

## 研究課題別評価

### 1. 研究課題名 細胞骨格の動的再構成による細胞形態と分化の制御

### 2. 研究者氏名 三木 裕明

グループメンバー 竹中 圭 (研究期間 H15.4.1. ~ H15.9.30.)

福岡 麻衣子 (研究期間 H13.4.1. ~ H14.5.31)

### 3. 研究の狙い：

WASP ファミリーは外界からの刺激に応じてアクチン細胞骨格を再構成する機能を持つ。本研究ではその生理的な重要性を調べるため、神経組織形成の最も基本的なプロセスである神経突起形成や線虫の初期発生期における WASP ファミリーおよびその関連因子の機能解析を行う。WASP ファミリーによる動的な細胞骨格再構成が、細胞の形態 分化の制御や形態形成など高次レベルの生命現象においてどのような役割を担っているのかを解明することを目指す。

### 4. 研究結果：

本研究は大きく分けて、(1) 神経細胞での解析、(2) 線虫での解析、の2つの研究計画から成っている。(1)の神経細胞での解析については、まず N-WASP が神経突起形成時に強くチロシンリン酸化されていることを見付けた。次に、このリン酸化が 253 番目のチロシン残基で起こっていること、そして神経発生に重要な役割を果たすことが知られている Src ファミリーのチロシンキナーゼが直接 N-WASP に結合してリン酸化することを確認した。このリン酸化が生化学的にどのような意味を持つのかを調べるため、N-WASP の持つアクチン重合誘導活性 (WASP ファミリー下流因子 Arp2/3 複合体の活性化能) に対する影響を調べた。その結果、チロシンリン酸化された N-WASP は強く活性化されていることが判明した。恒常的リン酸化型 非リン酸化型を mimic する変異体 (Y253E および Y253F) を神経細胞に強制発現すると、Y253E 変異体はそれだけで突起形成を誘導し、反対に Y253F 変異体は突起形成を阻害した。興味深いことにチロシンリン酸化されて活性化された N-WASP はユビキチン付加を受け、プロテアソームですみやかに蛋白分解されるが、神経突起形成が起こっている時にはこの分解機能が減弱しており N-WASP が活性化型のままで長時間に渡って保持されることが分かった。実際、プロテアソームの阻害剤を神経細胞培養系に加えると、それだけで神経突起形成が誘導された。つまり N-WASP のチロシンリン酸化による活性化と並行して、その分解を妨げることによって、N-WASP の活性を高く保持することが神経突起形成に重要なステップであることを意味している。

一方、(2)の線虫での解析については、RNAi 法によって N-WASP およびその標的因子である Arp2/3 複合体各サブユニットのノックダウン (遺伝子発現阻害) による解析を行った。興味深いことに、いずれの場合においても線虫は初期発生の段階で発生を止めて死んでしまった。このとき、線虫個体は「ventral enclosure」と呼ばれる、表皮細胞集団のシートが腹側で互いに閉じて接着し個体を形作るプロセスに異常があった。このプロセスで重要な遺伝子としては細胞同士の接着に関わるものなどがいくつか知られているが、N-WASP や Arp2/3 複合体のノックダウンがどのような異常を引き起こしているのかは不明だった。この原因を突き止めるため、AJM-1 という表皮細胞同士の接着面に局在する蛋白の GFP 融合型を発現する線虫を作製し、個々の表皮細胞の形態を生きたまま顕微鏡観察できる状態で RNAi 処理を行った。その結果、RNAi 処理を施した線虫

初期胚では表皮細胞シートが閉じるべき発生段階になっても、表皮細胞が(将来の)境界面に向かって運動することができず、そのまま腹側が開いた状態で発生を止めて死んでしまうことが判明した。またこの時表皮細胞の表皮としての細胞分化は正常に起こっており N-WASP や Arp2/3 複合体の機能が表皮細胞の運動に特異的に必須であることを明らかにした。

#### 5. 自己評価 :

N-WASP チロシンリン酸化の発見は世界で最初の報告であり、しかもそのアクチン重合活性の制御における重要性を明らかにできたことは非常に重要な研究成果と言える。従来 N-WASP は Cdc42 などの直接結合を受けて蛋白の立体構造が変化して活性化されることは知られていたが、リン酸化による活性制御はそれと異なる全く新たな活性制御メカニズムである。さらに、このリン酸化が本研究開始時の狙いとしていた神経突起形成時に強く誘導されており、突起形成に必須であることの発見も大きな意味がある。N-WASP は糸状仮足という細い突起状の構造形成に関わることを以前に突き止めていたが、それは数分単位で起こる現象である。一方、神経突起形成は数時間から数日かけて起こる現象であり、このような比較的長期間に渡る細胞形態変化においては N-WASP が全く新たなメカニズムで機能制御されているというのは非常に興味深い。リン酸化という共有結合による修飾によって活性を持続させることが神経突起形成には重要なのだろうと考えられる。これらの発見は N-WASP の神経突起形成における新たな機能制御メカニズムを明らかにしただけでなく、従来細胞形態制御との関連がよく解析されてきた Rho ファミリーの活性状態を調べるだけでは不十分な場合もあることを示唆しており、細胞形態・運動制御のより広い領域の研究にも強いインパクトを与えるものと考えられる。

一方、線虫での解析から N-WASP 相同分子やその下流で機能する Arp2/3 複合体が初期発生期の形態形成に重要であることを見付けた。その詳細な表現型の検討から、表皮細胞のシートが運動するプロセスに異常があり、その結果腹側で表皮が閉じられないことが分かった。この結果は、WASP ファミリーや Arp2/3 複合体が細胞運動制御に重要であることを明確に示す遺伝学的な証拠であり、これまで自分自身や国の内外を含め多くの研究者が行ってきた生化学的・細胞生物学的解析の成果を生物個体の中で初めて確認したものである。またそれと同時に、細胞の分裂や分化には大きな影響を与えなかったという点も重要な意味を持っている。つまり WASP ファミリーを分子標的とすることによって、細胞の増殖などには影響せず運動性のみを人為的に制御する可能性を示唆している。細胞運動が炎症反応、癌転移といった医学上重要な現象に関わることを考えると、その応用可能性は十分高いと考えられる。

#### 6. 研究総括の見解 :

細胞の分化と組織化(形態形成)の解明を細胞骨格の再構成とその制御に焦点を定めて追求してきた。特にアクチン骨格形成を対象として取りあげ、これに関連し分子機能の判明している WASP ファミリーを中心に注目すべき成果をあげるに至った。これを評価されて、最近助教授に昇進した。

#### 7. 主な論文等 :

##### 論文

1. Yamazaki, D., Suetsugu, S., Miki, H., Kataoka, Y., Nishikawa, S., Fujiwara, T., Yoshida, N., and Takenawa, T. WAVE2 is required for directed cell migration and cardiovascular development. *Nature* 424, 452-456 (2003)

2. Kitamura, Y., Tsuchiya, D., Takata, K., Shibagaki, K., Taniguchi, T., Smith, M. A., Perry, G., Miki, H., Takenawa, T., and Shimohama, S. Possible involvement of Wiskott-Aldrich syndrome protein family in aberrant neuronal sprouting in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 346, 149-152 (2003)
3. Kitamura, Y., Shibagaki, K., Takata, K., Tsuchiya, D., Taniguchi, T., Gebicke-Haerter, P. J., Miki, H., Takenawa, T., and Shimohama, S. Involvement of Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein (WAVE) and Rac1 in the phagocytosis of amyloid-beta(1 - 42) in rat microglia. *J. Pharmacol. Sci.* 92, 115-123 (2003)
4. Nakagawa, H., Miki, H., Nozumi, M., Takenawa, T., Miyamoto, S., Wehland, J., and Small, J. V. IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *J. Cell Sci.* 116, 2577-2583 (2003)
5. Sawa, M., Suetsugu, S., Sugimoto, A., Miki, H., Yamamoto, M., and Takenawa, T. Essential role of the *C. elegans* Arp2/3 complex in cell migration during ventral enclosure. *J. Cell Sci.* 116, 1505-1518 (2003)
6. Sun, P., Yamamoto, H., Suetsugu, S., Miki, H., Takenawa, T., and Endo, T. Small GTPase Rah/Rab34 is associated with membrane ruffles and macropinosomes and promotes macropinosome formation. *J. Biol. Chem.* 278, 4063-4071 (2003)
7. Klein, C., Nguyen, D., Liu, C. H., Mizoguchi, A., Bhan, A. K., Miki, H., Takenawa, T., Rosen, F. S., Alt, F. W., Mulligan, R. C., and Snapper, S. B. Gene therapy for Wiskott Aldrich Syndrome: rescue of T-cell signaling and amelioration of colitis upon transplantation of retrovirally transduced hematopoietic stem cells in mice. *Blood* 101, 2159-2166 (2003)
8. Nozumi, M., Nakagawa, H., Miki, H., Takenawa, T., and Miyamoto, S. Differential localization of WAVE isoforms in filopodia and lamellipodia of the neuronal growth cone. *J. Cell Sci.* 116, 239-246 (2003)
9. Abe, T., Kato, M., Miki, H., Takenawa, T., and Endo, T. Small GTPase Tc10 and its homologue RhoT induce N-WASP-mediated long process formation and neurite outgrowth. *J. Cell Sci.* 116, 155-168 (2003)
10. Suetsugu, S., Hattori, M., Miki, H., Tezuka, T., Yamamoto, T., Mikoshiba, K., and Takenawa, T. Sustained Activation of N-WASP through Phosphorylation Is Essential for Neurite Extension. *Dev. Cell* 3, 645-658 (2002)
11. Yamaguchi, H., Miki, H., and Takenawa, T. Two verprolin homology domains increase the Arp2/3 complex-mediated actin polymerization activities of N-WASP and WAVE1 C-terminal regions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 214-219 (2002)
12. Miki, H., and Takenawa, T. WAVE2 serves a functional partner of IRSp53 by regulating its interaction with Rac. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 93-99 (2002)
13. Yamaguchi, H., Miki, H., and Takenawa, T. Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein is involved in hepatocyte growth factor-induced migration, invasion, and tubulogenesis of epithelial cells. *Cancer Res.* 62, 2503-2509 (2002)
14. Suzuki, T., Mimuro, H., Suetsugu, S., Miki, H., Takenawa, T., and Sasakawa, C. Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) is the specific ligand for Shigella VirG among the WASP family and determines the host cell type allowing actin-based spreading. *Cell. Microbiol.*

- 4, 223-233 (2002)
15. Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. Spatial and temporal regulation of actin polymerization for cytoskeleton formation through Arp2/3 complex and WASP/WAVE proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 51, 113-122 (2002)
  16. Mizutani, K., Miki, H., He, H., Maruta, H., and Takenawa, T. Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res.* 62, 669-674 (2002)
  17. Kato, M., Miki, H., Kurita, S., Endo, T., Nakagawa, H., Miyamoto, S., and Takenawa, T. WICH, a novel verprolin homology domain-containing protein that functions cooperatively with N-WASP in actin-microspike formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 41-47 (2002)
  18. Vetterkind, S., Miki, H., Takenawa, T., Klawitz, I., Scheidtmann, K. H., and Preuss, U. The rat homologue of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-interacting protein (WIP) associates with actin filaments, recruits N-WASP from the nucleus, and mediates mobilization of actin from stress fibers in favor of filopodia formation. *J. Biol. Chem.* 277, 87-95 (2002)
  19. Suetsugu, S., Miki, H., Yamaguchi, H., Obinata, T., and Takenawa, T. Enhancement of branching efficiency by the actin filament-binding activity of N-WASP/WAVE2. *J. Cell Sci.* 114, 4533-4542 (2001)
  20. Shcherbina, A., Miki, H., Kenney, D. M., Rosen, F. S., Takenawa, T., and Remold-O'Donnell, E. WASP and N-WASP in human platelets differ in sensitivity to protease calpain. *Blood* 98, 2988-2991 (2001)
  21. Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. Identification of another Actin-related protein (Arp) 2/3 complex binding site in Neural-Aldrich syndrome protein (N-WASP), that complements actin polymerization induced by the Arp2/3 complex activating (VCA) domain of N-WASP. *J. Biol. Chem.* 276, 33175-33180 (2001)
  22. Suetsugu, S., Miki, H., Yamaguchi, H., and Takenawa, T. Requirement of the basic region of N-WASP/WAVE2 for actin-based motility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 739-744 (2001)
  23. Martinez-Quiles, N., Rohatgi, R., Anton, I. M., Medina, M., Saville, P., Miki, H., Yamaguchi, H., Takenawa, T., Hartwig, J. H., Geha, R. S., and Ramesh, N. WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nat. Cell Biol.* 3, 484-491 (2001)
  24. Nakagawa, H., Miki, H., Ito, M., Ohashi, K., Takenawa, T., and Miyamoto, S. N-WASP, WAVE and Mena different roles in the organization of actin cytoskeleton in lamellipodia. *J. Cell Sci.* 114, 1555-1565 (2001)
  25. Fukuoka, M., Suetsugu, S., Miki, H., Fukami, K., Endo, T., and Takenawa, T. A Novel Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) Binding Protein, WISH, Induces Arp2/3 Complex Activation Independent of Cdc42. *J. Cell Biol.* 152, 471-482 (2001)

#### 総解説

1. Miki, H., and Takenawa, T. Regulation of Actin Dynamics by WASP Family Proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* 134, 309-313 (2003)
2. Takenawa, T., and Miki, H. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid

rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J. Cell Sci.* 114, 1801-1809  
(2001)