

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06223

研究課題名(和文)カエル初期胚上皮細胞を用いた収縮環と細胞間接着のアクチン細胞骨格制御機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of actin assembly at the contractile rings and cell-cell junctions

研究代表者

東 智仁 (Higashi, Tomohito)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70515072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Rhoの下流で直鎖状アクチンの制御を行うフォルミン分子が細胞間接着や細胞分裂時の収縮環を制御する仕組みについて解析した。その結果、Dia1とDia2が細胞間接着に局在すること、これらの分子の局在は定常状態の接着部位の構造や張力の維持には必要ないことが明らかになった。また、Dia3は収縮環にRho依存的に局在することが分かったが、その局在は細胞質分裂の遂行には必要ではないことが示唆された。一方で、Dia3以外にDia1やDia2が異所的に収縮環に局在すると細胞分裂の失敗を引き起こしたため、細胞間接着と収縮環は相互に影響し合いつつRhoエフェクターを使い分けていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞接着は日本人が中心的な役割を果たして解明されてきた分野です。本研究は接着部位において細胞骨格を制御する因子について新しい知見を得ることができ細胞接着の研究史に新しい事実を提供できました。また、細胞質分裂が正しく行われることは組織の恒常性の維持のために重要であり、分裂の失敗はゲノムの不安定性を引き起こして発がんの原因となります。多くのがん細胞は細胞間接着に異常をきたすことが知られており、フォルミン分子が接着部位への局在を失ったことによって分裂が失敗するという私たちの発見は発がんのメカニズムの一端を解明につながる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：Formins are regulated by active Rho GTPases and are involved in the regulation of various cellular processes including cell-cell junction maintenance and contractile ring formation. In this study, I found that two formins Dia1 and Dia2 are localized at tight junctions. But the localization was dispensable for maintenance of cell-cell junction structure and tension generation. Dia3 was localized at contractile rings, but again the localization was dispensable. However, when Dia1 and Dia2 were mislocalized at the contractile ring, we observed increased rate of cytokinesis failure, suggesting that multiple formins under control of the same Rho GTPase function differentially at the junctions and contractile rings and that precise regulation of localization is important for successful cytokinesis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：フォルミン 細胞間接着 細胞質分裂

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞の細胞間接着と細胞分裂はともに低分子量 G タンパク質によって制御されているが、具体的に Rho のどのエフェクター分子がどのような制御を行っているのかが分かっていない。本研究は、Rho の下流で直鎖状のアクチン細胞骨格を制御することが知られているフォルミン分子に着目して研究を行うこととした。研究代表者は、本研究を開始するまでにミシガン大 MCDB の Miller 研究室において、脊椎動物の 15 種類のフォルミン全てをクローニングしてその上皮細胞における局在を調べていた (Higashi T et al., MBoC, 2019)。その結果、Dia1 と Dia2 が細胞間接着結合、Dia3 が分裂中の細胞の収縮環に局在することが分かっていた。

2. 研究の目的

本研究は、予備データに基づき「どのフォルミンが上皮細胞の収縮環と細胞間接着を制御しているのか」を解明することを目的として開始した。具体的には、Dia1、Dia2、Dia3 の 3 種類のフォルミンが細胞間接着 (Dia1 と Dia2) と収縮環 (Dia3) という異なった構造に局在する仕組みと、それぞれの局在部位において果たす役割を明らかにし、上皮細胞が、異なる Rho エフェクターを使い分けることによりバリア機能を保ちつつ細胞分裂を遂行する仕組みを解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) Dia1/2 の局在変化が細胞間接着や細胞質分裂に及ぼす影響の検討

Dia1 の DID ドメインを発現させると Dia1 と Dia2 が細胞間接着に局在できなくなるため、その細胞の細胞間接着の接着分子や F-アクチンの構造や、細胞間接着にかかる張力に変化がないかを調べる。また、細胞間接着に局在できなくなった Dia1 と Dia2 は異所的に分裂中の細胞の収縮環に集積するため、その細胞の細胞分裂に影響がないか調べる。

(2) Dia1 を細胞間接着にリクルートする因子の同定

Dia1 が細胞間接着に局在するために必要な DID ドメインを用いて結合因子を単離する。その際に、DID ドメイン内の局在に必要な残基を置換した A267 変異体をネガティブコントロールとして使用する。

(3) Dia3 の収縮環局在機構と細胞質分裂への関与の解析

Dia3 が収縮環に局在する仕組みを調べる。また、Dia3 が収縮環の形成や細胞質分裂に必要とされるかどうかを確かめる。

(4) Dia1/Dia2 の細胞間接着局在を阻害した際のバリア機能の検討

Dia1 と Dia2 のバリア機能への寄与を検討する。

4. 研究成果

(1) Dia1/2 の局在変化が細胞間接着や細胞質分裂に及ぼす影響の検討

Dia1 と Dia2 は細胞間接着部位に局在するが、Dia1 の局在責任ドメインである DID ドメインを過剰発現したアフリカツメガエル初期胚では、全長の Dia1 や Dia2 は細胞間接着に局在できず細胞質全体に遍在していた (図 1 A)。この細胞では接着分子の構造には全く変化が見られなかった。さらに詳細に細胞間接着の構造を検討するため、F-actin probe である Lifeact の局在を調べたが、DID 発現細胞 (*) とコントロールの細胞の間に差異を認めなかった (図 1 B)。このことから、Dia1 と Dia2 は定常状態の細胞間接着の F-アクチンの構造維持には必要ないことが分かった。また、細胞間接着にかかる張力を反映する Vinculin プローブを調べたが、同様に差が見られなかったため、Dia1 と Dia2 は張力の維持にも必要とされないことが明らかになった (図 1 C)。

分裂中の DID 発現細胞では、Dia1 と Dia2 は分裂収縮環に強く集積していた (図 2 A)。異所的な Dia1 と Dia2 の局在が細胞質分裂に及ぼす影響を調べることにした。細胞質分裂が失敗すると核が 2 つ同じ細胞に残るため、細胞核を染

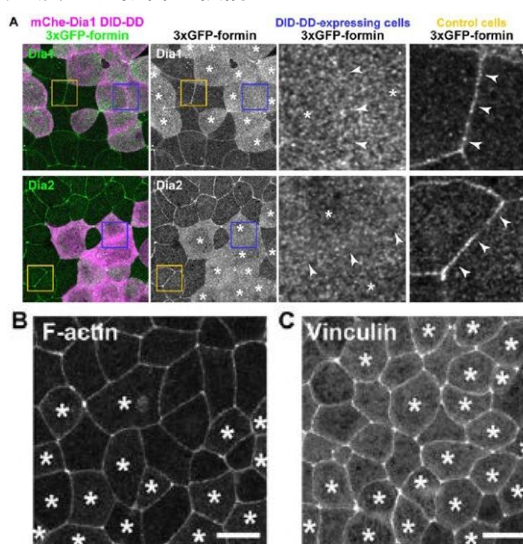


図 1 Dia1 アミノ末端断片をモザイク状に過剰発現したアフリカツメガエル初期胚の上皮
A. Dia1 全長 (上) と Dia2 全長 (下) の局在
過剰発現細胞のみで局在が失われている
B-C. F-actin プローブ Lifeact (B) と張力プローブ Vinculin (C) の局在。* ラベルは過剰発現細胞を示す。

色して調べた。その結果、DID 過剰発現細胞では、2核の細胞が有意に増加していることが分かった（図2 B, D）。また、接着因子とF-アクチンプロブを用いてライブイメージングを行うと、DID 過剰発現細胞では、細胞質分裂を開始した後に形成されかけた収縮環が脱重合して壊れ、収縮ができずに細胞質分裂が失敗する現象が頻繁に観察されることが分かった。細胞質分裂の成功率を定量化すると、約40%の確率で失敗していることが分かった。以上の結果から、Dia1 と Dia2 は細胞間接着部位に局在しているが、その局在は定常状態の細胞間接着の維持には必要とされないことが分かった。この結果は、Dia1 や Dia2 のノックアウトマウスが特に表現型を示さない事実とも符合する。また、Dia1 と Dia2 が細胞間接着部位に局在できなくなることによって細胞質分裂が失敗する現象は、発がん過程において細胞間接着が失われることがゲノムの不安定性につながる事実を説明できる可能性がある。

(2) Dia1 を細胞間接着にリクルートする因子の同定

次に、Dia1 が細胞間接着に局在する仕組みを調べるため、Dia1 の局在責任ドメインに結合する分子を探索した。FLAG タグを融合した DID を恒常的に発現する培養上皮細胞を樹立した。また、ネガティブコントロールとして点アミノ酸変異を導入した DID を恒常的に発現する細胞を用いた。両者から抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降法により結合分子を単離したところ、約130 kD のタンパク質が検出された。このバンドは点変異を導入した変異体には結合しなかった。質量分析によりこのタンパク質を同定したところ、Dia2 であることが分かった。

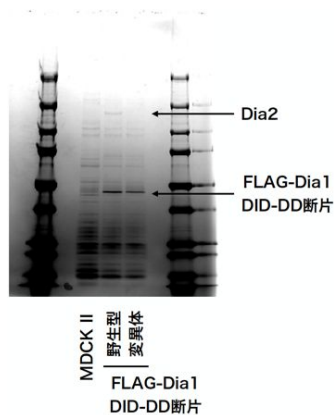


図3 Dia1 結合タンパクの同定

(3) Dia3 の収縮環局在機構と細胞質分裂への関与の解析

Dia3 は、分裂中の細胞の収縮環に強く局在する（図4 A）。Dia3 は187番目のバリンを介して活性型 Rho と結合することが知られているので、この残基に変異を入れて Rho と結合できない変異体を作成した。この変異体は、収縮環への局在が全くできなくなることが分かった。したがって、Dia3 は活性型の Rho との結合を介して収縮環に局在していることが分かった。

Dia3 をノックアウトした MDCK II 細胞を作成したが、細胞質分裂にはまったく異常を認めなかったため、Dia3 は細胞質分裂には必須の働きをしていないと考えられる。

図4 分裂中の細胞のフォルミンの局在

A. Dia1 と Dia2 は弱く Dia3 は強く収縮環に局在する。緑: GFP フォルミン、マゼンタ: ZO1 (TJ マーカー)
B. Dia3 の局在は活性型 Rho 依存性である
緑: GFP-Dia3、マゼンタ: 膜プロブ

(4) Dia1/Dia2 の細胞間

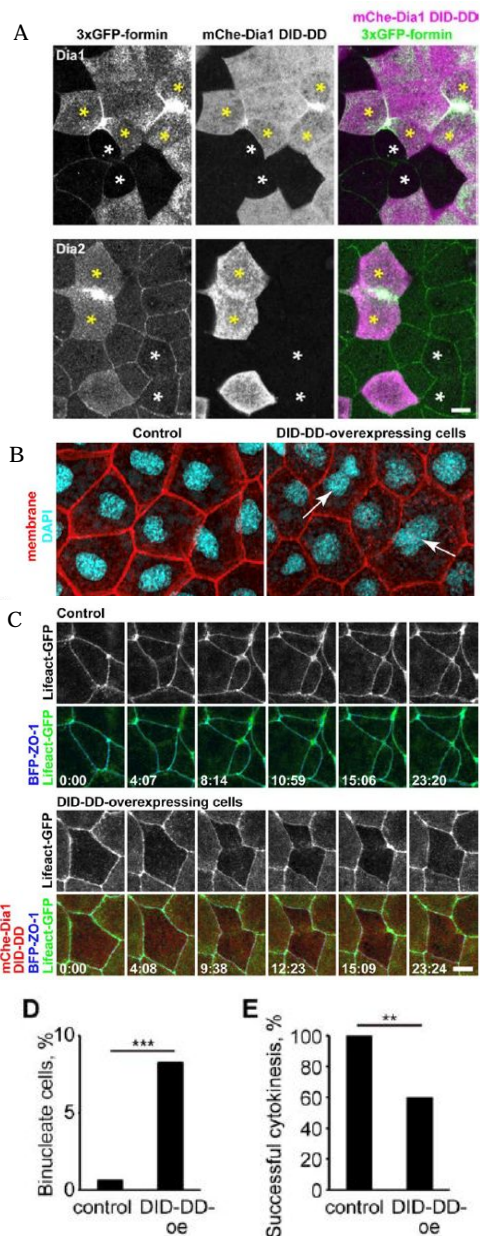
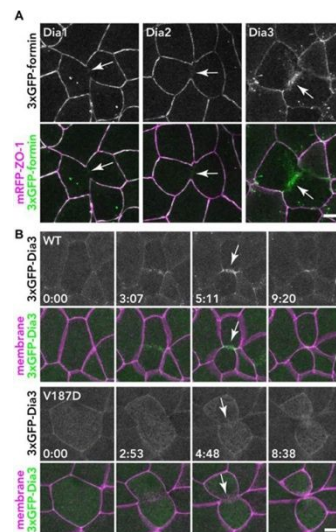


図2 A. Dia1 アミノ末端断片を過剰発現した分裂細胞では Dia1 と Dia2 は収縮環に局在する。
B. 核(シアン)と細胞膜(赤)染色。二核の細胞(矢印)が散見される。
C. 分裂中の細胞のライブイメージング。
D. 二核細胞の定量評価。
E. 細胞質分裂の成功率の定量評価。



接着局在を阻害した際のバリア機能の検討

蛍光デキストランや ZnUMBA 法などで DID 発現細胞を検討したが、バリア機能に大きな変化を認めなかった。また、MDCK II 細胞を用いて Dia1 と Dia2 をノックアウトした細胞を作成したが、MDCK II 細胞は細胞間隙のチャンネルとして働く内在性のクロードイン 2 を発現しているため、バリア機能を十分に検討できなかった。そこで、まずクロードイン 2 をノックアウトした MDCK II 細胞を作成し、その細胞を親株にして Dia1 と Dia2 をノックアウトした。現在、これらの細胞を検討しているが、経上皮抵抗値などの簡易的な測定では、バリア機能に特に大きな変化は見られない。

本研究の過程で樹立した Cldn2 ノックアウト MDCK II 細胞は、上皮細胞のバリア機能を検定する目的に非常に有用であるため、本研究室の他の研究に多数応用されている。そのうちの 1 つは、細胞間接着の構成分子であるオクルジンとトリセルリンの機能を調べる研究で、Cldn2 ノックアウト MDCK II 細胞を親株として用いて、オクルジンとトリセルリンをダブルノックアウトしてその機能を調べた。その結果、オクルジンとトリセルリンは、細胞のバリア機能を司る微細構造である TJ ストランドの複雑性を規定し、バリア機能を向上することに寄与していることが分かった(図 5)。この研究結果は、MBoC 誌に掲載された(Saito AC et al., MBoC, 2021)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomohito Higashi, Hideki Chiba	4. 巻 1862
2. 論文標題 Molecular organization, regulation and function of tricellular junctions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta (Biomembranes)	6. 最初と最後の頁 183143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamem.2019.183143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomohito Higashi, Rachel E. Stepheson, Ann L. Miller	4. 巻 30
2. 論文標題 Comprehensive analysis of formin localization in Xenopus epithelial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 82-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E18-02-0133.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Saito AC, Higashi T, Fukazawa Y, Otani T, Tauchi M, Higashi AY, Furuse M, Chiba H.	4. 巻 32
2. 論文標題 Occludin and tricellulin facilitate formation of anastomosing tight-junction strand network to improve barrier function.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 722-738
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E20-07-0464	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------