

研究種目：特別推進研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18002015

研究課題名（和文） Rho GTPases を介する細胞機能の時空間的制御と個体での役割

研究課題名（英文） Spatiotemporal regulation of cell and body functions by Rho GTPases

研究代表者

成宮 周 (NARUMIYA SHUH)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70144350

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：Rho GTPase, mDia, ROCK, アクチン、細胞移動、細胞分裂、細胞接着、免疫、がん、神経、遺伝子欠損マウス

1. 研究計画の概要

Rho GTPases は、低分子量 G 蛋白質の一種で Rho, Rac, Cdc42 などがあり、アクチンと微小管の動態を制御して細胞の形態、運動、接着を調節している。本研究では、Rho のシグナル経路によって誘導される細胞骨格とこれによって引き起こされる新たなシグナル伝達を詳細に解析することにより、細胞の機能発現に必要な細胞シグナルの時空間特異的制御の機構を明らかにする。また、これら Rho GTPases の細胞での機能を伝達する各種 effector 蛋白質の遺伝子欠損マウスを用い、Rho GTPases を介する経路がどのように働いて個体の形成と生理の発現に働いているか、さらに、これらの経路の異常が、がんなどの病態にどのように関与するかを明らかにする。

2. 研究の進捗状況

① Rho GTPases の細胞周期進行での役割を解析し、Rho GTPases が中心体での Aurora kinase A の活性化を行って G2/M 期進行に働いていることを明らかにした。また、細胞質分裂は分裂細胞の赤道面にアクトミオシンからなる収縮環により行われるが、ここに働く mDia の isoform を RNAi を用い NIH3T3 細胞で検討し、mDia2 が特異的に分裂溝に集積し、そこでのアクチン形成と生じた収縮環の維持に働くことを明らかにした。

② mDia アイソフォームの細胞での動態を解析し、mDia2 が importin- α/β と CRM1 を用いる核輸送系により特異的に核と細胞質を

行き来していることを明らかにした。

③細胞内での mDia1 のアクチン線維形成を蛍光 sepcle 法でモニターすることにより、mDia1 の活性化には Rho による活性化に加えて、細胞内の G-アクチンの局所濃度の上昇が重要であることを見いだした。

④ 細胞移動における Rho シグナリングの役割をグリオ-マ細胞を用いて検討し、Rho-mDia1 経路が細胞の移動と方向性を決めること、その機構の一つとして、この経路が Src を細胞接着斑に集積し、接着斑のターンオーバーを促進することを明らかにした。また、マウス胎児繊維芽細胞 (MEF) の PDGF に対する細胞遊走に関わる Cdc42 および Rac 関連遺伝子産物の役割を体系的に検討するため、4 種の Cdc42 関連蛋白質、4 種の Rac 関連蛋白質の各々を単独、あるいは、組み合わせで RNAi で枯渇し、その挙動を Dunn チャンバーで観察した。その結果、Cdc42, Rac 1, RhoG の各々を枯渇した場合に、細胞移動のスピードが減少すること、一方、移動の方向性は損なわれないことを明らかにした。

⑤ mDia isoform のアミノ末端を用いた pull-down 法により、新規の mDia 結合蛋白質として Liprin を見いだした。また、Liprin の mDia 結合ドメインの発現により Rho-mDia 依存性のアクチン線維が減弱すること、反対に、Liprin を RNAi で枯渇すると、アクチン線維の増強が起こることを見いだした。Liprin は神経可塑性に関係する蛋白質で、現在、生理状況下でのこのメカニズムの働きを検証中である。

⑥ mDia1, mDia2, mDia3 の各々の遺伝子を

欠損する conditional KO マウスを作出した。このうち、mDia1 と mDia3 の全身性欠損を行い、これがマウスの発生、発達に見かけ上、異常を来さないことを見いだした。

⑦ 上記、mDia1 欠損マウスで T リンパ球の末梢リンパ臓器へのトラフィック不全を見いだし、これが、mDia1 欠損 T 細胞が遊走刺激に対して正常なアクチン産生と極性を呈さないためであることを明らかにした。このため、このマウスは免疫不全を呈する。

⑧ 上記 Rho-mDia1 経路による Src の末梢への移動が、Src による細胞癌化に働いている可能性を、mDia1 欠損マウスより得た MEF 細胞に温度感受性の v-Src を感染させることで検討した。その結果、mDia1 が v-Src による細胞の悪性化、浸潤、個体での腫瘍形成に必須であること明らかにした。また、mDia1 欠損マウス、mDia3 欠損マウスを DMBA-TPA による皮膚発ガン実験に供し、mDia1 欠損マウスで選択的に有意に腫瘍形成が抑制されることを見いだした。この機構を現在検討中である。

⑨ mDia1 と mDia3 の二重欠損マウスを作出し、このマウスの体躯が矮小であること、左右の後肢を同時に動かす miffy 歩行を呈すること、coat color の異常があること、末梢血で好中球増多をおこすこと、などを見いだした。神経系での組織学的検討の結果、皮質脊髄路の投射異常、嗅球への神経細胞移動の障害、下垂体前葉の形成不全などを見いだした。これらの表現型が、神経細胞での mDia2, mDia3 のどのような作用の欠損によるかを解析中である。

⑩ マウスの排卵に伴い卵細胞を取り囲む卵丘細胞がケモカインで刺激され、その下で Rho-ROCK 経路が働いてインテグリンと細胞外基質との結合を強化して精子侵入を制御していることを見いだした。

3. 現在までの達成度

③ やや遅れている。

(理由)

研究の重点が、エフェクター欠損マウスの表現型とそれを来す細胞内作用の同定に移っており、培養細胞での実験に比べ、一つ一つの研究をまとめるまでより多くの実験と時間を要するようになっている。このため、インパクトのある論文の出版が遅れている。

4. 今後の研究の推進方策

今後、各々の欠損マウスの表現型に対応した in vitro の解析系の整備に努め、研究の進展を加速したい。

5. 代表的な研究成果

(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 58 件)

1. Yamana, N., Arakawa, Y., Nishino, T., Kurokawa, K., Tanji, M., Monypenny, J.,

Ishizaki, T., Bito, H., Nozaki, K., Hashimoto, N., Matsuda, M., and Narumiya, S. (2006) Rho-mDia1 Pathway Regulates Cell Polarity and Focal Adhesion Turnover in Migrating Cells Through Mobilizing APC and c-Src. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 6844-6858.

2. Ando, Y., Yasuda, S., Ocegüera-Yanez F. and Narumiya, S. (2007) Inactivation of Rho GTPases with Clostridium difficile Toxin B Impairs Centrosomal Activation of Aurora-A in G2/M Transition of HeLa Cells. *Mol Biol Cell*. **18**, 3752-3763.

3. Sakata, D., Taniguchi, H., Yasuda, S., Adachi-Morishima, A., Hamazaki, Y., Nakayama, R., Miki, T., Minato, N. and Narumiya, S. (2007) Impaired T lymphocyte trafficking in mice deficient in an actin-nucleating protein, mDia1. *J. Exp. Med.*, **204**, 2031-2038.

4. Watanabe, S., Ando, Y., Yasuda, S., Hosoya, H., Watanabe, N., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (2008) mDia2 induces the actin scaffold for the contractile ring and stabilizes its position during cytokinesis in NIH 3T3 cells. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 2328-2338.

5. Miki, T., Okawa, K., Sekimoto, T., Yoneda, Y., Watanabe, S., Ishizaki, T. & Narumiya, S. (2009) mDia2 shuttles between the nucleus and the cytoplasm through the importin- α/β - and CRM1-mediated nuclear transport mechanism. *J. Biol. Chem.*, **284**, 5753-5762.

[学会発表] (計 106 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www5.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/J/index.html>