

論文内容の要旨

論文題目 線虫 Arp2/3 複合体及び WASP ファミリータンパク質の形態形成期における機能解析

(Functional analysis of the *C. elegans* Arp2/3 complex and WASP family proteins in morphogenesis)

氏名 澤 真理子

多細胞生物の形態形成過程において、細胞は形を変え機能すべき場所へと移動していく。この細胞の形態変化や細胞移動に伴い、細胞膜直下に存在するアクチン細胞骨格系が再編される必要がある。

これまでに培養細胞や精製タンパク質を用いた再構築系での解析から、哺乳類 Arp2/3 複合体及び WASP ファミリータンパク質は、アクチン細胞骨格系の再編において速やかなフィラメント状アクチン(F-アクチン)の形成を可能にする重要な因子であることが示されてきた。哺乳類 Arp2/3 複合体は 7 個のサブユニットからなる複合体で、アクチン細胞骨格系の再編において F-アクチンの形成におけるアクチンの重合核として機能する。哺乳類 WASP ファミリータンパク質は Arp2/3 複合体の活性化因子として機能し、N-WASP 及び WASP, WAVE1-3 の 5 個のタンパク質からなる。培養細胞において、哺乳類 WASP ファミリータンパク質及び Arp2/3 複合体が活性化されると、細胞に糸状仮足や葉状仮足という細胞移動を担う基本的な構造が形成されることが知られている。

しかしながら多細胞生物の形態形成過程について考えてみると、アクチン細胞骨格系がどのような局面で再編され、どの様に制御されているのかということについては多くは明らかではない。そこで、私は多細胞生物の形態形成期におけるアクチン細胞骨格系の再編機構を明らかにするために、線虫をモデル生物として線虫 Arp2/3 複合体及び WASP ファミリータンパク質の機能解析を行った。

1. 線虫 Arp2/3 複合体の機能解析

線虫全ゲノムに対する相同遺伝子の検索から、線虫のゲノム上には哺乳類 Arp2/3 複合体の 7 個のサブユニットに対する相同遺伝子が、それぞれ一つずつ存在することが明らかになった。各遺伝子は、酵母や哺乳類の 7 個のサブユニットに対しそれぞれ 60%程度の相同性を示した。そこで、哺乳類の 7 個のサブユニット Arp3, Arp2, p41Arc, p34Arc, p21Arc, p20Arc, p16Arc に対応する線虫の相同遺伝子を分子量の順に *arx*(actin-related protein 2/3 complex)-1, *arx-2*, *arx-3*, *arx-4*, *arx-5*, *arx-6*, *arx-7* と名付けた。

まず、これらの遺伝子の機能を解析するために、RNA 干渉法(RNAi)による機能破壊実験を試みた。*arx-3*以外の Arp2/3 複合体のサブユニットに対する RNAi を、野生型株 (N2) を用いて行ったところ、どのサブユニットに対しても F1 世代で高い胚性致死率が観察された。それぞれの胚性致死率は、*arx-1(RNAi)*では 100%(n=211)、*arx-2(RNAi)*では 100%(n=254)、*arx-4(RNAi)*では 83%(n=234)、*arx-5(RNAi)*では 78%(n=261)、*arx-6(RNAi)*では 88%(n=285)、*arx-7(RNAi)*では 87%(n=296)であった。

さらに致死となる原因を明らかにする為に、微分干渉顕微鏡下で胚の発生過程を観察した。線虫の胚発生期においては、第一卵割から約 300 分の間は卵割が繰り返される分裂期で、個体としての形態は形成されていない。特に形態形成期を経た胚で見られる表皮細胞の左右対称に背側、側面、腹側の三層構造も、この段階では最も腹側の表皮細胞が胚の側面に位置するため腹側は表皮細胞に覆われていない状態である。ところが第一卵割後約 300 分から 400 分にかけて、最も腹側に位置する表皮細胞が左右から腹側中央に向かい移動し(図 A)、腹側中央で左右の細胞が互いに接着を形成する。この表皮細胞の移動過程は **ventral enclosure** と呼ばれ、この過程を経て線虫の胚は表皮細胞に体全体を覆われる。その後、前後軸に沿った伸長がおこり細長い形態が形成されていく(図 A)。ところが Arp2/3 複合体の各サブユニットに対する RNAi を行った個体では、**ventral enclosure** の時期における形態の変化が観察されなかった(図 B,C)。表皮系細胞の接着部位に発現する AJM-1 が GFP により可視化された株を用いて RNAi を行い表皮細胞の形態をより詳しく観察したところ、致死胚では表皮細胞が体全体を覆う構造を示さず端に退縮していた(図 F, G)。さらに多光子レーザー顕微鏡により、AJM-1::GFP を指標として *arx-2(RNAi)*F1 胚における表皮細胞の挙動を経時的に観察したところ、表皮細胞の移動が起きていないことが明らかになった。蛍光ファロイジン染色により F-アクチンを染色したところ、表皮細胞の伸長端での F-アクチンの集積が減少していることが確認された。その一方で、表皮細胞の分化マーカーとなる LIN-26 や AJM-1 の発現には、Arp2/3 の機能破壊による影響は見られなかった。さらに ARX-1 及び ARX-7 に対する抗体を産生し、その局在を免疫染色法により解析したところ、**ventral enclosure** 期における表皮細胞の伸長端付近にも存在していた。この局在は RNAi で観察された表現形を支持すると考えられた。

以上の解析結果から、線虫 Arp2/3 複合体は **ventral enclosure** における表皮細胞の移動におけるアクチン細胞骨格系の再編において必須な因子であることが示された。

2. 線虫 Wasp ファミリータンパク質の機能解析

次に Arp2/3 複合体の活性化因子であることが予想される線虫 Wasp ファミリータンパク質に着目した。データベースの検索から線虫のゲノム上には、哺乳類 N-WASP, Wasp に対応する遺伝子が唯一存在し(*wsp-1*)、WAVE1-3 に対する遺伝子も唯一存在する(*wve-1*)ことが明らかになった。

wsp-1 に対する RNAi を行ったところ、15%の F1 世代で胚性致死が観察された(n=134)(図 D)。微分干渉顕微鏡下で経時的に発生過程を観察すると 7 割の胚性致死胚は、ventral enclosure 期での形態形成異常によるものであることが明らかになった。致死胚における AJM-1::GFP の局在を観察したところ表皮細胞は体全体を覆わずに退縮していた(図 H)。一方で N2 を用いた *wve-1* に対する RNAi では表現形が観察されなかった。そこで RNAi の効きやすい株 *rrf-3* を用いて RNAi を行った。その結果 F1 世代の 35%の個体で Arp2/3 複合体や *wsp-1* に対する RNAi で観察された表現形と類似する、ventral enclosure 期における異常が観察された(n=109)。*rrf-3* を用いて *wsp-1* に対する RNAi を行ったが致死率の亢進は観察されなかった(n=97)。また *rrf-3* を用い *wsp-1* と *wve-1* に対する RNAi を同時に行ったところ 68%の F1 胚で ventral enclosure 期での形態形成異常が観察された(n=89)。RNAi によるタンパク質発現量の変化を確認するため、*rrf-3* を用いた *wsp-1(RNAi)*F1 胚及び *wve-1(RNAi)*F1 胚を回収し、ウェスタンブロッティング法により WSP-1 及び WVE-1 のタンパク質量を検出した。*wsp-1(RNAi)*F1 胚における WSP-1 と *wve-1(RNAi)*F1 胚における WVE-1 は、コントロールに比べそれぞれのタンパク質量は 90%程度減少していた。しかし、*wsp-1(RNAi)*F1 胚における WVE-1 及び *wve-1(RNAi)*F1 胚における WSP-1 のタンパク質量には変化はみられなかった。このことから、*wsp-1* 及び *wve-1* に対し RNAi は有意に効いていることが確認された。よって、*wsp-1* 又は *wve-1* に対する単独の RNAi で致死率が低いのは、機能阻害されていない WVE-1 又は WSP-1 が機能しているためと考えられた。

さらに WSP-1 及び WVE-1 に対する抗体を作製し、胚発生期における局在を観察した。WSP-1 及び WVE-1 は ventral enclosure 期に表皮細胞の伸長端にも存在することが観察された。このことは RNAi でみられた表現形と一致する結果と考えられた。また Arp2/3 複合体に対する RNAi F1 胚での WSP-1 の局在を観察したところ、部分的に核へ移行していた。このことは、WSP-1 の細胞膜への局在には Arp2/3 複合体との結合が必要であることを示し、*in vivo* での WSP-1 と Arp2/3 複合体の結合を示唆するものであった。一方で、*wsp-1(RNAi)*F1 胚及び *wve-1(RNAi)*F1 胚においても LIN-26 や AJM-1 を指標とした分化状態には影響はみられなかった。以上の解析から、線虫 Wasp ファミリータンパク質も Arp2/3 複合体とともに表皮細胞の移動において機能していることが示された。

本研究を通して線虫 *Arp2/3* 複合体は、ventral enclosure 期の表皮細胞の移動に伴う F-アクチンの形成過程で重要な因子であることが明らかになった。また線虫 WASP ファミリータンパク質 *WSP-1*、*WVE-1* も *Arp2/3* 複合体と同じ表皮細胞の移動に関与することが示された。これらのことから、線虫の形態形成期において WASP ファミリータンパク質から *Arp2/3* 複合体へのシグナル経路が表皮細胞の移動を担うアクチン細胞骨格系の再編において重要であることが示された。

今後、*WSP-1* 及び *WVE-1* の制御機構の解明により、形態形成過程におけるアクチン細胞骨格系の再編が、どの様にして時間的空間的に制御されているのか明らかにされる可能性がある。

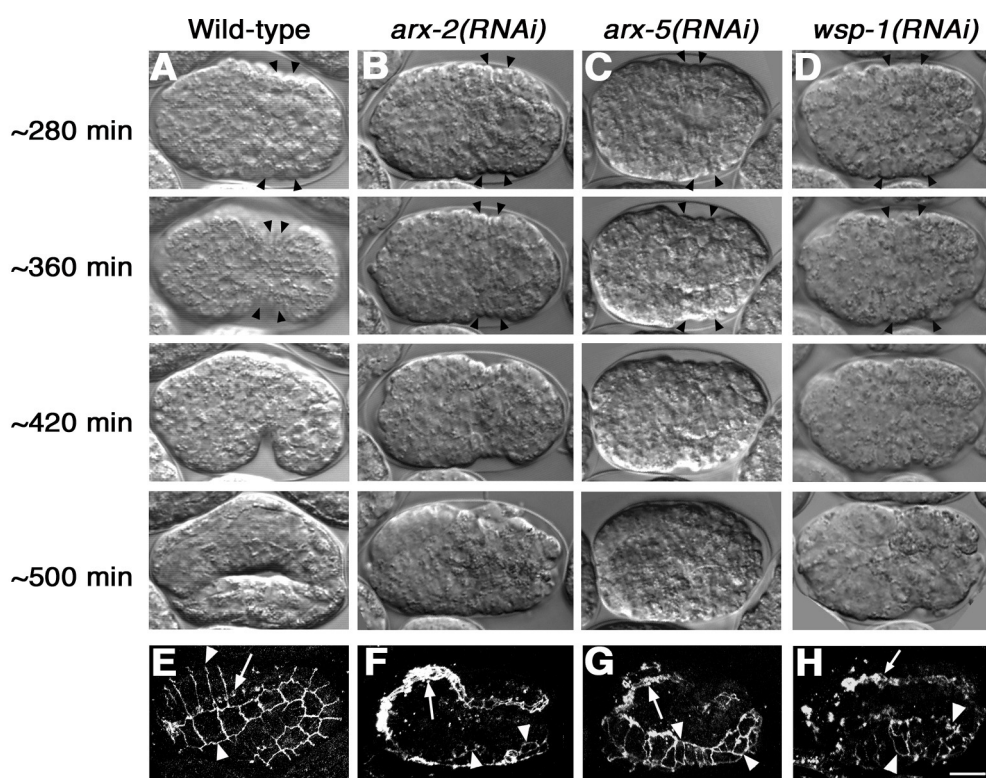


図 微分干渉顕微鏡による胚発生の経時的観察(A-D)及び共焦点レーザー顕微鏡による *AJM-1::GFP* の局在観察(E-H)。A,E; 野生型、B,F; *arx-2(RNAi)*/F1 胚、C,G; *arx-5(RNAi)*/F1 胚、D,H; *wsp-1(RNAi)*/F1 胚。RNAiF1 胚では第一卵割後約 280 分から 420 分にかけての形態変化が観察されず(B-D)、表皮細胞が体の一部に偏っている様子が観察される(F-H)。A における第一卵割後約 420 分と 500 分及び E は側面からの観察像であり、その他は腹側からの観察像。矢頭により表皮細胞を、矢印により咽頭細胞の境界面を示した。スケールバーにより 10 μ m を示す。