

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2014～2016

課題番号：26221302

研究課題名(和文)mDiaが紡ぐアクチン細胞骨格の個体生理での役割と分子メカニズムの解析

研究課題名(英文)Physiological roles and action mechanisms of mDia-induced actin cytoskeleton in the body

研究代表者

成宮 周(Narumiya, Shuh)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：70144350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 132,400,000円

研究成果の概要(和文)：アクチン細胞骨格は、細胞の形態、接着、移動、分裂に大きな役割を果たしているが、これが個体の様々な機能でどう働いているかは余り明らかでない。本研究では、アクチンを造り出すmDiaという分子の遺伝子を欠損したマウスを作出し、このマウスの表現型を解析することで、この点を明らかにしようとした。その結果、mDiaが造り出すアクチン細胞骨格が、脳内のシナプスの構造を制御して、社会隔離された動物の不安亢進に働くこと、免疫に重要なT細胞の抗原刺激による活性化に働いていること、精巣の精細間で精子細胞とセルトリ細胞の相互作用を調節して精子に形態形成に働くこと、皮膚腫瘍形成で大きな役割を果たすことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：While the actin cytoskeleton plays an important role in cell morphogenesis, adhesion, migration and division, its role in various body functions remains largely obscure. In this study we examined this issue by generating KO mice deficient in mDia, an actin polymerizing factor, and analyzing their phenotypes in the brain, the immune system, the reproductive system and tumorigenesis. In the brain, mDia-induced actin cytoskeleton is critically involved in synaptic remodeling that is required for social isolation-induced elevated anxiety. mDia-induced actin cytoskeleton is also involved in T cell activation by regulating dynamics of antigen-bound T cell receptors, morphogenesis of sperm by regulating interaction between germ cells and Sertoli cells in the testis and malignant cell transformation and tumorigenesis by interaction with Ras in chemical carcinogenesis model in the skin.

研究分野：薬理学、生化学

キーワード：アクチン Rho mDia シナプス T細胞 精子形成 皮膚腫瘍

1. 研究開始当初の背景

アクチン細胞骨格は、細胞の形態、接着、移動、増殖、分裂に大きな役割を果たしている。これまでの研究で、培養細胞でのアクチン細胞骨格の形成と機能の大略が明らかになった。しかし、これらのメカニズムが個体でどう働いているかは明らかでない。我々は、これまで、Rhoの下流でアクチン重合因子として働くmDiaの3種のアイソフォームの遺伝子欠損マウスを作出し、Rho-mDia経路で誘導されるアクチン細胞骨格が、赤芽球の細胞質分裂や脳組織構築に働くことを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、上記マウスでさらに見いだされたRho-mDia経路の神経シナプス前終末の可塑性、免疫T細胞の活性化、Sertoli細胞-精子細胞相互作用による精子の形態形成、皮膚角化細胞のがん化での働きとメカニズムを明らかにし、細胞内で形成されるアクチン細胞骨格がどのようにして個々の細胞機能を制御し、それがいかにして組織の恒常性と可塑性に働いているかを明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

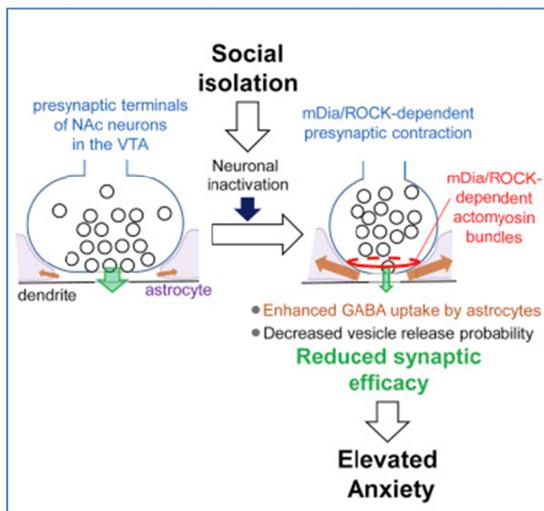
本基盤(S)研究では、mDiaのシナプス前終末での神経可塑性における働き、mDiaのTCRシグナリングにおける働き、mDiaの精子形態形成における働き、mDiaの細胞悪性化と皮膚発がんにおける働き、の4つのテーマで研究を行なう。テーマ1では、神経活動抑制時のmDiaのシナプス前部への集積とmDia依存的のシナプス前部の収縮を観察しており、その分子メカニズムとともにこれがin vivoで働いていることを側座核ニューロンで選択的のmDiaを欠損させたマウスのストレス行動を解析することで明らかにする。テーマ2では、mDia欠損胸腺T細胞でTCR刺激のシグナル伝達の障害を見ており、これより示唆されるmDiaによるアクチン細胞骨格のTCRシグナリングでの役割を解析する。テーマ3では、mDia欠損マウス精巢でSertoli細胞に依存した精子の形態形成異常を見出しており、そのメカニズムを明らかにする。さらにテーマ4では、mDiaのがん化への寄与をDMBA/TPAを用いた皮膚がんモデルとin vitroの培養細胞の悪性化実験で検証し、その機構を解明する。～までは、研究代表者の成宮の研究室で、は研究分担者の石崎の研究室で研究を行う。これらすべてについて個体でのin vivoの解析と培養系でのin vitroの解析を組み合わせ、個体での異常が細胞でのどのような分子機構に基づいているかを明らかにする。また、遺伝子欠損マウスでの解析を補完するものとして、RNAi、薬理学的アゴニスト及び阻害薬を併用し、では光遺伝学的手法も取り入れ、解析する。

4. 研究成果

(1)mDiaのシナプス前終末での神経可塑性における働き

神経可塑性は、記憶や行動変容など様々な脳機能の基盤であり、これまでの研究からその本体としてシナプスのリモデリング、とくに、シナプス後部を構成する樹状突起でのスパインの形態変化、が提唱されている。これに対し、シナプス前部のリモデリングによる神経可塑性の成人・成獣脳での例は、これまで報告がない。シナプス・リモデリングの形態変化がアクチン細胞骨格の組み替えで起こること、mDiaがアクチン重合因子として働くことから、本研究では、mDiaの神経可塑性における働きとそれが動物の行動変容に果たす役割について解析した。mDia 1/3を側坐核(NAc)の神経細胞で特異的に欠損したマウス(NAc特異的mDia 1/3欠損マウス)を作成し、その行動を解析した結果、このマウスでは社会隔離ストレスによる不安亢進が起こらないことを見出した。ついで、社会隔離ストレスを与えた野生型マウスでは、側坐核の活動が低下し、その投射先である腹側被蓋野(VTA)で神経伝達不全があること、この神経伝達をオプトジェネティクスで回復させると不安亢進が解消されることを見出した。また、このとき側坐核からVTAへ投射しているGABA作動性神経のシナプス前終末が収縮状態を示していること、これらの神経伝達不全、シナプス終末の収縮はNAc特異的mDia 1/3欠損マウスでは見られないことも見出した。即ち、マウスに社会隔離ストレスを加えると、側坐核の神経細胞の活動が低下し、その神経細胞のVTAでのシナプス前終末がmDia 1/3依存的に形態変化をおこし、神経伝達不全を惹き起こすこと、これが社会隔離ストレスによる不安亢進の神経メカニズムであることが示唆された。そこで、培養系神経細胞を用いて実験を行い、神経活動を低下させると培養神経細胞のシナプス前終末でもmDia 1/3依存的に収縮が起こりシナプス伝達が低下すること、この収縮はmDia 1/3が作り出したアクチン線維がROCKという別のRhoエフェクターの作用で形成されるアクトミオシン束のためであることが明らかになった。この結果を受け、社会隔離ストレスを与えて不安亢進を示しているマウスのVTAにROCK阻害薬Y-27632を注入すると不安亢進が解消する事が明らかになった。VTAは、行動変容を司るドパミン作動性神経の起始部であり、ドパミン神経の活性は側坐核からの神経伝達によって制御されている。これらを合わせると、上記の結果は、社会隔離ストレスによる神経活動低下により腹側被蓋野で側坐核神経細胞からのシナプス前終末がmDiaとROCK依存的に収縮してシ

ナプス伝達が低下、これにより GABA 作動性介在ニューロンの活性化からドパミン神経細胞の活動低下を来し、結果として不安亢進が起こると考えられた(下図)。本研究には二つの意義があると考えられる。一つは、社会隔離ストレスによる不安亢進が側坐核から腹側被蓋野にいたる神経細胞のシナプス伝達の不全にあることを見出したこと、二つ目は、このシナプス伝達不全の分子メカニズムとして、mDia1/3 と ROCK によるシナプス前終末のアクチン依存性収



縮を見出したことである。後者は、シナプス前終末の可塑的变化としては最初の報告であり、今後、別の神経回路での働きが見いだされることが期待される。なお、本研究成果は昨年 11 月に、Cell Reports に掲載された。

(2) mDia の TCR シグナリングにおける働き

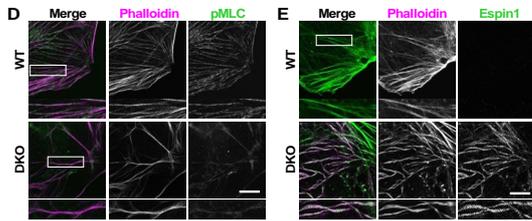
T 細胞受容体 (TCR) シグナルは T 細胞の分化及び活性化に不可欠である。そのシグナル伝達にアクチン細胞骨格が関与しているとの報告はあるが、その機構については不明な点が多い。本研究では、まず、mDia1/3 二重欠損マウスのリンパ節、脾臓など 2 次リンパ組織で T リンパ球数の有意な減少を認め、その原因として胸腺内での T 細胞産生の障害を同定した。この T 細胞産生障害は T 細胞選択的 mDia1/3 欠損マウスでも見いだされ、T 細胞の内在的異常によることがわかった。ついで、胸腺 T 前駆細胞から T 細胞が産生される過程では TCR を介したシグナル伝達が重要であることに鑑み、胸腺 T 前駆細胞に TCR 刺激を行ったところ mDia1/3 二重欠損細胞では TCR シグナル伝達が障害されていることが分かった。さらに、全反射顕微鏡を用い、live imaging 実験を行い、mDia1/3 DKO において、TCR 刺激時の TCR マイクロクラスターと F-actin 動態の連動が阻害されていることを見出し、この過程が TCR シグナル伝達を促進的に働いていることが明らかになった。さらに、resting 状態の T 前駆細胞の観

察で、mDia1/3 二重欠損は細胞皮質のアクチンの破断を生じていることが明らかになった。以上のことから、mDia1/3 は F-actin 動態を介して TCR シグナルを制御し、T 細胞の分化に不可欠であることが分かった。

一方、本研究ではさらに成熟 T 細胞特異的 mDia1/3 DKO マウスも作成し、解析を行った。その結果、mDia1/3 胸腺 T 前駆細胞に加えて、成熟 CD4 及び CD8 T 細胞の活性化にも mDia1/3 が極めて重要であることを見出した。さらに、mDia1/3 を可逆的に阻害する薬剤 SMIFH2 を用い、末梢 CD8 T 細胞の表現型を検討した結果、同様の T 細胞活性化の障害が観察された。そこで、SMIFH2 を用いて可逆的に mDia 活性の阻害実験を行い、アクチン重合の活性が TCR シグナル伝達経路の中でも、特に TCR シグナルのハブである LAT 分子のリン酸化に強く寄与していることを明らかにした。現在 LAT とアクチンの関係について検討中である。本研究成果は、胸腺 T 細胞の結果が出た時点で一旦投稿したが、成熟 T 細胞での実験を求められ、現在、上記結果を含めて投稿準備中である。

(3) mDia の精子形態形成における働き

哺乳類の精子の形態形成は、精巣の精細管内で行われ、精子細胞とその支持細胞であるセルトリ細胞の密接な相互作用が重要であることが分かっているが、その分子機構については不明な点が多い。特に、円形精子細胞から、先体形成、核の伸長、尾部形成など大きな形態変化を経て伸長した精子が形成される過程では、ectoplasmic specialized junction と呼ばれる精子-セルトリ細胞、セルトリ-セルトリ細胞間の接着構造が大事とされるが、その構築の分子機構も良くわかっていない。本研究は、mDia1/3 二重欠損マウスの自然交配の経過中、mDia1/3 欠損による雄性不妊を見出したことから出発した。本研究では、まず、mDia1/3 欠損マウス精子が異常な頭部形態を示し、受精能が著しく低下していること、ついで、mDia1/3 マウス精細管を観察し、この段階で、精子数の低下、異常形態の精子の存在とともに精子細胞の異所への迷入が観察されることを見いだした。ついで、精原細胞移植実験を行い、精細管での精子形成異常の原因が精子での mDia1/3 欠損でなくセルトリ細胞での欠損によることを明らかにした。これを受け、免疫染色により、精細管で mDia1/3 は主としてセルトリ細胞で発現されていることを明らかにし、培養セルトリ細胞では、F-actin hoop の形成不全に加え、espin を含む異常に束化されたアクチン線維が存在すること、反対に通常見られるアクトミオシン束が著しく減少していることを見いだした(下図)。



さらに、F-actin の3次元超解像度イメージングとmDiaの1分子イメージングを組み合わせセルトリ細胞を観察、mDia1/3 はセルトリ細胞で特徴的なアクチンの網目状構造を作り、このアクチン構造にミオシンが結合することを明らかにした。これら培養セルトリ細胞での結果を基に組織観察を行い、その結果、mDia1/3 欠損マウ精細管組織では、セルトリ細胞のアクトミオシン構築が著しく減弱していること、この結果として、精子-セルトリ細胞間、セルトリ-セルトリ細胞間の接着が損なわれており、これが精子の形態形成不全、異所への明乳となって顕れることが明らかになった。以上のことから、精子形成過程にセルトリ細胞側の mDia1/3 依存的なアクチンの重合がアクトミオシン形成に必須であり、これがセルトリ細胞-精子の細胞間接着機能制御を介して、精子形成に重要な役割を担っていることが明らかとなった。細胞生物学的には、mDia1/3 が細胞皮質下で非常に微細なアクチンの網目を作っており、これがアクトミオシン束の形成に必要であることを明らかに出来たのは大きな成果と考えている。以上の結果は、

”mDia1/3-mediated cortical actin meshwork regulates actomyosin assembly in Sertoli cells indispensable for ectoplasmic specialized junction and spermatogenesis”という題で論文作成中であり、近日投稿予定である。

(4) mDia の細胞悪性化と皮膚発がんにおける働き

本研究では、全身性 mDia1 欠損マウスに DMAB/TPA を塗布し、Ras 活性依存的なパピローマ形成が抑制されることを見出していた。さらに、これをもとに、その責任細胞の同定のためケラチノサイト特異的 mDia1 欠損マウスを作成し、DMBA/TPA 処理を行ったところ、全身性 mDia1 欠損マウスと同様に、パピローマ形成遅延、パピローマ形成数の減少を認めた。また、ケラチノサイトを単離し、遺伝子発現解析を行い、産生される IL-36 の量、ケラチン 14 の発現量のいずれも mDia1 欠損マウスでは減少していることが分かった。そのため、活性型 Ras 依存的皮膚がんモデルにおいて、表皮ケラチノサイトでの mDia1 の機能が必要であることが明らかとなった。本研究で用いた DMAB/TPA による腫瘍形成モデルは、TPA による炎症により腫瘍形成が促進されるため、全身欠損で同定された関与遺伝子が、

ケラチノサイトでの内因性のがん化に関与していない例も多数報告されている。本研究は、皮膚特異的 mDia 欠損作出のため、予定より遅延したが、上述のように mDia がケラチノサイトで働き、腫瘍化に働くことが明らかになったので、今後、その細胞内メカニズムを *in vitro*, *in vivo* の両面から詰めていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Deguchi Y, Harada M, Shinohara R, Lazarus M, Cherasse Y, Urade Y, Yamada D, Sekiguchi M, Watanabe D, Furuyashiki T, Narumiya S, mDia and ROCK mediate Actin-dependent presynaptic remodeling regulating synaptic efficacy and anxiety. *Cell Rep.* 17(9): 2405-2417, 2016. doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.088. 査読有
2. Yamaoka M, Ando T, Terabayashi T, Okamoto M, Takei M, Nishioka T, Kaibuchi K, Matsunaga K, Ishizaki R, Izumi T, Niki I, Ishizaki T, Kimura T. PI3K regulates endocytosis after insulin secretion by mediating signaling crosstalk between Arf6 and Rab27a. *J Cell Sci.* 129(3): 637-49, 2016. 査読有
3. Pan J, Lordier L, Meyran D, Rameau P, Lecluse Y, Kitchen-Goosen S, Bardirou I, Mokrani H, Narumiya S, Alberts AS, Vainchenker W, Chang Y. *Blood.* 124(26): 3967-3977, 2014. doi: 10.1182/blood-2013-12-544924. 査読有

[学会発表](計 1 件)

招待講演(1 件)

1. Narumiya S, Thumkeo D, Beemiller P, Krummel MF. mDia1 and mDia3, formin family actin nucleators and Rho effectors, mediate TCR microcluster dynamics and signaling and are critical for positive selection of thymocytes. The 2014 Cold Spring Harbor Asia Conference on “GTPases: Mechanisms, interactions and applications”, September 22-26, 2014, China.

学会発表(15 件)

1. Deguchi Y, Harada M, Shinohara R, Watanabe D, Furuyashiki T, and Narumiya S. A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in chronic stress-induced behavioral changes and synaptic plasticity. The 2014 Cold Spring Harbor Asia Conference on “GTPases: Mechanisms, interactions and applications”, September 22-26, 2014, China.

2. 坂本智子、タムケオ ディーン、**成宮周** 精子形成における Rho 標的タンパク質 mDia の役割 第 66 回細胞生物学会、奈良、2014 年 6 月 11 日
 3. Thumkeo D, Nomachi A, Tohyama K, **Narumiya S**. The formin protein mDia is indispensable for TCR signaling dependent T cell development through actin nucleation activity. 第 66 回細胞生物学会、奈良、2014 年 6 月 11 日
 4. Thumkeo D, Beemiller P, Nomachi A, Krummel MF, **Narumiya S**. Indispensable role of formin family actin nucleator, mDia1 and mDia3, in TCR microcluster dynamics and signaling critical for positive selection of thymocytes. The 37th Naito Conference "Bioimaging-a paradigm shift for the life science". Hokkaido, Japan, July 16, 2014.
 5. Thumkeo D, Nomachi A, Tohyama K, **Narumiya S**. Formin family actin nucleators, mDia1 and mDia3, mediate TCR microcluster dynamics and signaling critical for positive selection of thymocytes. 第 88 回日本薬理学会年会、名古屋、2015 年 3 月 20 日
 6. Tohyama K, Thumkeo D, **Narumiya S**. T cell cortical F-actin is mediated by mDia and critical for TCR signaling. 第 88 回日本薬理学会年会、名古屋、2015 年 3 月 20 日
 7. 山岡真美、安藤朋海、寺林健、松永耕一、泉哲郎、仁木一郎、**石崎敏理**、木村俊秀。膵 B 細胞におけるエンドサイトーシスの時間的・空間的制御機構の解析。第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、山口、2015 年 5 月 21 日
 8. Thumkeo D, Tohyama K, Kanchanawong P, **Narumiya S**. mDia1/3-mediated cortical F-actin assembly is required for T cell receptor signaling. 第 67 回日本細胞生物学会、東京、2015 年 7 月 2 日
 9. 坂本智子、タムケオ ディーン、伊川正人、藤原祥高、大田浩、渡邊定則、**成宮周** 精子形成における Rho 標的タンパク質・フォルミンファミリーアクチン核化因子 mDia の役割解明 第 67 回日本細胞生物学会、東京、2015 年 7 月 2 日
 10. 山岡真美、寺林健、松永耕一、泉哲郎、仁木一郎、**石崎敏理**、木村俊秀 膵 B 細胞におけるエンドサイトーシスの時間的・空間的制御機構の解析。第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月 1 日
 11. Thumkeo D, Shinohara R, **Narumiya S**. Roles of mDia1/3 in neuroepithelium integrity and neuroblast migration. The 56th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego, USA, December 14, 2015.
 12. タムケオ ディーン、坂本智子、**成宮周** Indispensable role of mDia1/3 in sperm morphogenesis through the remodeling of Sertoli cell meshwork F-actin 第 89 回日本薬理学会、横浜、2016 年 3 月 10 日
 13. 桂善親、タムケオ ディーン、**成宮周** 免疫シナプスにおける mDia1/3 依存的な F-actin の機能解析 第 90 回日本薬理学会年会、長崎、2017 年 3 月 17 日
 14. タムケオ ディーン、坂本智子、符毅欣、**成宮周** 目の発生における mDia の機能解析 第 90 回日本薬理学会年会、長崎、2017 年 3 月 17 日
 15. 符毅欣、坂本智子、タムケオ ディーン、**成宮周** 精子形成における mDia1/3 の機能解析 第 90 回日本薬理学会年会、長崎、2017 年 3 月 17 日
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕
ホームページ等
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2016/161123_1.html
テーマ 1 で、研究した社会隔離による不安先進は、引きこもりのモデルとして考えられることから、本論文の結果は、社会的にも注目を集め、朝日新聞、京都新聞、産経新聞、毎日新聞、読売新聞に掲載された。
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
成宮 周 (Narumiya, Shuh)
京都大学・大学院医学研究科・特任教授
研究者番号：70144350
- (2) 研究分担者
石崎 敏理 (Ishizaki, Toshimasa)
大分大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70293876
- (3) 連携研究者 なし