

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2011～2013

課題番号：23229003

研究課題名(和文) 個体での組織構築・恒常性における Rho-mDia 経路の役割

研究課題名(英文) The role of Rho-mDia signaling in tissue architecture and homeostasis in the body

研究代表者

成宮 周 (Narumiya, Shuh)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授(特任)

研究者番号：70144350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 126,000,000円、(間接経費) 37,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Rhoの下流でアクチン核化・重合因子として働くmDiaの機能を分子・細胞レベルと個体レベルで解析した。前者では、mDiaがアクチン線維のピッチに沿って回転しながら重合を行っていること、Liprin- α が活性化mDiaの細胞膜への移行を制御してその活性を抑制していることを見出した。後者では、mDia1と3が、神経上皮の極性維持、抑制性神経前駆細胞の遊走制御、大脳皮質脊髄路の軸索ガイダンスの制御を行って脳の組織構築と恒常性の維持を行っていること、mDia2が赤芽球の細胞質分裂の制御を行って造血系の制御と行っていることを明らかにし、各々の過程でmDia由来のアクチン線維の働きを解明した。

研究成果の概要(英文)：Here we examined action and regulation of mDia, a Rho-regulated actin nucleator/polymerization factor, at the molecular and cellular level and the role of each mDia isoform in tissue architecture and maintenance in the body. In the former, we discovered that mDia catalyzes actin polymerization by rotating along the pitch of actin filament and that Liprin- α negatively regulating mDia activity by trapping mDia in the cytosol. In the latter, we used mDia-deficient KO mice and discovered that mDia contribute to shaping and maintenance of architecture of the brain by regulating the neuroepithelial polarity, tangential migration of inhibitory neuron precursors and axon guidance of the corticospinal tract neurons. We also discovered that mDia2 regulates cytokinesis of erythroblasts and contributes to maintenance of the hematopoietic system. In this work, we further elucidated how mDia-induced actin cytoskeleton functions in each of these in vivo processes.

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：mDia actin Liprin neuroepithelial polarity neuronal migration axon guidance cytokinesis tissue architecture

1. 研究開始当初の背景

細胞骨格、とりわけ、actin 細胞骨格は細胞の形態、接着、移動、増殖に大きな役割をなしている。ここ 20 年の研究で、actin 細胞骨格の形成が、細胞の中でどのように制御されて上記過程に働くのかの大略が明らかになって来た。しかし、これらの解析の多くは培養細胞でなされたもので、培養細胞で明らかになった原理が、個体の組織でどう働いているかは殆ど不明であった。

2. 研究の目的

上記背景の下、本研究では、Rho の下流で actin 重合因子として働いている mDia を対象として、3 種の mDia isoform の遺伝子欠損マウスを用い、その組織構築、組織恒常性、組織可塑性における働きを明らかにしようとしたものであった。これに加え、未だに不明なことが多い細胞内での mDia 活性の制御メカニズムの解明や mDia と並ぶ Rho effector である ROCK の個体での機能、citron の細胞機能の解明も目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、mDia の各種 isoform の欠損マウスを用い、Rho-mDia 経路の神経幹細胞制御、軸索ガイダンス、シナプス可塑性などの神経系の恒常性での役割、骨髄幹細胞制御や分裂、脱核など主に骨髄恒常性での役割を解析する。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、*in utero* electroporation による遺伝子発現、RNAi を併用する。

4. 研究成果

(1) 神経系の組織構築と恒常性での mDia の役割

mDia1/3 による神経上皮の極性維持。

神経上皮は、神経幹細胞として中枢神経系の各種細胞の前駆体を産み出す。神経幹細胞のこの働きは時間空間的に厳密に制御されているが、これを保障しているのが神経上皮の極性 (apicobasal polarity) であり、これは頭頂部の細胞間接着 (apical adherens junction) で保持されている。mDia1/3 二重欠損 (DKO) マウスの脳では、神経上皮の apical adherens junction とそれを連ねるアクチンベルトが消失、この結果神経上皮極性が破綻して神経幹細胞の増殖制御が外れ、脳室内へ向かっての異常増殖が起こった。それにより、mDia1/3 DKO マウスは脳室閉鎖と水頭症を発症した。この結果は、Rho-mDia 経路が神経上皮で誘導するアクチン細胞骨格が apical adherens junction の形成と維持を介して神経上皮極性と幹細胞制御に必須の働きを行っている

ことを示したものである (発表論文 9)。

mDia1/3 による抑制性神経前駆細胞の tangential migration の制御。

脳の発生過程で興奮性神経細胞と抑制性神経細胞の前駆細胞は、radial migration と tangential migration という異なる移動様式を示し脳構造の形成に預かっている。mDia1/3 DKO マウス脳では、興奮性神経細胞の radial migration とそれに伴う大脳皮質層形成に異常は認められなかったが、抑制性神経細胞の大脳皮質や海馬、嗅球への tangential migration は有意に減少し、成体で顆粒細胞の減少による嗅球低形成が見られた。脳組織の *in vitro* 培養系での神経前駆細胞移動の観察により、mDia1/3 は中心体の先導突起方向への移動と、移動した中心体への細胞核・細胞体の移動の両方に関与していること、これらが中心体に付随したアクチン線維の先導突起方向への移動と細胞体移動時の細胞体後部での一過的なアクチン線維の集積で起こることが明らかとなった。これらの結果から、抑制性神経細胞の tangential migration とその結果としての脳構造の形成において Rho-mDia 経路によるアクチン形成が不可欠であることが明らかとなった (発表論文 7)。

mDia1/3 による大脳皮質脊髄路の軸索ガイダンスの制御。

動物の運動制御では、脳の運動皮質に発する皮質脊髄路の軸索が起始部と反対側の脊髄前角の運動ニューロンに投射することが重要である。mDia1/3-DKO は、左右両肢が同時に動く 'miffy 型' の歩行を呈し、大脳皮質脊髄路の軸索が反対側だけでなく同側の脊髄前角にも投射しているのが見られた。mDia1/3-DKO 脊髄では反発ガイダンス分子である Ephrin 中央部集積の消失が見られ、*in vitro* の神経培養系で mDia1/3-DKO 神経細胞は Ephrin に対する反応性を欠くことが見られた。これらの結果は、mDia1/3 によるアクチン細胞骨格が脊髄の正常な組織構築や神経細胞の軸索ガイダンスに不可欠なことを示したものである (発表論文 3)。

(2) mDia2 欠損マウスの作出と mDia2 の赤芽球細胞質分裂での役割の解明

mDia2 条件付き欠損 flox マウスを作出し、まず、全身欠損マウスで解析を行なった。その結果ホモ欠損マウスは、胎生 11.5 日まで生存するが、多核赤芽球を主徴とする強度の貧血を示し、全例が胎生 12.5 日までに死亡することを見出した。In vitro の実験で、mDia2 欠損赤芽球は、正常に分化するが、前赤芽球の段階で、分裂溝にアクチン線維が集積せず、細胞質分裂が起こらないことが明らかになった (発表論文 1)。これは培養細胞で見いだした mDia2 の細胞質分裂での働きが個体レベルでも働いていることを証明したものである。

(3) mDia 活性の細胞内での制御機構の研究

Liprin- α による mDia の細胞膜局在の制御。

mDia は Rho エフェクターであり、Rho による活性制御を受けるが、この分子がその他にどういった制御を受けるかは不明であった。本研究では、mDia の DID-DD domain に結合する蛋白質として Liprin- を同定した。Liprin- の過剰発現は mDia の膜移行を抑制し、Rho-mDia 経路による stress fiber を減弱させ、反対に RNAi による Liprin- の枯渇は mDia の膜集積と stress fiber 形成を促進した。このことから、Liprin- が活性化 mDia の細胞膜への移行を制御することにより mDia のアクチン核化・重合活性を負に制御していることが明らかになった（発表論文 6 と 8）。

mechanosensor としての mDia の働き。

生体内で細胞は絶え間なくズリ応力や収縮伸展などの機械刺激を受け、それらに沿って形態を変換する。このことは、細胞に張力を感知してアクチン細胞骨格の再編成に結ぶ仕組みが存在することを意味する。これを mechanosensor と呼ぶ。本研究では、培養細胞に伸展刺激や張力解除を加えた時に起こるアクチン線維形成機構を解析し、これが mDia によること、この場合の mDia の活性化は張力解除時におこる Rho の活性化とアクチン繊維崩壊によるアクチンモノマーの局所濃度増加の両方によることを明らかにした（発表論文 4）。これは、mDia の mechanosensor としての働きを明らかにしたものである。

(4) ROCK の血管発生での役割の同定。

ROCK は mDia と並ぶ主要な Rho エフェクターである。ROCK は ROCK-I と ROCK-II の 2 つのアイソフォームからなり、我々はこれまで各々の単独欠損マウスを用い、ROCK が個体発生の過程で細胞をまたぐアクトミオシン束を形成し眼や臍部などの体壁閉鎖に働いていることなどを明らかにして来た。しかし、ROCK が 2 つのアイソフォームを合わせ全体として生体内でどう働いているかは不明であった。本研究では、ROCK-I/ROCK-II の 2 重ヘテロ欠損マウスを交配してその点を解析した、その結果、ROCK-I/ROCK-II の 2 重ホモ欠損マウスは、胎生 9.5 日以前にすべて死亡すること、ROCK-I/ROCK-II のヘテロ・ホモ、ホモ・ヘテロ欠損マウスでは卵黄嚢の血管形成不全と body turning の異常を呈し、胎生 12.5 日までに死亡することが明らかになった。これらの結果は、ROCK が血管形成で不可欠なことを明らかにしたものである（発表論文 10）。これまで、同様の表現型が、Lysophosphatidic acid (LPA) 合成酵素である atuatotaxin と LPA 受容体刺激を Rho の活性化に繋ぐ Galpha13 の遺伝子欠損マウスで見られており、以上の結果は LPA-LPA 受容体-G13-Rho-ROCK というシグナル伝達経路が血管発生に働いていることを示すも

のと考えられる。

(5) Citron-K の細胞質分裂での働きの同定。

Citron-kinase は GTP-Rho に結合して活性化される Rho エフェクターの一つで、活性化体の発現が細胞質分裂の失敗を招来することから、細胞質分裂での Rho エフェクターと考えられてきた。しかし、この分子の正確な働きは不明であった。本研究では、RNAi と truncation mutants の rescue 実験により Citron-K の働きを解析した。その結果、Citron-K が収縮環による細胞質絞扼時に分裂溝に局在したのちに細胞間橋の midbody で ring 状の安定構造をつくること、この ring 構造は KIF14 や PRC-1 などの微小管結合分子の midbody 局在に必要なこと、Citron-K を枯渇させると midbody/細胞間橋は不安定化し分裂が reverse されること、これらの働きに Citron-K の kinase domain は不要なこと、などを見出した。このことは、Citron-K が細胞質分裂で分裂溝の収縮と細胞間橋の切断を繋ぎ分裂の完了に働く分子であることを明らかにしたものである（発表論文 5）。

(6) 本研究で得られたその他の未発表・予備的知見

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で GFP-mDia1/3 を発現させたり、AAV-Cre による mDia1/3 の欠損を起こしたりして、mDia の神経細胞での局在と機能を検討した。その結果、TTX により神経活動を抑制すると mDia1/3 がシナプス前終末に集積すること、その時に前終末の active zone 周囲にアクチン線維が形成されること、mDia1/3 を欠損させると TTX 処理に伴う神経活動の減弱が軽度になること、このとき active zone 周囲のアクチン線維は見られず、active zone に接着しているシナプス小胞数の減少が見られないこと、を見出している。さらに、Cre を発現する AAV を側坐核に注入して、側坐核神経細胞で mDia1/3 を欠損した mDia-cKO を作出し、これに社会隔離ストレスを与えると野生型に比し不安行動が減弱していることを見出している。これらの結果は神経前終末のシナプス可塑性で mDia が重要な役割をしていること、この機構が不安様行動を制御する神経回路で働いていることを示している。現在、研究継続中である。

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。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。mDia1/3 double floxed マウスより T 細胞を単離し Cre を導入して mDia1/3 二重欠損成熟 T 細胞を作成し test したところ、同様の TCR 依存的活性化の障害を認めた。現在研究継続中である。

mDia の精子形態形成における働き

これ迄の実験で 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 Sertoli 細胞での欠損によることを明らかにした。また、免疫組織化学で Sertoli 細胞に mDia3 シグナルを認め、phalloidin 染色で mDia1/3 二重欠損マウス精巣で Sertoli 細胞の F-actin hoop の形成不全と異常に束化されたアクチン繊維の存在を観察している。現在、上記メカニズムを解析中である。

mDia の細胞悪性化と皮膚発がんにおける働き

C57BL/6N × CBA の遺伝背景の ES 細胞を用いて作成した mDia1 と mDia3 の各単独欠損マウスを DMBA/TPA 投与による皮膚発ガンモデルに供して、mDia1 欠損特異的にパピローマ数の減少および発生時期の顕著な遅延を認めた。しかし、欠損マウスを C57BL/6 背景に戻し交配するにつれ、この腫瘍形成が対照となる野生型 littermate で見られなくなった。DMBA/TPA を用いた皮膚二段階発癌モデルは用いるマウスの遺伝背景に依存することが報告されており、現在、以前の所見を再現するために、mDia1 欠損マウスを腫瘍形成が評価できる FVB 遺伝背景に戻し交配中である。さらに、DMBA/TPA による発がんは Ras の活性化変異に起因するのでマウス個体実験を補完するため、NIH3T3 細胞や MEF を用いて活性化 Ras による細胞悪性化での mDia1 の関与を検討中である。

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 10 件)

1. Watanabe S, De Zan T, Ishizaki T, Yasuda S, Kamijo H, Yamada D, Aoki T, Kiyonari H, Kaneko H, Shimizu R, Yamamoto M, Goshima G, Narumiya S. Loss of a Rho-Regulated Actin Nucleator, mDia2, Impairs Cytokinesis during Mouse Fetal Erythropoiesis. *Cell Rep*. 5(4): 926-932, 2013. doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.021
2. Thumkeo D, Watanabe S, Narumiya S. Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals. *Eur J Cell Biol*.

92(10-11): 303-315, 2013.

doi:10.1016/j.ejcb.2013.09.002

3. Toyoda Y, Shinohara R, Thumkeo D, Kamijo H, Nishimaru H, Hioki H, Kaneko T, Ishizaki T, Furuyashiki T, Narumiya S. EphA4-dependent axon retraction and midline localization of Ephrin-B3 are disrupted in the spinal cord of mice lacking mDia1 and mDia3 in combination. *Genes Cells*. 18(10): 873-885, 2013. Doi:10.1111/gtc.12081
4. Higashida C, Kiuchi T, Akiba Y, Mizuno H, Maruoka M, Narumiya S, Mizuno K, Watanabe N. F and G-actin homeostasis regulates mechanosensitive actin nucleation by formins. *Nature Cell Biol*. 15(4): 395-405, 2013. doi:10.1038/ncb2693
5. Watanabe S, De Zan T, Ishizaki T, Narumiya S. Citron-kinase mediates transition from constriction to abscission through its coiled-coil domain. *J. Cell Sci.*, 126(Pt 8): 1773-1784. 2013, doi: 10.1242/jcs.116608
6. Sakamoto S, Narumiya S, Ishizaki T. A new role of multi scaffold protein Liprin- : Liprin- suppresses Rho-mDia mediated stress fiber formation. *Bioarchitecture* 2(2): 43-49. 2012, doi: 10.4161/bioa.20422
7. Shinohara R, Thumkeo D, Kamijo H, Kaneko N, Sawamoto K, Watanabe K, Takebayashi H, Kiyonari H, Ishizaki T, Furuyashiki T, Narumiya S. A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors. *Nature Neurosci*. 15(3): 373-380, S1-2. 2012, doi: 10.1038/nn.3020
8. Sakamoto S, Ishizaki T, Okawa K, Watanabe S, Arakawa T, Watanabe N, Narumiya S. Liprin- controls stress fiber formation by binding to mDia and regulating its membrane localization. *J Cell Sci*. 125(1): 108-120, 2012, doi: 10.1242/jsc.087411
9. Thumkeo D, Shinohara R, Watanabe K, Takebayashi H, Toyoda Y, Tohyama K, Ishizaki T, Furuyashiki T, Narumiya S. Deficiency of mDia, an actin nucleator, disrupts integrity of neuroepithelium and causes periventricular dysplasia. *PLoS One* 6(9):e25465.2011, doi:101371/journal.pene.0025465
10. Kamijo H, Matsumura Y, Thumkeo D, Koike S, Masu M, Shimizu Y, Ishizaki T, Narumiya S. Impaired vascular remodeling in the yolk sac of embryos deficient in ROCK-I and ROCK-II. *Genes Cells* 16(10):1012-1021. 2011, doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01546.x.

〔学会発表〕(計 24 件)

招待講演 (9 件)

1. Narumiya S: Phenotype analysis of mDia-deficient mice; impaired neurblast migration and disordered proliferaitotn of

- neural stem cells. Gordon Research Conference on Mechanism of Cell Signaling, August 1, 2011, Maine, U.S.A.
2. 成宮 周 : 毒素研究から細胞生物学へ : Rho 研究の冒険。特別講演。第 152 回日本獣医学会学術集会。大阪。
 3. Narumiya, S.: Rho-mediated regulation of actin cytoskeleton; from single molecule actions to significance in the body. Plenary Lecture, The 84th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, September 21-24, 2011, Kyoto, Japan.
 4. Narumiya, S.: My Adventures in Medical Research; Prostanoid Receptors and Rho GTPase. The 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. March 29-31, Matsumoto, Japan.
 5. Narumiya, S.: Rho-mDia signaling; regulation and actions in cells and tissues. The 2nd Internaitonal Meeting of the German Society for Cell Biology on "Actin Dynamics". September 12-15, 2012, Regensburg, Germany.
 6. Narumiya, S.: Rho-mDia pathway in the cell, the tissue and the body. The 2012 Cold Spring Harbor Asia Conference on "Small GTPases at Different Scales: proteins, membranes, cells". September 24-28, Suzhou, China.
 7. Ishizaki, T : Liprin-alpha suppresses Rho-mDia mediated stress fiber formation. Cold Spring Harbor Asia meeting on Small GTPases at Different Scales: Proteins, Membranes, Cells. September 2012, Suzhou, China
 8. Dean, T, Watanabe, S., and Narumiya, S.: Roles of mDia in TCR signaling and its potential as a novel target for immunoregulation drugs. The 2nd International Conference in Medicine and Public Health, June 2013, Bangkok, Thailand
 9. Dean, T, Shinohara, R. and Narumiya, S.: Rho-mDia signaling in developing nervous system. The 84th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society, March 2011, Yokohama, Japan
 4. Dean T., et al. : Roles of mDia, a Rho effector and actin nucleator, in neuroepithelium integrity and neuroblast migration. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Cell Biology. March 2013, Kobe, Japan
 5. Dean T., et al. : Deficiency of mDia, an actin nucleator, disrupts integrity of neuroepithelium and causes periventricular dysplasia. Cancer Workshop for Young Scientists, September 2011, Nagano, Japan
 6. Dean T., et al. : Disruption of neuroepithelial integrity by mDia deficiency causes periventricular heterotopia and hydrocephalus. The 63th Annual Meeting of the Japanese Society for Cell Biology. June 2011, Sapporo, Japan
 7. Watanabe S., et al. : アクチン重合分子 mDia2 によるマウス発生期の赤芽球細胞質分裂の調節。第 65 回 細胞生物学会大会, 2013, 6. 21, 名古屋
 8. Watanabe S., et al. : Loss of a Rho-regulated actin nucleator, mDia2, impairs cytokinesis during fetal erythropoiesis. The 61th NIBB Conference. July 2013, Okazaki, Japan
 9. Watanabe S., et al. : 生体内における mDia の機能解析, 第 86 回 日本生化学会大会, September 2013, Yokohama, Japan
 10. Watanabe S., et al. : 配偶子形成および受精における Rho 標的タンパク質 mDia の役割, 第 59 回 日本実験動物学会総会, May 2012, Beppu, Japan
 11. Watanabe S., et al. : Citron-kinase mediates transition from constriction to abscission through its coiled-coil domain. 第 35 回 日本分子生物学会年会, December 2012, Fukuoka, Japan
 12. Watanabe S., et al. : Roles of mDia2, an actin nucleator, in embryonic development. 第 35 回 日本分子生物学会年会, December 2012, Fukuoka, Japan
 13. Deguchi, Y., et al. : A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in emotional changes induced by social isolation stress, Nauro 2013, June 2013, Kyoto, Japan
 14. Deguchi, Y., et al. : A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in elevated anxiety induced by social isolation stress in mice. 第 87 回 日本薬理学会年会
 15. Sakamoto, S., et al. : 配偶子形成および受精における Rho 標的タンパク質 mDia の役割, 日本実験動物科学・技術 九州 2012, May 2012, Beppu, Japan

学会発表 (15 件)

1. Dean T., et al. : Actin nucleator mDia1 and mDia3, cooperatively function in T cell receptor signaling-dependent T cell development in thymus. The 87th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. March 2014, Sendai, Japan
2. Dean T., et al. : Physiological roles of mDia, a Rho effector and actin nucleator, in mammals. The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemistry Society, September 2013, Yokohama, Japan
3. Dean T., et al. : Roles of mDia, a Rho effector and formin family actin-nucleator, in T cell development. The 86th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. March 2013, Fukuoka, Japan

〔図書〕(計 1 件)

Ishizaki T., Narumiya, S. Molecular Structures, Cellular Functions and Physiological Roles of Rho Effectors in Ras superfamily small G proteins: Biology and Mechanisms (Wittinghofer, A., ed.), Springer, in press

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成宮 周 (Narumiya, Shuh)

研究者番号：70144350

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：