

個体での組織構築・恒常性における Rho-mDia 経路の役割

Dissection of Rho-mDia pathway-mediated mechanisms of tissue organization and homeostasis

成宮 周 (NARUMIYA SHUH)

京都大学・大学院医学研究科・特任教授



研究の概要

アクチン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が、これが個体でどう機能しているかは不明な点が多い。本研究では、Rho の下流でアクチン重合因子として働いている mDia を対象として遺伝子欠損マウスや RNAi を用い個体での働きの解明を目指している。これまでの解析で、この分子が神経幹細胞や軸索ガイダンスの制御を介して脳の組織構築と機能発現に関係することが明らかになった。

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：細胞医化学

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、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、これらの解析は、多くが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る。

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するものである。

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、さらに、DMBA/TPA 投与による皮膚発ガンモデルや色素異常などの皮膚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 を併用するほか、これら KO マウスが Cre-LoxP で作られている利点を生かして、適宜、場所時期特異的な KO を作成しメカニズムの特定を図る。

4. これまでの成果

1. 神経系の組織構築と恒常性での mDia の役割

① 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 (apical basal 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り、これによる脳室閉鎖と水頭症の発症が見られた。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 6)。

② 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 4)。

③ 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 の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 (論文 revision 中)。

2. 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。今回、mDia の DID-DD domain に結合する蛋白質として Liprin- α を同定し、Liprin- α 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を見出した (発表論文 3 と 5)。これに加え、張力解除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アクチンモノマーの局所濃度増加によることを明らかにした (発表論文 1)。

3. mDia と並ぶ Rho エフェクターである ROCK-I と ROCK-II のヘテロ・ホモマウスで卵黄囊の血管形成が障害されることを見出し、ROCK が血管形成で不可欠なことを明

らかにした (発表論文 7)。

4. Citron-K は細胞分裂での Rho エフェクターの一つであるが、この分子の正確な働きは不明であった。今回、RNAi と rescue 実験により Citron-K が細胞質分裂と分裂細胞の細胞間橋の切断を繋ぐ分子であることを明らかにした (発表論文 2)。

5. 今後の計画

既に、mDia2 欠損マウスでいくつかの細胞系列で細胞質分裂が異常となり胎生致死になること、mDia1/3DKO マウスで胸腺 T リンパ球の発生異常があること、神経終末機能変化によってシナプス伝達が亢進すること、mDia1 欠損マウスでの DMBA/TPA による皮膚がん発生が減弱すること、mDia1/3 DKO マウスで毛色異常があること、などを見出し、解析中である。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. 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.* in press
2. 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.*, in press
3. Sakamoto S, Narumiya S, Ishizaki T. A new role of multi scaffold protein Liprin- α : Liprin- α suppresses Rho-mDia mediated stress fiber formation. *Bioarchitecture* 2(2): 43-49. 2012
4. 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
5. Sakamoto S, Ishizaki T, Okawa K, Watanabe S, Arakawa T, Watanabe N, Narumiya S. Liprin- α controls stress fiber formation by binding to mDia and regulating its membrane localization. *J Cell Sci.* 125(1):108-120. 2012
6. 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
7. 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