

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:

Wnt シグナルによる神経細胞のネットワーク形成制御

### 2 研究者氏名:

三木 裕明

### 3 研究のねらい:

Wnt シグナルはショウジョウバエの形態形成を制御するシグナル伝達系として発見された。ヒトでも同様のシグナル系が進化的に保存されており、増殖や分化、また形態など様々な細胞機能を制御している。Wnt シグナルは Dishevelled などの細胞内シグナル伝達因子を経て伝えられるが、中でも最もよく解析されているのが beta-catenin という蛋白質を安定化して、細胞の増殖制御に関わる標的遺伝子の発現を誘導する経路である。この beta-catenin 安定化シグナル経路の異常な活性化が、ヒトにおける多くのがんの発生原因になっていることも知られており、強い注目を集めてきた。その一方で、Wnt シグナルが細胞の形態制御、特に神経細胞の軸索や樹状突起の伸展制御に重要であることも現象論レベルにおいて知られている。しかし、Wnt 刺激を受けた神経細胞がそのシグナルに対してどのように応答し、突起伸展を起こしているのかは殆ど未解明の状態に留まっている。本研究では、Wnt シグナルから神経細胞の突起伸展に至る未知のシグナル経路の究明を目指し、神経ネットワーク形成におけるその重要性の解明を目指した。

### 4 研究成果:

Dishevelled (Dvl) は Wnt シグナル伝達に必須の役割を果たすことが知られるアダプター蛋白質である。この Dvl を神経突起形成の分子メカニズム解析に汎用されている神経芽細胞腫 N1E-115 細胞に強制発現させたところ、非常に長い神経突起伸展を誘導することが分かった。海馬から採取した初代培養系の神経細胞に Dvl を発現させると、N1E-115 細胞と同様に神経突起の伸展を引き起こした。この海馬神経細胞の培養系においては、神経細胞が本来有している軸索と樹状突起という形態や機能の異なる 2 種類の突起構造が形成されている。Dvl の発現によって、これらの異なる突起のどちらが、もしくは両方が影響を受けているのか調べるため、Tau と MAP2 というマーカー蛋白質の局在を調べた。その結果、Dvl の発現によって影響を受けているのは樹状突起のみであり、軸索の本数や長さには全く影響しないことが分かった。これらの実験結果から Dvl が海馬神経細胞の樹状突起伸展を特異的に制御していることが分かった。

この分子メカニズムを明らかにするため、Dvl のどの部分が神経突起伸展に重要かを調べた。その結果、Dvl 蛋白質の中央部に位置する PDZ ドメインが突起伸展に必須であることが分かった。この部分に結合する蛋白質の探索などから、あるリン酸化酵素が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。実際、その酵素を海馬神経細胞で過剰発現すると樹状突起が退縮し、RNA 干渉によって抑制すると樹状突起の異常な伸展が引き起こされた。その一方で、軸索に対しては Dvl の場合と同様に全く影響は観察されなかった。これらの実験結果から、このリン酸化酵素が Dvl と拮抗的に作用することによって、神経細胞の樹状突起伸展を制御している可能性が強く示唆された。

上記の神経突起伸展制御の研究と並行して、Dvl に結合する蛋白質の網羅的スクリーニングを行った。その結果、細胞内で Dvl と結合する蛋白質の中で量的に最も多いものとして nucleoredoxin (NRX) という酸化還元状態の制御に関わるものを見つけた。培養細胞で NRX を過剰発現すると Dvl の機能が阻害され、Wnt シグナル伝達が抑制された。一方、RNA 干渉により NRX の発現抑制を行うと Wnt シグナルが活性化され、繊維芽細胞の増殖が誘導された。さらにカエル初期胚で NRX の発現抑制を行うと、頭部の形態形成がうまく起こらなくなり、目が消失した。カエル初期胚での正常な頭部形成には Wnt シグナルが重要であることは以前から知られており、これらの実験結果はいずれも NRX が Wnt シグナル伝達の抑制因子であることを意味している。NRX はもともと、細胞内の酸化還元状態に応じて機能する分子として発見されていたが、Dvl との

結合に関しても酸化還元制御を受けており、過酸化水素などの活性酸素種で処理すると NRX と Dvl の結合が阻害された。さらに、細胞を過酸化水素で刺激すると、Wnt シグナルの一過的な活性化が観察され、この応答に NRX が重要であることも確認した。

#### 5 自己評価:

本さきがけ研究では Wnt シグナルによる神経細胞のネットワーク形成における神経突起伸展制御のメカニズムを明らかにすることを目指していた。特に、分子レベルにおいてその基礎を成すと考えていた、微小管細胞骨格の安定性制御との関連性について調べることを大きな目標と考えていた。

まず特定のリン酸化酵素が Wnt 刺激による神経突起伸展に重要であり、それが微小管安定性と関連していることを見つけたことができた点は、このさきがけ研究のメインテーマと言える課題に直結するものであり十分な評価に値する。さらに培養細胞レベルだけでなく、海馬から採取した初代培養系の神経細胞を用いることによって、神経突起の中でも樹状突起という神経シグナルを受容する突起の伸展を特異的に制御していることを発見できた点は、当初の予想を超える成果だと考えている。その一方で、Wnt シグナルが樹状突起伸展を特異的に制御するという点は、海外のグループに先んじて報告されており、発見のプライオリティを取ることができなかった点は残念である。また、微小管の安定性自体がどのようにして起こっているのかについて、現象論を超えて追究することができず、その点で不十分な成果に終わってしまったと考えている。

一方、さきがけ研究で副次的に行うことを想定していた Dvl 結合蛋白質 NRX の解析は非常に順調に進展した。実際に過剰発現実験や発現抑制実験を行い、また培養細胞だけでなくカエル初期胚を実験材料として用いることによって、極めて厳密な意味で NRX が Wnt シグナル伝達の抑制因子であることを確立することができた。また、この分子機能に立脚して、Wnt シグナルが酸化還元制御を受けていることを発見できた点も十分な評価に値すると考えている。今後生物個体レベルでの重要性を解明することによって、これまでの研究成果を確認するとどまらず、新たな研究の展開が期待できる。

#### 6 研究総括の見解:

多くの研究者が集中する Wnt シグナル伝達系の研究において、神経突起のうち軸索ではなく樹状突起の伸長に特異的に Dvl の発現が関与していることを明らかにしたことは評価に値する。海馬神経細胞の樹状突起伸長制御において、Dvl と拮抗的に作用するリン酸化酵素との関係の詳細解明が待たれる。並行して進められている Dvl 結合タンパク質の探索で、NRX などを見出しているが樹状突起伸長制御への関与などの解明が必要である。研究成果の神経変性疾患の理解への展開が成果の意義を明らかにするはずである。

#### 7 主な論文等:

##### 原著論文

1. Funato, Y., Michiue, T., Asashima, M., and Miki, H. Nucleoredoxin, a thioredoxin-related redox-regulating protein, inhibits Wnt/beta-catenin signaling through Dishevelled. **Nat. Cell Biol.** 8, 501–508 (2006)
2. Oda, A., Miki, H., Wada, I., Yamaguchi, H., Yamazaki, D., Suetsugu, S., Nakajima, M., Nakayama, A., Okawa, K., Miyazaki, H., Matsuno, K., Ochs, H. D., Machesky, L. M, Fujita, H., and Takenawa, T. WAVE/Scars in Platelets. **Blood** 105, 3141–3148 (2005)
3. Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempiak, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., Segall, J., Eddy, R., Miki, H., Takenawa, T., and Condeelis, J. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. **J. Cell Biol.** 168, 441–452 (2005)
4. Kawamura, K., Takano, K., Suetsugu, S., Kurisu, S., Yamazaki, D., Miki, H., Takenawa, T., and Endo, T. N-WASP and WAVE2 acting downstream of phosphatidylinositol 3-kinase are

required for myogenic cell migration induced by hepatocyte growth factor. **J. Biol. Chem.** 279, 54862–54871 (2004)

5. Funato, Y., Terabayashi, T., Suenaga, N., Seiki, M., Takenawa, T., and Miki, H. IRSp53/Eps8 complex is important for positive regulation of Rac and cancer cell motility/invasiveness. **Cancer Res.** 64, 5237–5244 (2004)

他に論文 4 件(国際)、総説 2 件(国内)、口頭発表 5 件(国内 5 件)

特許出願:無し

受賞:無し

招待講演:無し