

「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や膜ラッ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。更に細胞の遊走がどのように筋発生と筋再生に関与するのかを調べた。特に今年度はWAVE1およびWAVE2の欠損マウスを作成し、個体での形態形成におけるこれらの蛋白質の役割について集中的に調べた。

## 2. 研究実施内容

(1) 細胞先端部でのアクチン線維の構築と推進力発生の機序。

WASPファミリー蛋白質がどのように細胞の運動や組織形成に関与しているかを明らかにする基礎的データとして細胞がいかにして運動するのか、遊走細胞先端部でどのようにして細胞推進力を生じているのかを調べた。

N-WASPやWAVEのC末にはverplorin相同領域(V)とcofilin様領域(C)及び酸性に富むアミノ酸配列(A)がある。V領域はアクチン結合領域であり、CA領域はArp2/3複合体を活性化して、アクチンの重合を促す。VCA領域はアクチン重合の触媒領域であり、WASPファミリータンパク質のArp2/3複合体活性化の必要最小領域である。Arp2/3複合体は新たなアクチン線維の形成に必須の役割を果たす。Arp2/3は、VCA領域で活性化され、新たなアクチンの核化と重合を促し、枝別れ状のアクチン線維を構築する。Arp2/3複合体によるアクチン線維の構築の特徴は枝別れ状構造を形成することであり、このようなアクチン構造は細胞が運動する際、先端部で推進力を発生するので必須である。N-WASPやWAVEのどの領域が枝別れ状構造形成に必要であるかを調べた。その結果、VCA領域に加え、塩基性領域が枝分かれ構造形成に必須であることが分かった。塩基性の領域はすでに存在しているアクチン線維のサイドに結合する活性を有し、Arp2/3複合体をアクチン線維の側鎖にリクルートする。その結果、アクチンがすでに存在する線維の側鎖から伸び、枝分かれ状の構造

を作ることが分かった。これらの構造は遊走している細胞の先端部で見られる構造と同一である。

### (2) WAVE1 と 2 の個体における機能解析。

WAVE1 と WAVE2 のノックアウトマウスを作成し、個体での機能を調べた。

WAVE1 は主に脳神経系で発現し、WAVE2 は普遍的に多くの組織で発現している。WAVE1 のノックアウトマウスは生後 3-4 週まで生きていたが、WAVE2 のノックアウトマウスは胎児期の 10.5 日で死亡した。WAVE1 ノックアウトマウスでは脳の層構造に一部異常が認められたものの、著明な変化はなかった。一方、WAVE2 のノックアウトマウスでは胎児期の 10 日頃に起こる、血管新生に異常が起こり、出血で死亡した。この原因を詳しく解析するため、様々な部位での血管の切片を切って組織染色し調べた。すると発生初期の頃に起こる原始的な血管の形成は正常に起こっているが、その後起こる血管のリモデリング、血管新生に異常が見られることが分かった。ノックアウトマウスでは 10 日ころに生じる神経管の中への血管の進入も認められず、いったんでき上がった血管の複雑な血管への移行が妨げられることが分かった。一方、*in vitro*での血管形成実験でも原始的な血管網はできるものの、複雑な血管網の構築にまで進まなかった。WAVE2 の発現は特に血管内皮細胞で高く、それも胎児期 8 日目頃から発現量が著しく増加した。一方、WAVE1 の内皮細胞での発現は見られたが、発生時期で変わらなかった。また血管の内皮細胞を取りだし、VEGF による遊走を調べた。WAVE2 ノックアウトマウスから取った内皮細胞は VEGF 刺激による、遊走先端部での葉状仮足形成が著しく阻害されていた。これらの結果から WAVE2 は血管新生において内皮細胞の遊走に関わり、複雑な血管網を作るのに必須であると考えられた。

### (3) 成熟筋細胞の脱分化誘導と再生

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た。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。これらの脱分化細胞を単離して適切な条件下で培養すると、骨格筋細胞だけでなく脂肪細胞や骨細胞に分化転換した。したがって脱分化細胞は幹細胞と同様に分化の多能性をもっていることが示された。

筋再生過程では、筋衛星細胞が損傷部に遊走し増殖した後に、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、分化が阻害された。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と未分化状態の維持に関与していると考えられる。一方、C2 細胞の遊走は HGF により誘導された。この遊走は N-WASP のドミナントネガティブ変異体によって抑制されたことから、遊走には N-WASP が関与していることが示された。

筋原線維のアクチン重合の機構は未だに不明である。筋原線維の Z 線には N-WASP が

局在していた。一方, nebulin の C 末端側に存在する SH3 部位は Z 線に局在している。N-WASP のプロリンリッチ領域は nebulin の SH3 部位に結合し, しかも Z 線への局在に不可欠であった。したがって N-WASP は nebulin への結合を介して Z 線に局在し, 筋原線維のアクチン重合にかかわると推測される。

### 3. 研究実施体制

#### 竹縄 グループ

(1) 研究分担グループ長: 竹縄忠臣 (東京大学医科学研究所・教授)

(2) 研究項目: 細胞遊走の形態形成への関与

#### 遠藤 グループ

(1) 研究分担グループ長: 遠藤 剛 (千葉大学理学部・助教授)

(2) 研究項目: 筋肉形成機序の解明

### 4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

#### (1) 論文発表

##### 竹縄グループ

- 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, 41-47 (2002)

- Arai, Y., Ijuin, T., Takenawa, T., Becker, L. E., and Takashima, S. Excessive expression of synaptojanin in brains with Down syndrome Brain Dev. 24, 67-72 (2002)

- Suzuki, T., Mimuro, H., Suetsugu, S., Miki, H., Takenawa, T. and Sasakawa, C.

Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) is the specific ligand for Shigella VirG among the WASP family and determines the host cell type allowing actin-based spreading.

Cell Microbiol. 4, 223-233 (2002)

- Yamaguchi, H., Miki, H., and Takenawa, T,

Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein is involved in hepatocyte growth factor-induced migration, invasion, and tubulogenesis of epithelial cells.

Cancer Res. 62, 2503-2509 (2002)

- Miki, H., and Takenawa, T.

WAVE2 serves a functional partner of IRSp53 by regulating its interaction with Rac.

- Biochem. Biophys. Res. Commun. 293, 93–99 (2002)
- Fujiwara, I., Suetsugu, S., Uemura, S., Takenawa, T., and Ishiwata, S.  
Visualization and force measurement of branching by Arp2/3 complex and N-WASP in actin filament.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 293, 1550–1555 (2002)
  - Sayama, K., Yamasaki, K., Hanakawa, Y., Shirakata, Y., Tokumaru, S., Ijuin, T., Takenawa, T., and Hashimoto, K.  
Phosphatidylinositol 3-kinase is a key regulator of early phase differentiation in keratinocytes J. Biol. Chem. 277, 40390–40396 (2002)
  - Yamaguchi, H., Miki, H., and Takenawa, T.  
Two verprolin homology domains increase the Arp2/3 complex-mediated actin polymerization activities of N-WASP and WAVE1 C-terminal regions.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. ;297, 214–219 (2002)
  - Suetsugu, S., Hattori, M., Miki, H., Tezuka, T., Yamamoto, T., Mikoshiba, K., and Takenawa, T.  
Sustained Activation of N-WASP through Phosphorylation Is Essential for Neurite Extension.  
Dev. Cell 3, 645–658 (2002)
  - Klein, C., Nguyen, D., Liu, C. H., Mizoguchi, A., Bhan, A. K., Miki, H., Takenawa, T., Rosen, F. S., Alt, F. W., Mulligan, R. C., and Snapper, S. B.  
Gene therapy for Wiskott Aldrich Syndrome: rescue of T-cell signaling and amelioration of colitis upon transplantation of retrovirally transduced hematopoietic stem cells in mice.  
Blood 101, 2159–2166 (2003)
  - Otsuki, M., Itoh, T. and Takenawa, T.  
N-WASP is recruited to rafts and associates with wndophilin A in response to EGF  
J. Biol. Chem. 278, 6461–6469 (2003)
  - Nozumi, M., Nakagawa, H., Miki, H., Takenawa, T., and Miyamoto, S.  
Differential localization of WAVE isoforms in filopodia and lamellipodia of the neuronal growth cone.  
J Cell Sci 116, 239–246 (2003)
  - Ijuin, T., and Takenawa, T.  
SKIP Negatively Regulates Insulin-Induced GLUT4 Translocation and Membrane Ruffle Formation.  
Mol .Cell. Biol. 23, 1209–1220 (2003)
  - Tobe, K., Asai, S., Matuoka, K., Yamamoto, T., Chida, K., Kaburagi, Y., Akanuma, Y., Kuroki, T., Takenawa, T., Kimura, S., Nagai, R., and Kadowaki, T.

Cytoskeletal reorganization induced by insulin: involvement of Grb2/Ash, Ras and phosphatidylinositol 3-kinase signalling.

Genes Cells 8, 29-40 (2003)

- Sawa, M., Suetsugu, S., Sugimoto, A., Miki, H., Yamamoto, M., and Takenawa, T. Essential role of the *C. elegans* Arp2/3 complex in cell migration during ventral enclosure.

J Cell Sci 116, 1505-1518 (2003)

- Fukami, K., Yoshida, M., Inoue, T., Kurokawa, M., Fissore, R. A., Yoshida, N., Mikoshiba, K., and Takenawa, T.

Phospholipase Cdelta4 is required for Ca<sup>2+</sup> mobilization essential for acrosome reaction in sperm.

J. Cell. Biol. 161, 79-88 (2003)

#### 遠藤グループ

- Nguyen, Q.-D., Faivre, S., Bruyneel, E., Rivat, C., Seto, M., Endo, T., Mareel, M., Emami, S., and Gaspach, C.: RhoA- and RhoD-dependent regulatory switch of G $\alpha$  subunit signaling by PAR-1 receptors in cellular invasion. FASEB J. 16, 565- 576 (2002).

- Régnauld, K., Nguyen, Q.-D., Vakaert, L., Bruyneel, E., Launay, J.-M., Endo, T., Mareel, M., Gaspach, C., and Emami, S.: G-protein  $\alpha$ olf subunit promotes cellular invasion, survival, and neuroendocrine differentiation in digestive and urogenital epithelial cells. Oncogene 21, 4020- 4031 (2002).

- Abe, T., Kato, M., Miki, H., Takenawa, T., and Endo, T.

Small GTPase Tc10 and its homologue RhoT induce N-WASP-mediated long process formation and neurite outgrowth

J. Cell Sci. 116, 155-168 (2003)

- Sun, P., Yamamoto, H., Suetsugu, S., Miki, H., Takenawa, T., and Endo, T.

Small GTPase Rac/Rab34 is associated with membrane ruffles and macropinosomes and promotes macropinosome formation.

J. Biol. Chem. 278, 4063-4071 (2003)

#### (2) 特許出願

1 件