

「生物の発生・分化・再生」

平成 12 年度採択研究代表者

竹縄 忠臣

(東京大学医科学研究所 教授)

「器官形成における細胞遊走の役割及びそのシグナリングと再生への応用」

1. 研究実施の概要

我々は細胞の遊走先端に局在し、糸状仮足形成にかかわる N-WASP や膜ラフリングにかかわる WAVE を発見した。これら WASP や WAVE ファミリー蛋白質は外界からの遊走シグナルを受けて、活性化され、遊走先端部でダイナミックなアクチン線維の再構築を引き起こし、細胞を直接移動させるキイの蛋白質であることを証明してきた。本プロジェクトでは WASP や WAVE ファミリー蛋白質が形態形成時の遊走に関わっていることを明らかにして、器官形成における細胞遊走の重要性を解明する。

2. 研究実施内容

2-1 細胞遊走への WASP ファミリー蛋白質の役割。

遊走している細胞の先端部での推進力発生機序についてはほとんど分かっていない。そこで WASP ファミリー蛋白質がどのように遊走細胞の先端部でアクチン線維を構築し、推進力を生み出しているのかを調べた。遊走している細胞の先端部では枝分かれ状のアクチン線維が存在する。このような形のアクチン線維は細菌が宿主の細胞内でアクチンコメットを作り、泳ぎ回る際のコメットを形成するアクチン線維の形と似通っている。我々はそこで人工的にビーズに N-WASP を結合させ、脳抽出液によりビーズ状にコメットを形成させることに成功した。この系を用いて、N-WASP のどの部位がコメット形成に必須であるかを、様々な欠損体を用いて調べた。その結果、C-末に存在し、Arp2・3 複合体と結合してアクチンの重合を直接引き起こす VCA 領域の他、塩基性領域が必要であった。この塩基性領域はすでに存在するアクチン線維のサイドに結合し、Arp2・3 複合体をアクチン線維の側鎖部分に運んで、サイドからアクチンを伸ばし、枝分かれ状の形のアクチン線維を構築する。通常、細胞はアクチンが伸びる端が capping 蛋白質で塞がれ、細胞骨格系が安定し、細胞の形が変わらないように制御されている。外部からの刺激を受けて、急激にアクチン線維を伸ばすとき、capping 蛋白質で塞がれていても、N-WASP-Arp2・3 複合体系を使えば、側鎖から素早くアクチンを伸ばすことができ、迅速に細胞が運動できる態勢が整う。これが細胞遊走の基本的メカニズムである。

2-2 WASP ファミリー蛋白質の管腔形成への関与

WASP ファミリー蛋白質の形態形成への関与を調べるため、まず簡単な形態形成のモデルであ

る HGF による MDCK 細胞の管腔形成への影響を調べた。HGF は MDCK 細胞の運動性を高めるとともに、コラーゲンゲル中で3次元的な管腔形成を引き起こすことが知られている。N-WASP (WT-NW) およびドミナントネガティブ N-WASP(DN-NW)の安定発現株を作成し解析した。HGF に反応して WT-NW およびもとの MDCK 細胞はコラーゲンゲル中で枝分かれ状の管腔を形成した。しかし DN-NW 発現 MDCK 細胞では管腔形成は強く抑制された。内在性の N-WASP は管腔形成期において tube が伸びようとしている先端部の突起部に蓄積していた。一方、細胞間接着、細胞極性やランダムな細胞運動は WT-NW や DN-NW 発現による影響を全く受けなかった。しかし方向性をもった細胞遊走やゲル中への浸潤は DN-NW では明らかに抑制された。これらの結果から N-WASP は HGF により引き起こされる上皮管腔形成に必要な細胞遊走や浸潤に関わっていることが明らかになった。

2-3 WAVE2 の個体での機能

WAVE2 は Rac の下流にあり、Arp2・3 複合体を活性化して、膜ラフリングを引き起こす分子である。形態形成には個体発生のある時期に生じる細胞の方向性をもった運動が必要であり、WAVE がなんらの役割を果たしているとおもわれるが、個体の発生過程でどのような役割をはたしているのかは明らかではない。そこで個体発生における WAVE2 の役割を明らかにするため、WAVE2 のノックアウトマウスを作成した。WAVE2 のノックアウトマウスは胎生致死で 10.5 日までに死亡した。胎生 10.25 日目において心のうの膨張がしばしば認められ、心臓およびその周辺の血管での出血が認められた。また頭部に出血がみとめられる胚も存在した。脊椎動物の血管系の構築は胎生前期の脈管形成とそれに続く血管新生、およびさまざまな血管のリモデリングによって担われている。WAVE2(-/-)マウスでは脈管形成は正常に起こっていたが、血管新生が異常になっていた。血管新生に特有の血管内皮細胞の sprouting に異常が見られた。この異常は平滑筋細胞層の遊走異常によって生じているというよりは、血管内皮細胞層自身の異常に起因していることが電顕写真像から明らかになった。傍大動脈臓側中胚葉という胎児期の前造血幹細胞、血管内皮前駆体細胞が豊富に含まれる領域を OP9 ストロマ細胞上で器官培養することにより、血管内皮細胞の血管床、および血管網の形成が観察できる。WAVE2(-/-)胚の血管形成をこのような試験管内での脈管形成、血管新生を見る培養系で観察した。WAVE2(-/-)胚では血管床の形成は認められたが、血管網の形成は著しく阻害されていた。これらの結果より WAVE2 は血管新生に重要に関わっていると結論された。

2-4 筋発生と筋再生のメカニズム

脊椎動物の筋発生過程では、皮筋節から肢芽形成部に筋前駆細胞が遊走する。この肢芽細胞は細胞同士のコミュニケーションにかかわると考えられる特徴的な細い細胞突起を形成する。RhoD によって形成されるアクチンフィラメントを含む細胞突起はその形態的特徴から、この肢芽細胞の突起に相当すると考えられた。この突起は他の細胞に隣接する面に優勢的に形成され、分泌小胞を含むと考えられる膨化部があった。RhoD の標的蛋白質として、アクチンフィラメント形成にかかわっている villin/gelsolin スーパーファミリーの蛋白質が得られた。この蛋白質は C 末端側で RhoD に結合し、C 末端側の断片は RhoD による突起形成を阻害した。この蛋白質には Arp2/3 複

合体が結合するコンセンサス配列が含まれていた。一方、RhoD は N-WASP に結合しなかったことから、RhoD はこの蛋白質と Arp2/3 複合体を介してアクチンの重合を引き起こして、突起を形成する可能性が考えられる。

筋再生過程では、筋衛星細胞が損傷部に遊走し増殖して、やがて分化し成熟する。この増殖は LIF や IL-6 によりもたらされる。衛星細胞由来のマウス C2 細胞では、LIF や IL-6 により増殖が促進され、M-Ras の発現が誘導された。また LIF や IL-6 は転写因子の STAT3 を活性化することにより転写を引き起こすが、M-Ras 遺伝子の転写調節領域には STAT3 結合配列が存在していた。しかも C2 細胞を LIF や IL-6 で刺激すると、M-Ras 遺伝子の転写活性化がみられた。したがって M-Ras は LIF や IL-6 による衛星細胞の増殖に関与している可能性が示された。

骨格筋組織の成熟筋細胞は分裂することはないと考えられている。しかしマウス骨格筋組織にホメオボックス遺伝子の Msx1 を発現させたところ、多核の成熟筋細胞が脱分化をして、分裂することにより単核細胞が出現した。これらの脱分化細胞はやがて分化して筋再生をした。この結果は、この系が筋ジストロフィー症をはじめとした筋疾患の再生治療に応用できる可能性を示唆している。

3. 研究実施体制

(1) 竹縄グループ

グループ長： 竹縄 忠臣 (東京大学医科学研究所・教授)

- 研究項目： 1. WASP ファミリー蛋白質の形態形成への役割の解明。
2. 細胞骨格、細胞遊走制御のシグナルの解明。
3. 線虫を用いての発生における WASP ファミリー蛋白質の役割の解明。

(2) 遠藤グループ

グループ長： 遠藤 剛 (千葉大学理学部・助教授)

- 研究項目： 1. 筋発生過程における肢芽形成時に肢芽細胞でみられる細胞突起形成
2. 筋再生における筋衛星細胞の遊走と増殖
3. 筋細胞の極性形成
4. 筋原線維形成におけるアクチンフィラメント形成

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

竹縄グループ

- Minagawa, T., Ijuin, T., Mochizuki, Y. and Takenawa, T.: Identification and Characterization of a Sac domain-containing Phosphoinositide 5-Phosphatase. **J. Biol. Chem.** 276 22011-22015 (2001)
- Nakagawa, H., Miki, H., Ito, M., Ohashi, K., Takenawa, T. and Miyamoto, S.: N-WASP, WAVE and Mena play different roles in the organization of actin cytoskeleton in lamellipodia. **J. Cell Sci.** 114, 1555-1565 (2001)

- Wu, H., Smyth, J., Luzzi, V., Fukami, K., Takenawa, T., Black, S. L., Allbritton, N. L., and Fissore, R. A.: Sperm Factor Induces Intracellular Free Calcium Oscillations by Stimulating the Phosphoinositide Pathway. **Biol. Reprod.** 64, 1338–1349 (2001)
- Takenawa, T., and Miki, H. (Review): WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. **J. Cell Sci.** 114, 1801–1809 (2001)
- Martinez-Quiles, N., Rohatgi, R., Anton, I. M., Medina, M., Saville, S. P., Miki, H., Yamaguchi, H., Takenawa, T., Hartwig, J. H., Geha, R. S., and Ramesh, N.: WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. **Nature Cell Biol.** 3, 484–491 (2001)
- Fukami, K., Nakao, K., Inoue, T., Kataoka, Y., Kurokawa, M., Fissore, R. A., Nakamura, K., Katsuki, M., Mikoshiba, K., Yoshida, N., and Takenawa, T.: Requirement of phospholipase C δ 4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. **Science** 292, 920–923 (2001)
- Suetsugu, S., Miki, H., Yamaguchi, H., and Takenawa, T.: Requirement of the basic region of N-WASP/WAVE2 for actin-based motility. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 282, 739–744 (2001).
- Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T.: Identification of another Actin-related protein (Arp) 2/3 complex binding site in Neural Wiskott–Aldrich syndrome protein (N-WASP), that complements actin polymerization induced by the Arp2/3 complex activating (VCA) domain of N-WASP. **J. Biol. Chem.** 276 33175–33181 (2001)
- Arai, Y., Ijuin, T., Itoh, M., Takenawa, T., Takashima, S., and Becker L. E.: Developmental changes of synaptojanin expression in the human cerebrum and cerebellum. **Brain Res Dev Brain Res.** 129, 1–9 (2001).
- Shcherbina, A., Miki, H., Kenney, D. M., Rosen, F. S., Takenawa, T., and Remold-O'Donnell, E.: WASP and N-WASP in human platelets differ in sensitivity to protease calpain. **Blood** 98, 2988–2991 (2001)
- Takenawa, T. and Itoh, T.: Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. (Review) **Biochim. Biophys. Acta** 1533, 190–206 (2001)
- Suetsugu, S., Miki, H., Yamaguchi, H., Obinata, T and Takenawa, T.: Enhancement of branching efficiency by the actin filament-binding activity of N-WASP·WAVE2 **J. Cell Sci.** 114, 4533–4542 (2001)
- Matuoka K, Chen KY, Takenawa T.: Rapid reversion of aging phenotypes by nicotinamide through possible modulation of histone acetylation. **Cell Mol. Life Sci.** 58, 2108–2116 (2001)
- Vetterkind, S., Miki, H., Takenawa, T., Klawitz, I., Scheidtmann, K. H., and Preuss, U.: The

rat homologue of WASP interacting protein (WIP) associates with actin filaments, recruits N-WASP from the nucleus and mediates mobilization of actin from stress fibers in favor of filopodia formation. **J. Biol. Chem.** 277, 87-95 (2002)

- Mizutani, K., Miki, H., He, H., Maruta, H. and Takenawa, T.: Essential Role of N-WASP in Podosome Formation and Degradation of Extracellular Matrix in src-transformed Fibroblasts. **Cancer Res.** 62, 669-674 (2002)

遠藤グループ

- Endo, T.: Reversal of terminally differentiated state in skeletal myocytes by SV40large T antigen. In *Reactivation of the Cell Cycle in Terminally Differentiated Cells* (Crescenzi, M., ed.) Landes Bioscience, Georgetown, Texas. pp. 63-75 (2002).
- Kato, M., Miki, H., Kurita, S., Endo, T., Nakagawa, H., Miyamoto, S., and Takenawa, T.: WICH, a novel verprolin homology domain-containing protein that functions cooperatively with N-WASP in actin-microspike formation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 291 (1): 41-47 (2002).
- Suzuki, A. and Endo, T.: Ermelin, an endoplasmic reticulum transmembrane protein, contains the novel HELP domain conserved in eukaryotes. **Gene** 284 (1/2): 31-40 (2002).

(2) 特許出願(平成 13 年度出願)

国内 3件

国外 1件