

受賞者

南 康博

神戸大学大学院医学系研究科生理学 細胞生物学講座細胞生理学分野

研究テーマ

Ror2受容体型チロシンキナーゼを介するnon-canonical Wntシグナル伝達におけるアクチン結合タンパク質 filamin Aの機能解析

1. はじめに

Rorファミリー受容体型チロシンキナーゼは種を超えて構造が良く保存されており、哺乳動物ではRor1, Ror2の2つのメンバーから構成される1)。我々はRor2受容体型チロシンキナーゼはマウス発生過程において、主に移動能の高い神経堤細胞や体幹の間葉系細胞に強い発現が認められ、またRor2遺伝子ノックアウトマウス（以下、Ror2変異マウス）では神経堤細胞、間葉系細胞等より形成される顔面、中軸骨格・附属肢の低形成や心室中隔欠損などの心奇形が認められることを見いだした2-4)。Ror2変異マウスの表現型は、Wnt5a変異マウスの表現型と類似しており、いずれもnon-canonical Wntシグナル伝達の異常に起因すると考えられる原腸陥入時の収斂伸長運動 [convergent extension (CE) movements]や平面内細胞極性 [planar cell polarity (PCP)] 経路の異常を呈する5)。実際、我々はRor2受容体型チロシンキナーゼがWnt5aの受容体（または共受容体）として機能し、Wnt5a/JNK経路を活性化するとともに、Ror2がアクチン結合タンパク質filamin Aと物理的機能的に共役し、Wnt5aによる細胞移動において必須の役割を担うことを明らかにした6), 7)。本研究では、Wnt5aによる極性を持った細胞移動におけるRor2の役割を、特にRor2とRor2と共役するfilamin Aに焦点を当てて、その分子機構の解明を目標とした。

2. 方法

細胞は細胞外からの様々な刺激に応答して、アクチンや微小管などの細胞骨格の再編成を行い、移動方向前後で極性を獲得し、方向性（極性）をもった細胞移動を行うことが知られている。本研究においては、主に線維芽細胞株であるNIH3T3細胞株を用いて、*in vitro* wound healing assayを行った。*In vitro* wound healing assayは、コンフルエントな状態の単層培養細胞に引っ掻き傷による模擬的な傷を作り、傷口の部位における細胞の移動過程を観察する手法として知られている。本研究では*in vitro* wound healing assayを用い、Wnt5a存在下・非存在下での創傷面における細胞の極性をもった細胞移動を（1）創傷面における葉状仮足の形成（アクチン細胞骨格再編成）、（2）微小管形成中心（MTOC）の再配向、（3）細胞移動能、および（4）細胞内シグナル伝達（JNKの活性化等）について解析を行った。Wnt5aによる極性をもった細胞移動におけるRor2, filamin A及びJNKの機能については、Ror2, filamin AについてはsiRNAを用いた発現抑制実験により、またJNKについてはJNK阻害剤を用いて解析を行った。また、filamin Aの機能解析においては、NIH3T3細胞に加えて、filamin Aを発現しているメラノーマ細胞株（A7）やA7に由来し内在的にfilamin Aの発現を欠失しているM2細胞を用いた。また、極性をもった細胞移動におけるプロテインキナーゼC（PKC）アイソフォームの関与については、各種PKCアイソフォーム特異的pseudo-substrate（PS）を用いて、それらを与える影響を検討した。

3. 結果 研究成果

内在的にRor2を発現しているNIH3T3細胞にWnt5a刺激を行ったところ、創傷面に向かって葉

状仮足の形成、MTOCの再配置、および細胞移動能の亢進が認められ、またこれらはsiRNAを用いてRor2の発現を抑制すると顕著に減弱することが見いだされた。次に、Wnt5aによる細胞移動におけるシグナル伝達機構の解析を行ったところ、MAPキナーゼの中でJNKが活性化されることが明らかになった。抗リン酸化c-Jun抗体を用いた免疫染色を行ったところ、Wnt5a刺激により創傷面に面した細胞において強くJNKの活性化が検出された。また、Wnt5aによるJNKの活性化は、siRNAによるRor2の発現抑制により顕著に減弱することが示された。さらに、JNK阻害剤により、Wnt5aによる葉状仮足形成、MTOC再配置、細胞移動能いずれもが著しく抑制された。これらの結果から、Wnt5aはRor2を介してJNKを活性化し、この活性化が必須の役割を担うと考えられる。

以前の研究から我々はRor2の細胞内プロリンリッチドメインを含むC末端領域に会合する分子としてfilamin Aを同定したが7)、filamin Aはアクチン細胞骨格の架橋化のみならず、シグナル伝達の足場タンパク質として機能することが知られている。そこで、Wnt5aによるJNKの活性化におけるfilamin Aの機能解析を行った。その結果、filamin Aを発現しているメラノーマ細胞株(A7)では、Wnt5a刺激によるJNKの活性化が認められたのに対して、filamin Aを発現していないメラノーマ細胞株(M2)やsiRNAによるfilamin Aの発現を抑制した細胞では、Wnt5aによるJNKの活性化がほとんど検出されなかった。また、M2細胞にRor2との結合ドメインを欠失させたfilamin A変異体(FLNaD20)を発現させた細胞でも、Wnt5aによるJNKの活性化ならびにWnt5aによる細胞移動能・MTOCの再配置の亢進は観察されなかった。したがって、filamin AはRor2と会合することにより、Wnt5aによるJNKの活性化や極性をもった細胞移動を制御することが明らかとなった。

また、最近atypical PKC (aPKC)として知られているPKC ζ がWntシグナル伝達分子Dishevelledと会合することで、Wnt5aによる線維芽細胞株の極性を制御することが報告された8)。そこで、Wnt5aによる極性をもった細胞移動におけるPKCの関与を調べる目的で、各PKCアイソフォーム特異的pseudo-substrate (PS)を用いて、Wnt5aによるJNKの活性化およびMTOCの再配置へ与える影響を検討した。その結果、Wnt5aによるJNKの活性化、MTOCの再配置いずれもPKC ζ PSにより特異的に抑制された。これらの結果から、PKC ζ の活性化がWnt5aによるJNKの活性化や細胞極性制御に必須の役割を担うことが示された。

以上の結果は、5. 発表論文、参考文献における論文9)として発表した。

4. 考察 まとめ

本研究により、Wnt5aはその受容体であるRor2とそれに会合するアクチン結合タンパク質filamin Aを介してJNKを活性化し、このWnt5a/Ror2/filamin A/JNK経路がWnt5aによる極性をもった細胞移動制御において必須の役割を担うことが明らかとなった。また、PKC ζ もJNKの活性化を制御し、極性をもった細胞移動において重要な役割を担うことが示された。今後、filamin AやPKC ζ によるJNKの活性化機構の解明、および活性化されたJNKによる極性をもった細胞移動の分子機構の解明が必要とされる。また、本研究において見いだされた*in vitro*での知見が、*in vivo*におけるCE movementsやPCP経路の制御とどのように関連するか、その解明が待たれる。

5. 発表論文、参考文献

1) Oishi, I., Takeuchi, S., Hashimoto, R., Nagafukuro, A., Ueda, T., Liu, Z-J., Hatta, T., Akira, S., Matsuda, Y., Yamamura, H., Otani, H., and Minami, Y.: Spatio-temporally regulated expression of receptor tyrosine kinases, mRor1, mRor2, during mouse development:

implications in development and function of the nervous system. **Genes to Cells** 4: 41-56, 1999.

2) Matsuda, T., Nomi, M., Ikeya, M., Kani, S., Oishi, I., Terashima, T., Takada, S., and Minami, Y.: Expression of the receptor tyrosine kinase genes, *Ror1* and *Ror2*, during mouse development. **Mech. Dev.** 105: 153-156, 2001

3) Takeuchi, S., Takeda, K., Oishi, I., Nomi, M., Ikeya, M., Itoh, K., Tamura, S., Ueda, T., Hatta, T., Otani, H., Terashima, T., Takada, S., Yamamura, H., Akira, S., and Minami, Y.: mRor2 receptor tyrosine kinase is required for the heart development and limb formation. **Genes to Cells** 5: 71-78, 2000.

4) Nomi, M., Oishi, I., Kani, S., Suzuki, H., Matsuda, T., Yoda, A., Kitamura, M., Itoh, K., Takeuchi, S., Takeda, K., Akira, S., Ikeya, M., Takada, S., and Minami, Y.: Loss of *mRor1* enhances the heart and skeletal abnormalities in *mRor2* deficient mice: redundant and pleiotropic functions of mRor1 and mRor2 receptor tyrosine kinases. **Mol. Cell. Biol.** 21: 8329-8335, 2001

5) Yamamoto, S., Nishimura, O., Misaki, K., Nishita, M., Minami, Y., Yonemura, S., Tarui, H., and Sasaki, H.: Cthrc1 selectively activates planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing Wnt-receptor complex. **Dev. Cell** 15: 23-36, 2008.

6) Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Mundlos, S., Shibuya, H., Takada, S., and Minami, Y.: The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signaling pathway. **Genes to Cells** 8: 645-654, 2003.

7) Nishita, M., Yoo, S-K., Nomachi, A., Kani, S., Sougawa, N., Ohta, Y., Takada, S., Kikuchi, A., and Minami, Y.: Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. **J. Cell. Biol.** 175: 555-562, 2006

8) Schlessinger, K., McManus, E. J., and Hall, A.: Cdc42 and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity. **J. Cell. Biol.** 178: 355-361, 2007.

9) Nomachi, A., Nishita, M., Inaba, D., Enomoto, M., Hamasaki, M., and Minami, Y.: Receptor tyrosine kinase Ror2 mediates Wnt5a-induced polarized cell migration by activating c-Jun N-terminal kinase via actin-binding protein filamin A. **J. Biol. Chem.** 283: 27973-27981, 2008.

6. 謝辞

本研究成果は、貴研究会による助成金により得られたものであり、この場を借りて深謝申し上げます。