

科学研究費補助金（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成 18 年度採択分

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究課題名（和文） Rho GTPases を介する細胞機能の時空間的制御と
個体での役割

研究課題名（英文） Spatiotemporal control of cell functions by Rho
GTPases; mechanisms and physiological roles

研究代表者

成宮 周 (NARUMIYA SHUH)

京都大学・大学院医学研究科・教授



研究の概要：本研究は、アクチン、微小管などの細胞骨格を制御している Rho シグナルの個々の細胞機能での働きと個体での役割を解明することを目的とする。これまで、細胞移動、細胞質分裂、細胞周期の G2/M 進行での役割と経路を明らかにし、個体での免疫細胞移動での役割を見いだした。加えて、脳神経系構築やがん化過程への関与も明らかにしつつある。

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：Rho GTPase, mDia, ROCK, アクチン、細胞移動、細胞分裂、細胞接着、免疫、がん、神経、遺伝子欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

Rho GTPases は、低分子量 G 蛋白質の一種で Rho, Rac, Cdc42 などがあり、アクチンと微小管の動態を制御して細胞の形態、運動、接着を調節している。これまでの代表者の研究で、アクチン重合を司る mDia やミオシンを活性化してこれを束ねる ROCK などのエフェクター蛋白質が単離され、Rho 蛋白質からアクチンに至る基本経路は明らかにされたが、これが各々の細胞機能の発現でどのように働くか、個体の発生、発達、生理、病態でどのように働いているかには、不明な点が多い。

2. 研究の目的

Rho のシグナル経路によって誘導される細胞骨格とこれによって引き起こされる新たなシグナル伝達を解析し、細胞の機能発現に必要な細胞シグナルの時空間特異的制御の機構を明らかにする。また、これら Rho GTPases の細胞での機能を伝達する mDia, ROCK などの各種エフェクター蛋白質の欠損マウスを用い、Rho を介する経路がどのように個体の形成と生理機能の発現に働いているか、さらに、これらの経路の異常が、がんなどの病態でどのように関与するかを明らかにする。

3. 研究の方法

① 培養細胞を用い、細胞周期進行、形態形成、移動などの過程における Rho シグナル経路の関与と作用発現機構を Rho GTPases や各種エフェクターの RNAi などを用いて明らか

にする。また、分子的理解を助けるため、ここに関与する新規蛋白質をエフェクター蛋白質との相互作用により明らかにする。

② mDia や ROCK などの Rho エフェクター蛋白質の遺伝子欠損マウスを作出し、各々の個体発生と個体生理での役割を検討するとともに、これらのがん化などの病態に供し、各々の病的過程での働きを明らかにする。

4. これまでの成果

① Rho GTPases の細胞周期進行での役割。Rho GTPases が中心体での Aurora kinase A の活性化を行って G2/M 期進行に働いていること、細胞質分裂の際、mDia isoform のうち mDia2 が特異的に分裂溝に集積し、そこでのアクチン形成と生じたアクトミオシンからなる収縮環の維持に働き、正常の分裂遂行に働いていること（図 1）を明らかにした。

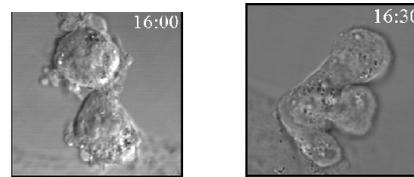


図 1. 正常細胞では、真ん中が収縮環でくびれて分裂する（左図）が、mDia2 枯渇細胞は異常収縮を起こし、分裂に失敗する（右図）。

② mDia アイソフォームの細胞での動態を解析し、mDia2 が importin- α/β と CRM1 を用いる核輸送系により特異的に核と細胞質を行き来していることを明らかにした。

③ 細胞の移動は、個体発生のみならず、免疫反応やがんの転移浸潤などで重要である。この過程における Rho シグナリングの役割

〔4. これまでの成果 (続き)〕

をグリオ-マ細胞を用いて検討し、Rho-mDia1 経路が細胞の移動と方向性を決めること、その機構の一つとして、この経路が Src を細胞接着斑に集積し、接着斑のターンオーバーを促進することを明らかにした。

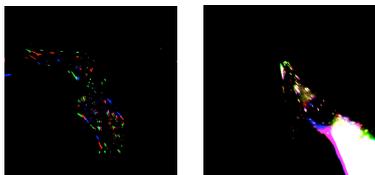
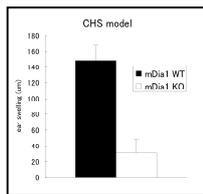


図2. 接着斑の回転を時間毎に見たもの(1h, 緑; 2h, 赤; 3h, 青)。左の対照細胞では時間毎に置き換わるが、右の mDia1 枯渇細胞では、同じ場所に留まっている。

④ mDia isoform のアミノ末端を用いた pull-down 法により、新規の mDia 結合蛋白質として Liprin を見いだした。また、Liprin の mDia 結合ドメインの発現により Rho-mDia 依存性のアクチン線維が減弱すること、反対に、Liprin を RNAi で枯渇すると、アクチン線維の増強が起こることを見いだした。Liprin は神経可塑性に関係する蛋白質で、現在、神経細胞でのこの機構の働きを検討中である。

⑤ mDia1, mDia2, mDia3 の各々の遺伝子を欠損する conditional KO マウスを作出した。このうち、mDia1 と mDia3 の全身性欠損を行い、これがマウスの発生、発達に見かけ上、異常を来さないことを見いだした。次いで、mDia1 欠損マウスで T リンパ球の末梢リンパ臓器へ移動不全を見だし、これが、mDia1 欠損 T 細胞が遊走刺激に対して正常なアクチン産生と極性を呈さないためであることを明らかにした。このため、このマウスは免疫不全を呈する。

図3. mDia1 欠損マウスで免疫反応の減弱。接触性皮膚炎を、野生型 (WT) と mDia1 欠損マウス (mDia1 KO) に施行し、耳介厚で炎症反応を見たもの。



⑥ 上記 mDia1 欠損マウスを用い、v-Src や Ras などのがん遺伝子によるがん化過程への Rho シグナルの関与とメカニズムを検討している。また、mDia1/3 の二重欠損マウスを作出し、見られた脳神経系の表現型の同定とこれから想定される Rho シグナルの神経系構築での働きを検討している。

5. 今後の計画

1. がん化における Rho シグナル経路の役割の解明: ノックアウト・マウスを化学的皮膚発ガンに供したり、腭がんを自然発症する変異マウスと掛け合わせることにより、がん化での Rho シグナルの関与とメカニズムを明らかにする。これにより、ヒトのがんで見られる

遺伝子発現の意義を明らかにする。

2. 脳での神経前駆細胞の移動や軸索のガイダンスにおける Rho シグナルの働きを解明し、脳神経系構築のメカニズムの一端を明らかにする。また、Rho シグナルの神経可塑性への関与を欠損マウスで検討し、記憶や心的外傷形成などとの関わりを検討する。

3. mDia1/3 の二重欠損マウスで明らかになった細胞内アクチン重合機構の重複メカニズムの解明に努める。

6. これまでの発表論文等 (受章等も含む) (研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

〔雑誌論文〕 (これまで計 58 件)

1. Yamana, N., Arakawa, Y., Nishino, T., Kurokawa, K., Tanji, M., Monypenny, J., Ishizaki, T., Bito, H., Nozaki, K., Hashimoto, N., Matsuda, M. & **Narumiya, S.** (2006) Rho-mDia1 Pathway Regulates Cell Polarity and Focal Adhesion Turnover in Migrating Cells Through Mobilizing APC and c-Src. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 6844-6858.
2. Ando, Y., Yasuda, S., Ocegüera-Yanez F. & **Narumiya, S.** (2007) Inactivation of Rho GTPases with Clostridium difficile Toxin B Impairs Centrosomal Activation of Aurora-A in G2/M Transition of HeLa Cells. *Mol Biol Cell*, **18**, 3752-3763.
3. Sakata, D., Taniguchi, H., Yasuda, S., Adachi-Morishima, A., Hamazaki, Y., Nakayama, R., Miki, T., Minato, N. & **Narumiya, S.** (2007) Impaired T lymphocyte trafficking in mice deficient in an actin-nucleating protein, mDia1. *J. Exp. Med.*, **204**, 2031-2038.
4. Watanabe, S., Ando, Y., Yasuda, S., Hosoya, H., Watanabe, N., Ishizaki, T. & **Narumiya, S.** (2008) mDia2 induces the actin scaffold for the contractile ring and stabilizes its position during cytokinesis in NIH 3T3 cells. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 2328-2338.
5. Miki, T., Okawa, K., Sekimoto, T., Yoneda, Y., Watanabe, S., Ishizaki, T. & **Narumiya, S.** (2009) mDia2 shuttles between the nucleus and the cytoplasm through the importin- α/β - and CRM1-mediated nuclear transport mechanism. *J. Biol. Chem.*, **284**, 5753-5762.

〔学会発表〕 (これまで計106件)

〔受章〕

学士院賞・恩賜賞 平成18年

The Ulysses Medal, The University College Dublin, May, 2008

ホームページ等

<http://www5.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/J/index.html>