

Wnt シグナルによる神経細胞のネットワーク形成制御

三木 裕明

1. 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。

2. 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。

3. 今後の展開

海馬神経細胞の初代培養系を用いて、Wnt シグナルが Dvl を介して樹状突起の伸展を特異的に制御していることを明らかにした。またその分子メカニズムとして、微小管の安定性を制御するあるリン酸化酵素が重要であることも発見した。現在、Wnt シグナルがその酵素の働きをどのようにして調節しているのか、またその酵素がどのようにして樹状突起伸展を制御しているのか解析している。樹状突起は神経細胞が神経シグナルを受け取る入り口であり、神経ネットワーク形成に必須の突起構造であることが知られる。神経発生期に見られるダイナミックな樹状突起伸展や、老化・疾病に伴う樹状突起の異常な退縮などにおいて、この Wnt シグナルによる伸展制御メカニズムがどのような役割を果たしているのか、今後解析してゆきたい。

Dvl に細胞内で結合する主要な蛋白質として新たに NRX を見つけた。過剰発現実験および発現抑制実験の結果や、培養細胞およびカエル初期胚を用いた実験の結果、NRX が Wnt シグナルを抑制する働きを持つことを確立することができた。しかし、この Wnt シグナル抑制因子としての働きが生物個体レベルでいかなる重要性を担っているのか全く不明である。さらに NRX の機能が酸化還元制御を受けていることを見つけているが、これが個体レベルで意味のある現象なのかも現在のところ不明である。これらの点を究明してゆくため NRX 遺伝子ノックアウトマウスを作製中であり、今後 NRX による Wnt シグナル制御のよりマクロなレベルでの重要性について解析を進めてゆきたい。

4. 研究成果リスト

原著論文

1. Verma, S., Shewan, A. M., Scott, J. A., Helwani, F. M., den Elzen, N. R., Miki, H., Takenawa, T., and Yap, A. S. Arp2/3 activity is necessary for efficient formation of E-cadherin adhesive contacts. *J. Biol. Chem.* 279, 34062–34070 (2004)
2. Takenaka, K., Nakagawa, H., Miyamoto, S., and Miki, H. The pre-mRNA splicing factor SF3a66 functions as a microtubule binding and bundling protein. *Biochem. J.* 382, 223–230 (2004)
3. 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)
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. 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)
6. Bierne, H., Miki, H., Innocenti, M., Scita, G., Gertler, F. B., Takenawa, T., and Cossart, P. WASP-related proteins, Abi1 and Ena/VASP are required for Listeria invasion induced by the Met receptor. *J. Cell Sci.* 118, 1537–1547. (2005)
7. 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)
8. Funato, Y., Michiue, T., Asashima, M., and Miki, H. Nucleoredoxin, a thioredoxin-related redox-regulating protein, inhibits Wnt/b-catenin signaling through Dishevelled. *Nat. Cell Biol.* 8, 501–508 (2006)
9. Kise, Y., Takenaka, K., Tezuka, T., Yamamoto, T., and Miki, H. Fused kinase is stabilized by Cdc37/Hsp90 and enhances Gli protein levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (in press)