

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域「生物の発生・分化・再生」

研究課題

「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」

## 研究終了報告書

研究期間:平成 12 年 11 月～平成 17 年 10 月

研究代表者 : 竹縄 忠臣

(東京大学医科学研究所、教授)

## 1. 研究実施の概要

### 1) WASP/WAVE 蛋白質の細胞運動および形態形成での役割.

細胞運動(遊走)は免疫担当細胞の移動、皮膚創傷の治癒、癌細胞の浸潤、転移から器官形成や再生に至る、様々な生命活動に関係する、生物の根幹をなす現象の一つである。

我々は新しいアダプター蛋白質、Ash/Grb2 を見つけ、その蛋白質が SH3 ドメインを介して、Sos (Ras の GDP/GTP 交換因子)に結合し、Ras を活性化させ、MAP-K の活性化を経て、核へ増殖シグナルを送る働きをすることを明らかにした。現在、Ash/Grb2 は様々な細胞増殖因子のシグナル伝達に使われ、非常に重要なシグナリング分子となっていることが分かっている。我々は本プロジェクトに繋がる重大な手がかりをその実験の過程で見いだした。それは Ash/Grb2 の抗体を細胞内に注入したところ、PDGF 刺激による DNA 合成促進を阻害したのみならず、膜ラフリングをも抑制したことである。この事実は Ash/Grb2 の下流に細胞骨格系を制御する蛋白質が存在することを示唆していた。次に細胞骨格に繋がる Ash/Grb2 の下流分子の探索に取り掛かった。その結果、細胞運動に必須の役割を果たす蛋白質、N-WASP や WAVE 蛋白質を発見した。

これらの蛋白質はいずれも C-末に VCA 領域を有し、V 領域に単量体アクチンを結合し CA 領域に Arp2/3 複合体を結合して、アクチン重合の核を作り、アクチンの重合を引き起こすことを明らかにした。静止状態にあるアクチン細胞骨格はアクチン線維の端がキャッピング蛋白質で塞がれ、細胞が安定化されている。そこで細胞が刺激を受けて骨格の再編を生じ、遊走しようとする際にはキャップを外すか、アクチン線維を切断して新たなアクチン端を作り、そこからアクチンを伸ばす必要があると考えられていた。しかしこのような機序では先端部で見られる網目状のアクチンの線維は構築されないし、アクチン重合開始に時間がかかりすぎる。我々の見いだしたシステムでは N-WASP や WAVE はすでにあるアクチン線維の側面に結合でき、Arp2/3 複合体を使って、側鎖をのばすことができるため、新たなアクチン端を作らなくても刺激を受けて、急激な先端部でのメッシュ状のアクチン線維の構築を起すことができるという特徴を持っていた。次に、N-WASP や WAVE2 が細胞先端部に局在し、活性化を受ける機序を明らかにしようと試みた。N-WASP は細胞膜に存在する PI(4,5)P<sub>2</sub> と結合し、活性化 Cdc42 と膜で結合し活性化され、WAVE2 は PI(3,4,5)P<sub>3</sub> が生成するとその部位に移行し、活性型 Rac と結合して活性化されることを証明した。その結果、化学遊走因子の刺激を受け、細胞先端部で N-WASP は Cdc42 の下流で活性化され、糸状仮足を形成し進む方向を決定し、

WAVE は Rac の下流にあって葉状仮足を形成して推進力を生み出し、細胞を動かすという、細胞運動の基盤的概念を世界に先駆けて確立した(図1)。

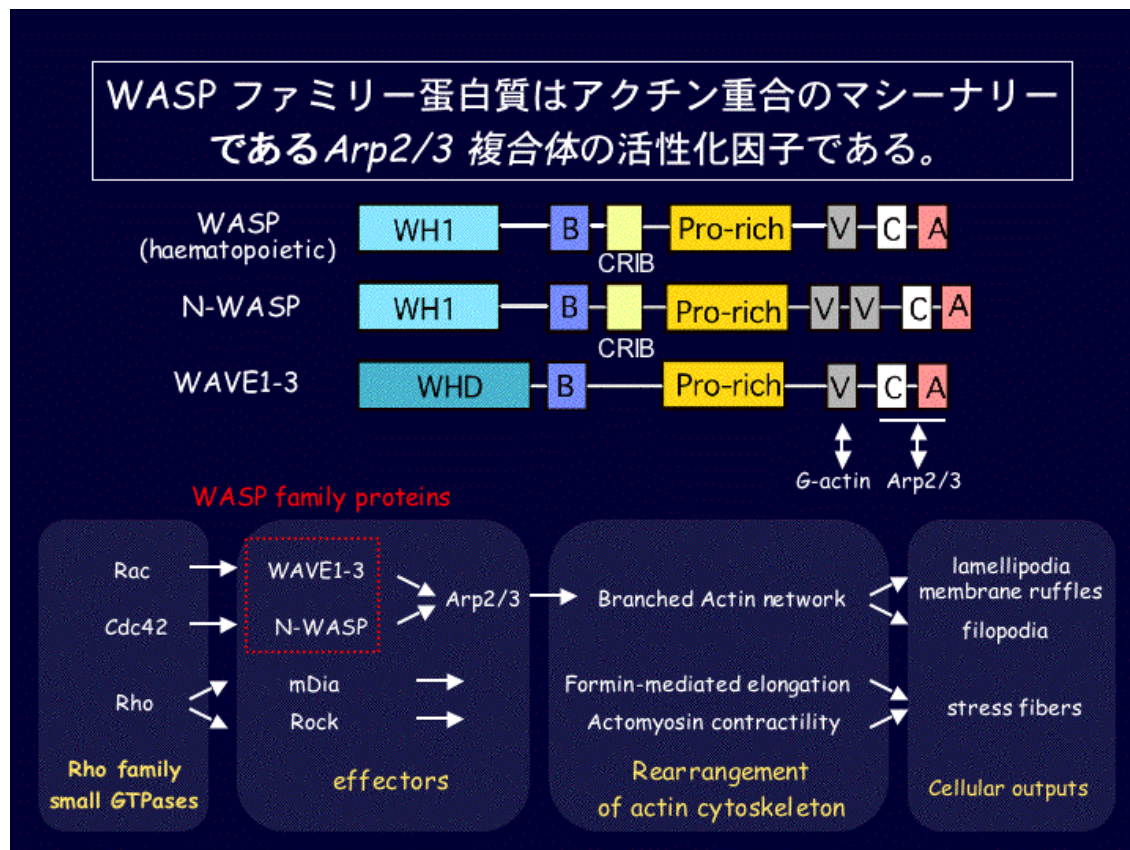


図1. WASP ファミリー蛋白質は C 末の VCA 領域で Arp2/3 複合体と actin に結合し、網目状のアクチン線維を編み上げる。

更に、WAVE 蛋白質の形態形成期での機能を調べるため、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 と、WAVE1 が発現していた。WAVE2 を欠損した MEF は化学遊走因子の濃度勾配に応じたラメリポジアの形成がほとんど見られず、細胞遊走も著しく障害されていた。一方、WAVE1 欠損 MEF ではほぼ正常に先端部にラメリポジアの形成が生じ、化学遊走因子に向かっての遊走も生じた。これらの細胞を用いて、細胞の伸展における、WAVE1 と WAVE2 の役割をファイブロネクチンをコートしたシャーレを用いて調べた。野生型の線維芽細胞はシャーレに接着した後、速やかにラメリポジアを発達させ伸展した。この際、WAVE1 は細胞の伸展先端部にあるというよりも、細胞の上方に存在し一方、WAVE2 は細胞伸展の先端に存在した。WAVE1 のノックダウンした細胞では、薄いラメリポ

ジアの発達と非常に速い伸展が起こり、接着が伸展に追いつかず、ラメリポジアの退縮がおこった。WAVE2のノックダウンした細胞ではラメリポジアそのものができず、一部WAVE1による代償的に生じたラメリポジアが部分的に存在した。これらの結果から、WAVE2は細胞の先端部にあり、ラメリポジアを構成し、細胞を運動させる力を発生させるのに対し、WAVE1は先端部のラメリポジアを成熟した形にしていると考えられた。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日ご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。

## 2) 筋発生と筋再生における細胞の遊走と形態形成の分子機構

哺乳類の発生過程や再生過程において正常に形態形成が起こるために、細胞遊走は不可欠な現象である。培養細胞の遊走の機構については近年盛んに研究がなされている。しかし生体における細胞遊走の分子機構についてはほとんど明らかにされていない。発生過程における筋形成では、筋前駆細胞が皮筋節から葉裂し、肢芽や横隔膜などへ遊走して骨格筋を形成する。また成体における筋再生過程では、幹細胞の一種である衛星細胞が筋損傷部に遊走する。そこで衛星細胞は増殖、分化、さらに成熟して筋再生に至る。したがって骨格筋は発生・再生過程における細胞遊走の格好のモデルを提供する。本研究では、マウスの筋発生および筋再生過程における細胞遊走と形態形

成の分子機構について、特に WASP ファミリー蛋白質および当研究室で同定した低分子量 G 蛋白質の M-Ras に着目して解明を進めた。まず再生過程における肝細胞増殖因子 (HGF) による衛星細胞の走化性の機構を解明する目的で、衛星細胞由来のマウス骨格筋 C2C12 細胞の走化性の分子機構を N-WASP と WAVE に着目して調べた。またインスリン様増殖因子 1 (IGF-1) により筋成熟と筋肥大が起こるが、この際に起こる筋原線維形成の分子機構について、N-WASP によるアクチン線維形成に着目して調べた。一方、WAVE1 ノックアウトマウスでは著しい筋萎縮がみられたが、この分子機構の解明を進めている。さらに M-Ras の標的蛋白質として同定した DA-Raf による筋細胞分化誘導の分子機構を調べた。

これまでに、C2C12 の最終分化筋管細胞に SV40 large T 抗原を発現させると、再び細胞周期に入り細胞分裂をすること、すなわち脱分化がもたらされることを明らかにしている。その後、C2C12 筋管細胞にホメオボックス遺伝子 Msx1 を発現させた場合にも、脱分化が起こり多数の単核細胞が出現することが示された。さらにこれらの脱分化細胞は分化の多能性をもち、筋管細胞に再分化するだけでなく脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞に分化転換することも示されている。しかし依然として、成体の成熟筋細胞(筋線維)に脱分化や分化転換が起こるかどうかは不明であった。そこで本研究では、マウス骨格筋に Msx1 を発現させた場合に脱分化が起こり、さらに脱分化細胞に分化転換が起こる可能性について検討した。また SV40 large T 抗原によって筋管細胞から生じた脱分化細胞、および Msx1 によって筋線維から生じた脱分化細胞が、幹細胞の状態になっているかどうかを調べた。さらに Msx1 によって生じた脱分化細胞が、筋ジストロフィーをはじめとした筋疾患の細胞治療に応用できる可能性について検討した。

我々は本研究で血管等の形態形成や神経突起伸展において N-WASP や WAVE による細胞運動が必須であることや筋肉の再生におけるアクチン重合でも重要であることを示し、又その医学応用性の大きさも示した。

## 2. 研究構想及び実施体制

### (1) 研究構想

細胞運動(遊走)は免疫担当細胞の移動、皮膚創傷の治癒、癌細胞の浸潤、転移から器官形成や再生に至る、様々な生命活動に関係する、生物の根幹をなす現象の一つである。我々はすでに見つけていた新しいアダプター蛋白質 Ash/Grb2 の抗体を細胞に注入すると増殖因子刺激による

DNA 合成のみならず、細胞骨格再編も抑制されることを見いだした。そのことは Ash/Grb2 の下流にある蛋白質が細胞骨格調節を行っていることを意味した。そこで下流に存在するこの蛋白質を探索し、SH3 ドメインに結合する蛋白質として N-WASP を採った。これがこのプロジェクトの始まりである。N-WASP は Cdc42 の下流で活性化され糸状体仮足を形成する蛋白質であった。続いて WAVE1-3 蛋白質を採った。この蛋白質は Rac の下流にあり葉状仮足を形成する蛋白質であった。これらの蛋白質は両者とも細胞骨格を制御し、細胞運動を引き起こす蛋白質であった。そこで細胞運動や形態形成へのこれらの蛋白質の関与を調べた。竹縄チームは主に WASP/WAVE 蛋白質の細胞運動への関与や個体での機能を明らかにする研究を行い、遠藤チームは筋肉の分化、再生へのこれらの蛋白質の関与を主に研究した。

## (2) 実施体制

### 竹縄 グループ

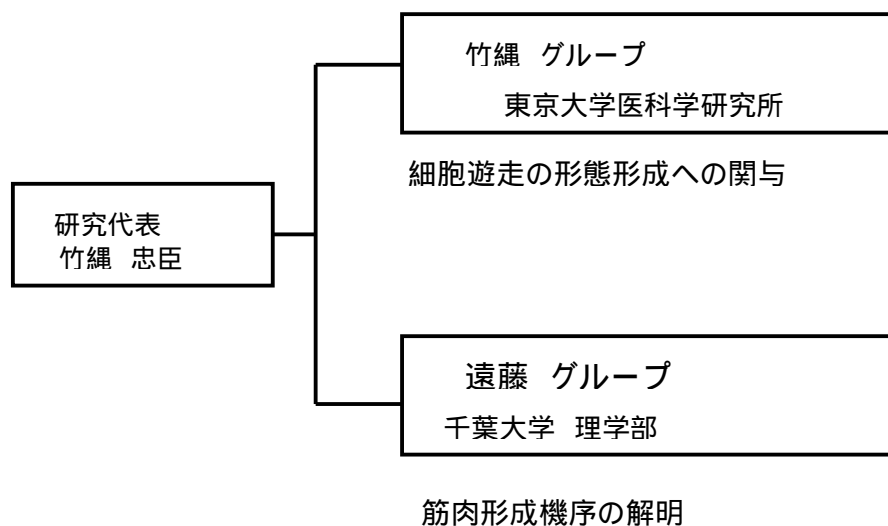
( 1 ) 研究分担グループ長：竹縄忠臣（東京大学医科学研究所・教授）

研究項目：細胞遊走の形態形成への関与の解明を分担

### 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・教授）

研究項目：筋肉形成機序の解明を分担



### 3. 研究実施内容及び成果

#### 3.1 細胞遊走の形態形成への関与(東京大学 竹縄グループ)

##### (1) 研究実施内容及び成果

胎児期に生じる形態形成には様々な細胞が決められた時期、所定の場所に遊走し、器官を形成する。我々は WASP/WAVE ファミリータンパク質が細胞のアクチン骨格系の再構成を介して細胞運動を制御し、形態形成にかかわっていることを証明しようとしてきた。今までに N-WASP が Cdc42 の下流で、糸状仮足形成を促し、WAVE が Rac の下流で葉状仮足形成を促すことを明かとし、これらの蛋白質が細胞の遊走に不可欠であることを証明した。更に、これらのタンパク質が胎児期の形態形成にどのように関与するかを解明した。特に、WAVE1 が筋肉の発生期に筋肉成熟のため必須であるのに対し、WAVE2 は血管新生期におこる血管の出芽に必須であった。

##### 1) 細胞先端部でのアクチン線維の構築と細胞推進力発生の機序

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を得るため、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 領域は単量体アクチン結合領域であり、CA 領域は Arp2/3 複合体に結合、活性化して、アクチンの重合を促す部位であることを示した。よって 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 複合体活性化に必要な最小領域である。Arp2/3 複合体はアクチンの核化を引き起こし、メッシュ状の新たなアクチン線維の形成に必須の役割を果たす。刺激を受けて WASP ファミリー蛋白質が活性化されると、VCA 領域が露出し、Arp2/3 と結合して、すでに存在するアクチン線維の側鎖からアクチンの重合を促し、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に必須である。

次に、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。

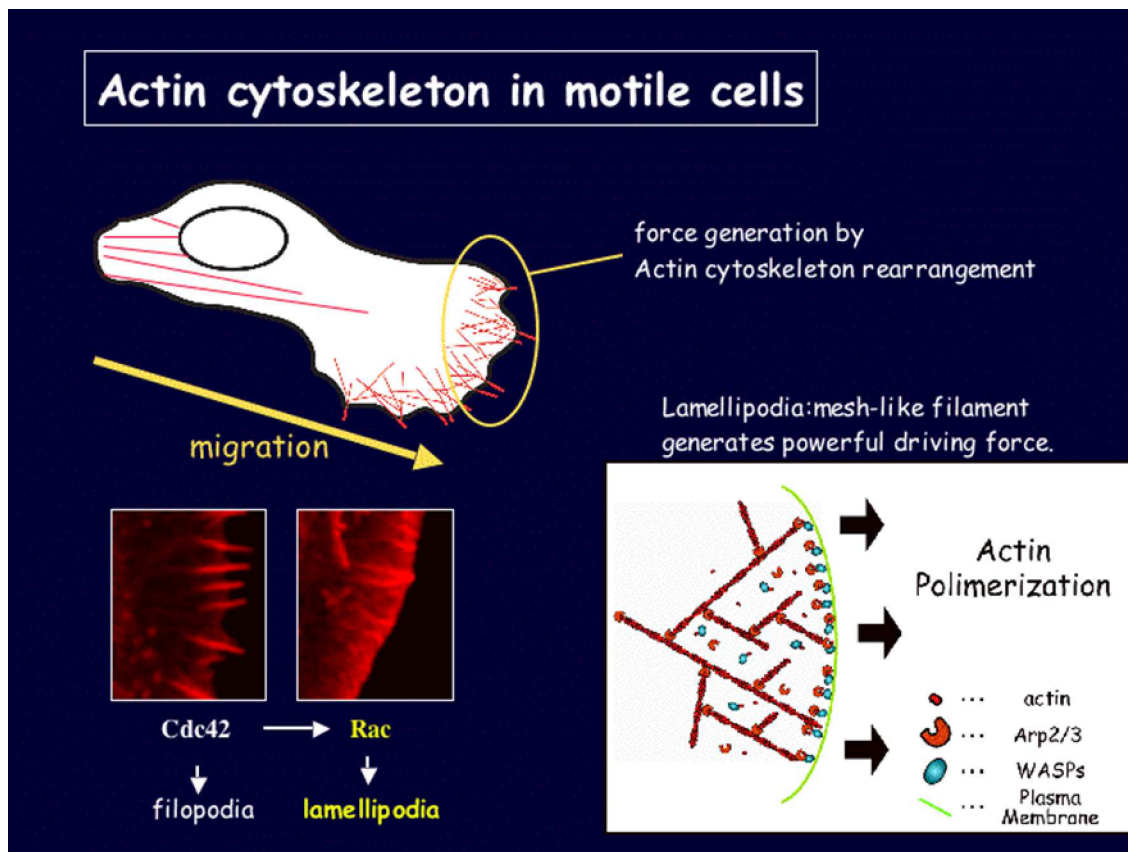


図2. WAVE は Rac の下流にあって網目状アクチン線維を作り推進力を発生する。

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り、細胞が推進力を得るのに必須である（図2）。

## 2) 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 WAVE1 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。WAVE1 の欠損は葉状仮足形成や細胞の遊走に著明な影響を与えなかったが、WAVE2 を欠損した細胞は葉状仮足形成ができないのみならず、細胞遊走も異常となっていた。これらの結果から WAVE2 が細胞の遊走に参与していることを示した。

### 3) 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。これらの結果からまず化学遊走因子の濃度勾配を察知した細胞は PI 3-キナーゼを活性化させ PI(3,4,5)P3 を産生する。その部位は先端部となり細胞の進む方向が決まる。その脂質を感知して Rac の GEF(Rac の GDP/GTP 交換因子)や WAVE2 が膜に移行し、活性化される。その結果アクチン重合が促され、葉状仮足形成が起こり、細胞に推進力が与えられると考えられた。

### 4) WAVE2 の活性化機序

WAVE2 は Rac によって活性化され、葉状仮足を生じた。しかし WAVE2 は Rac によって活性化されるものの、直接結合せず、Rac と WAVE の間にシグナルを橋渡ししている分子があることを示唆した。そこで Rac の下流にあって WAVE2 にシグナルを渡し、Arp2/3 複合体の活性化を生じて、葉状仮足形成を促す分子を特定した。その分子は IRSp53 という全く機能が分かっていない蛋白質であった。IRSp53 は活性型の Rac に特異的に結合し、さらに SH3 ドメインで WAVE のプロリンに富む配列に結合して、WAVE を活性化し、膜へリクルートする蛋白質であった。更に IRSp53 の Rac に結合する部位(RCB ドメイン)の結晶構造を明らかにした。RCB ドメインはダイマーを形成し、 $\alpha$ -ヘリックスバンドルよりなり、両端は塩基性アミノ酸に富むクラスターよりなっていた。ドメインの発現は糸状仮足状の膜変性を生じ、膜の脂質構造の変形を、アクチン線維に依存しないで起こさせる作用があった(図

3)。

RCB ドメインの C 末にある塩基性に富む領域は PI(3,4,5)P3 結合し IRSp53 を膜にリクルートして活性型 Rac と結合して、IRSp53 の構造変化を起こして、SH3 ドメインを露出させ、WAVE2 を結合して活性化させることを示した。IRSp53 のロックダウンにより WAVE2 は膜に行けず、そのため葉状仮足形成が起こらず、細胞遊走も異常になった。

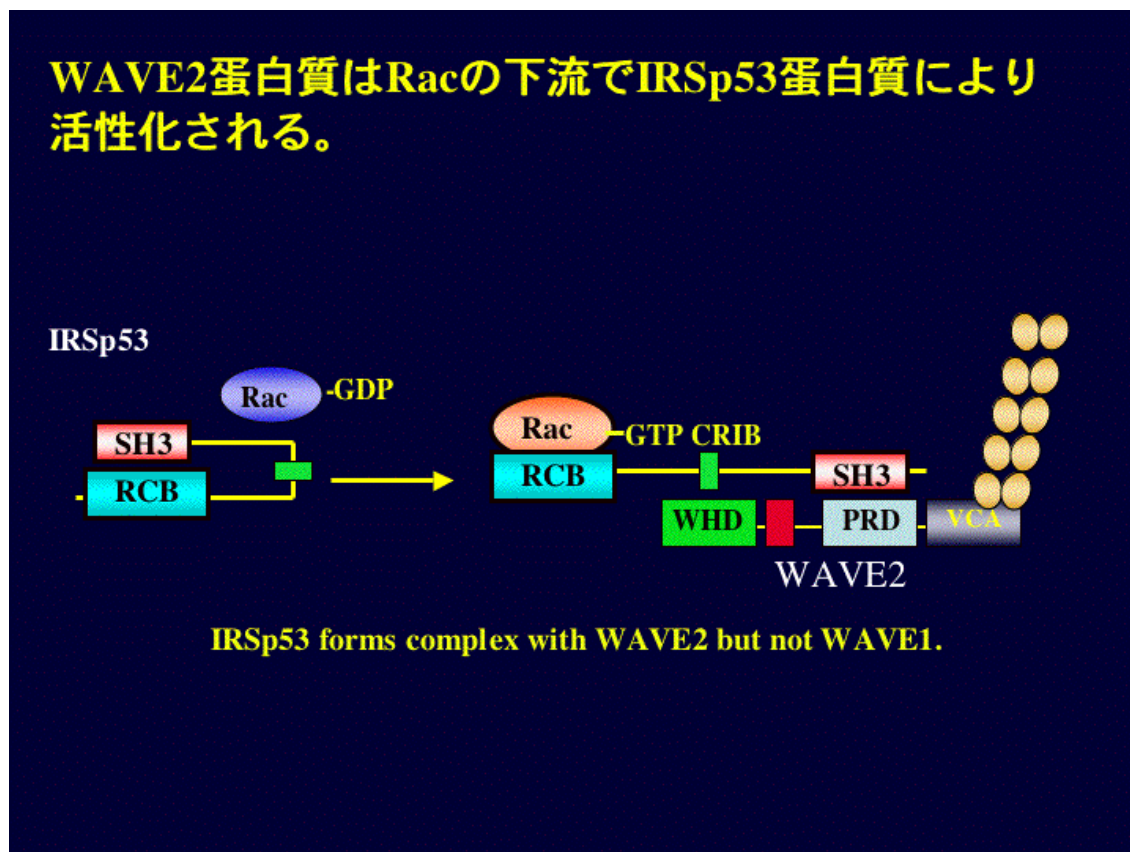


図 3. WAVE2 は Rac の下流で IRSp53 により活性化される。

## 5) 細胞の集団遊走と単細胞の遊走の違いの解明

器官形成などの形態形成時に生じる細胞遊走の特徴は、個々の細胞がバラバラになって遊走するのではなく、集団で遊走していくことである。血管や気管支などを形成する内皮細胞は一旦チューブを形成した後、より複雑な分枝した組織へと変わる。これら上皮系細胞はカドヘリンのような接着分子でお互いに接着しているため、単細胞の遊走とはメカニズムが異なると考えられている。このような集団遊走のモデルとして、MDCK 細胞がコラーゲンゲルの3次元中で複雑なチューブを形成する過程への N-WASP や WAVE の役割を明らかにした。MDCK 細胞は tight junction を保ったまま集団で

遊走する。その際、adherence junction が外れると、WAVE2 が葉状仮足を形成して、細胞間の隙間を埋めようとし、アクチン線維を伸ばす。他の細胞に触れるとそこにカドヘリンを集めて接着を回復する。WAVE2 は常に細胞の先端部にあつて、隙間ができるとすぐに、隙間を埋めようと葉状仮足を伸ばし、細胞が接着すると、細胞に常に伸展させる力を与えて、シート状の細胞集団を作ると考えられた。WAVE2 のノックダウンは葉状仮足を作れないため、細胞運動が遅く接着までに時間がかかった。

## 6) N-WASP や Arp2・3 複合体が線虫の初期の形態形成に關与する

線虫には Arp2・3 複合体は全て存在するのに対し、WASP ファミリー蛋白質としては N-WASP と WAVE が一つずつしか存在しない。よつて Arp2.3 複合体や N-WASP の個体レベルでの機能解析に適している。我々は RNAi 技術により Arp2・3 複合体中の N-WASP 結合蛋白質である p21Arc や Arp2 および N-WASP を欠損させ、個体発生にどのような影響が起こるかを調べた。するとこれらを欠損させた線虫は全て同じ表現系を示し、ventral enclosure がうまく行かなくなつていた。表皮の細胞の遊走がうまくいかず、表皮で体表を覆うことができずに死亡してしまうことに原因があつた。

## 7) 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、著明な変化はなかつた。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つ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つた。ノックアウトマウスでは10日こる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つた。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つた。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。

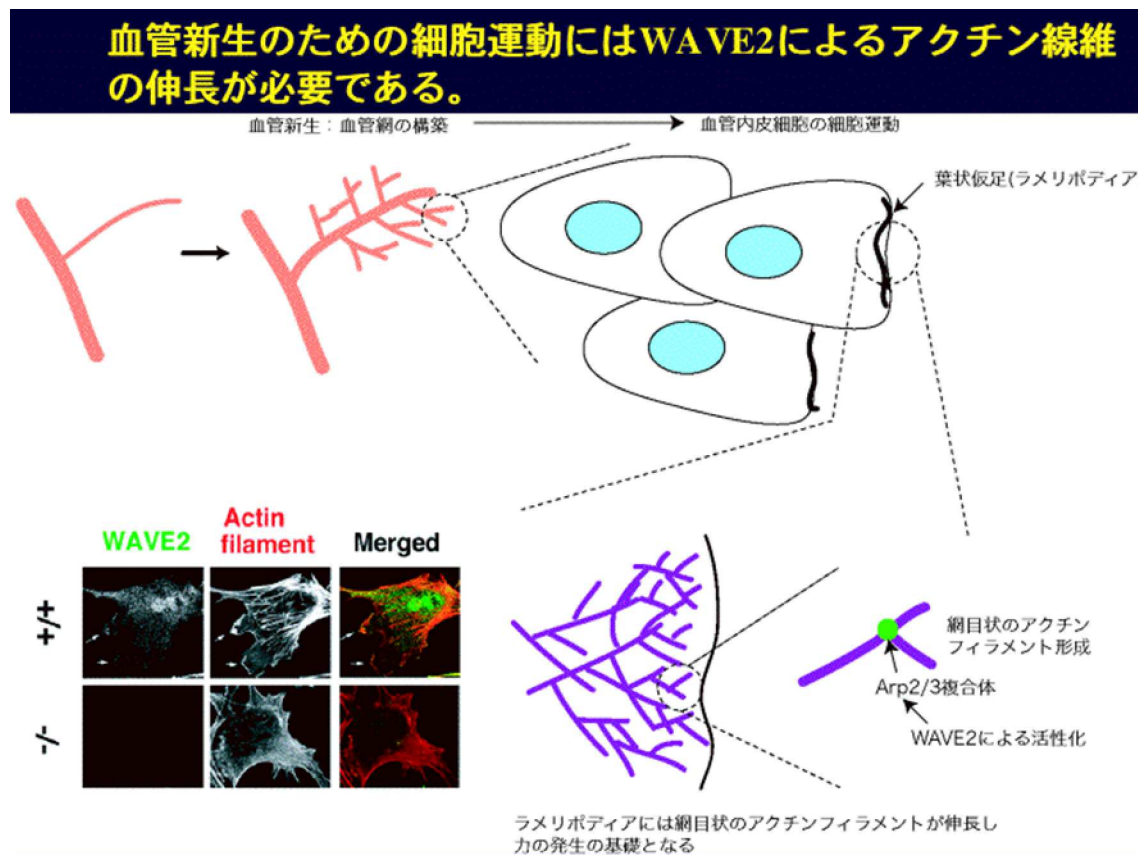


図4. WAVE2は血管内皮細胞の葉状仮足形成や遊走に必須で、その欠損は血管新生に異常が起こる。

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(図4)。

### 8) CR16のノックアウトマウスの解析

CR16はN-WASPの結合蛋白質でN-WASPのアクチン重合機能を制御しているが、その生理的意義は不明である。N-WASPの結合蛋白質にはWIP, WICHとCR16が存在し、これらはお互いに相同性の高い蛋白質で、同じ機能を有していると考えられているが、その機能は不明である。そこでCR16のノックアウトマウスを作製し、個体での機能を解析した。CR16のノックアウトマウスは見かけ上異常が認められないが、雄性不妊を生じた。この原因は精子の形成不全で、testisでの精子の成熟が不完全であることによる。精子の形成過程において精子はセルトリ細胞とnectinという接着因子

で繋がれ、アファジンを通じてアクチン線維によって固定されたまま成熟していくことが分かっている。Cr16 のノックアウトマウスではこのアクチン線維束化の形成に異常があることが電子顕微鏡観察により分かった。特に、精子の成熟過程で、セルトリ細胞につなぐアクチンバンドルの形成が見られず、精子の形も異常になっていた。CR16 や N-WASP に結合する蛋白質をマウスの、testis の可溶性画分を用いて探し、その蛋白質をプロテオーム解析により同定し、Nck を得た。Nck はアファジンと N-WASP に結合し、N-WASP をネクチンに結合させていた。CR16 の欠損は N-WASP の分解を促進し、N-WASP 量を減少させ、精子形成に必須のアクチンバンドル形成を異常にして、精子の成熟がうまくいかなくなることを明らかにした。人の雄性不妊の一原因の可能性もあり、今後の検討が待たれる。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

### 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

我々は細胞先端部で細胞を動かす基盤の実態を初めて明らかにできた。WASP ファミリー蛋白質のなかでも特に WAVE2 が先端部の端にあり、Arp2/3 を活性化して扇状のアクチン線維である葉状仮足を形成することやその形成が細胞遊走に必須であることを示した。細胞の遊走は神経回路形成や創傷治癒、血球細胞の遊走、癌細胞の浸潤転移や形態形成にも必須であることなどより、細胞運動の基本的原理を明らかにできたことはインパクトの大きい研究成果だと考えられる。今後細胞運動を調節することで器官の再生を速めたり、病気の治療に役立てる方策の研究へと進む道が拓かれた。

### 2) WAVE1 と WAVE2 の機能の違い

WAVE1 と WAVE2 は構造的にも非常に類似し、同じような機能を有すると考えられていた。しかし WAVE2 は細胞の遊走時に先端部にできる葉状仮足形成に必須で、細胞遊走にも必要であるのに、WAVE1 はどちらかという先端部というよりは少し後方の細胞上部に存在し、WAVE2 が構築したアクチン線維網をより強固にするのに使われていることを示した。更に WAVE2 は血管内皮細胞の遊走にも重要で、欠損は血管新生時の内皮細胞の出芽に異常を起こすことを示した。しかし WAVE2 欠損マウスは原始的な血管は正常に形成される (Vasculogenesis) ことから、血管新生 (angiogenesis) に

特異的に働いていることが分かった。これらのことは WAVE2 を利用した血管の再生又は血管新生の抑制を開発できる可能性を示し、応用性が広がると考えられた。

### 3) CR16 及び N-WASP は精子の成熟に必要である

CR16 のノックアウトマウスは精子形成に異常を起こし、雄性不稔を生じた。セルトリ細胞には CR16 は多量に発現し、N-WASP の安定性を保っている。CR16 の欠損は N-WASP の分解を速め、アクチンバンドルによる精子のセルトリ細胞へのアンカーリング異常が起こり、精子の成熟過程が阻害される。今後調べてみないと分からないが、人の男性の不妊の原因となる可能性を秘めている。そのような原因による不妊の治療法を見いだすのに有効であろう。

## 3.2 筋肉形成機序の解明 (千葉大学 遠藤 グループ)

### (1) 研究実施内容及び成果

#### 1) 衛星細胞の遊走のシグナル伝達機構

筋再生過程で衛星細胞は HGF により活性化され、損傷部から放出された HGF に対する走化性により損傷部に向かって遊走する。損傷部で衛星細胞は増殖した後に、分化・成熟して筋再生がもたらされる。この HGF による衛星細胞の走化性の機構を明らかにするために、衛星細胞由来の C2C12 細胞が HGF に対してどのようなシグナル伝達機構で遊走するかを調べた。C2C12 細胞は HGF 刺激により葉状仮足を形成し、HGF に対して走化性を示した。C2C12 細胞では WASP ファミリーの中で N-WASP と WAVE2 が高く発現していたので、これらの関与を調べた。N-WASP と WAVE2 はいずれも葉状仮足の先端に局在していた。さらに N-WASP と WAVE2 のドミナントネガティブ変異体の発現、および N-WASP と WAVE2 の RNAi により、HGF 刺激による葉状仮足形成と HGF に対する走化性が阻害された。また PI3 キナーゼ (PI3K) 阻害剤処理により、HGF 刺激による葉状仮足形成と HGF に対する走化性が阻害された。以上の結果から、C2C12 細胞の HGF に対する走化性は PI3K シグナリングとその下流で機能する N-WASP および WAVE2 により誘導されることが明らかになった。HGF に対する衛星細胞の走化性も同様の機構で起こると推定される。さらには発生過程でみられる HGF による筋前駆細胞の枝芽への遊走も同様の機構による可能性が考えられる。衛星細胞や筋前

駆細胞の遊走のシグナリング機構を示したのはこれが初めてである。

## 2) 筋肉再成・筋肥大における WAVE1 の機能

マウスにおける WAVE1 の機能を明らかにするために、WAVE1 ノックアウト (KO) マウスの表現型を解析した。誕生する KO マウスの数はメンデルの法則から期待される誕生数の約 1/2 であったことから、約 1/2 は胎生致死であると考えられる。誕生した KO マウスも、生後 21-28 日の間に死亡した。また生後の成長は不良で、野生型マウスと比較して生後 20 日の体長は約 2/3、体重は約 1/2 であった。KO マウスの全身の骨格筋および心筋は著しく萎縮していた。この萎縮は筋線維の数の減少によるものではなく、筋線維の萎縮によるものであった。KO マウスの筋線維は周辺核をもち、また浸潤している貪食細胞も認められず、Evans blue の透過もみられなかったことから、筋崩壊や筋再生はほとんど起きていないことが示された。骨格筋において運動ニューロンの神経支配が失われると、アセチルコリン受容体 (AChR) の発現量の増加や筋線維タイプのグループ化が認められる。しかし KO マウスの骨格筋ではこれらの所見は認められなかったことから、神経原性ではなく筋原性の萎縮であると考えられる。さらに IGF-1 を投与しても寿命の延長は起こらず、骨格筋は依然として萎縮していたことから、KO マウスでは IGF-1 シグナリングの経路に異常が起きている可能性が考えられる。そこで IGF-1 シグナリングの下流にある Akt や ERK の活性化を引き起こすリン酸化をみたところ、いずれのリン酸化量も低下していた。したがって WAVE1 は IGF-1 シグナリングの活性化に働いている可能性が示唆された。WASP/WAVE ファミリー蛋白質がこのようなシグナリングの制御にかかわっているという報告はこれまでにない。したがって WASP/WAVE ファミリーの新たな機能を示す重要な知見である。

## 3) IGF-1 による筋成熟・筋肥大における筋原線維形成の分子機構

筋再生の過程でみられる筋細胞分化や筋成熟、および筋肥大は IGF-1 シグナリングにより誘導される。IGF-1 シグナリングは蛋白質合成を促進することにより筋再生や筋肥大を誘導すると考えられている。しかし筋再生や筋肥大には、蛋白質合成の亢進とともに、収縮構造である筋原線維の形成が必要である。そこで IGF-1 シグナリングがどのような分子機構で筋再生や筋肥大における筋原線維形成を誘導するかを調べた。筋再生の過程で筋原線維の Z 帯の形成とともに N-WASP が Z 帯に局在化していった。また IGF-1 刺激により N-WASP が Z 帯に局在化した。この N-WASP の Z 帯への局在化は、Z 帯に入り込んでいる nebulin の C 末端の SH3 ドメインに、N-WASP のプロリンに富ん

だ領域が結合することによりもたらされた。この nebulin との結合により N-WASP は活性化され、Arp2/3 複合体を介してアクチン重合を引き起こした。Nebulin の C 末端側は GSK-3 によりリン酸化され、このリン酸化により nebulin と N-WASP の結合は抑制された。しかしこの結合の抑制は、IGF-1 シグナリングで活性化される PI3K-Akt により GSK-3 がリン酸化されることによって解除された。さらに N-WASP ドミナントネガティブ変異体を発現させることにより、筋再生における筋成熟および、IGF-1 による筋肥大が抑制された。したがって IGF-1 シグナリングによる筋再生と筋肥大における筋原線維形成は、このシグナリングによって誘導される nebulin-N-WASP の結合によるアクチン重合を介してもたらされると考えられる。これまでも IGF-1 による筋細胞分化や筋肥大の分子機構は調べられており、概要は明らかにされている。しかし筋原線維形成の見地からの機構は調べられていなかった。また筋原線維形成におけるアクチン線維形成の機構も不明であった。本研究はこれらを明らかにした独自性の高い研究である。

#### 4) DA-Raf による骨格筋細胞分化の分子機構

DA-Raf は M-Ras/Ras 結合蛋白質として私たちが新たに同定した蛋白質である。DA-Raf は A-Raf と同一の pre-mRNA から選択的スプライシングにより生じ、A-Raf の N 末端側の Ras 結合ドメインを含んでいるが、C 末端側のキナーゼドメインを欠損している。この構造から推定されるように、DA-Raf は活性型 Ras (H-, K-, N-Ras) および M-Ras に結合し、下流の ERK カスケードを阻害した。v-K-Ras によってトランスフォームした NIH3T3 線維芽細胞 (NRT9 細胞) に DA-Raf をトランスフェクトした細胞株 (NRT/DR 細胞) ではいずれも、トランスフォーメーションの形質が抑制された。さらにヌードマウスに NRT9 細胞を移植した場合には腫瘍が形成されたが、NRT/DR 細胞を移植した場合には、腫瘍は形成されなかった。したがって DA-Raf はがん化 Ras によって引き起こされるがんに対して抑制作用をもっていることが示された。一方、C2C12 細胞の最終分化の過程において、DA-Raf の発現が著しく誘導された。骨格筋細胞において M-Ras/Ras-ERK カスケードは、筋特異的転写因子の MyoD, myogenin, MEF2 などの発現を抑制することにより、分化を抑制する。DA-Raf を過剰発現させた C2C12 細胞では、分化の特徴である細胞増殖の停止と myogenin の発現誘導がみられた。さらに DA-Raf の RNAi によって myogenin の発現が著しく阻害された。これらの結果から、DA-Raf は M-Ras/Ras-ERK カスケードの生理的ドミナントネガティブ拮抗因子として、筋細胞分化を誘導していることが示された。本研究により、DA-Raf は新たなタイプのがん抑制遺伝子である可能性が示された。また本研究は筋細胞分化の新たな制御機構を明らかにした重要な研究である。



## 5) 骨格筋の脱分化と幹細胞化

私たちはこれまでに、マウス骨格筋 C2SVT 細胞 (誘導性プロモーターの制御下で SV40 large T 抗原を発現させることができる C2C12 細胞) を樹立し、最終分化をした筋管細胞に large T 抗原を発現させると、脱分化により細胞周期に入り細胞分裂をすることを示してきた。さらに生体内の成熟筋線維も分化の可塑性をもっているかどうかを明らかにするために、成体マウスの骨格筋にホメオボックス遺伝子 *Msx1* を発現させた。*Msx1* を発現した筋線維は脱分化をして、多数の単核細胞が出現した。これらの単核細胞は *Msx1* の発現が消失した後に、再び分化・成熟して筋再生をした。C2SVT 筋芽細胞も *Msx1* による脱分化細胞も適切な分化条件下では、筋管細胞に分化するだけでなく、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多能性の幹細胞様の状態に変換した可能性が考えられる。C2SVT 筋管細胞に large T 抗原を発現させて脱分化を誘導した場合には、いくつかの幹細胞マーカー (nucleostemin, Sca-1, CD34, Mdr1a) および ES 細胞マーカー (Nanog, E-Ras, Oct-4) の発現量が 3-14 倍増加した。また *Msx1* による脱分化細胞においても Sca-1 と CD34 の発現が上昇した。これらの結果から、large T を発現させた C2SVT 細胞および *Msx1* による脱分化細胞は、多能性の幹細胞様状態になっている可能性が考えられる。さらに正常マウスに *Msx1* を発現させて生じた脱分化細胞を単離して、Duchenne 型筋ジストロフィーのモデルマウスである *mdx* マウスの骨格筋に移植した。脱分化細胞は筋再生をして Duchenne 型筋ジストロフィーの原因遺伝子である dystrophin を発現した。したがってこれらの脱分化細胞は筋ジストロフィーをはじめとする筋疾患の細胞治療に応用できる可能性が示された。これらの脱分化細胞の幹細胞化についての研究は、私たちが独自に進めているものである。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

### 1) 衛星細胞の遊走のシグナル伝達機構

本研究により、衛星細胞由来の C2C12 細胞の HGF に対する走化性に PI3K シグナリングとその下流で働く N-WASP, WAVE2 が不可欠であることが示された。この結果に基づき、衛星細胞だけでなく皮筋節からの枝芽や横隔膜への筋前駆細胞の遊走、さらには神経冠細胞の遊走にも、N-WASP や WAVE2 が不可欠な役割を果たしていることが明らかにされる可能性が期待される。

### 2) 筋形成・筋肥大における WAVE1 の機能

本研究により WAVE1 が IGF-1 シグナリングの制御にかかわっている可能性が示されたが、WASP/WAVE ファミリー蛋白質がこのようなシグナリングにかかわっているという報告はこれまでにない。したがって本研究が WASP/WAVE ファミリーによるシグナリングの制御という新たな機能についての研究の契機となり、今後同様の研究が進展する可能性が期待される。

### 3) IGF-1 による筋成熟・筋肥大における筋原線維形成の分子機構

がんや AIDS などの病気あるいは老化にともない筋萎縮が起こる。このような場合に筋肥大を起こして筋力を維持することが必要である。筋萎縮の薬物治療には IGF-1 が有用であるが、本研究により解明された IGF-1 による筋成熟と筋肥大のシグナル伝達機構が、新たな薬物による治療法の開発につながることを期待される。また nebulin はネマリンミオパチーという筋疾患の原因遺伝子である。したがって本研究における nebulin-N-WASP を介した筋原線維のアクチン線維形成の機構の解明は、ネマリンミオパチーの分子機構の解明につながることを期待される。

### 4) DA-Raf による骨格筋細胞分化の分子機構

本研究により、DA-Raf が M-Ras/Ras-ERK カスケードの生理的ドミナントネガティブ拮抗因子として、筋細胞分化を誘導していることが示された。M-Ras/Ras-ERK カスケードは PC12 細胞における NGF による神経細胞分化の誘導にも働いているので、DA-Raf はこの神経細胞分化の生理的抑制因子としても機能していることが予想される。さらに M-Ras/Ras-ERK カスケードが働いている他の細胞現象や生命現象において、DA-Raf が生理的拮抗因子として普遍的に機能していることが明らかにされることを期待される。

### 5) 骨格筋の脱分化と幹細胞化

さまざまな成体幹細胞の起源についてはまだ不明なものが多い。本研究による骨格筋脱分化細胞が多能性幹細胞の状態になっているという結果は、成体幹細胞の起源が最終分化細胞にもあるという興味深い可能性を示唆している。今後この可能性についてさらに検討していく必要がある。また脱分化細胞が筋ジストロフィーをはじめとした筋疾患の細胞治療に応用できる可能性がマウスを用いて示されたので、今後は中型の実験動物を用いてこの可能性を検討し、最終的にヒトの治療に応用することをめざす。

#### 4. 研究参加者

##### (1) 竹縄 グループ (細胞遊走の形態形成への関与)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
竹縄忠臣	東大 医科研	教授	研究の総括	平成 12 年 11 月 ~ 平成 17 年 10 月
深見希代子	同上	助教授	形態形成と細胞遊走	平成 12 年 11 月 ~ 平成 15 年 3 月
伊藤俊樹	同上	助手	形態形成と細胞遊走	平成 12 年 10 月 ~ 平成 15 年 7 月
伊集院壮	同上	助手	形態形成と細胞遊走	平成 15 年 6 月 ~ 平成 17 年 3 月
末次志郎	同上	助手	細胞遊走への WASP の関与	平成 12 年 11 月 ~ 平成 17 年 10 月
朴宣奏	同上	CREST 研究員	形態形成のシグナル伝達	平成 12 年 11 月 ~ 平成 16 年 8 月
長野光司	同上	CREST 研究員	細胞遊走決定因子の探索	平成 13 年 5 月 ~ 平成 13 年 7 月
山崎大輔	同上	CREST 研究員	ノックアウトマウスの作成	平成 12 年 11 月 ~ 平成 17 年 3 月
中平和子	同上	CREST 技術員	細胞遊走への WASP の関与	平成 15 年 4 月 ~ 平成 16 年 12 月
山口英樹	同上	大学院生 CREST 研究補助員	細胞遊走への WASP の関与	平成 12 年 11 月 ~ 平成 14 年 3 月
大槻真紀子	同上	大学院生 CREST 研究補助員	ノックアウトマウスの作成	平成 12 年 11 月 ~ 平成 14 年 3 月
竹中圭	同上	大学院生 CREST 研究補助員	ノックアウトマウスの作成	平成 12 年 4 月 ~ 平成 14 年 3 月
中村由和	同上	大学院生 CREST 研究補助員	ノックアウトマウスの作成	平成 14 年 4 月 ~ 平成 14 年 12 月
濱口有知子	同上	大学院生 CREST 研究補助員	形態形成のシグナル伝達	平成 12 年 11 月 ~ 平成 14 年 12 月
水谷清人	同上	大学院生 CREST 研究補助員	細胞遊走への WASP の関与	平成 14 年 10 月 ~ 平成 15 年 3 月
澤真理子	同上	大学院生 CREST 研究補助員	線虫における形態形成	平成 14 年 3 月 ~ 平成 16 年 3 月
横田達也	同上	大学院生 CREST 研究補助員	細胞遊走への WASP の関与	平成 13 年 10 月 ~ 平成 16 年 3 月
辻田和也	同上	大学院生 CREST 研究補助員	細胞遊走への WASP の関与	平成 15 年 4 月 ~ 平成 17 年 10 月
古谷昌広	同上	大学院生 CREST 研究補助員	細胞遊走への WASP の関与	平成 15 年 4 月 ~ 平成 17 年 10 月
王 峰	同上	大学院生 CREST 研究補助員	細胞遊走への WASP の関与	平成 15 年 4 月 ~ 平成 17 年 10 月
及川司	同上	大学院生 CREST 研究補助員	細胞遊走への WASP の関与	平成 15 年 4 月 ~ 平成 17 年 10 月

栗栖修作	同上	大学院生 CREST 研究補助員	細胞遊走への WASP の関与	平成 15 年 4 月 ~ 平成 17 年 10 月
中西修	同上	大学院生 CREST 研究補助員	細胞遊走への WASP の関与	平成 15 年 4 月 ~ 平成 17 年 10 月
中島幸子	同上	事務員	事務一般	平成 15 年 1 月 ~ 平成 17 年 10 月
神田教子	同上	事務員	事務一般	平成 14 年 3 月 ~ 平成 14 年 12 月
西条育子	同上	事務員	事務一般	平成 12 年 11 月 ~ 平成 14 年 3 月

## (2) 遠藤グループ (筋肉形成機序の解明)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
遠藤 剛	千葉大学理学部 / 大学院自然科学 科学研究科	教授	全体	平成 12 年 11 月 ~ 平成 17 年 10 月
福岡 麻衣子	千葉大学大学院 自然科学研究科	大学院生	肢芽形成における細胞突起形成	平成 12 年 11 月 ~ 平成 13 年 3 月
鈴木 暁子	同上	大学院生	筋再生における筋衛星細胞の遊 走と増殖	平成 12 年 11 月 ~ 平成 14 年 3 月
加藤 真良	同上	大学院生	肢芽形成における細胞突起形成	平成 12 年 11 月 ~ 平成 15 年 3 月
孫 ぼん	同上	大学院生 CREST 研究補助員 CREST 研究員	筋再生における筋衛星細胞の遊 走と増殖 DA-Raf による筋細胞分化と筋形 成の誘導	平成 12 年 11 月 ~ 平成 14 年 3 月 平成 14 年 4 月 ~ 平成 15 年 3 月 平成 15 年 4 月 ~ 平成 15 年 8 月
阿部 智行	同上	大学院生 CREST 研究補助員	筋細胞の極性形成	平成 12 年 11 月 ~ 平成 14 年 3 月 平成 14 年 4 月 ~ 平成 16 年 3 月
徳田 恵美	同上	大学院生	肢芽形成における細胞突起形成	平成 13 年 4 月 ~ 平成 15 年 3 月
大越 有一	同上	大学院生 CREST 研究補助員	筋細胞の脱分化と幹細胞化	平成 14 年 4 月 ~ 平成 16 年 3 月 平成 16 年 4 月 ~ 平成 16 年 10 月
栗田 宗一	同上	大学院生	筋再生・筋肥大における N-WASP の役割	平成 14 年 4 月 ~ 平成 16 年 3 月
渡邊 晴子	同上	大学院生 CREST 研究補助員	筋再生・筋肥大における N-WASP の役割	平成 14 年 4 月 ~ 平成 16 年 3 月 平成 17 年 4 月 ~ 平成 17 年 10 月
横山 隆志	同上	大学院生 CREST 研究補助員	DA-Raf による筋細胞分化と筋形 成の誘導	平成 15 年 4 月 ~ 平成 17 年 10 月

高野 和儀	同上	大学院生 CREST 研究補助員	筋再生・筋肥大における N-WASP の役割	平成 15 年 4 月 ~ 平成 17 年 10 月
海保 愛	同上	大学院生	筋細胞の極性形成	平成 15 年 4 月 ~ 平成 16 年 3 月
河村 和広	同上	大学院生 CREST 研究補助員	筋再生における筋衛星細胞の遊 走と増殖	平成 16 年 4 月
黒瀬 隆史	同上	大学院生	筋細胞の脱分化と幹細胞化	平成 16 年 4 月 ~ 平成 17 年 10 月
堅田 史子	同上	大学院生	DA-Raf による筋細胞分化と筋形 成の誘導	平成 16 年 4 月 ~ 平成 17 年 10 月
大平 峻一	同上	大学院生	筋形成における WAVE1 の役割	平成 17 年 4 月 ~ 平成 17 年 10 月
山田 敬子	同上	大学院生	筋細胞の脱分化と幹細胞化	平成 17 年 4 月 ~ 平成 17 年 10 月

## 5.研究成果の発表

### (1) 論文発表 (国内2件 海外 90 件)

#### 竹縄グループ

1. Fukami K, Takenaka K, Nagano K, Takenawa T  
Growth factor-induced promoter activation of murine phospholipase C delta4 gene.  
**Eur J Biochem.** 267, 28-36 (2000)
2. Ijuuin T., Michizuki Y., Fukami K., Funaki M., Asano T. and Takenawa T.  
Identification and characterization of a novel inositol polyphosphate 5-phosphatase.  
**J. Biol. Chem.** 275, 10870-10875 (2000)
3. Banzai Y., Miki H., Yamaguchi, H. and Takenawa T.  
Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in neurite extension in PC12 cells and rat hippocampal primary culture cells.  
**J. Biol. Chem.** 275, 11987-11992 (2000)
4. Itoh T., Ishihara. H., Shibasaki, Y., Oka Y. and Takenawa T.  
Autophosphorylation of type I phosphatidylinositol phosphate kinase regulates its lipid kinase activity.  
**J. Biol. Chem.** 275, 19389-19394 (2000)
5. Sasaki, N, Miki, H, and Takenawa, T.  
Arp2/3 complex-independent actin regulatory function of WAVE.  
**Biochem. Biophys. Res. Commun.**272, 386-390 (2000)
6. Suzuki, T, Mimuro, H, Miki, H, Takenawa, T, Sasaki, T, Nakanishi, H, Takai, Y, and Sasakawa C.  
Rho family GTPase Cdc42 is essential for the actin-based motility of Shigella in mammalian cells.  
**J. Exp. Med.**191, 1905-1920 (2000).
7. Mimuro, H, Suzuki, T, Suetsugu, S, Miki, H, Takenawa, T, and Sasakawa, C.  
Profilin is required for sustaining efficient intra- and intercellular spreading of shigella flexneri.  
**J. Biol. Chem.** 275, 28893-28901 (2000)
8. Yamaguchi, H., Miki, H., Suetsugu, S., Ma, L., Kirschner, M. W., and Takenawa, T.  
Two tandem verprolin homology domains are necessary for a strong activation of Arp2/3 complex-induced actin polymerization and induction of microspike formation by N-WASP.  
**Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 97, 12631-12636 (2000)
9. Yang, C., Huang, M., DeBiasio, J., Pring, M., Joyce, M., Miki, H., Takenawa, T., and Zigmond, S. H.

- Profilin enhances Cdc42-induced nucleation of actin polymerization.  
**J. Cell Biol.** 150, 1001-1012. (2000)
10. Zhang, Y., Sugiura, R., Lu, Y., Asami, M., Maeda, T., Itoh, T., Takenawa, T., Shuntoh, H., and Kuno, T.  
Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase *its3* and calcineurin *ppb1* coordinately regulate cytokinesis in fission yeast.  
**J. Biol. Chem.** 275, 35600-35606 (2000)
11. Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T.  
IRSp53 is an essential intermediate in the regulation of membrane ruffling by Rac and WAVE.  
**Nature** 408, 732-735 (2000)
12. Suzuki A, Kadota N, Hara T, Nakagami Y, Izumi T, Takenawa T, Sabe H, Endo T  
Meltrin alpha cytoplasmic domain interacts with SH3 domains of Src and Grb2 and is phosphorylated by v-Src.  
**Oncogene** 19, 5842-5850 (2000)
13. Fukuoka, M., Suetsugu, S., Miki, H., Fukami, K., and Takenawa, T.  
A novel N-WASP binding protein, WISH induced Arp2/3 complex activation independent of Cdc42.  
**J. Cell Biol.** 152, 471-482(2001)
14. Itoh, T., Yokoyama, S., Kikuchi, H. and Takenawa T.  
The Epsin N-terminal homology(ENTH)domain: a Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding domain essential for endocytosis.  
**Science** 291, 1047-1051 (2001)
15. Park, S. J., Itoh, T., and Takenawa, T.  
Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type I is regulated through phosphorylation response by extracellular stimuli.  
**J. Biol. Chem** 274 4781-4787 (2001)
16. 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)
17. 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)
18. 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)
19. 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)
20. 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)
21. 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 Cdelta4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction.  
**Science** 292, 920-923 (2001)
22. Suetsugu, S., Miki, 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).
23. 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)
24. 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).
25. 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)
26. 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)
27. 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)
28. 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)
29. 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)
30. 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)
31. 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)
32. 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)
33. Setsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T.  
 Spatial and temporal regulation of actin polymerization for cytoskeleton formation through Arp2/3 complex  
 and WASP/WAVE proteins.  
**Cell Motil. Cytoskeleton** 5, 113-122 (2002)
34. 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)

35. 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)
36. 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)
37. 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)
38. Itoh, T., and Takenawa, T.  
Phosphoinositide-binding domains. Functional units for temporal and spatial regulation of intracellular signalling. (Review)  
**Cell Signal** 14, 733-743 (2002)
39. 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)
40. 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)
41. 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)
42. 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)
43. 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)
44. 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)
45. Otsuki, M., Itoh, T. and Takenawa, T.  
N-WASP is recruited to rafts and associates with endophilin A in response to EGF  
**J. Biol. Chem.** 278, 6461-6469 (2003)
46. 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)
47. Ijuin, T., and Takenawa, T.  
SKIP negatively regulates insulin-Induced GLUT4 translocation and membrane ruffle formation.  
**Mol Cell Biol.** 23, 1209-1220 (2003)
48. 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)
49. 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)
50. Fukami, K., Yoshida, M., Inoue, T., Kurokawa, M., Fissore, R. A., Yoshida, N., Mikoshiba, K., and Takenawa, T.  
Phospholipase C $\delta$ 4 is required for Ca<sup>2+</sup> mobilization essential for acrosome reaction in sperm.  
**J. Cell. Biol.** 161, 79-88 (2003)
51. Nakamura, Y., Fukami, K., Yu, H., Takenaka, K., Kataoka, Y., Shirakata, Y., Nishikawa, S., Hashimoto, K., Yoshida, N., and Takenawa, T.  
Phospholipase C $\alpha$ 1 is required for skin stem cell lineage commitment  
**EMBO J.** 22 2981-2991 (2003)

52. 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)
53. 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)
54. 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).
55. 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).
56. 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)
57. 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).
58. 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)
59. Miki, H., and Takenawa, T.  
Regulation of Actin Dynamics by WASP Family Proteins.

- J Biochem** (Tokyo). 134, 309-313 (2003).
60. Itoh, T., and Takenawa, T.  
Regulation of endocytosis by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and ENTH proteins.  
**Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 282, 31-47 (2003)
61. Suetsugu, S., and Takenawa, T.  
Regulation of cortical actin networks in cell migration.  
**Int Rev Cytol.** 229, 245-286 (2003)
62. 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)
63. 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).
64. 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)
65. 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)
66. 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).
67. 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).
68. 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)

69. 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).
70. 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.
71. 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).
72. 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)
73. 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)
74. Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempfak, 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)
75. 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)
76. 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.
77. Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempfak, 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)

78. Bierne, H., Miki, H., Innocenti, M., Scita, G., Gertler, F. B., Takenawa, T., and Cossart, P.

WASP-related proteins, Abi1 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

1. Suzuki, A., Kadota, N., Hara, T., Nakagami, Y., Izumi, T., Takenawa, T., Sabe, H., and Endo, T.:

Meltrin  $\alpha$  cytoplasmic domain interacts with SH3 domains of Src and Grb2 and is phosphorylated by v-Src.

**Oncogene** 19 (51): 5842–5850 (2000).

2. Kadota, N., Suzuki, A., Nakagami, Y., Izumi, T., and Endo, T.

Endogenous meltrin  $\alpha$  is ubiquitously expressed and associated with the plasma membrane but exogenous meltrin  $\alpha$  is retained in the endoplasmic reticulum.

**J. Biochem.** 128 (6): 941–949 (2000).

3. Fukuoka, M., Suetsugu, S., Miki, H., Fukami, K., Endo, T., and Takenawa, T

A novel neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP)-binding protein, WISH, induces Arp2/3 complex activation independent of Cdc42.

**J. Cell Biol.** 152 (3): 471–482 (2001).

4. Endo, T.

Reversal of terminally differentiated state in skeletal myocytes by SV40 large T antigen.

In **Reactivation of the Cell Cycle in Terminally Differentiated Cells** (Crescenzi, M., ed.) Landes Bioscience, Georgetown, Texas. pp. 63–75 (2002).

5. 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)

6. 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).

7. Nguyen, Q.-D., Faivre, S., Bruyneel, E., Rivat, C., Seto, M., Endo, T., Mareel, M., Emami, S., and Gespach,

- C.  
RhoA- and RhoD-dependent regulatory switch of G $\alpha$  subunit signaling by PAR-1 receptors in cellular invasion.  
**FASEB J.** 16 (4): 565–576 (2002).
8. Régnault, K., Nguyen, Q.-D., Vakaert, L., Bruyneel, E., Launay, J.-M., Endo, T., Mareel, M., Gespach, C., and Emami, S.  
G-protein  $\alpha$ olf subunit promotes cellular invasion, survival, and neuroendocrine differentiation in digestive and urogenital epithelial cells.  
**Oncogene** 21 (25): 4020–4031 (2002).
9. 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 (1): 155–168 (2003).
10. Sun, P., Yamamoto, H., Suetsugu, S., Miki, H., Takenawa, T., and Endo, T.  
Small GTPase Rah/Rab34 is associated with membrane ruffles and macropinosomes and promotes macropinosome formation.  
**J. Biol. Chem.** 278 (6): 4063–4071 (2003).
11. Nishiyama, A., Endo, T., Takeda, S., and Imamura, M.  
Identification and characterization of  $\epsilon$ -sarcoglycans in the central nervous system.  
**Mol. Brain Res.** 125 (1/2): 1–12 (2004).
12. 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 (26): 6523–6534 (2004).
13. 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 (52): 54862–54872 (2004).
14. Peng, S. and Endo, T.  
Assays for functional properties of Rab34 in macropinosome formation.  
In **Methods in Enzymology, Vol. 403: Regulators and Effectors of Small GTPases, Part F.** (Balch, W.E., ed.) Elsevier, San Diego. pp. 229–243 (2005).  
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).

**(1) 口頭発表（招待講演）**

**竹縄グループ（国内 10 件、海外 12 件）**

- 1) Takenawa, T.(Institute of Medical Science, University of Tokyo)  
Regulation of cortical actin organization by WASP family proteins 10th Hot Spring Harbor Symposium, 別府、2001、2、25
- 2) Takenawa, T. (Institute of Medical Science, University of Tokyo and CREST, Japan Science and Technology Corporation.: Role of WASP family proteins in cytoskeletal re-organization and cell motility. (Abercrombie Symposium on Cell Behavior, St Catherine College, Oxford 英国 9, 17, 2002)
- 3) Suetsugu, S. and Takenawa, T. . (Institute of Medical Science, University of Tokyo and CREST, Japan Science and Technology Corporation.: Role of WASP family proteins in cytoskeletal re-organization and cell motility. (Abercrombie Symposium on Cell Behavior, St Catherine College, Oxford 英国 9, 14, 2002)
- 4) Fukami, K., and Takenawa, T. . (Institute of Medical Science, University of Tokyo and CREST, Japan Science and Technology Corporation.: Essential role of inositolphospholipid metabolism in fertilization (The 9<sup>th</sup> East Asian Joint Symposium, Souwan, 韓国 6、14、2002)
- 5) Fukami, K., and Takenawa, T. . (Institute of Medical Science, University of Tokyo and CREST, Japan Science and Technology Corporation.: Requirement of phospholipase Cd4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. (The 43th Advance in Enzyme Regulation, Indianapolis, 米国 9、23、2002)
- 6) 末次志郎、三木裕明、竹縄忠臣（東京大学医科学研究所 CREST, 科学技術振興事業団）: Src ファミリーチロシンキナーゼとプロテアソームによる N-WASP の制御（第 7 5 回日本生化学会、京都 10、16、2002）
- 7) 澤真理子(1)、末次志郎(1)、杉本亜砂子(2)、竹縄忠臣(1) ((1) . 東京大学医科学研究所 CREST, 科学技術振興事業団. (2) 理化学研究所発生、再生科学総合研究センター): Essential role of Arp2·3 complex in cell migration during ventral enclosure in *C. elegans* (第 3 回 C . エレガンス日本線虫学会、名古屋 8、7、2002)
- 8) 竹縄忠臣（東京大学医科学研究所 CREST, 科学技術振興事業団）: 細胞はどのようにして動き、形をつくるのか？（京都大学再生医学研究所学術講演会 京都 2、5、2003）
- 9) 竹縄忠臣（東大医科研,CREST, JST）: WASP ファミリー蛋白質の細胞遊走、形態形成への関与. 第 2 6 回日本医学会総会（福岡、4 / 4、2003）

- 10) 竹縄忠臣 (東大医科研,CREST, JST): 細胞遊走のシグナリング.第 41 回日本生物物理学会 (新潟、9 / 23 , 2003 )
- 11) 末次志郎、山崎大輔、竹縄忠臣 (東大医科研,CREST, JST): WASP ファミリー蛋白質による細胞運動制御. 第 3 回日本蛋白質科学会 (札幌、6 / 23 , 2003 )
- 12) Takenawa, T., Itoh, T., Tsujita, K. and T. Oikawa ( IMSUT, University of Tokyo,CREST, JST ) : Phosphoinositide-binding Domains: Their roles in intracellular signaling. 56<sup>th</sup> IUBMB World Congress(Montreal, Canada 8/11,2003)
- 13) Takenawa, T. Yamazaki, D. and Suetsugu, S, ( IMSUT, University of Tokyo,CREST, JST ) : Differential functions of WAVE1 and WAVE2. FEBS special Meeting on Cytoskeletal Dynamics. (Helsinki, Finland 6/13, 2004)
- 14) Takenawa T. ( IMSUT, University of Tokyo,CREST, JST ) : Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in cell movement. Novartis Foundation Symposium 269, Signaling networks in cell shape and motility. (Singapore, 8/30, 2004)
- 15) Takenawa T. ( IMSUT, University of Tokyo,CREST, JST ) : Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in cell motility. Germany Biochemical Meeting ( Muenster, Germany 9/20, 2004)
- 16) Takenawa T: (IMSUT, University of Tokyo,CREST, JST) Activation mechanism of WAVE family proteins ( Gordon Conference, Mechanism of cell signaling, Hong Kong, June 12-17)
- 17) Takenawa T. IMSUT, University of Tokyo,CREST, JST Reconstitution of Rac-mediated actin assembly by the WAVE2 complex, IRSp53 and PIP3 for lamellipodia formation (ASCB Summer Meeting, Coordinating the Events of Directed Cell Motility, Seattle, USA 7/27-30, 2005)
- 18) Takenawa T. ( IMSUT, University of Tokyo,CREST, JST) Detection of a trace amount of phosphoinositides by phosphoinositide-binding domains (60<sup>th</sup> Harden Conference, Inositol Phosphates and Lipids Regulation and Functions, Ambleside, UK, 8/13-18 2005)

#### **遠藤グループ(海外 1 件 国内 4 件)**

- 1) 遠藤 剛, 石井順一郎, 阿部智行, 徳田恵美, 椿本圭祐 (千葉大・理・生物): 新規の Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質による細胞運動と細胞分化の制御. 第 53 回日本細胞生物学会大会シンポジウム「アクチン制御の新たな側面とダイナミックな細胞機能」(福岡, 10/31, 2000).

- 2) 遠藤 剛, 阿部智行, 徳田恵美, 栗田宗一, 渡邊晴子, 押森直木 (千葉大・理・生物): Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質による筋形成の制御. 第 55 回日本細胞生物学会大会シンポジウム「生体における多様な細胞運動の基盤としてのアクチン細胞骨格制御」(パシフィコ横浜, 5/21, 2002).
- 3) 遠藤 剛, 大越有一, 高野和儀, 河村和広 (千葉大・理・生物): 骨格筋の脱分化と再生: その制御機構. 日本動物学会第 73 回大会シンポジウム「骨格筋研究の最近の展開」(金沢大学, 9/25, 2002).
- 4) 遠藤 剛 (千葉大・理・生物): 骨格筋の可塑性による幹細胞化: 筋疾患の細胞治療への応用をめざして. 第 45 回日本神経学会教育講演 (新高輪プリンスホテル, 5/14, 2004).
- 5) Endo, T., Takano, K., Watanabe, H., Kawamura, K., and Kurita, S. (Dept. Biol., Fac. Sci., Chiba Univ.): Molecular mechanisms of myocyte migration and myofibrillogenesis during skeletal muscle regeneration. 6th French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophies. (Paris, France, 7/2, 2005).

## (2) ポスター発表 (国内 32 件, 海外 0 件)

- 1) 石井順一郎, 徳田恵美, 椿本圭祐, 遠藤 剛 (千葉大・理・生物): 低分子量 G 蛋白質 RhoD による癌細胞の形質の抑制と RhoD の標的蛋白質の同定. 第 53 回日本細胞生物学会大会 (福岡, 10/31, 2000).
- 2) 原智一, 吉田顕, 孫ぼん, 鈴木暁子, 松本健, 遠藤 剛 (千葉大・理・生物): 神経細胞分化にかかわる低分子量 G 蛋白質 M-Ras の標的蛋白質の同定. 第 53 回日本細胞生物学会大会 (福岡, 10/31, 2000).
- 3) 阿部智行, 遠藤 剛 (千葉大・理・生物): Cdc42 に近縁の低分子量 G 蛋白質 Tc10 と RhoT によるアクチン細胞骨格の制御と神経突起形成の誘導. 第 53 回日本細胞生物学会大会 (福岡, 11/2, 2000).
- 4) 鈴木暁子, 遠藤 剛 (千葉大・理・生物): 新規の ErH ドメインを持つ ermelin による神経突起形成の機構. 第 53 回日本細胞生物学会大会 (福岡, 11/2, 2000).
- 5) 遠藤 剛, 門田奈依, 鈴木暁子 (千葉大・理・生物): Meltrin  $\alpha$  細胞質部位に結合する蛋白質の同定. 第 54 回日本細胞生物学会大会 (岐阜, 5/30, 2001).
- 6) 吉田 顕, 原 智一, 孫 ぼん, 遠藤 剛 (千葉大・理・生物): M-Ras 結合蛋白質として同定した DA-Raf. 第 54 回日本細胞生物学会大会 (岐阜, 5/30, 2001).
- 7) 阿部智行<sup>1</sup>, 三木裕明<sup>2</sup>, 竹縄忠臣<sup>2</sup>, 遠藤 剛<sup>1</sup> (1 千葉大・理・生物, 2 東大・医科研・腫瘍分子医学): 低分子量 G 蛋白質 Tc10 と RhoT による神経突起形成の機構. 第 54 回日本細胞生物学会大会 (岐阜, 5/30, 2001).
- 8) 徳田恵美<sup>1</sup>, 石井順一郎<sup>1</sup>, 三木裕明<sup>2</sup>, 竹縄忠臣<sup>2</sup>, 遠藤 剛<sup>1</sup> (1 千葉大・理・生物, 2 東大・医科研・腫瘍分子医学): RhoD に特異的な細胞突起の形成とその機構. 第 54 回日本細胞生物学会大会

- (岐阜, 5/30, 2001).
- 9) 鈴木暁子, 遠藤剛 (千葉大・理・生物): Ermelin による CaMKIV と CREB を介した神経突起形成. 第 54 回日本細胞生物学会大会 (岐阜, 6/1, 2001).
- 10) 阿部智行 1, 三木裕明 2,4, 竹縄忠臣 2,3, 遠藤 剛 1,3 (1 千葉大・理・生物, 2 東大・医科研・腫瘍分子医学, 3CREST, JST, 4PRESTO, JST): 低分子量 G 蛋白質 Tc10 と RhoT は N-WASP を介して神経突起を形成する. 第 24 回日本分子生物学会年会 (横浜, 12/10, 2001).
- 11) 孫 ぼん, 遠藤 剛 (千葉大・理・生物): 低分子量 G 蛋白質 Rah はマクロピノソームの形成にかかわる. 第 24 回日本分子生物学会年会 (横浜, 12/10, 2001).
- 12) 徳田恵美 1, 押森直木 1, 阿部智行 1,3, 末次志郎 2,3 竹縄忠臣 2,3, 遠藤 剛 1,3 (1 千葉大・理・生物, 2 東大・医科研・腫瘍分子医学, 3 CREST, JST): RhoD によって形成される特異的な細胞突起の性質とその形成機構. 第 55 回日本細胞生物学会大会 (横浜, 5/21, 2002).
- 13) 孫 ぼん 1,2, 遠藤 剛 1,2 (1 千葉大・理・生物, 2 CREST, JST): M-Ras による神経細胞分化の新たな経路. 第 55 回日本細胞生物学会大会 (横浜, 5/23, 2002).
- 17) 吉田 顕 1, 孫 ぼん 1,2, 阿部智行 1,2, 横山隆志 1, 遠藤 剛 1,2 (1 千葉大・理・生物, 2 CREST, JST): DA-Raf は Ras に拮抗作用を示す. 第 55 回日本細胞生物学会大会 (横浜, 5/23, 2002).
- 15) 徳田恵美 1, 押森直木 1, 阿部智行 1,3, 末次志郎 2,3 竹縄忠臣 2,3, 遠藤 剛 1,3 (1 千葉大・理・生物, 2 東大・医科研・腫瘍分子医学, 3 CREST, JST): RhoD に特異的な細胞突起形成の分子機構. 第 56 回日本細胞生物学会大会 (大津, 5/14, 2003).
- 16) 栗田宗一 1, 渡邊晴子 1, 木村澄子 1, 末次志郎 2,3, 竹縄忠臣 2,3, 遠藤 剛 1,3 (1 千葉大・理・生物, 2 東大・医科研・腫瘍分子医学, 3 CREST, JST): 筋原線維において N-WASP は nebulin に結合して Z 線に局在する. 第 56 回日本細胞生物学会大会 (大津, 5/14, 2003).
- 17) 横山隆志 1, 吉田 顕 1, 孫 ぼん 1,2, 遠藤 剛 1,2 (1 千葉大・理・生物, 2 CREST, JST): DA-Raf は MAP キナーゼカスケードを阻害することにより Ras に拮抗する. 第 56 回日本細胞生物学会大会 (大津, 5/15, 2003).
- 18) 海保 愛 1, 阿部智行 1,2, 小笠原道生 1, 遠藤 剛 1,2 (1 千葉大・理・生物, 2 CREST, JST): Cdc42 サブファミリー低分子量 G 蛋白質のマウス発生過程における特異的発現. 日本発生生物学会第 36 回大会 (札幌, 6/11, 2003).
- 19) 高野和儀 1,3, 小笠原道生 1, 海保 愛 1, 孫 ぼん 1,3, 阿部智行 1,3, 渡邊晴子 1, 佐藤矩行 2, 遠藤 剛 1,3 (1 千葉大・理・生物, 2 京都大・院理・動物, 3 CREST, JST): Ras ファミリー低分子

量 G 蛋白質の分子系統学的解析と発現・機能解析 .日本発生生物学会第 36 回大会 (札幌 ,6/11, 2003) .

- 20) 横山隆志 1,2 ,吉田 颯 1 ,孫 ぼん 1,2 ,遠藤 剛 1,2 (1 千葉大・理・生物 ,2 CREST, JST): DA-Raf antagonizes Ras by interfering with the MAP kinase cascade. 第 76 回日本生化学会大会 (横浜 , 10/16, 2003) .
- 21) 孫 ぼん 1,2 ,高野和儀 1,2 ,阿部智行 1,2 ,小笠原道生 1 ,渡邊晴子 1 ,海保 愛 1 ,遠藤 剛 1,2 (1 千葉大・理・生物 ,2 CREST, JST): Neural function of M-Ras is conserved in mammalian and ascidian which lacks classical Ras. 第 76 回日本生化学会大会 (横浜 , 10/16, 2003) .
- 22) 河村和広 1,3 ,末次志郎 2,3 ,栗栖修作 2,3 ,竹縄忠臣 2,3 ,遠藤 剛 1,3 (1 千葉大・理・生物 ,2 東大・医科研・腫瘍分子医学 ,3 CREST, JST): N-WASP and WAVE2 are required for myogenic cell migration induced by hepatocyte growth factor. 第 57 回日本細胞生物学会大会 (大阪 , 5/26, 2004) .
- 23) 阿部智行 1,2 ,高野和儀 1,2 ,稲垣昌樹 3 ,遠藤 剛 1,2 (1 千葉大・理・生物 ,2 CREST, JST , 愛知がんセンター) Myocyte differentiation gives rise to nuclear invaginations penetrated by myofibrils. 第 57 回日本細胞生物学会大会 (大阪 , 5/27, 2004) .
- 24) 大越有一 1,2 ,黒瀬隆史 1 ,水上浩明 3 ,今村道博 4 ,久米晃啓 3 ,小澤敬也 3 ,竹縄忠臣 2,5 ,武田伸一 4 ,遠藤 剛 1,2 (1 千葉大・理・生物 ,2 CREST, JST ,3 自治医大・分子病態治療研究センター ,4 国立精神・神経センター・神経研 ,5 東大・医科研・腫瘍分子医学) : Msx1 induces dedifferentiation in skeletal muscle followed by regeneration. 第 57 回日本細胞生物学会大会 (大阪 , 5/27, 2004) .
- 25) 孫 ぼん 1,2 ,遠藤 剛 1,2 (1 千葉大・理・生物 ,2 CREST, JST) : NGF differentially activates M-Ras and Ras during neuronal differentiation of PC12 cells. 第 77 回日本生化学会大会 (横浜 , 10/15, 2004) .
- 26) 高野和儀 1,3 ,栗田宗一 1 ,渡邊晴子 1 ,木村澄子 1 ,末次志郎 2,3 ,竹縄忠臣 2,3 ,遠藤 剛 1,3 (1 千葉大・理・生物 ,2 東大・医科研・腫瘍分子医学 ,3 CREST, JST) : N-WASP is located to Z bands in myofibrils by binding to nebulin. 第 77 回日本生化学会大会 (横浜 , 10/16, 2004) .
- 27) 海保 愛 1 ,渡邊晴子 1,2 ,阿部智行 1,2 ,高野和儀 1,2 ,遠藤 剛 1,2 (1 千葉大・理・生物 ,2 CREST, JST) : Expression and roles of RhoT in neural crest and midbrain-hindbrain boundary. 第 58 回日本細胞生物学会大会 (大宮 , 6/15, 2005) .
- 28) 大平峻一 1 ,末次志郎 2,3 ,竹縄忠臣 2,3 ,遠藤 剛 1,3 (1 千葉大・理・生物 ,2 東大・医科研・腫瘍分子医学 ,3 CREST, JST) : Abnormality in myogenesis in WAVE1 knockout mice. 第 58 回日本細胞生物学会大会 (大宮 , 6/15, 2005) .
- 29) 山田敬子 1 ,黒瀬隆史 1 ,遠藤 剛 1,2 (1 千葉大・理・生物 ,2 CREST, JST) : Expression of stem cell markers in dedifferentiated skeletal muscle myotubes. 第 58 回日本細胞生物学会大会 (大宮 ,6/17, 2005) .

- 30) 横山隆志 1,2 ,高野和儀 1,2 ,孫 ぼん 1 ,堅田史子 1 ,遠藤 剛 1,2 (1 千葉大・理・生物 ,2 CREST, JST) : DA-Raf regulates neuronal and myogenic differentiation by antagonizing Ras-ERK pathway. 第 78 回日本生化学会大会 (神戸 , 10/21, 2005) .
- 31) 黒瀬隆史 1 ,山田敬子 1 ,大越有一 1 ,遠藤 剛 1,2 (1 千葉大・理・生物 ,2 CREST, JST) : Expression of stem cell markers in dedifferentiated skeletal muscle cells. 第 78 回日本生化学会大会 (神戸 , 10/22, 2005) .
- 32) 高野和儀 1,3 ,渡邊晴子 1,3 ,末次志郎 2,3 ,竹縄忠臣 2,3 ,遠藤 剛 1,3 (1 千葉大・理・生物 ,2 東大・医科研・腫瘍分子医学 ,3 CREST, JST) : N-WASP is required for muscle regeneration and hypertrophy. 第 78 回

### (3) 特許出願 (国内 4 件 海外 1 件)

#### 国内出願

#### 竹縄グループ (国内 2 件)

- 1) ホスホリパーゼ Cδ1 遺伝子欠損動物. 発明者：竹縄忠臣、中村由和 出願人：JST (1/28, 2002) 特許出願番号 2003-219758
- 2) WAVE2 遺伝子欠損動物. 発明者：竹縄忠臣、山崎大輔 出願人：JST (1/17, 2002) 特許出願番号 2002-009201

#### 遠藤グループ (国内 2 件 海外 1 件)

#### 国内出願

- 1) H-Ras および M-Ras 結合蛋白質 DA-Raf. 発明者：遠藤 剛, 吉田 顕, 原 智一, 孫 ぼん; 出願人：JST. (10/10, 2001) 特許出願番号 2001-312491
- 2) 骨格筋細胞を用いる再生治療. 発明者：遠藤 剛, 大越有一, 小澤敬也; 出願人：JST. (3/4, 2003) 特許出願番号 2003-56651.

#### 海外出願

- 1) Small GTPase RhoT. 発明者：遠藤 剛, 阿部智行, 三木裕明, 竹縄忠臣; 出願人：JST. (10/3, 2001) 国際特許出願番号 PCT/JP01/08702.

### (4) 受賞等

#### 受賞

東レ科学技術賞 (2006 年 3 月)

#### 新聞報道

なし

#### その他

遠藤 剛グループの「骨格筋の脱分化と再生」についての研究内容が、2002 年 9 月 24 日の NHK テレビとラジオのニュースで報道された。

### (5) その他特記事項

なし

## 6. 研究期間中の主な活動

### (1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2000年10月31日	第53回日本細胞生物学会大会シンポジウム (オーガナイザー: 竹縄忠臣, 遠藤 剛)	アクロス福岡	200人	アクチン制御の新たな側面とダイナミックな細胞機能についてのシンポジウム
2002年5月21日	第55回日本細胞生物学会大会シンポジウム (オーガナイザー: 竹縄忠臣, 遠藤 剛)	パシフィコ横浜	200人	生体における多様な細胞運動の基盤としてのアクチン細胞骨格制御についてのシンポジウム
2004年5月10-12	The 3rd Japanese Biochemical Society Biofrontier Symposium (organizer: 竹縄忠臣)	鎌倉プリンス	200人	脂質のシグナル伝達

### (2) 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Dr. Laurent Blanchoin; Department Reponse et Dynamique Cellulaire Laboratoire de Physiologie Cellulaire Vegetale CNRS/CEA/UJF France, Chief	細胞運動におけるアクチン重合のメカニズムについてのセミナーと討論	東京	2002年5月18～23日



## 7. 結び

### 東京大学(竹縄 グループ)

細胞先端部でアクチン重合を促し、糸状仮足や葉状仮足形成を促して細胞に駆動力を与える N-WASP や WAVE を発見し、その作用機序を解明することで細胞遊走の機序解明という目的はほぼ達することができた。細胞遊走は血球細胞の移動、神経回路の形成、形態形成という生命の根幹の現象に必須であり、この研究成果は今後の医療応用研究の発展に大きなインパクトを与えると考えられる。

WAVE 蛋白質の形態形成への役割りとして、WAVE2 蛋白質が胎生期の血管新生における血管内皮細胞の遊走に必須であり、正常な血管形成に必要なものであるとの証明をしたものの、細胞遊走の形態形成や再生への役割りなどの解明という応用面では今後更なる展開が必要であろう。

これらの研究はJSTの職員の方々の支援や教室員、事務員のたゆまない努力のもと出された成果であることを明記して感謝の代わりとしたい。



竹縄グループ研究室ハイキング

### 千葉大学 (遠藤グループ)

当初の研究の目標以上に研究が広く展開して、それぞれ興味深い結果が得られている。またそれぞれについて今後の発展が期待できる状態になっている。ただしこれらの結果について、現時点で論文投稿中や投稿準備中のものがいくつかあり、これらについては本報告書の論文発表欄への掲載には至らなかったが、早急に出版される状態にもっていくことを心掛けている。



遠藤グループ研究室の教室員