

「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（膜ラップリング）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。3種存在するWAVEファミリー蛋白質のお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役割について調べた。更に、WAVE 1とWAVE2の欠損マウスよりマウス胎児線維芽細胞株を樹立し、WAVE1とWAVE2の細胞遊走への関与を調べた。

## 2. 研究実施内容

### 1. 細胞遊走先端部の形成とアクチン線維の構築

我々はN-WASPがCdc42のシグナルを受けて活性化され、アクチン重合のマシーナリーであるArp2/3複合体を使って、細胞先端部で新たなアクチンの重合を促し糸状仮足形成を起こすこと、一方WAVEはRacによって活性化されArp2/3複合体を活性化して葉状仮足形成を引き起こすことを明らかにしてきた。WAVE蛋白質は3種存在するが、これらが同じ働きをするのか、異なるのかを調べるためWAVE 1とWAVE2の欠損マウスよりマウス胎児線維芽細胞株を樹立し、WAVE1とWAVE2の細胞遊走への関与を調べた。WAVE2は細胞先端部でのlamellipodia形成に必須であったが、WAVE1は必須ではなかった。WAVE2はより先端部でのアクチンの重合を引き起こすのに対し、WAVE1はWAVE2の後方に位置し、WAVE2が構築した葉状仮足を更に厚く、成熟したものにする役割を果たしていることを明らかにした。

### 2. WAVE2が細胞先端部へ局在する理由

なぜ細胞先端部にN-WASPやWAVE2が局在してくるのかは不明であった。そこでWAVE2の先端部局在と活性化を明らかにしようと試みた。化学遊走因子の濃度勾配を感知して、Gタンパク質にカップルした受容体が活性化され、PI 3-キナーゼが活性化されると、PI(3,4,5)P3が生成する。これが細胞の極性を発生する最初のシグナルであると考えられている。我々はWAVE2がこの脂質により先端部に引きつけられ、活性化するのではないか

と考えた。様々なWAVE2の変異体を構築し脂質との結合活性を調べた。するとWAVE2は分子の中間に存在する、塩基性に富んだ領域でPI(3,4,5)P3に特異的に結合することが分かった。また結合できない変異体は先端部への局在も見られず、アクチンの重合も抑制されていた。またPI 3-キナーゼの阻害剤であるワートマニンの処理によってもWAVE2の細胞膜への移行は阻害された。よってWAVE2が先端部に局在するのは生成したPI(3,4,5)P3を目指して移行することで生じていることを示した。

### 3. 筋細胞の遊走機序

筋肉が傷害を受け再生する際、筋サテライト細胞が傷害部位に遊走し、分裂して筋肉を再生する。この遊走は主に筋原繊維や傷害筋肉から遊離されたHGFによって起こされる。この遊走の機序を明らかにするため、サテライト細胞由来のマウスC12C2骨格筋細胞を用いた。HGFはアクチン細胞骨格系の再構築を起こし、lamellipodia形成を促した。しかもHGF処理により方向性のない遊走も方向性の決まった遊走も促進された。運動している細胞において、WAVE2やN-WASPは細胞の先端部に位置した。WAVE2やN-WASPの発現は更に運動性を高めるのに対し、WAVE2やN-WASPのドミナントネガティブ体の発現やRNA1によるそれらの蛋白質の欠損は葉状仮足形成や遊走を抑制した。またPI 3-キナーゼの阻害剤の処理によってもHGFによる細胞遊走は抑制された。これらの結果からWAVE2やN-WASPはPI 3-キナーゼの下流で活性化されて、葉状仮足を形成して細胞を遊走に導くと考えられた。

### 4. 筋原繊維のアクチンフィラメント形成の機構

筋原繊維の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。インスリンシグナルがない状態では、nebulinはGSK3bでリン酸化され、nebulinとN-WASPとの結合が抑制されている。インスリン刺激によりPI 3-キナーゼが活性化されAktが活性化されると、GSK3bのリン酸化が生じ、GSK3bの活性を阻害する。するとnebulinのリン酸化が阻害され、N-WASPとの結合活性が増し、N-WASPを活性化してアクチン重合を起こすと考えられた。したがってinsulinによるnebulin-N-WASP相互作用の誘導が、筋原繊維の再生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

- 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.* 279, 9565-9576 (2004)
- 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).
- Kouchi, Z., Fukami, K., Shikano, T., Oda, S., Nakamura, Y., Takenawa, T., and Miyazaki, S.: Recombinant phospholipase C $\zeta$  has high Ca<sup>2+</sup> sensitivity and induces Ca<sup>2+</sup> oscillations in mouse eggs. *J. Biol. Chem.* 279, 10408-10412 (2004)
- Tsujita K, Itoh T, Ijuin T, Yamamoto A, Shisheva A, Laporte J, and Takenawa T.: Myotubularin regulates the function of the late endosome through the gram domain-phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate interaction. *J. Biol. Chem.* 279, 13817-13824 (2004)
- Kurokawa, M., Sato, K., Smyth, J., Wu, H., Fukami, K., Takenawa, T., and Fissore, R. A.: Evidence that activation of Src family kinase is not required for fertilization-associated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in mouse eggs. *Reproduction.* 127, 441-454 (2004).
- Oikawa, T., Yamaguchi, H., Itoh, T., Kato, M., Ijuin, T., Yamazaki, D., Suetsugu, S., and Takenawa, T. : PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nat. Cell Biol.* 6, 420-426 (2004).
- Verma, S., Shewan, A.M., Scott, J.A., Helwani, F.M., den Elzen, N.R., Miki, H., Takenawa, T., and Yap, A.S.: Arp2/3 activity is necessary for efficient formation of E-cadherin adhesive contacts. *J Biol. Chem.* 279, 34062-34070. (2004)
- Irino, Y., Cho, H., Nakamura, Y., Nakahara, M., Furutani, M., Suh, P.G., Takenawa, T., and Fukami, K.: Phospholipase C delta-type consists of three isozymes: bovine PLCdelta2 is a homologue of human/mouse PLCdelta4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 537-543 (2004).
- Oda, A., Miki, H., Wada, I., Yamaguchi, H., Yamazaki, D., Suetsugu, S., Nakajima, M., Nakayama, A., Okawa, K., Miyazaki, H., Matsuno, K., Ochs, H.D, Machesky, L.M., Fujita, H., and Takenawa, T. : WAVE/Scars in Platelets. *Blood.* 2004 Aug 3 Epub 2004 Jul 27.

- Funato, Y., Terabayashi, T., Suenaga, N., Seiki, M., Takenawa, T., and Miki, H.: IRSp53/Eps8 complex is important for positive regulation of Rac and cancer cell motility/invasiveness. *Cancer Res.* 64, 5237-5244 (2004).
- Suetsugu S., Tezuka T., Morimura T., Hattori M., Mikoshiba K., Yamamoto T., and Takenawa T.: Regulation of actin cytoskeleton by mDab1 through N-WASP and ubiquitination of mDab1. *Biochem J.* 384, 1-8 (2004)
- Kawamura, K., Takano, K., Suetsugu, S., Kurisu, S., Yamazaki, D., Miki, H., Takenawa, T., and Endo T.: N-WASP and WAVE2 acting downstream of phosphatidylinositol 3-kinase are required for myogenic cell migration induced by hepatocyte growth factor. *J Biol Chem.* 279, 54862-54871 (2004)
- Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempiak, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., Segall, J., Eddy, R., Miki, H., Takenawa, T., and Condeelis, J.: Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J. Cell Biol.* 168, 441-452 (2005)
- Kato M, and Takenawa T.: WICH, a member of WASP-interacting protein family, cross-links actin filaments. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 328,1058-1066 (2005)
- Kurisu, S., Suetsugu, S., Yamazaki, D., Yamaguchi, H., and Takenawa, T.: Rac-WAVE2 signaling is involved in the invasive and metastatic phenotypes of murine melanoma cells. *Oncogene* 24 1309-1319. (2004)
- Bierne, H., Miki, H., Innocenti, M., Scita, G., Gertler, F. B., Takenawa, T., and Cossart, P.: WASP-related proteins, Abil and Ena/VASP are required for Listeria invasion induced by the Met receptor. *J. Cell Sci.* 118, 1537-1547 (2005)

#### 遠藤グループ

- Nishiyama, A., Endo, T., Takeda, S., and Imamura, M.: Identification and characterization of  $\epsilon$ -sarcoglycans in the central nervous system. *Mol. Brain Res.* 125, 1-12. (2004).
- Abe, T., Takano, K., Suzuki, A., Shimada, Y., Inagaki, M., Sato, N., Obinata, T., and Endo, T.: Myocyte differentiation generates nuclear invaginations traversed by myofibrils associating with sarcomeric protein mRNAs. *J. Cell Sci.* 117, 6523-6534 (2004).
- Kawamura, K., Takano, K., Suetsugu, S., Kurisu, S., Yamazaki, D., Miki,

H., Takenawa, T., and Endo, T.: N-WASP and WAVE2 acting downstream of phosphatidylinositol 3-kinase are required for myogenic cell migration induced by hepatocyte growth factor. *J. Biol. Chem.* 279, 54862–54872 (2004).

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：4件）