

平成17年度科学研究費補助金（学術創成研究費）研究進捗状況報告書

ふりがな		かいぶち こうぞう			所属研究機関 ・部局・職		名古屋大学・大学院医学系研究科・教授	
研究代表者氏名		貝淵 弘三						
研究課題名	和文	細胞の極性形成と遊走を制御する分子機構の解明						
	英文	Molecular mechanism underlying cell polarity and cell migration						
研究経費 (直接経費) <small>18年度以降は内約額 単位：千円</small>	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計		
	63,000	64,600	60,000	60,000	60,000	307,600		
研究組織（研究代表者及び研究分担者）								
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）					
貝淵 弘三	名古屋大学・大学院医学系研究科・教授	生物化学 分子生物学	研究総括、細胞の極性形成を制御する細胞外シグナルの同定とシグナル伝達、小胞輸送の解析					
天野 睦紀	名古屋大学・大学院医学系研究科・講師	細胞生物学 生物化学	小胞輸送と極性形成および遊走の関係、微小管ダイナミクスの解析					
黒田 真也	東京大学・大学院情報理工系研究科・特任助教授（科学技術振興特任教員、常勤形態）	情報科学 生物化学	コンピューターシミュレーションを用いたシグナル伝達ネットワークの解析					
当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）								
<p>生体を構成する種々の細胞はその固有の機能を発揮するために極性を獲得する。例えば、炎症細胞や線維芽細胞、内皮細胞などは種々の外界シグナルに応答して遊走するが、外界シグナルの濃度勾配に対してアクチン細胞骨格や微小管を再構築して leading edge を形成し極性化する。また、神経細胞も樹状突起から信号を入力して軸索から信号を出力するという極性を有している。軸索も樹状突起も分化の過程で共通の未成熟な突起から形成されることが知られている。しかし、こういった極性化の分子機構は現時点ではほとんど理解されていない。</p> <p>本研究では炎症細胞や線維芽細胞、内皮細胞、神経細胞の細胞極性を制御する細胞外シグナルやその伝達メカニズムを明らかにする。また、Rhoファミリーを中心としたシグナルによる微小管のダイナミクスや小胞輸送の制御機構を明らかにする。さらに、コンピューターシミュレーションを用いたシグナル伝達ネットワークの解析を行い、細胞の極性形成と細胞遊走の制御の分子機構を統合的に理解することを試みる。最近、動脈硬化や腎炎の発症にマクロファージなどの炎症細胞の遊走が大きく関与することが明らかになってきた。本研究で得られる知見を基に、細胞遊走を標的とした治療薬の開発も試みる。</p>								

これまでの研究経過

本研究は、学術創成研究費の趣旨の3つの観点のうち、どの観点到に主眼を置いて研究を行っているかについてお書きください。

(1) 創造的・革新的・学際的学問領域を創成する研究

研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、研究組織内の連携状況を含め、具体的に記入してください。

1) 細胞の極性形成を制御する細胞外シグナルの同定とシグナル伝達の解析

生体内において、細胞極性は成長因子や細胞外基質（接着因子）などの細胞外因子により形成・制御されると考えられている。細胞外基質ラミニンは神経突起の伸長に関与することが知られている。本研究では、ラミニンでコートしたビーズを、海馬初代培養細胞の未成熟な神経突起に付着させる系を確立し、PI3-キナーゼの産生物PIP₃の産生を時間・空間的に観察した。その結果、ラミニンの付着した領域で局所的なPIP₃の産生と急速な突起の伸長を認め、その後伸長した突起が軸索に分化することを明らかにした(Ménagerら *J. Neurochem.* 2004)。我々は既に、成長しつつある軸索の遠位側にCRMP-2が濃縮し、CRMP-2の過剰発現により神経軸索が複数本形成されることを報告し、CRMP-2が神経細胞の軸索・樹状突起の運命決定に重要な役割を果たすことを提唱している(稲垣ら *Nature Neurosci.* 2001)。我々は、GSK-3βがCRMP-2をリン酸化しCRMP-2を不活性化すること(チューブリン結合能が失われる)ことを明らかにした(吉村ら *Cell* 2005)。さらに、PIP₃の下流でAktが活性化され、GSK-3βがAktによってリン酸化され不活性化すること、その結果、非リン酸化型のCRMP-2が神経突起の先端で増加して突起の伸長を促し、軸索を形成するメカニズムを見出した。

一方、極性関連分子Par-3がキネシンファミリーのKIF3Aに直接結合することを見出した。Par-3がKIF3Aによって未成熟な神経突起の先端に輸送され、神経細胞の極性を制御することも明らかにした(西村ら *Nature Cell Biol.* 2004)。これまでPar-3の下流のシグナル伝達経路については不明であったが、Par-3がRacGEFであるSTEFと直接結合して、Rac1を活性化することも見出した(西村ら *Nature Cell Biol.* 2005)。Par-3は神経突起の先端でSTEFを介してRac1の活性を調節して、神経細胞の極性を制御していると考えている。

2) 微小管ダイナミクスの解析

CRMP-2はチューブリンヘテロダイマーと複合体を形成し、微小管の重合を促進する(深田ら *Nature Cell Biol.* 2002)。我々はCRMP-2がチューブリンヘテロダイマーとキネシン-1を直接連結させるリンカーとして働くことを見出した。さらに、CRMP-2・チューブリン複合体が、キネシン-1によって選択的に軸索に運ばれることを明らかにした(木村ら *J. Neurochem.* 2005)。

遊走する細胞のleading edgeでは、微小管が局所的に安定化され細胞の極性化に寄与する。我々は以前、leading edgeでRac1とCdc42が活性化され、その標的分子IQGAP1を介してCLIP-170(微小管のプラス端に局在する+TIPsの一員)を細胞表層で捕捉することを明らかにしている(深田ら *Cell* 2002)。最近、我々はAPC(adenomatous polyposis coli)が直接IQGAP1に結合してアクチンフィラメント上にアンカーすることを明らかにした。さらに、線維芽細胞の遊走時、IQGAP1/APC複合体が、CLIP-170を細胞表層で捕捉し、leading edgeで微小管を安定化して、MTOC(microtubules organizing center)の再配置を促し、細胞の極性化を制御することを見出した(渡辺ら *Dev. Cell* 2004)。

3) 小胞輸送と極性形成および遊走の関係

Rhoファミリーはendocytosis/exocytosisに関与することが示唆されているが、その分子メカニズムは不明な点が多い。我々は、活性型のRhoがRho-キナーゼを介してEGFレセプターのendocytosisを阻害することを見出した。また、Rho-キナーゼの基質蛋白質としてendophilin A1を同定した。endophilin A1はEGFシグナルの下流でCIN85と結合し、endocytosisを制御していると考えられている。Rho-キナーゼによるendophilin A1のリン酸化はこのCIN85との結合を阻害することを明らかにした(投稿中)。一方、CRMP-2による軸索伸長の制御機構を解析する中で、CRMP-2がNumbを介して接着分子L1のendocytosisを制御することを明らかにした(西村ら *Nature Cell Biol.* 2003)。CRMP-2は微小管の重合を促進するだけでなく、接着分子のリサイクリングを介して、極性形成を制御すると考えられる。

4) 細胞遊走を抑制する薬剤の開発

我々はすでにRho-キナーゼの阻害剤がマクロファージや平滑筋細胞の遊走を阻害して、動脈硬化を抑制することを報告している(宮田ら *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000)。本年度、我々はRacやCdc42がほぼすべての細胞の遊走に必要な不可欠であることを見出した(中山ら *Genes Cells* 2005)。一方、Rho-キナーゼの阻害剤はマクロファージや平滑筋の遊走を特異的に阻害することが明らかになった。しかも、Rho-キナーゼの阻害剤は平滑筋細胞のポイデンチャンパーにおける3次元的な遊走は阻害するが、wound healingなどの2次元的な遊走は阻害しないことが判明した。

5) コンピューターシミュレーションを用いたシグナル伝達ネットワークの解析

上記の結果に基づいて、分担研究者の黒田らと共同で、Cdc42/Par-6/Par-3/aPKC/STEF、Rac、PI3-キナーゼ、PTEN、Rho/Rho-キナーゼなどの分子を用いた極性形成機構に関するシミュレーションモデルを作製しつつある。

その他

特記事項

（これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入するとともに、推薦者の期待がどの程度達成されつつあるかについて記入してください。）

1) 神経細胞は、通常一本の軸索と複数の樹状突起を有する高度に極性化した細胞である。樹状突起はシグナルを受容し、軸索は伝達する。このように方向性を持った情報の流れが神経細胞としての機能を成立させている。しかしながら、この神経細胞の極性形成機構は長らく不明であった。我々は、CRMP-2 が神経細胞の極性形成に重要な役割を果たすことを見出し、この分子を中心に神経細胞の極性形成の制御機構の解明に取り組んできた。本研究の過程で、1) ラミニンなどの細胞外基質が未成熟な神経突起に接触すると、局所的にPIP₃が産生されて急速な突起の伸長を促し、その後伸長した突起が軸索に分化すること、2) PIP₃がAktを介してGSK-3βを制御すること、3) CRMP-2 がGSK-3βによってリン酸化され、不活性化されることを明らかにした。これら一連の成果は、未だ世界で明らかにされていない神経細胞の極性形成機構の解明に向けて大きな進展をもたらしたものと国際的に高く評価されている(ScienceのPerceptiveやNature Neurosci.のNews & Viewsで紹介された)。また、リン酸化型CRMP-2 がアルツハイマー患者の脳皮質で増加しており、病態と密接に関連していることが知られている。そのリン酸化メカニズムが明らかになったことが、国内外のメディアによって広く紹介された(朝日新聞、中日新聞、The Scientist、The Alzheimer Research Forum)。

2) 神経細胞の軸索、樹状突起の機能的差異を保持する機構として軸索特異的輸送システムが考えられる。よく知られた輸送システムとしてキネシンファミリーによる微小管上での輸送が挙げられる。これらのモーター分子は神経軸索の伸長、形態維持に必要な分子の輸送をするが、多種多様な輸送分子(積み荷)がどのようにして種類の限られたモーターへ結合しているか不明な点が多い。我々は、CRMP-2 がチューブリンヘテロダイマーとキネシン-1 との結合を仲介する“積み荷分子の受容体”であることを見出した。この結果は、神経軸索に濃縮する細胞質タンパク質の輸送機構を初めて解明すると同時に、軸索輸送モーターと輸送される分子(積み荷)の選択的結合様式を明らかにし、多種多様な分子が単一のモーター分子に結合するメカニズムを理解する上で新規のコンセプトを提唱するものである。また、微小管ダイナミクスが、チューブリンの輸送レベルでもCRMP-2によって制御されることを示唆している。

3) 上皮細胞などの細胞で、Par-3/Par-6/aPKC 複合体が細胞極性に関与していると報告されている。我々は、Par-3 がKIF3によって未成熟な神経突起の先端に輸送され、神経細胞の極性を制御することを明らかにした。さらに、PI3-キナーゼの下流で、Cdc42とPar-3/Par-6/aPKC複合体がRacGEFであるSTEFを介してRac1を活性化することを見出した。この発見はこれまで解明されていなかったCdc42からRac1へのシグナル伝達機構を明らかにした。非神経細胞にも共通の極性制御機構が存在することが考えられ、学術的に非常に重要な発見である(Nature Cell Biol.やNature Neurosci.のNews & Viewsで紹介された)。

4) 癌抑制遺伝子であるAPCは大腸癌の原因遺伝子とされており、C末端の欠落(truncated APC)がポリープの形成を引き起こすと推定されている。この過程において、truncated APCはドミナントネガティブ様式に極性を有した細胞運動を阻害すると推測されていたが、どのようにしてtruncated APCが極性形成・運動を抑制するのか不明であった。我々は、IQGAP1がAPCのN末端側に存在するアルマジロリピートに結合することを見出した。さらに、truncated APCの発現により、IQGAP1がleading edgeから脱局在し、MTOCの極性化や細胞運動を抑制することを見出した。これらの知見は、大腸癌に見られるtruncated APCがIQGAP1の機能阻害を介して、細胞極性形成・運動を阻害しポリープの形成を助長する可能性を示唆している。APCがどのようにして細胞極性形成・細胞運動に寄与するか、truncated APCはどのようにして大腸癌を引き起こすのか不明であったが、我々はその一端を明らかにした。これらの発見は、学術的かつ臨床的にも注目に値する発見である(Dev. CellのPreviewで紹介された)。

5) 上記の様な独自の解析、発見に基づきシグナル伝達のシミュレーションモデルを現在作成中である。細胞極性形成の全貌を理解するためには、それらの分子を総体的に捉え、システムとして理解することが必要である。しかし、システムとして理解を試みるとき、システムの各要素の同定と機能解析は欠かすことができない。我々は極性分子の同定とその相互作用を詳細に検討し、それらの分子についてネットワークシステムを構成する要素としてデータ収集を行っている。そして、これらのデータを基にシグナル伝達のシミュレーションを行うことにより、システムレベルでの生命理解の先端的な研究を成し遂げることができると考えている。

以上のように、推薦者の期待はほぼ達成されていると考えている。

研究成果の発表状況

(この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号) 最初と最後のページ、発表年(西暦) 及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

論文

1. Kimura, T., Arimura, N., Fukata, Y., Watanabe, H., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1. *J. Neurochem.* 93,1371-1382(2005)
2. Watanabe, T., Noritake, J., and Kaibuchi, K. Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol.* **15**, 76-83 (2005)
3. Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., and Kaibuchi, K. GSK-3 β regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* **120**, 137-149 (2005)
4. Nishimura, T., Yamaguchi, T., Kato, K., Yoshizawa, M., Nabeshima, Y. I., Ohno, S., Hoshino, M., and Kaibuchi, K. PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat Cell Biol.* **7**, 270-277 (2005)
5. Nakayama, M., Amano, M., Katsumi, A., Kaneko, T., Kawabata, S., Takefuji, M., and Kaibuchi, K. Rho-kinase and myosin II activities are required for cell type and environment specific migration. *Genes Cells* **10**, 107-117 (2005)
6. Watanabe, T., Wang, S., Noritake, J., Sato, K., Fukata, M., Takefuji, M., Nakagawa, M., Izumi, N., Akiyama, T., and Kaibuchi, K. Interaction with IQGAP1 Links APC to Rac1, Cdc42, and Actin Filaments during Cell Polarization and Migration. *Dev. Cell* **7**, 871-883 (2004)
7. Noritake, J., Fukata, M., Sato, K., Nakagawa, M., Watanabe, T., Izumi, N., Wang, S., Fukata, Y., and Kaibuchi, K. Positive Role of IQGAP1, an Effector of Rac1, in Actin-Meshwork Formation at Sites of Cell-Cell Contact. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1065-1076 (2004)
8. Nishimura, T., Kato, K., Yamaguchi, T., Fukata, Y., Ohno, S., and Kaibuchi, K. Role of the PAR-3-KIF3 complex in the establishment of neuronal polarity. *Nat. Cell Biol.* **6**, 328-334 (2004)
9. Menager, C., Arimura, N., Fukata, Y., and Kaibuchi, K. PIP₃ is involved in neuronal polarization and axon formation. *J. Neurochem.* **89**, 109-118 (2004)
10. Kawabata, S., Usukura, J., Morone, N., Ito, M., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K., and Amano, M. Interaction of Rho-kinase with myosin II at stress fibers. *Genes Cells* **9**, 653-660 (2004)
11. Nishimura, T., Fukata, Y., Kato, K., Yamaguchi, T., Matsuura, Y., Kamiguchi, H., and Kaibuchi, K. CRMP-2 regulates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth. *Nat. Cell Biol.* **5**, 819-826 (2003)

国際会議・学会発表 (招待講演のみ)

- 「Signaling for Neuronal Polarity」
Keystone Symposia (D3) ソルトレイク・アメリカ 2005年4月9-14日
- 「Neuronal Polarity and Cytoskeletons」
Keystone Symposia (X2) アイダホ・アメリカ 2005年3月4-8日
- 「Roles of Rho Family GTPases in Regulation of Cell Migration and Polarity」
The 2005 Miami Nature Biotechnology Winter Symposium マイアミ・アメリカ 2005年2月5-9日
- 「Microtubule dynamics in cell migration」
Signalling network in cell shape and motility, Novartis symposium
バイオポリス・シンガポール 2004年8月31日-9月2日
- 「Roles of Rho family GTPases in cell polarization and directional migration」
13th International Vasucular Biology Meeting トロント・カナダ 2004年6月1-5日
- 「Roles of the Rho family GTPases and CRMP-2 in cell polarity」
VI Taller Argentino de Neurociencias コルドバ・アルゼンチン 2004年4月1-5日
- 「Roles of Rho family GTPases in cell polarization and directional migration」
43rd The American Society for Cell Biology サンフランシスコ・アメリカ 2003年12月13-17日
- 「Regulation of phosphorylation of myosin light chain by Rho」
19th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology
モントリオール・カナダ 2003年10月8-11日
- 「Capturing mechanism of microtubule plus ends during cell migration」
2003 Gordon Research Conference on Motile & Contractile Systems
ニューロンドン・アメリカ 2003年6月29日-7月4日