

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成27年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分
平成27年3月10日現在

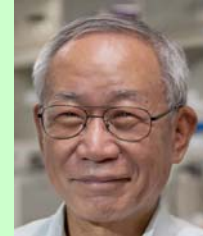
**mDia が紡ぐアクチン細胞骨格の個体生理での役割と
分子メカニズムの解析**

Physiological roles and action mechanisms of mDia-induced
actin cytoskeleton in the body

課題番号：26221302

成宮 周 (NARUMIYA SHUH)

京都大学・大学院医学研究科・特任教授



研究の概要

mDia は Rho の下流で働くアクチン重合因子で、その機能は、これまで、主として培養細胞で解析されストレスファイバー形成に関わることなどが明らかになっている。本研究では、mDia 欠損マウスから明らかになった mDia の神経可塑性、T 細胞の活性化、精子の形態形成、がん化などでの働きを解析し、アクチン細胞骨格の個体生理での役割と分子機構を明らかにする。

研究分野：基礎医学医化学一般

キーワード：生体分子医学

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

本研究では、mDia の①シナプス終末での神経可塑性における働き、② TCR シグナリングにおける働き、③精子形態形成における働き、④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 依存的シナプス前部の縮小を観察しており、その分子メカニズムと

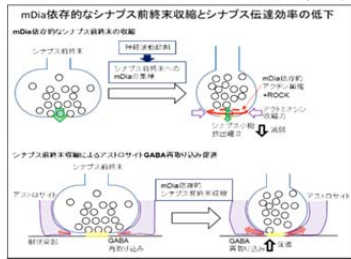
もにこれが *in vivo* で働いていることを側座核ニューロンで選択的に mDia を欠損させたマウスのストレス行動を解析することで明らかにする。テーマ2では、mDia 欠損胸腺 T 前駆細胞で TCR 刺激のシグナル伝達の障害を見ており、これより示唆される mDia によるアクチン細胞骨格の TCR シグナリングでの役割を解析する。テーマ3では、mDia 欠損マウス精巣で Sertoli 細胞に依存した精子の形態形成異常を見出しており、そのメカニズムを明らかにする。さらにテーマ4では、mDia のがん化への寄与を DMBA/TPA を用いた皮膚がんモデルと *in vitro* の培養細胞の悪性化実験で検証し、その機構を解明する。いずれも、mDia アイソフォームの遺伝子欠損マウスを用いた *in vivo* の解析と *in vitro* の培養細胞実験を併用して、mDia が紡ぐアクチン細胞骨格の働きの本質を明らかにする。

4. これまでの成果

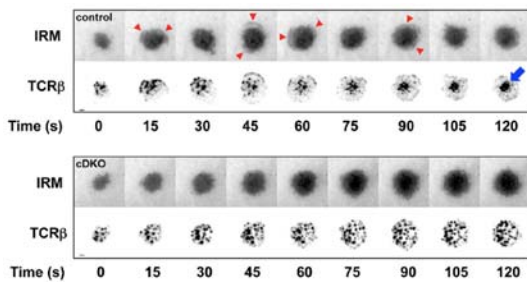
① mDia のシナプス終末での神経可塑性における働き

海馬初代培養神経細胞において神経活動低下時に mDia1/3 がシナプス前終末に蓄積し、もう一つの Rho エフェクター ROCK と協調してシナプス間隙末端付近にアクトミオシンを形成してシナプス前終末を収縮させシナプス伝達効率を低下させていることを見出した。ついで、慢性社会隔離ストレスに曝したマウス脳側座核神経細胞の腹側被蓋野 (VTA) へ投射シナプス前終末で同様の前終末収縮が mDia 依存性に起こり、神経伝達の低下を起こしていること、これ

が、慢性ストレスによる不安様行動の惹起に関係していることを明らかにした。これは、これまで不明であったシナプス前終末の可塑性の一つの様式を明らかにし新規のシナプス調節機構を発見したものである(右図)。

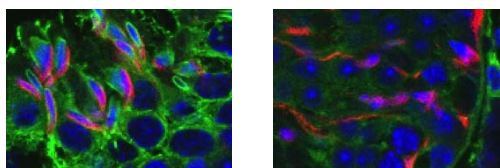


② mDiaのTCRシグナリングにおける働き
mDia1/3 二重欠損マウスの胸腺 T 前駆細胞、末梢 T 細胞で見出した TCR シグナル伝達障害を解明するため、T 細胞選択的に mDia1/3 を二重欠損した OT-I T 前駆細胞を作成、この TCR を人工脂質二重膜上で MHC-agonist peptide 複合体で刺激し、TIRFによる TCR microcluster 解析を行った。その結果、mDia が TCR microcluster の求心性移動に働き cSMAC 形成を促進すること、この過程が TCR からのシグナル伝達を可能ならしめるように働いていることが明らかになった(下図)。これは、これまで薬物などを用いて示唆されていた TCR シグナル伝達に必要なアクチン細胞骨格誘導分子を明らかにしたものである。



③ mDiaの精子形態形成における働き

mDia1/3 欠損マウスで精子形成不全を認め、精原細胞移植実験でこれが精子での 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。phalloidin 染色の結果、mDia が精子頭部の形態形成に預かるセルトリ細胞の F-actin hoop の形成に関係するほか、細胞を裏打ちする皮質のアクチン線維の形成に預り、これらのアクチン細胞骨格を介して、セルトリ細胞 - 精子細胞間接着やセルトリ-セルトリ細胞間接着に寄与していることが明らかになった。



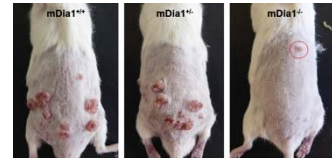
Sertoli 細胞での F-actin hoop の形成 (左) と mDia1/3 欠損 Sertoli 細胞での異常 (右)

現在、mDiaの細胞裏打ちアクチン形成の働きの詳細を解析している。

④ mDiaの細胞悪性化と皮膚がんにおける働き

FVBの遺伝子背景に戻した mDia1 遺伝子欠損マウスを、DMBA/TPA 塗布による皮膚発がんモデルに供した。その結果、パピローマ形成時期が野生型、mDia1 ヘテロ (HT) マウスに比べホモノックアウト (KO) マウスでは著しく遅延し、1 匹当たり形成されたパピローマ数も、野生型 11.0 ± 3.74 個、HT マウス 10.5 ± 5.02 個に対し、KO マウスでは 1.75 ± 0.83 個と著しく減少している

こと、さらに、パピローマの大きさも野生型、HT マウス



に比べ KO マウスでは有意に小さいこと、が明らかになった(上図)。これらのことから、Ras 依存性の皮膚腫瘍発生を検討する本モデルで mDia1 はパピローマ形成と進展に関与していることが判明した。これらの結果は、多くの臨床癌で想定されている Rho シグナリングの細胞悪性化やがん進展での経路の一端を明らかにしたものである。

5. 今後の計画

①においては計画した実験はほぼ終え論文投稿中であり、審査者のコメントに基づき追加実験を行う。②では、mDia由来のアクチン骨格と TCR および下流のシグナル分子のナノスケールレベルでの局在を 3 次元超解像度顕微鏡法で明らかにする。③ではアクチン繊維の超解像度顕微鏡に mDia の一分子ライブイメージングを組み合わせて mDia によって特異的に作られるアクチン線維の同定を行う。④では、mDia1 の皮膚特異的欠損マウスでの発がん実験を行うとともに、腫瘍発生における mDia1 の働きを分子レベルで解析する。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

原著論文

研究開始以来、一年未満なので、本研究に発する原著論文は未だ無い。

著書

Ishizaki T and Narumiya S (2014) Molecular structures, cellular functions, and physiological roles of Rho effectors. Ras Superfamily Small G Proteins: Biology and Mechanisms (ed. Alfred Wittinghofer), vol. 1, pp. 363-394, Springer

招待講演

Narumiya, S., Thumkeo, D., Beemiller, O. and Krummel, M.F. 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, China. ホームページ等