

機関番号： 14501
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2009～ 2010
 課題番号： 21770212
 研究課題名(和文) セミインタクト上皮細胞を用いた細胞間接着の裏打ちアクチン繊維の形成機構の解析
 研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms of the formation of the intercellular junction-underlying actin bundle using semi-intact epithelium.
 研究代表者 東 智仁 (HIGASHI TOMOHITO)
 神戸大学・大学院医学研究科・グローバルCOE 研究員
 研究者番号： 70515072

研究成果の概要(和文)：上皮細胞シートはわたしたち多細胞生物のからだの形態形成に重要な役割を果たしているが、上皮細胞が形態形成時の張力を伝達するために必要な細胞間接着部位の裏打ちアクチンがどうやって形成されるのか不明であった。本研究では、低分子量Gタンパク質 RhoA のヌクレオチド交換因子 ArhGEF11 が細胞間接着部位に特異的に局在し、細胞間接着が形成される際に、接着方向と垂直なアクチン繊維を形成するのに働いていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Epithelial sheets play important roles in morphogenesis of multicellular organisms. So far, it has been unknown how the intercellular junction-underlying actin cytoskeleton are formed. In this study, I showed that ArhGEF11, a guanine nucleotide exchange factor of the small GTPase RhoA, is localized at the cell-cell-junction and that ArhGEF11 is required for the formation of the actin cytoskeleton vertical to cell-cell junction during the formation process of cell-cell junction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：細胞間接着、アクチン細胞骨格、Rho 低分子量Gタンパク質、ArhGEF11

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は、バリア機能の維持や形態形成の際の形態変化を的確に行うためには、細胞

間接着が適切に形成され、維持されている必要がある。細胞間接着の形成には、その裏打ちとなるアクチン繊維の存在が不可欠であ

るが、これまで、裏打ちアクチンが形成される機構はほとんど解明されてこなかった。

2. 研究の目的

本研究は、細胞間接着が形成される際に接着部位の近傍においてアクチン細胞骨格の動態を制御する機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、当初、セミインタクト上皮細胞を用いたアッセイ系を確立することで裏打ちアクチン繊維形成を制御する因子を単離しようと試みた。しかし上皮細胞のセミインタクト細胞ではアクチンが再構築できなかったため、他の方法で細胞間接着部位のアクチンを制御する因子を解析することとした。実際には、所属研究室において細胞間接着部位局在タンパク質の候補として単離していた因子の中で、アクチン動態の制御に関与することが想定される因子について、局在や機能を検討した。

4. 研究成果

所属研究室において、ArhGEF11（アクチン動態を制御する低分子量Gタンパク質 RhoAの活性化因子）が細胞間接着部位局在因子の候補として単離されていたため、ArhGEF11(PRG)を特異的に認識する抗体を作製し、細胞染色と組織染色によってその細胞内局在を調べた。その結果、ArhGEF11 (PRG)は組織においても細胞においても、細胞間接着に局在することが確かめられた。

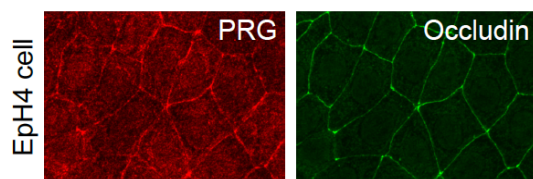


図1 PRGの培養細胞における局在

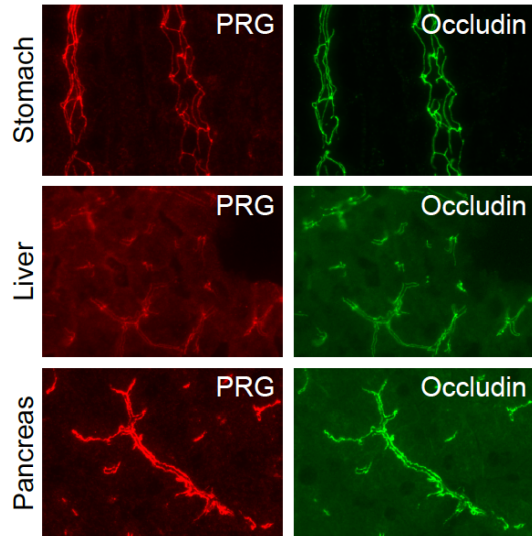


図2 PRGの組織における局在

さらに、ArhGEF11の機能を調べるため、培養細胞にArhGEF11を過剰発現させたところ、上皮細胞の頂端側が収縮する表現型が観察された。この現象はapical constrictionとして知られ、多細胞生物の形態形成において重要な役割を担うと考えられている。

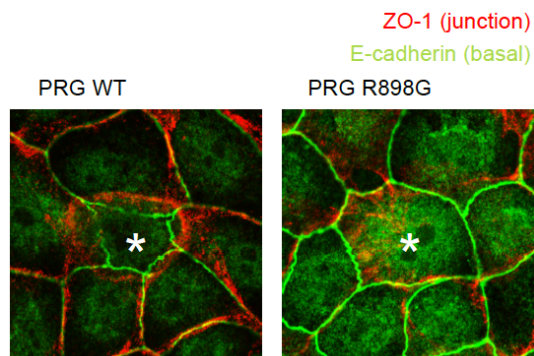


図3 頂端側が収縮した上皮細胞

また、ArhGEF11のRho活性化ドメインに変異を導入したR898G変異体を作製し、これを細胞に過剰発現したところ、apical constrictionは観察されなかった。このことから、ArhGEF11はRhoの活性化を介してapical constrictionを引き起こしていることが明らかになった。

ArhGEF11がapical constrictionを引き起こす仕組みをさらに詳細に調べるため、アク

チン繊維の染色を試みた。すると、ArhGEF11を過剰発現した細胞にのみ、細胞の頂端側において過剰なアクチン繊維の形成を認めた。

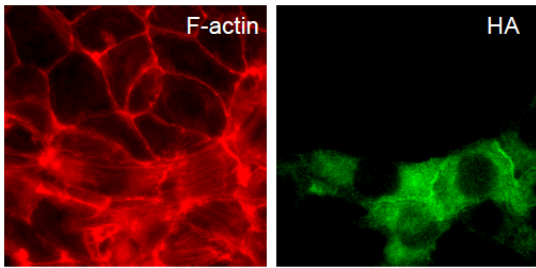


図4 アクチン繊維の染色

こうしたアクチン繊維は、通常よく見られる細胞間接着と平行な「裏打ちアクチン」ではなく、細胞間接着に垂直な「ラディアルアクチン」であった。「ラディアルアクチン」は組織や定常状態の培養細胞においては観察されない。しかし、観察を続けていると、細胞間接着が形成されるときには、一過的にラディアルアクチンが形成されることが分かった。具体的には、カルシウムスイッチ実験を用いた。細胞間接着はカルシウムイオンの存在に依存しているため、培地中からカルシウムイオンをなくすと接着構造が破綻する。この状態で細胞をカルシウムイオンを含んだ培地に戻すと、細胞間接着が回復するのが観察される。今回は、この実験法を用いて、カルシウム濃度回復時の細胞間接着の再建時に、アクチン繊維を観察した。

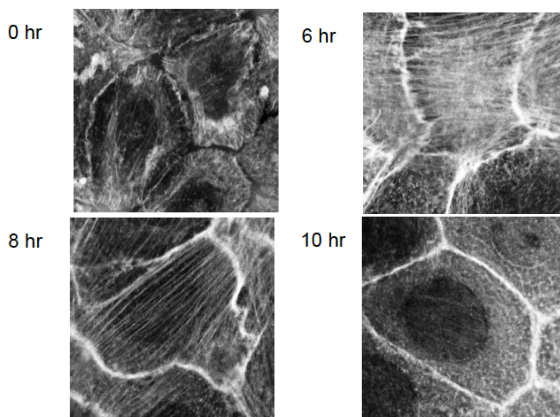


図5 カルシウムスイッチ時のアクチン

すると、カルシウム回復から6〜8時間経過した時に、強固なラディアルアクチン繊維が形成されているのが観察された。

カルシウムスイッチ時のラディアルアクチン形成が ArhGEF11 によって制御されているかどうかを調べるため、ArhGEF11 をノックダウンした細胞を作製し、カルシウムスイッチ実験を行ってアクチンを観察した。すると、ArhGEF11 ノックダウン細胞では、カルシウム濃度を回復した後どのタイムコースでもラディアルアクチンが観察されなかった。

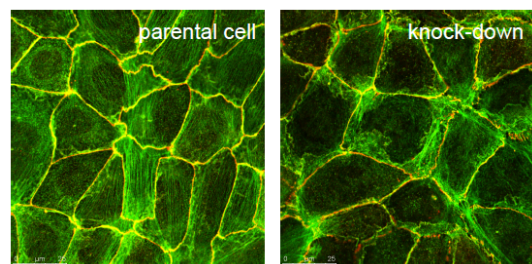
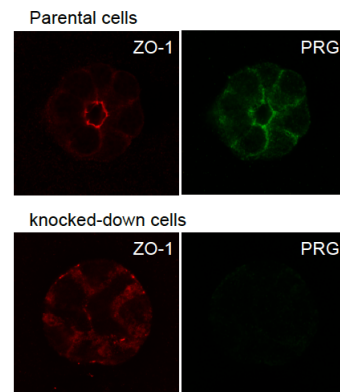


図6 ノックダウン細胞

また、ArhGEF11 が形態形成においても重要な役割を果たしている可能性を検討するため、培養細胞でシストを作る実験を試みた。シストは、細胞外基質に埋め込んで培養された上皮細胞が、内側を頂端側とした球状構造を形成したもので、形態形成のモデルとしてよく利用されている。野生型の細胞と ArhGEF11 ノックダウン細胞を用いて、シスト形成実験を行

うと、ノックダウン細胞のシスト形成が著しく阻害されていた。

図7 シスト



以上より、ArhGEF11 が RhoA 依存的に、ラディアルアクチン繊維形成を促進して

apical constriction を惹起することが明らかになり、形態形成にも影響を与えている可能性が示唆された。多細胞生物のかたち作りの分子基盤の理解は始まったばかりであり、ArhGEF11 の上流や下流を探索することによってさらに詳細な仕組みが明らかになることが予想される。

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 1 件)

① Higashi T, Ikeda T, Murakami T, Shirakawa R, Kawato M, Okawa K, Furuse M, Kimura T, Kita T, Horiuchi H
Flightless-I (Fli-I) regulates the actin assembly of diaphanous-related formins (DRFs) Daam1 and mDial in cooperation with active Rho GTPases.
J Biol Chem, 査読あり、285 巻、2010, 16231-8

[学会発表] (計 2 件)

- ① Flightless-I (Fli-I) regulates the actin assembly activity of Diaphanous-related formins (DRFs) Daam1 and mDial in cooperation with active Rho GTPases
アメリカ細胞生物学会、平成 22 年 12 月 13 日、ペンシルベニア会議場 (米国)
- ② PDZ-RhoGEF は細胞間接着部位に局在し上皮細胞のアピカル面張力を制御する
日本細胞生物学会、平成 22 年 5 月 19 日
大阪国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 智仁 (HIGASHI TOMOHITO)
神戸大学・大学院医学研究科
・グローバルCOE 研究員
研究者番号：70515072

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし