

機関番号：14301

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特異的制御と個体での役割

研究課題名（英文） Spatiotemporal control of cell functions by Rho GTPases: mechanisms and physiological roles

## 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

研究成果の概要（和文）：細胞は、刺激に伴って形態を変え、接着したり、移動したり、分裂したりする。これらの過程で細胞内のスイッチとして働いているのが Rho という蛋白質である。本研究では、Rho とその下流の経路の細胞と個体での役割を解析した。その結果、この経路が、細胞の移動や分裂で働いている仕組みが解明され、この仕組みが、神経が正常に分布したり、血管が正常に発生するのに必須であること、また、癌細胞ではこの仕組みががん遺伝子産物に利用され癌化に働くことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The small GTPase Rho functions as a molecular switch of cell morphogenesis, adhesion, migration and division by acting on downstream signaling molecules. Here we studied the spatiotemporal role of this signaling in cultured cells and the body. We revealed the role and mechanism of the Rho signaling in cell migration and cell division in cultured cells and further found that this pathway plays an essential role in development such as embryo vasculogenesis and proper path finding of axon, and that this pathway is exploited by oncogenes in cell transformation and tumorigenesis.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	105,100,000	31,530,000	136,630,000
2007年度	110,600,000	33,180,000	143,780,000
2008年度	105,100,000	31,530,000	136,630,000
2009年度	87,600,000	26,280,000	113,880,000
2010年度	84,800,000	25,440,000	110,240,000
総計	493,200,000	147,960,000	641,160,000

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、アクチン、微小管、細胞周期、細胞質分裂

## 1. 研究開始当初の背景

細胞が刺激を受けると接着、移動、分泌、増殖など様々な細胞応答を呈する。低分子量 G 蛋白質は、GDP 結合型の不活化体と GTP 結合型の活性化体の間を往復して、これら反応の分子スイッチとして働く。なかでも、Rho ファミリー蛋白質は、細胞骨格の再編成を介して、細胞の形態、接着、移動、細胞周期制御などの分子スイッチとして働いている。これまでの研究で、Rho の下流のシグナル伝達分

子が同定され、Rho からアクチン細胞骨格の再構成までの基本的機構は、明らかになったが、これが細胞の中でどのように時間空間特異的に使用され、生理作用を介達しているかは必ずしも明らかでない。さらに、細胞のがん化などの病態でこの経路がいかに使われているかも明らかでない。また、培養細胞で見られた現象が、動物個体の中でどのように働いているかも不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究は、Rho ファミリーの中でも Rho に主眼をおき、下流のエフェクター分子、とくに、ROCK と mDia による細胞骨格制御とシグナル伝達機能を解析することにより、細胞機能の時空間特異的制御機構とこれら経路の個体での組織構築、生理、病態での役割を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) mDia は GTP 型 Rho の結合によって活性化され、アクチン重合を行なう。この機構を 1 分子イメージング法および単分子蛍光偏光による可視化により検討した。また、mDia の活性制御を起こす mDia 結合分子の探索を行なった。

(2) 培養細胞を用いて Rho GTPases による細胞機能の時空間特異的制御を、細胞周期、細胞質分裂、細胞移動を対象に解析した。

(3) これまでに作製した ROCK-I, ROCK-II の欠損マウスに加え、mDia の 3 つのアイソフォーム、mDia1, mDia2, mDia3 の各遺伝子欠損マウスを作出し、これら分子を介する Rho シグナルの個体での意義を解析するとともに、これらのマウスやそれ由来の細胞を用い、Rho シグナルの細胞がん化、腫瘍形成における役割を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) mDia のアクチン重合機序の解明とその制御メカニズムの発見。

mDia による重合を一定の濃度の蛍光化アクチン下で *in vitro* で行わせしめ、アクチン線維の挙動を単分子蛍光偏光により可視化することにより、mDia がアクチン線維の barbed end に結合し、生成する線維をその螺旋に沿って回転させながら重合を触媒することを見出した (文献①)。また、細胞内での mDia1 によるアクチン線維形成を蛍光 speckle 法でモニターすることにより、mDia1 によるアクチン線維形成は Rho による活性化とともに細胞内 G-アクチンの局所濃度が重要であることを見出した (文献②)。さらに、mDia 結合蛋白質として Liprin を見出した。Liprin が刺激依存的な mDia の細胞辺縁部の集積を阻害して Rho-mDia 経路によるアクチン形成を調節していることを見出した (Sakamoto et al. J. Cell Sci. in revision)。

### (2) 細胞周期、細胞質分裂での Rho GTPase の機能と機能発現機構の研究。

Rho GTPases を不活化する Clostridium difficile toxin B を用い HeLa 細胞の G2/M 期進行での Rho GTPases の関与を検討した。その結果、Rho GTPases が G2 期初期から中心体で PAK の活性化を起こすこと、この PAK の活性化により、中心体で Aurora A が活性化され、これが CDK1/cyclin B の活性化を起

こし G2/M 期進行に働いていることを明らかにした (文献③; 図 1)。

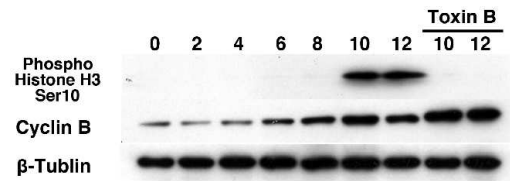


図 1: toxin B 添加による G2/M 期進行の阻害。Toxin 処理細胞では、histone H3 のリン酸化が障害されている。

また、NIH3T3 細胞を用い、mDia の 3 種の isoform の各々の分裂期での局在と RNAi での枯渇が細胞質分裂に与える効果を検討した。その結果、mDia2 が、anaphase より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安定化に働くことを明らかにした。mDia2 が無いと、収縮環は正常に形成、維持されず、細胞は異常収縮を繰り返し、分裂に失敗する (文献④; 図 2)。ついで、pull down 法を用い、細胞質分裂期における mDia2 の結合蛋白質を探索し、anillin を同定した。Anillin-mDia2 の結合が mDia2 の収縮環局在と細胞質分裂遂行に必須であることを見出した (文献⑤)。

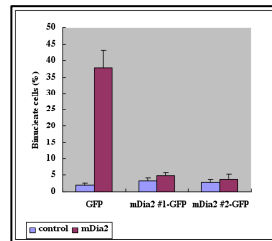


図 2: mDia2 RNAi による多核細胞の出現 (左) が RNAi 耐性の mDia2 の発現で rescue されている (中、右)。

さらに、mDia アイソフォームの細胞での動態を解析し、mDia2 が importin- $\alpha/\beta$  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 (文献③)。

### (3) 細胞運動における Rho GTPases および mDia の寄与に関する研究。

細胞移動における Rho シグナリングの役割をグリオー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、mDia1 が Src を細胞接着斑に集積して、接着斑のターンオーバーを促進していることを明らかにした (文献⑥)。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、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、組み合わせて RNAi で枯渇し、その挙動を Dunn チャンバーにより観察した。その結果、Cdc42, Rac 1, RhoG の各々の RNAi で、細胞移動のスピードが減少するが、移動の方向性は損なわれないことを明らかにした (文献⑫)

**(4) 遺伝子欠損マウスの作出と mDia1 欠損マウスを用いた mDia1 の免疫系での役割解析。**  
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 欠損マウスでは、T リンパ球の末梢リンパ臓器へのトラフィック不全があり、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、このため、このマウスは免疫不全を呈することを明らかにした (文献⑬)。

**(5) 遺伝子欠損マウスを用いた mDia のがん化での役割解析。**

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 (以下に示す) 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 (文献⑤; 図 3)。

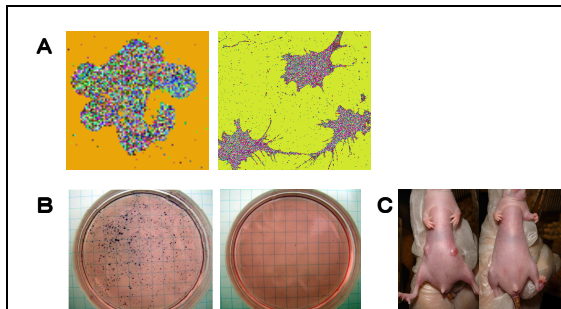


図 3 A. ts-v-Src の移動。Control MEF 細胞では温度シフトで v-Src (green) は末梢に移動するが (左)、mDia1 欠損 MEF 細胞では核周囲に貯留する (右)。B. soft agar での colony 形成。mDia1<sup>-/-</sup>-MEF 細胞 (右) は、WT (左) と異なり、v-Src 発現下でもコロニーを形成しない。C. 腫瘍形成。v-Src 発現 WT-MEF 細胞は、ヌードマウスへの移植で腫瘍を形成する (左) が、mDia1<sup>-/-</sup>-MEF 細胞は腫瘍を形成しない (右)。

また、mDia1, mDia3 欠損マウスを Ras の変異により腫瘍が形成される 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腫瘍形成が有意に抑制されることを見出した (解析中、図 4)。

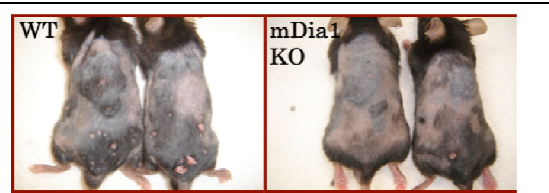


図 4. DMBA-TPA による皮膚発ガン。左のパネルの対照マウスに対し、右の mDia1<sup>-/-</sup>-マウスでは、皮膚癌の発生が抑制されている。

**(6) mDia1/3 二重欠損マウスを用いた mDia の生体での役割解析**

mDia1/3 の 2 重欠損マウス (mDia1/3-DKO) は、両足を揃えて動く miffy 型歩行異常を呈する (図 5A)。一次運動野への順行性トレーサー注入による大脳皮質脊髄路の解析で、mDia1/3-DKO では多くの軸索が正中線を越えて脊髄の両側に投射しており、軸索ガイダンス異常が疑われている (解析中、図 5B)。

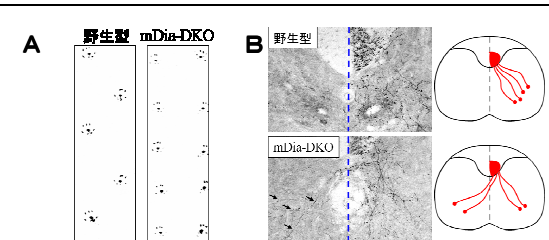


図 5 : A. mDia1/3-DKO の miffy 型歩行異常。野生型 (左)、mDia-DKO (右) の後肢の足跡。後肢にインクをつけ、白紙上を歩行させ、足跡を得た。B. mDia1/3-DKO における大脳皮質脊髄路軸索の走行異常。野生型および mDia-DKO の一次運動野にトレーサーを注入し、軸索を順行性に標識した。図は脊髄の横断面を示す。

さらに、mDia1/3-DKO では、発生時、神経上皮組織の apical 側にある actin belt が破綻しており、これにより神経幹細胞が無秩序に増殖を行なうなど組織構築と恒常性の破綻が認められた。これは、mDia が造り出す細胞を繋ぐアクチン骨格が幹細胞の増殖を調節する niche としての役割を果たしている可能性を示唆する (Thumkeo et al. PLoS One submitted, 図 6)。

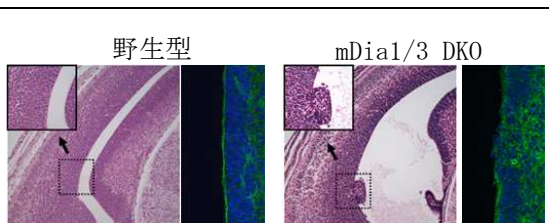


図 6. mDia1/3 DKO マウスにおける脳室異所性

(7) その他の結果 (主要なものを抜粋)

①ROCK-I欠損マウスとROCK-II欠損マウスを掛け合わせ表現型を解析することにより、ROCKの2つのアイソフォームが胎生期に卵黄嚢での血管形成に必須の役割をしていることを見出した (Kamijo et al., revision)。

②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出した(文献⑩)。

③ヒトES細胞の分散培養に伴うapoptosisについて検討し、これにRho-ROCK経路が働いていることを明らかにした(文献④)。

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90件)

- ① Mizuno H, Higashida C, Yuan Y, Ishizaki T, Narumiya S, Watanabe N. Rotational movement of the formin mDial along the double helical strand of an actin filament. *Science*. 査読あり 2011, 331, 80-83.
- ② Tanizaki H, Egawa G, Inaba K, Honda T, Nakajima S, Moniaga CS, Otsuka A, Ishizaki T, Tomura M, Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, Okada T, Kabashima K. Rho-mDial1 pathway is required for adhesion, migration, and T-cell stimulation in dendritic cells. *Blood*. 査読あり 2010, 116, 5875-5884.
- ③ Esaki Y, Li Y, Sakata D, Yao C, Segi-Nishida E, Matsuoka T, Fukuda K, Narumiya S. Dual roles of PGE2-EP4 signaling in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読あり 2010, 107, 12233-12238.
- ④ Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, Murakami K, Aramaki T, Nishiyama A, Muguruma K, Nakano T, Suga H, Ueno M, Ishizaki T, Suemori H, Narumiya S, Niwa H, Sasai Y. Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 査読あり 2010, 7, 225-239.
- ⑤ Tanji M, Ishizaki T, Ebrahimi S, Tsuboguchi Y, Sukezane T, Akagi T, Frame MC, Hashimoto N, Miyamoto S, Narumiya S. mDial targets v-Src to the cell periphery and facilitates cell transformation, tumorigenesis, and invasion. *Mol Cell Biol*. 査読あり 2010, 19, 4604-4615.
- ⑥ Watanabe S, Okawa K, Miki T, Sakamoto S, Morinaga T, Segawa K, Arakawa T, Kinoshita M, Ishizaki T, Narumiya S. Rho and anillin-dependent control of mDia2 localization and function in cytokinesis. *Mol Biol Cell*. 査読あり 21, 2010, 3193-3204.
- ⑦ Hanada R, Leibbrandt A, Hanada T, Kitaoka S, Furuyashiki T, Fujihara H, Trichereau J, Paolino M, Qadri F, Plehm R, Klaere S, Komnenovic V, Mimata H, Yoshimatsu H, Takahashi N, von Haeseler A, Bader M, Kilic SS, Ueta Y, Pifl C, Narumiya S, Penninger JM. Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature*. 査読あり 2009, 462, 505-509.
- ⑧ Oga T, Matsuoka T, Yao C, Nonomura K, Kitaoka S, Sakata D, Kita Y, Tanizawa K, Taguchi Y, Chin K, Mishima M, Shimizu T, Narumiya S. Prostaglandin F(2 $\alpha$ ) receptor signaling facilitates bleomycin-induced pulmonary fibrosis independently of transforming growth factor-beta. *Nat Med*. 査読あり 2009, 15, 1426-1430.
- ⑨ Fujita A, Shishido T, Yuan Y, Inamoto E, Narumiya S, Watanabe N. Imatinib mesylate (STI571)-induced cell edge translocation of kinase-active and kinase-defective Abelson kinase: requirements of myristoylation and src homology 3 domain. *Mol Pharmacol*. 査読あり 2009, 75, 75-84.
- ⑩ Yao C, Sakata D, Esaki Y, Li Y, Matsuoka T, Kuroiwa K, Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat Med*. 査読あり 2009, 15, 633-640.
- ⑪ Yodoi R, Tamba S, Morimoto K, Segi-Nishida E, Nishihara M, Ichikawa A, Narumiya S, Sugimoto Y. RhoA/Rho kinase signaling in the cumulus mediates extracellular matrix assembly. *Endocrinology*. 査読あり 2009, 150, 3345-3352.
- ⑫ Monypenny J, Zicha D, Higashida C, Ocegüera-Yanez F, Narumiya S, Watanabe N. Cdc42 and Rac family GTPases regulate

- mode and speed but not direction of primary fibroblast migration during platelet-derived growth factor-dependent chemotaxis. *Mol Cell Biol.* 査読あり 2009, 29, 2730-2747.
- ⑬ Miki T, Okawa K, Sekimoto T, Yoneda Y, Watanabe S, Ishizaki T, Narumiya S. mDia2 shuttles between the nucleus and the cytoplasm through the importin- $\alpha/\beta$ - and CRM1-mediated nuclear transport mechanism. *J Biol Chem.* 査読あり 2009, 284, 5753-5762.
- ⑭ Takeya R, Taniguchi K, Narumiya S., Sumimoto H. The mammalian formin FHOD1 is activated through phosphorylation by ROCK and mediates thrombin-induced stress fibre formation in endothelial cells. *EMBO J.* 査読あり 2008, 27, 618-628.
- ⑮ Higashida C, Suetsugu S, Tsuji T, Monypenny J, Narumiya S., Watanabe N. G-actin regulates rapid induction of actin nucleation by mDia1 to restore cellular actin polymers. *J Cell Sci.* 査読あり 2008, 121, 3403-3412.
- ⑯ Watanabe S, Ando Y, Yasuda S, Hosoya H, Watanabe N, Ishizaki T, Narumiya S. mDia2 induces the actin scaffold for the contractile ring and stabilizes its position during cytokinesis in NIH 3T3 cells. *Mol Biol Cell.* 査読あり 2008, 19, 2328-2338.
- ⑰ Nagamachi M, Sakata D, Kabashima K, Furuyashiki T, Murata T, Segi-Nishida E, Soontrapa K, Matsuoka T, Miyachi Y, Narumiya S. Facilitation of Th1-mediated immune response by prostaglandin E receptor EP1. *J Exp Med.* 査読あり 2007, 204, 2865-2874.
- ⑱ Sakata D, Taniguchi H, Yasuda S, Adachi-Morishima A, Hamazaki Y, Nakayama R, Miki T, Minato N, Narumiya S. Impaired T lymphocyte trafficking in mice deficient in an actin-nucleating protein, mDia1. *J Exp Med.* 査読あり 2007, 204, 2031-2038.
- ⑲ Ando Y, Yasuda S, Ocegüera-Yanez F, Narumiya S. 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.* 査読あり 2007, 18, 3752-3763.
- ⑳ Honda T, Segi-Nishida E, Miyachi Y, Narumiya S. Prostacyclin-IP signaling and prostaglandin E2-EP2/EP4 signaling both mediate joint inflammation in mouse collagen-induced arthritis. *J Exp Med.* 査読あり 2006, 203, 325-335.
- ㉑ Yamana N, Arakawa Y, Nishino T, Kurokawa K, Tanji M, Itoh RE, Monypenny J, Ishizaki T, Bito H, Nozaki K, Hashimoto N, Matsuda M, Narumiya S. The Rho-mDia1 pathway regulates cell polarity and focal adhesion turnover in migrating cells through mobilizing Apc and c-Src. *Mol Cell Biol.* 査読あり 2006, 26, 6844-6858.
- [学会発表] (計 73 件)
- ① Narumiya, S., “Phenotype Analysis of Mice Deficient in Actin Nucleator, mDia”, 4<sup>th</sup> Mechanobiology Workshop and Biophysical Society Meeting, November 9-12, 2010, Singapore
- ② Narumiya, S., “Functions of the Rho-mDia pathway in the body; lessons from knockout mice”, The Gordon Research Conference on “Mechanisms of Cell Signaling”, August 23-28, 2009, Magdalene College, Oxford, U.K.
- ③ Narumiya, S., “Rho-mDia pathway, Src and cell transformation”, Gordon Conference on Phosphorylation and G-protein mediated Signaling Networks, June, 15-20, 2008, University of New England, Maine, U.S.A.
- ④ Narumiya, S., “The Rho-mDia Pathway in Cell Transformation and Migration”, The AACR Special Conference in Cancer Research on Cytoskeletal Signaling in Cancer, February 3-5, 2008, San Diego, U.S.A.
- ⑤ Narumiya, S., “mDia Isoforms Mediate Delivery of c-Src and Spindle Orientation through Actin Cytoskeleton; A Conserved Mechanism from Yeast to Mammals?”, ASCB-ECF Summer Meeting *Dynamic Interplay Between Cytoskeletal and Membrane Systems*, Dijon Congrexpo, June 27-30, 2007, Dijon, France.
- ⑥ Narumiya, S., “Rho signaling : Roles and Mechanism in Cell Morphogenesis and Movement”, Dana-Farber Cancer Institute Seminars in Oncology, April 3, 2007,

Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, U.S.A.

- ⑦ Narumiya, S., “Rho GTPases in animal cell mitosis”, FASEB Summer Research Conference on Regulation & Function of Small GTPases, July 15-20, 2006, Vermont Academy, Vermont, U.S.A.
- ⑧ Narumiya, S., “Cytoskeleton Remodeling by Rho GTPases and Effectors in cell morphogenesis, migration and mitosis. The Symposium on Cytoskeleton: dynamics and structural basis of cytoskeleton assembly”, The 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and the 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto, Japan.

[その他]

ホームページ :

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

#### 6. 研究組織

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