

「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や葉状仮足（膜ラッフリング）形成にかかわるWAVE 1-3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3種存在するWAVEファミリー蛋白質のおのおのの生理的機能の違いを明らかにしたいと考え、WAVE1, WAVE2, WAVE3の欠損マウスを作成し、個体での形態形成や細胞運動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。今年度はWAVE 1とWAVE2の欠損マウスが作成できたので、この2つの蛋白質について調べた。

筋再生において筋衛星細胞の遊走と増殖ならびに未分化状態の維持が不可欠である。LIFは衛星細胞を未分化状態に維持し、筋細胞に自己複製能を付与する重要なファクターであるが、その情報伝達系は不明であった。本プロジェクトではLIFによる情報伝達にM-Rasの転写誘導とM-Ras蛋白質の活性化が必要であることを証明した。更にマウス生体内の成熟筋細胞にホメオボックス遺伝子のMsx1を発現させると、細胞周期を回って細胞分裂を引き起こすことで単核細胞が多数生じ、筋肉細胞の脱分化がもたらされた。これらの脱分化細胞は幹細胞化しており、多分化能を持っていた。

2. 研究実施内容

(1) WAVE1およびWAVE2欠損線芽細胞を用いたの運動能解析

WAVE1およびWAVE2のノックアウトマウスを作成し、マウス胎児より線維芽細胞(MEF)を採取しライン化した。野生型のMEFにはWAVE2が主に、WAVE1が少量発現していた。細胞内での局在を調べたところ、WAVE1は主にupward ruffleに存在し、WAVE2は主にperipheral ruffleに存在した。WAVE1欠損MEFではleading edgeの形成は生じたが、細胞の上方向に見られる、花びら状のupward ruffleの形成に障害が見られた。一方、WAVE2を欠損するMEFは化学遊走因子の濃度勾配に応じたleading edgeの形成がほとんど見られず活性型Racによる膜ラッフリングも消失した。化学遊走因子による方向性をもった細胞遊走ではWAVE1欠損MEFではほぼ正常に先端部にleading edgeの形成が生じ、化学遊走因子に

向かっての遊走も生じたが、WAVE2欠損MEFではleading edgeの形成及び遊走が著しく障害されていた。更に、マトリゲル中での3次元における遊走ではWAVE1もWAVE2も細胞の先端部に存在し、WAVE1は先端部にメタロプロテアーゼを濃縮し、マトリゲルを溶かし、進む道を作るのに必須で、WAVE2は運動そのものに必須であった。これらの結果から、WAVEはいずれも膜ruffle形成に関わるものの、細胞運動にWAVE1とWAVE2は異った機能を果たしていることが示唆された。胎児期の形態形成には細胞が3次元の中を、基質を溶かしだして、移動することが必要である。よってWAVE1とWAVE2は両者とも形態形成時の細胞運動に重要であろう。

(2) N-WASPのリン酸化と神経突起形成

N-WASPはCdc42とPIP2の共存下で活性化され、VCA領域が開き、arp2/3複合体が結合することで、アクチンの重合を促し、糸状仮足を形成すると考えられている。我々はこの経路とは別に、Srcファミリーのチロシンキナーゼでリン酸化されて、活性化される系を見いだした。この経路による活性化は神経細胞ではむしろ主要な経路であった。NGF刺激はN-WASPのリン酸化を促し、活性化し、神経の成長円錐でのアクチン繊維を伸ばして、神経突起形成を促進した。N-WASPのリン酸が起こらないようにした変異体では、NGFによる神経突起形成が抑制された。更に、いったんリン酸化され、活性化されたN-WASPは速やかにユビキチン化を受け、プロテアソームで分解されるが、NGFは分解を抑制してN-WASPの活性を持続させるのに対し、EGF刺激はリン酸化を起こすものの、リン酸化されたN-WASPは速やかに分解された。これらのことから、神経突起形成には持続したN-WASPの活性化が必要であることが明らかとなった。

(3) 成熟筋細胞の脱分化誘導と再生

(1) 生体内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にAAVベクターによりMsx1を形質導入し発現させたところ、多核の成熟筋細胞が細胞周期を回って細胞分裂をすることにより単核細胞が多数出現した。すなわち脱分化がもたらされた。これらの脱分化細胞はやがて分化と成熟をして、筋再生が起こった。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。また脱分化細胞では、幹細胞マーカーのSca-1の発現が上昇していた。したがって脱分化細胞は幹細胞化して分化の多能性をもつようになった可能性が示された。

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、分化し成熟して再生がもたらされる。衛星細胞の遊走はHGFにより誘導される。マウス衛星細胞由来C2細胞のHGFによる葉状仮足形成と遊走は、N-WASPとWAVE2のいずれのドミナントネガティブ変異体によっても抑制された。さらにWAVE2のRNAiによっても顕著に抑制された。またPI3キナーゼ阻害剤によっても抑制された。したがって衛星細胞の遊走にはPI3キナーゼの下流で働くN-WASPとWAVE2がかかわっていることが示された。

一方、衛星細胞の未分化状態の維持はES細胞の未分化状態の維持と同様に、LIFによってもたらされる。LIF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。実際に、C2細胞をLIFで刺

激すると、M-Ras遺伝子の転写が誘導され、さらにM-Rasの活性化と核移行がみられた。また活性化M-RasはC2細胞の分化を阻害した。したがってM-RasはLIFによる衛星細胞の未分化状態の維持に関与していると考えられる。

(4) 筋原線維のアクチンフィラメント形成の機構。

筋原線維のZ帯にはN-WASPが局在していた。一方、nebulinのC末端に存在する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帯への局在に不可欠であった。N-WASP-Arp2/3複合体によるアクチン重合はnebulinのC末端断片により促進された。さらにN-WASPとnebulinの結合はinsulin刺激により促進された。これはinsulin刺激によりnebulinのリン酸化が阻害されることと、N-WASPのコンフォメーション変化などが起こることにより引き起こされた。したがってinsulinによるnebulin-N-WASP相互作用の誘導が、筋原線維のアクチンフィラメント形成をもたらすと考えられる。

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

○ Nakamura, Y., Fukami, K., Yu, H., Takenaka, K., Kataoka, Y., Shirakata, Y., Nishikawa, S., Hashimoto, K., Yoshida, N., and Takenawa, T.

Phospholipase C δ 1 is required for skin stem cell lineage commitment

EMBO J. 22 2981-2991 (2003)

○ Yamazaki, D., Suetsugu, S., Miki, H., Kataoka, Y., Nishikawa, S., Fujiwara, T., Yoshida, N., and Takenawa, T.

WAVE2, involved in directed cell migration, is required for cardiovascular development

Nature 424, 452-456 (2003)

○ Matuoka, K., Chen, K.Y., and Takenawa, T.

A positive role of phosphatidylinositol 3-kinase in aging phenotype expression in cultured human diploid fibroblasts.

Arch Gerontol Geriatr. 36, 203-219 (2003)

- Kitamura, Y., Shibagaki, K., Takata, K., Tsuchiya, D., Taniguchi, T., Gebicke-Haerter, P. J., Miki, H., Takenawa, T., and Shimohama S.
Involvement of Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein (WAVE) and Rac1 in the phagocytosis of amyloid-beta(1 - 42) in rat microglia.
J. Pharmacol. Sci. 92, 115-123 (2003).
- Kitamura, Y., Tsuchiya, D., Takata, K., Shibagaki, K., Taniguchi, T., Smith, M. A., Perry, G., Miki, H., Takenawa, T., and Shimohama, S.
Possible involvement of Wiskott-Aldrich syndrome protein family in aberrant neuronal sprouting in Alzheimer's disease.
Neurosci. Lett. 346, 149-152 (2003).
- Suetsugu, S., and Takenawa, T.
Translocation of N-WASP by nuclear localization and export signals into the nucleus modulates expression of HSP90.
J. Biol. Chem. 278, 42515-42523 (2003)
- Takenaka, K., Fukami, K., Otsuki, M., Nakamura, Y., Kataoka, Y., Wada, M., Tsuji, K., Nishikawa, S., Yoshida, N., and Takenawa T.
Role of phospholipase C-12, a novel phospholipase C-like protein that lacks lipase activity, in B-cell receptor signaling.
Mol. Cell Biol. 23, 7329-7338 (2003).
- Suetsugu, S., Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T.
Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration.
Dev. Cell. 5, 595-609 (2003)
- Wu, X., Suetsugu, S., Cooper, L. A., Takenawa, T., and Guan, J. L.
Focal adhesion kinase regulation of N-WASP subcellular localization and function.
J. Biol. Chem. 2003
- Mizutani, K., Suetsugu, S., and Takenawa, T.
FBP11 regulates nuclear localization of N-WASP and inhibits N-WASP-dependent microspike formation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 313, 468-474 (2004).

(2) 特許出願

なし