

「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や膜ラッピングにかかわる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

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の基礎データをとるためまず培養細胞を用いて上皮細胞の管腔形成へのWASP蛋白質の役割を調べた。上皮系細胞の1種であるMDCK細胞はHGF刺激により遊走し、管腔形成を起こす。HGFが無い条件下ではN-WASPは核の周りにベジクル状に存在するが、HGF刺激を加えると局在が膜へと変化した。HGFによるMDCK細胞の遊走をマトリゲルを用いて調べたところ、N-WASPは遊走の先端部に局在するようになり、アクチン線維と共在した。この遊走はドミナントネガティブN-WASP発現細胞で抑制されたが、ランダムに起こる細胞運動は抑制されなかった。MDCK細胞を長期培養すると、チューブ状の形態を生じるようになる。その際のN-WASPの局在を調べるとチューブを形成するように動いていく細胞の先端部に存在するようになった。更にこのチューブ形成はドミナントネガティブN-WASP発現で抑制された。これらの結果はN-WASPがMDCK細胞の遊走と形態形成に重要であることを示した。

筋発生と筋再生における筋前駆体細胞の遊走にかかわっている可能性が考えられる低分子量G蛋白質のCdc42, Tc10, RhoT, RhoDによる細胞突起の形状の差異を調べた。Cdc42は10 $\mu$ m程度の微小突起(フィロポディア)を形成するのに対し、Tc10やRhoTはより長く太い突起を形成した。特にRhoTはきわめて長く太い突起を形

成する傾向があった。またTc10やRhoTは神経突起形成を引き起こしたが、Cdc42にはこの作用はみれなかった。一方、RhoDは細く柔軟性のある細胞突起を形成した。RhoDによる突起は細胞同士が近接する部位に形成されたことから、RhoDは細胞同士のコミュニケーションに関与している可能性が考えられる。Cdc42, Tc10, RhoT はいずれもN-WASPに直接結合し、これらによる突起形成はN-WASPのドミナントネガティブ変異体により抑制された。したがってこれらの突起形成にはN-WASPを介したアクチン重合が必須であることが明らかになった。一方、RhoDはN-WASPに直接結合することはなかったが、突起形成はN-WASPのドミナントネガティブ変異体により抑制されたことから、これらの突起形成にはN-WASPがかかわっていることが示された。

次に線虫を用いてWASPおよびWAVEファミリー蛋白質の欠損が形態形成へどのように影響するかを調べた。WASPおよびWAVEファミリー蛋白質のRNAiを行った。ほ乳類ではWASPおよびWAVEファミリー蛋白質として、N-WASPとWASPがWAVEファミリー蛋白質としてWAVE1-3が存在するが、線虫ではWASPおよびWAVEファミリー蛋白質として各々1個ずつしか存在しないので機能解析がクラーヤに行える特徴がある。線虫ではWASPは胚発生期に細胞の接着面に局在した。WASPのRNAiによる機能破壊を行うと胚性致死が生じた。この胚性致死を生じた個体では表皮細胞が退縮し形態形成が途中で停止していた。線虫の形態は胚時期に表皮細胞が体を覆うように移動し表皮細胞同士が接着するventral enclosureおよび体を包んだ表皮細胞のダイナミックな形態変化を伴う体の前後軸への伸長を経て形成される。RNAi実験によりWASPは胚発生期に表皮細胞の移動、表皮細胞の接着形成、維持に関与する可能性が考えられた。

### 3 . 主な研究成果の発表 ( 論文発表 )

Sasaki, N, Miki, H, and Takenawa, T. : Arp2/3 complex-independent actin regulatory function of WAVE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*272, 386-390 ( 2000 )

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 )

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 )

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 )

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 )

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 )

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 )

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 )

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 )

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 )

Wang, D., Yang, W., Du, J., Devalaraja, M.N., Liang, P., Matsumoto, K., Tsubakimoto, K., Endo, T., and Richmond, A. : MGSA/GRO-mediated melanocyte transformation involves induction of Ras expression. *Oncogene* 19, 4647-4659 ( 2000 )

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, 941-949 ( 2000 )

3) 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, 5842-5850 ( 2000 )