aPKC 複合体は apical 膜に局在し、apico-basal polarity 形成に必須な役割を果たす。申請者はこれまでに、新規な Par6 結合タンパク質として Morg1 を同定した。Morg1 は7つの WD40 リピートを有し、タンパク質間相互作用の足場として働く。実際、Morg1 は Par6 に加え、また別の Par6 結合タンパク質である Crumbs 3 (Crb3) とも結合し、Par6-Crb3 複合体形成を促進する(図2)。Crb3 は apical 膜に局在する膜タンパク質である Crumbs family (脊椎動物は Crb1, Crb2, 及び Crb3 の3つの homolog を持つ) の1つで、apical 膜形成に重要であることが知られている。申請者は、腎尿細管

由来の上皮細胞である MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) 細胞において、Morg1 が Par6-aPKC 複合体を apical 膜の Crb3 にリクルートすることにより apico-basal polarity 形成に働くことを明らかにした。Morg1 の腎機能における役割の解明を目的として Morg1 欠損マウスを作出したところ、このマウスは胎生致死であることが分かった。Morg1 の apico-basal polarity 形成における重要性から、Morg1 欠損マウスの致死原因として胎生期の上皮組織形成不全もしくは血管形成不全の可能性が考えられた。

2. 研究の目的

これまでに申請者は、細胞極性の形成に必要なタンパク質として、Morg1 (mitogen-activated protein kinase organizer 1) を同定し、その作用機構を上皮細胞の2次元及び3次元培養系を用いて明らかにしてきた。さらに最近、申請者らは Morg1 欠損マウスを作出したところ、ホモ接合体が胎生期に死に至ることを見出した。このことは Morg1 が胚発生に必須の役割を担うことを示唆する。そこで本研究において、申請者は Morg1 の胚発生過程における役割の解明を目指した。Morg1 が培養上皮細胞の apico-basal polarity 形成に必須なタンパク質であることから、発生過程の中でも特に、胎生初期の上皮組織形成過程、または血管形成過程に着目し、Morg1 の作用機構を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

本研究では、Morg1 欠損マウスを用いて以下の2項目を軸に解析を行った。

(1) Morg1 欠損マウスの表現型解析

1) どの胎齢で致死となるのか。
致死時期が胎生初期か胎生後期なのかを明らかにするため、まずは胎齢 12.5 日で解剖し genotyping を行い、生存するホモ接合体が存在するかどうかを調べ、生存している場合は、そこから順に胚を採取し、どの時点で

異常が見られるかを解析した。死亡して胚が残存している場合はその日から逆行性に胚を採取していき、ホモ接合体の胚がどの時期まで正常であるかを解析した。

2) 胎生期初期の上皮組織もしくは血管形成における Morg1 の役割の解析

各胎齢の胎仔の組織切片を作製し、腸管等胎生期初期に形成される上皮組織および血管形成の程度を観察した。

(2) 新規 Morg1 結合タンパク質の探索

Morg1 はタンパク質間相互作用の足場となる WD40 リピートからなるタンパク質である。従って Morg1 は、Par6 や Crb3 の他にも多数のタンパク質と結合し、多彩な複合体形成を担う可能性が考えられる。胎生期における Morg1 の作用機構を明らかにするために、Mass spectrometry を用いた新規 Morg1 結合タンパク質の探索を行ったところ、Par6 以外の幾つかの細胞極性制御に関わるタンパク質、及び Small G タンパク質活性化因子である GEF (guanine nucleotide exchange factor) を単離することができた。これらの結合候補タンパク質と Morg1 が実際に結合するかどうかを検討し、胎生期の発生過程に Morg1 と協調して働くかどうかの検討を進めた。

4. 研究成果

(1) Morg1 欠損マウスの表現型解析

1) どの胎齢で致死となるのか。

Morg1^{+/+} 同士の time mating を行い、胎生期 12.5 日 (E12.5) での表現型を観察した。その結果、Morg1 欠損マウスは E12.5 において、すでに死亡し胎仔の吸収が進んでいた。そこで、E12.5 より遡ってどの時期から Morg1 欠損マウスに異常があらわれるかを観察した。その結果、E8.5 から E11.5 にかけて Morg1 欠損マウスが得られた。E8.5 では wild-type と Morg1 欠損マウス間で明瞭な違いを観察することはできなかった。このことから、少なくとも Morg1 欠損マウスにおいて三杯葉誘導は正常に起こっていると考えられた。

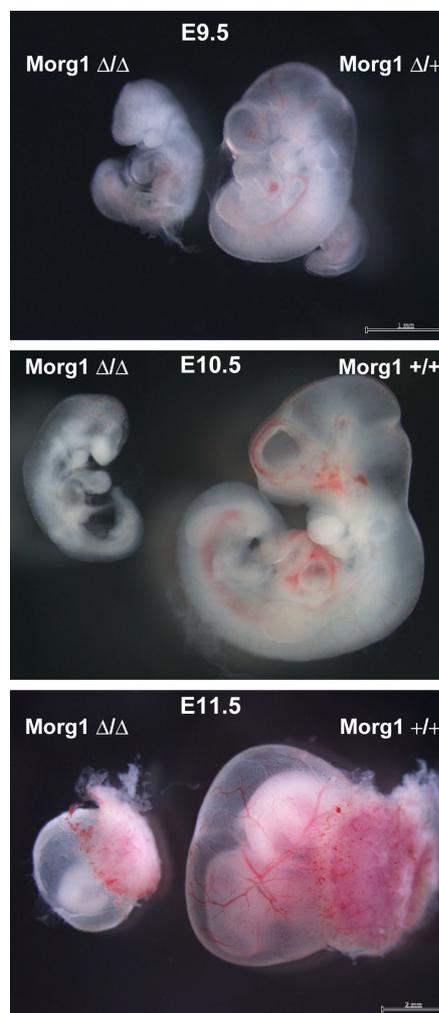


図 1 Morg1 knockout マウスの表現型

一方、E9.5 から E11.5 にかけて、図 1 に示されるような表現型を観察することができた。E9.5 : E8.5 より起こる turning は完了しているものの、Morg1 欠損マウスの body size は wild-type の 2/3 程度であり、明らかな発育の遅延が観察された。このことから、Morg1 欠損マウスは E8.5 前後の発生過程は正常に起こるが、E9.5 までの間で発育の遅れが生じ始めることがわかった。

E10.5 : wild-type マウスでは発達が正常に進んでいるのに対し、Morg1 欠損マウスでは E9.5 からの成長が停止しているように見えた。Morg1 欠損マウスの body size は wild-type に比べて 1/2 程度になっており、発育の遅れが顕著となっていた。

E11.5 : Morg1 欠損マウスでは、正常のマウスの発生過程において E10.5 より観察される後肢芽の出現、中腸ヘルニアの出現、および目の着色のいずれも観察されなかった。また、

wild-type との body size の差もより顕著になったことから、Morg1 欠損マウスは E10 前後に死亡しているのではないかと考えられた。

2) 胎生期初期の上皮組織もしくは血管形成における Morg1 の役割の解析

E9.5 および E10.5 の wild-type および Morg1 欠損マウス胎仔から組織切片を作製し、上皮組織の観察を行った。その結果、消化管等発生初期に形成される上皮組織構築に大きな異常は観察されなかった。従って、Morg1 は初期発生過程において、上皮組織形成に必要でないことがわかった。一方、図 1 でも観察されるように、Morg1 欠損マウスでは胎盤の形成は正常に観察されるものの、胎仔内の血流がほとんど観察されなかった(図 1 中)。また、胎仔を覆う羊膜においても血管の走行が顕著に減少していた(図 1 下)。さらに組織切片の観察においても、Morg1 欠損マウスでは血管形成の異常が観察された。これらの結果から、Morg1 は血管形成に必要であることがわかった。一方、Morg1 欠損マウスでは胎生期の血球産生部位である肝臓に赤色の蓄積が見られたこと、および組織切片により血球が正常に観察されたことから、血球形成は問題なく起こっていると思われた。

(2) 新規 Morg1 結合タンパク質の探索

以上のように、Morg1 は血管形成に必要なタンパク質であることが明らかとなったが、更にその分子メカニズムを明らかにするため、新規 Morg1 結合タンパク質の探索も行った。Morg1 を免疫沈降させた際に共沈するタンパク質を Mass Spectrometry を用いて解析したところ、表 1 に記された結合候補タンパク質を得ることができた。

RhoA GEF	GEF-H1
Rac GEF	Tiam1, DOCK7
細胞骨格関連タンパク質	FRMD4A, CRMP2, CEP170, CEP170B

GEF: guanine nucleotide exchange factor

表 1 Morg1 結合候補タンパク質

これらの結合候補タンパク質の中でも、特に RhoA 特異的に活性化する GEF (guanine

nucleotide exchange factor)である GEF-H1 は、再現よく Morg1 の免疫沈降で共沈してきたことから、有力な Morg1 結合候補タンパク質であると考えられた。実際に、GEF-H1 を Morg1 と共に HEK293T 細胞に過剰発現させ、GEF-H1 の免疫沈降を行ったところ、Morg1 の共沈が観察された。この結果から、Morg1 は GEF-H1 と相互作用することがわかった。興味深いことに、GEF-H1 は内皮細胞および上皮細胞の両方に発現することが知られており、特に内皮細胞では細胞間接着因子の制御を介して vascular permeability を制御することが報告されている。従って、Morg1 は、GEF-H1 の結合を介してその活性もしくは局在を制御することにより、血管形成および remodeling を制御する可能性が考えられる。現在、Morg1 と GEF-H1 の相互作用が血管形成過程において重要な役割を果たす可能性を考え、解析を進めている。

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 3 件)

Kanako Chishiki, Sachiko Kamakura, Junya Hayase, Satoru Yuzawa, and Hideki Sumimoto

Ric-8A-mediated stabilization of the trimeric G protein subunit G_i is inhibited by pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation

Biochem. Biophys. Res. Commun. 283, 941-945, 2017 <査読あり>

doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.036

Kanako Chishiki, Sachiko Kamakura, Junya Hayase, and Hideki Sumimoto

Ric-8A, an activator protein of G_i, controls mammalian epithelial cell polarity for tight junction assembly and cystogenesis.

Genes Cells 22, 293-309, 2017 <査読あり>

doi: 10.1111/gtc.12477

Takuya Kiyohara, Kei Miyano, Sachiko Kamakura, Junya Hayase, Kanako Chishiki, Akira Kohda, and Hideki Sumimoto

Differential cell surface recruitment of the superoxide-producing NADPH oxidases Nox1, Nox2 and Nox5: The role of the small GTPase Sar1.

Genes Cells 23, 480-493, 2017 <査読あり>

doi: 10.1111/gtc.12590

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早瀬 純也 (HAYASE, Junya)

九州大学大学院・医学研究院・助教

研究者番号: 40621686