

線虫 ADAMTS の細胞移動における役割

菊地 哲 宏¹, 久保田 幸彦^{1,2}, 伊原 伸治³, 西脇 清二¹

線虫の ADAMTS プロテアーゼ MIG-17 は、生殖巣形成のリーダー細胞の移動制御に必須の役割を果たす。MIG-17 は体壁筋から分泌され、プロドメイン依存的に生殖巣基底膜に局在し、自己触媒的にプロドメインが除去されることにより活性化される。活性化 MIG-17 は生殖巣基底膜にフィブリリン (fibulin) をリクルートし、さらにフィブリリンはニドジェン (nidogen) をリクルートする。これら一連の基底膜分子カスケードが、リーダー細胞の方向性のある移動を可能にしていることが明らかとなった。

1. ADAMTS プロテアーゼ MIG-17 の時空間的制御

ADAMTS (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs) は分泌型のメタロプロテアーゼであり、13 年前に初めて発見された¹。ADAMTS には細胞外マトリックス (ECM) に異常をきたす遺伝病の原因遺伝子が多数見つかっており注目を集めている²。例えば ADAMTS-2 は procollagen propeptidase であり、その変異 Ehlers-Danlos 症候群では皮下の結合組織が極端に脆弱になる。ADAMTS-10 の基質は不明であるが、その欠損である Weill-Marchesani 症候群では低身長や関節硬化などの症状を呈する。最近、ADAMTS-5, ADAMTS-9, ADAMTS-20 が指の形態形成に関与することが示された³。しかしながら、ADAMTS の発生過程における役割はまだほとんど分

かっていない。我々は線虫 *C. elegans* の生殖巣形成異常変異体 *mig-17* の解析から、この遺伝子が ADAMTS の一種をコードすることを明らかにした⁴。線虫の U 字型の生殖巣 (チューブ状上皮より成る) は原基先端のリーダー細胞 (distal tip cell; DTC) が、幼虫期に U 字型の移動を行うことにより形成される。*mig-17* 変異体では DTC が蛇行・迷走するために、生殖巣の形状が異常となる (図 1)。チューブ状上皮の移動を伴う器官形成は肺、腎臓、唾液腺、乳腺など種々の器官の発生過程で広く見られる現象である⁵。線虫の生殖巣の形成は個体のレベルで上皮チューブの移動を解析できる最も単純なシステムである。上皮チューブの表面には基底膜があり、上皮細胞の足場として、上皮シートを物理的に支えている。しかしながら、上皮チューブの伸張や方向転換、分枝の過程では、基底膜はダイナミックに分解・再編される。MIG-17 は背側および腹側の体壁筋細胞から分泌されて、生殖巣の基底膜に局在し、その酵素活性に依存して DTC の移動方向を調節する⁴ (図 2)。本研究では、糖鎖修飾をうけたプロドメインが MIG-17 の局在決定に必須であること、さらに MIG-17 の生体内における時空間的制御を明らかにした。

1) プロドメインの糖鎖修飾は局在決定に重要である

我々は以前、MIG-17 が局在するには、MIG-23 (ゴルジ NDP アーゼ) に依存した適切な糖鎖修飾が必要だと報告した⁶。MIG-17 は N 末端に分泌シグナル、これに続きプロドメイン、メタロプロテアーゼ (MP) ドメイン、ディスインテグリン (DI) ドメイン、PLAC ドメインを持つが、

¹ 関西学院大学大学院理工学研究科 (〒669-1337 三田市学園 2-1)

² 東北大学大学院生命科学研究科 (〒980-8577 仙台市青葉区片平 2-1-1)

³ Biology Department, Duke University (Durham, NC 27708, USA)

Role of ADAMTSs in cell migration in the nematode *C. elegans* Tetsuhiro Kikuchi¹, Yukihiko Kubota^{1,2}, Shinji Ihara³ and Kiyoji Nishiwaki¹ (¹Department of Bioscience, Kwansai Gakuin University, 2-1 Gakuen, Sanda, Hyogo 669-1337, Japan; ²Department of Developmental Biology and Neurosciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan; ³Biology Department, Duke University (Durham, NC 27708 USA))

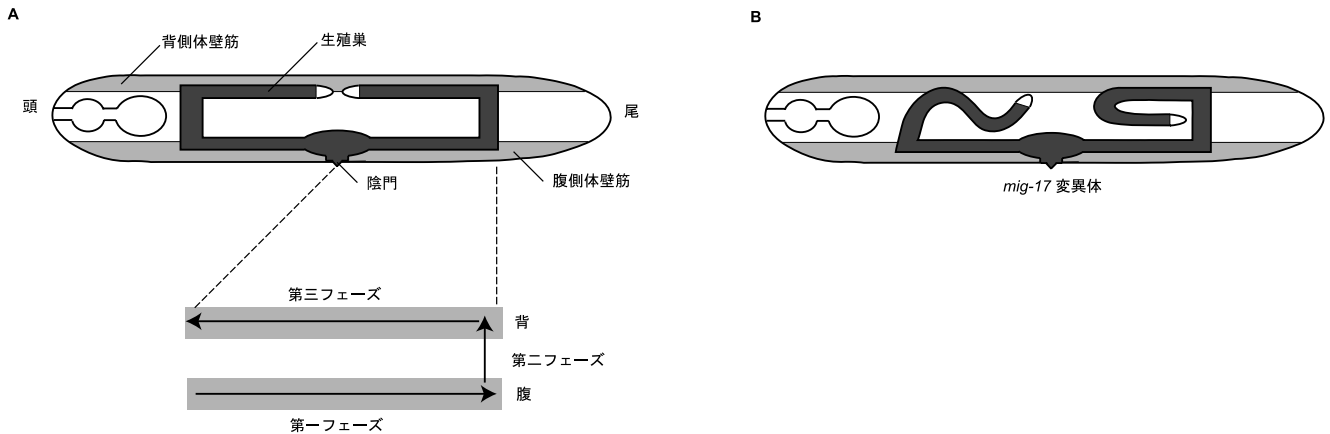


図1 線虫の生殖巣形成

A) 野生型線虫の生殖巣の形態と DTC 移動の模式図. B) DTC 移動異常に伴う *mig-17* 変異体の生殖巣形成異常.

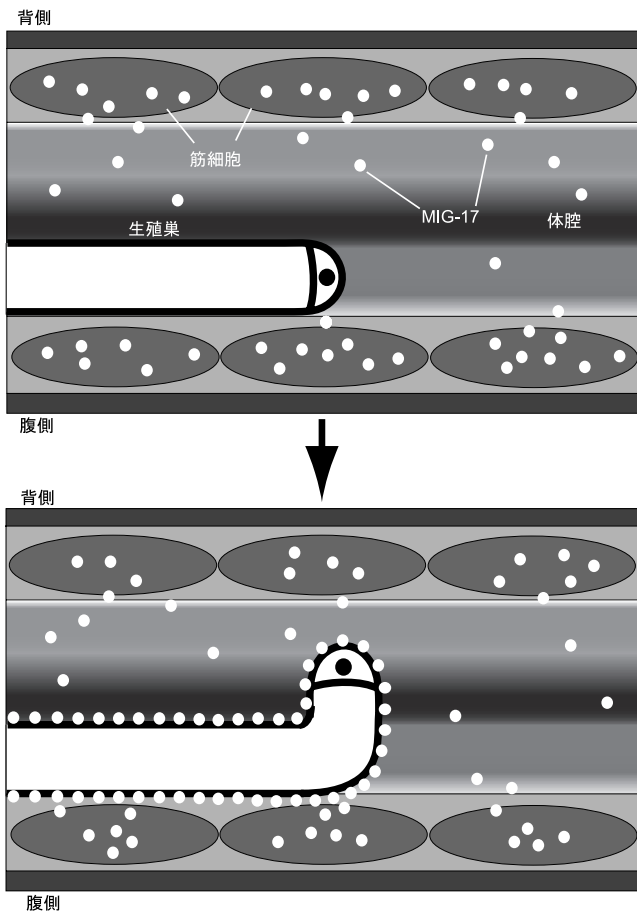


図2 MIG-17の挙動

MIG-17は背側および腹側の体壁筋細胞から体腔中に分泌され、DTCが背側へ方向転換を始めると基底膜に局在する。

この中でプロドメインに6箇所、メタロプロテアーゼドメインに3箇所のN型糖鎖修飾を持つ(図3)。これらについて、糖鎖が付加されるアスパラギン酸からグルタミン酸への置換を行い糖鎖修飾を取り除いた。(1)全ての糖鎖を

取り除いた場合、(2)プロドメインの糖鎖を取り除いた場合、および(3)MPドメインの糖鎖を取り除いた場合について、生殖巣上への局在と *mig-17* 変異体のレスキュー活性の有無を検討した。その結果、プロドメインの糖鎖は局在とレスキューに必須であることが分かった。しかしながら、これら3種類のコンストラクトをDTCに特異的な *lag-2* プロモーターで発現させると、いずれも *mig-17* 変異体を有意にレスキューすることが分かった⁷⁾(図3)。これらの結果は、プロドメインの糖鎖修飾はMIG-17の生殖巣への局在に非常に重要であるが、プロテアーゼ活性には必須ではなく、DTCで直接発現させれば、DTCの移動を調節できることを示している。

さらに我々はMIG-17の持つそれぞれのドメインの欠損体および酵素活性欠損変異体(活性部位のグルタミン酸のグルタミンへの置換)を作成し、局在と機能への影響を検討した。全てのドメインがMIG-17のDTC移動調節機能に重要であったが、局在に最も重要なドメインはプロドメインであった。しかしながら、プロドメイン単独では局在活性は無かった⁷⁾(図3)。プロテアーゼのプロドメインは後方に折り返し、MPドメインをマスクすることにより、酵素の潜在性を保っていると考えられている。MIG-17のプロドメインも同様に後方に折り返し、MPやDIドメインと相互作用しており、このような相互作用がプロドメインの局在活性に必要なコンフォメーションの形成に重要であるのかも知れない。

2) MIG-17の自己触媒作用による活性化

ADAMやADAMTSファミリーの多くは、分泌に伴ってプロドメインがフェーリンと呼ばれるプロセッシングプロテアーゼによって切断を受ける。しかしながら、MIG-17にはフェーリンの認識サイトは存在せず、*in vitro* 実験系によりMIG-17はそのプロテアーゼ活性による自己切断で活

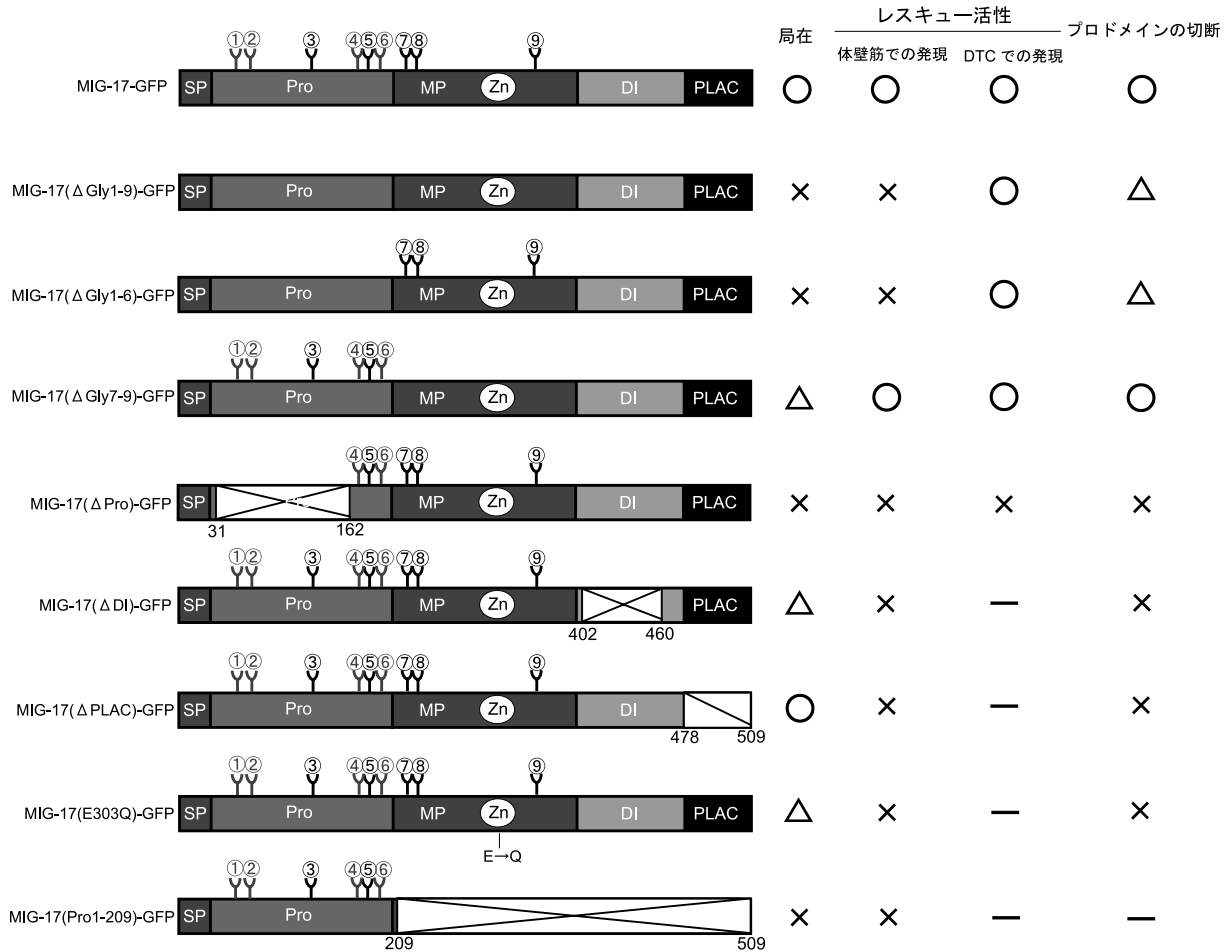


図3 局在と機能に必要なMIG-17のドメインの解析

MIG-17の種々の変異体を作成した。欠失領域を×印のボックスとして示した。欠失領域のN末端およびC末端のアミノ酸のポジションを数字で示した。○, △, ×はそれぞれ強い, 部分的, なしを意味する。

性化することが分かった。このプロドメインの切除にはMIG-17の全てのドメインと触媒活性が必要であったが、糖鎖修飾は必ずしも必須ではなかった⁷⁾(図3)。また *in vivo* において、プロドメインの自己切断はDTCの正常な移動に必要なことが明らかとなった。さらに興味深いことに、本来の切断部位を無くして、フューリンの認識サイトを導入したMIG-17を体壁筋で発現させても、DTCの移動異常を回復することができないが、異所的にDTCに発現させると異常は回復した。この結果は、活性化は生殖巣上でなければならない必然性を示唆している。MIG-17の各ドメインおよび糖鎖の局在とプロセッシングへの関与について図4にまとめた。

3) MIG-17の分泌, 局在と作用機構のモデル

これまでの結果より、糖鎖を持ったプロドメインが局在決定に最も重要であることが明らかになった。次に我々は、線虫胚細胞の初代培養系を用いて、MIG-17の分泌効率を測定した。その結果、糖鎖やプロドメインの欠損は分

泌効率にほとんど影響を与えなかった。線虫培養細胞を用いた分泌タンパク質の検出は、これが最初の成功例であり、新しい手法として用いられることを期待している。またプロドメインを特異的に認識する抗体を作成して免疫染色を行ったところ、プロドメインを持つMIG-17(プロフォーム)は生殖巣基底膜に強く局在することが判明した⁷⁾。我々はまた、活性化MIG-17のN末端ネオエピトープを認識するモノクローナル抗体を作成し、組織染色を行った。その結果、MIG-17はDTCが活発に移動する幼虫期に、生殖巣基底膜で活性化されることを明らかにした⁸⁾。以上の結果より、我々は次のようなモデルを提出する。MIG-17は筋肉細胞からプロフォームで分泌後、糖鎖修飾されたプロドメインに依存して、生殖巣に局在する(Pro-domain Targetingと命名)。局在後、自己触媒により活性化して細胞の移動方向を調節すると考えられる(図5)。哺乳類のADAMTSファミリーにもプロドメインを持ったまま分泌されるケースは複数知られており、MIG-17と同様に、プロドメインが局在シグナルとして機能している可能

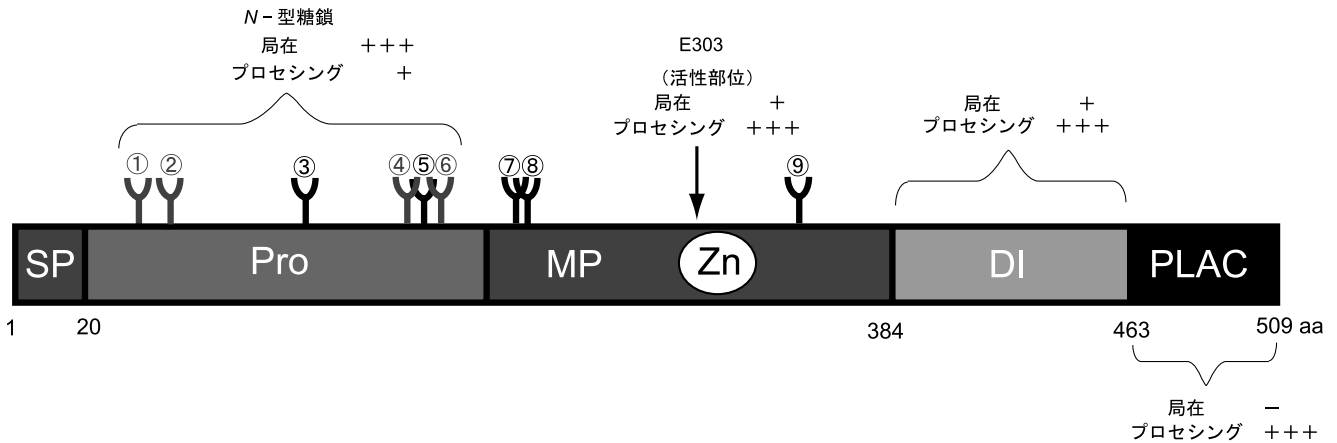


図 4 MIG-7 の各ドメインの機能
 +++, +, - はそれぞれ必須, 部分的に必要, 不必要を意味する.

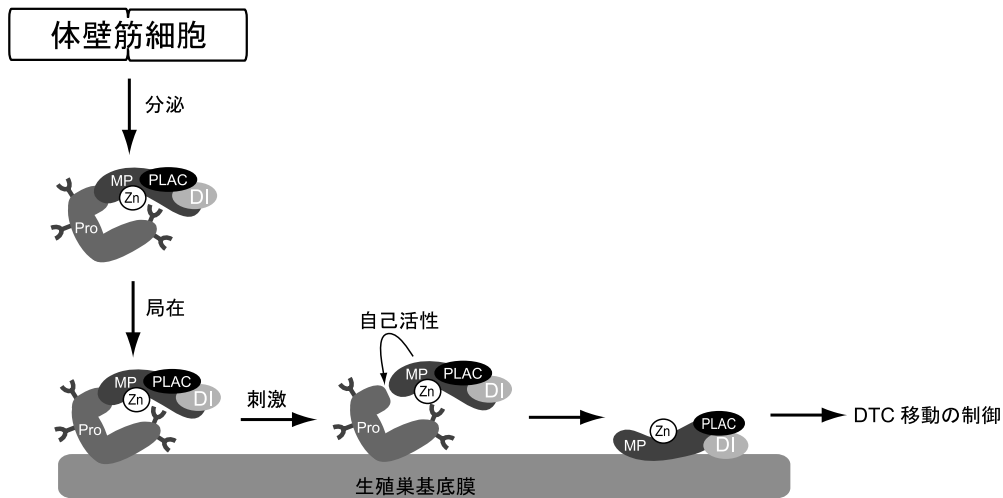


図 5 生殖巣形成における MIG-7 の挙動
 MIG-7 はプロフォームとして体壁筋細胞から分泌され, 糖鎖修飾されたプロドメインに依存して生殖巣基底膜に局在する. MIG-7 は基底膜に局在後, 何らかの刺激によりプロドメインが自己触媒的に除去され, 活性化される. 活性化型 MIG-7 はその触媒作用により, DTC 移動を制御する.

性が考えられる⁹⁾.

2. MIG-7 下流の制御経路

1) 基底膜分子フィビュリン-1C と IV 型コラーゲンのアミノ酸置換が MIG-7 の欠損をサプレスする

我々は MIG-7 がどのような分子を介して DTC の移動を制御しているのかを明らかにするために, *mig-17* (*null*) 変異体を突然変異誘発剤 (Ethylmethanesulfonate ; EMS) で処理することにより, 遺伝的サプレッサーを分離した. これらは全て優性の変異であり, マッピングの結果, 少なくとも 6 種類の遺伝子があることが分かっている. ここでは 2 種類の遺伝子について紹介する. *fb1-1* はこのような遺伝子の一つであり, その優性の機能獲得型変異 *fb1-1* (*gf*) と *mig-17* の二重変異体では正常な U 字型の DTC 移動が

回復する¹⁰⁾. *fb1-1* は哺乳類で知られている基底膜分子フィビュリン-1 のホモログをコードする. FBL-1 タンパク質は繰り返し構造に富むタンパク質であり, シグナルペプチドに続き 3 個のアナフィラトキシン様リピート, 9 個の EGF 様リピート (2~9 番目まではカルシウム結合型), さらに C 末端にフィビュリン特異的ドメインを持つ. サプレッサー変異は 3 番目の EGF 様モチーフ内の進化的に保存されたアミノ酸の置換であった (図 6). 選択的スプライシングにより, C 末端ドメインの異なる 2 種類のイソフォーム FBL-1C と FBL-1D ができるが, 変異型 FBL-1C のみが *mig-17* 変異をサプレスできる. FBL-1C-Venus 融合タンパク質を用いた解析から, FBL-1C は消化管細胞から分泌され, 生殖巣基底膜に局在することが明らかとなった. FBL-1C は DTC が 1 回目の方向転換を行う前は生殖

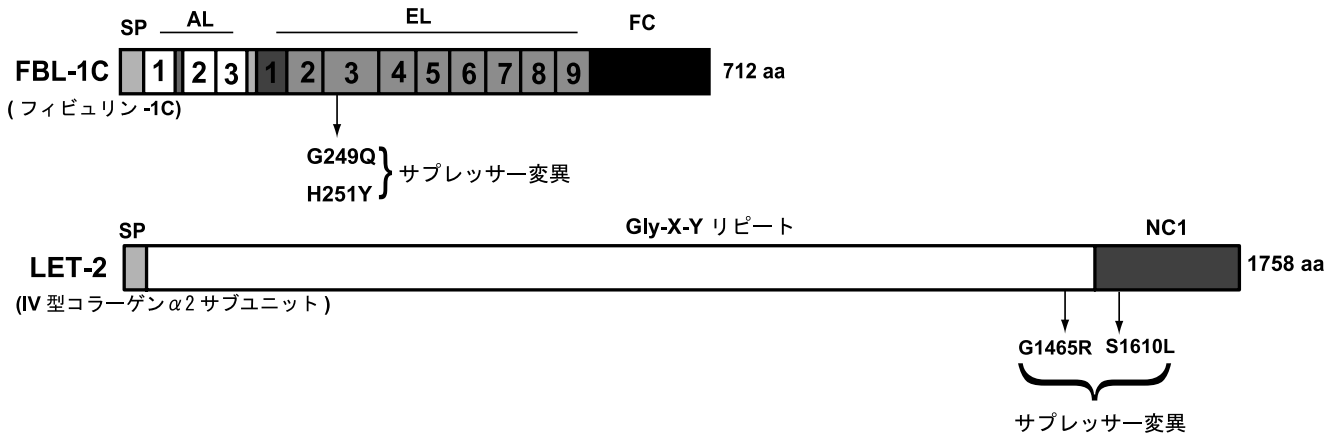


図6 FBL-1CとLET-2の構造と抑圧変異の位置

SP：分泌シグナルペプチド，AL：アナフィラトキシンリピート，EL：EGF様リピート（2-9はCa⁺⁺結合型），FC：フィブリリン特異的C末端ドメイン，NC1：ノンコラゲナズドメイン1。図中にサプレッサー変異の位置を示した。

巢基底膜に弱く局在するが，興味深いことに，DTCが方向転換するとMIG-17の活性に依存して強く局在することが分かった。変異型FBL-1CはMIG-17が無くても強い局在を示す可能性が考えられたが，実際にはMIG-17の活性に非感受性となっており，MIG-17の有無に拘わらず局在は弱かった¹⁰⁾。

我々は*let-2*遺伝子の機能獲得型変異*let-2(gf)*も*fbl-1(gf)*と同様に強力なサプレッサーとなることを見出した¹¹⁾。*let-2*は基底膜IV型コラーゲンの $\alpha 2$ サブユニットをコードしており，2種類のアレルはそれぞれ，トリプルヘリックス領域とC末端のNC1ドメイン内のアミノ酸置換であった（図6）。抗体染色によりLET-2の分布を調べたところ，野生型と同様に消化管および生殖巣の基底膜に局在していることが分かった。また，FBL-1Cとは異なり，基底膜へのLET-2の局在はMIG-17の有無には依存していなかった。

2) MIG-17はFBL-1CとLET-2を介して基底膜ニドジェンをリクルートする

哺乳類での*in vitro*の研究から，フィブリリン-1とIV型コラーゲンはともにニドジェンに特異的に結合することが知られている。そこで*mig-17*のサプレッションにニドジェンが関与するかどうかを調べた。面白いことに*fbl-1(gf)*によるサプレッションはNID-1/ニドジェン依存的であったが，*let-2(gf)*によるサプレッションは非依存的であった¹¹⁾。*mig-17*，*fbl-1*および*let-2*の機能喪失型変異体を用いて，NID-1の生殖巣基底膜への局在を調べた。その結果，*fbl-1(null)*ではNID-1の基底膜への局在が顕著に低下していた。また*let-2(ts)*変異体を非許容温度で培養したときあるいは*mig-17(null)*変異体でも，NID-1の局在が低下することが分かった。次に，*mig-17(null); fbl-1(gf)*およ

び*mig-17(null); let-2(gf)*二重変異体を調べたところ，NID-1の局在は正常に回復していた。これらの結果は生殖巣基底膜でのNID-1の減少が*mig-17*変異体でのDTC移動異常の原因である可能性を示唆する。そこで*mig-17(null)*変異体においてNID-1を過剰発現したところ，驚いたことに*mig-17*変異体でのDTC移動異常が回復することが分かった。このことからMIG-17によるDTC移動制御には，基底膜へのNID-1の集積が重要であると考えられる。変異型FBL-1C(*gf*)やLET-2(*gf*)タンパク質は，基底膜のNID-1への親和性を上昇させることによって，MIG-17の機能を模倣していると考えられる。

以上の結果から，FBL-1CはMIG-17の活性に依存して基底膜に局在し，さらにNID-1を基底膜にリクルートすると考えられる。もしそうであるとすると*mig-17(null)*変異体において，FBL-1Cの過剰発現を行えば，同様にDTC移動異常を回復するはずである。しかしながら，FBL-1Cの過剰発現では*mig-17*の異常は回復できず，また基底膜へのNID-1の局在も回復していなかった¹¹⁾。MIG-17の機能はFBL-1Cの集積のみではなく，それに続くNID-1のリクルートメントのためのFBL-1Cの活性化にも必要であるのかも知れない。

サプレッションがNID-1依存的であることから，変異型FBL-1C(*gf*)がMIG-17非依存的にNID-1をリクルートすることは理屈に合っている。しかしながら，NID-1非依存的に*mig-17*をサプレッスするLET-2(*gf*)においても，基底膜にNID-1がリクルートされることは予想外であった。しかし，*let-2*の機能喪失型の変異において，NID-1の局在が減少していたことから，野生型LET-2もやはりNID-1のリクルートメントに必要であることが示唆される。*let-2(gf)*変異体においては，MIG-17の下流でNID-1依存的および非依存的経路の両方が活性化されており，後者は*nid-*

1(null); *let-2(gf)* 二重変異体においても機能しているのかも知れない。我々はまた FBL-1C の基底膜への局在が機能喪失型 *let-2* 変異体で影響を受けないことも突き止めている。すなわち LET-2 による NID-1 のリクルートメントは FBL-1C を介していない。以上の結果から、MIG-17 の下流での基底膜の制御には、(1)FBL-1C と LET-2 が NID-1 をリクルートする経路と、(2)LET-2 が NID-1 非依存的に働く経路の二つが存在すると考えられる¹¹⁾(図 7)。

3) 2種類の ADAMTS プロテアーゼによる細胞移動のゆらぎと拘束の制御

線虫の U 字型の生殖巣は生殖巣原基の前後両端に生じた 2 個のリーダー細胞 DTC が幼虫期に U 字型の移動を行うことにより形成される。上皮チューブの表面には基底膜があり、上皮シートを物理的に支えている。上皮チューブの伸張や方向転換の過程では、基底膜は細胞から分泌されるプロテアーゼにより分解・再編されるが、基底膜は逆にインテグリンなどの受容体を介して上皮細胞の細胞骨格を制御している。我々は ADAMTS ファミリーメタロプロテアーゼである MIG-17 が DTC の移動方向制御に機能する

ことを見出した。MIG-17 は移動中の生殖巣の基底膜に局在し、DTC の移動方向を調節する。*mig-17* 変異体では DTC が蛇行・迷走するため、形成される生殖巣の形態が異常となる。これに対して DTC 移動に必要な別の ADAMTS である GON-1 が欠損すると、DTC は逆にほとんど移動できなくなる¹²⁾。これらの結果から *mig-17* 変異体では基底膜による物理的拘束が弱まり、移動細胞が本来持つゆらぎが顕在化し、*gon-1* 変異体では物理的拘束が極端に強まっている可能性が考えられる。我々は MIG-17 が FBL-1C を基底膜にリクルートすることを明らかにしたが、FBL-1C の機能喪失型の変異は GON-1 の欠損をサプレッスすることが分かっている¹³⁾。これらの結果は MIG-17 は基底膜への FBL-1C の局在を促進するのに対して、GON-1 は阻害している可能性を示唆する。これら 2 種類の ADAMTS プロテアーゼは FBL-1C、さらに NID-1 の基底膜への局在やその活性を制御することにより、DTC 移動のゆらぎと拘束を適度に調節し、発生過程での正確な U 字型の移動を可能にしているのかも知れない。

文 献

- 1) Kuno, K., Kanada, N., Nakashima, E., Fujiki, F., Ichimura, F., & Matsushima, K. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 556–562.
- 2) Porter, S., Clark, I.M., Kevorkarin, L., & Edwards, D.R. (2005) *Biochem. J.*, **386**, 15–27.
- 3) McCulloch, D.R., Nelson, C.M., Dixon, L.J., Silver, D.L., Wylie, J.D., Lindner, V., Sasaki, T., Cooley, M.A., Argraves, W.S., & Apte, S.S. (2009) *Dev. Cell*, **17**, 687–698.
- 4) Nishiwaki, K., Hisamoto, N., & Matsumoto, K. (2000) *Science*, **288**, 2205–2208.
- 5) Lu, P. & Werb, Z. (2008) *Science*, **5**, 1506–1509.
- 6) Nishiwaki, K., Kubota, Y., Chigira, Y., Roy, S.K., Suzuki, M., Schvarzstein, M., Jigami, Y., Hisamoto, N., & Matsumoto, K. (2004) *Nat. Cell Biol.*, **6**, 31–37.
- 7) Ihara, S. & Nishiwaki, K. (2007) *EMBO J.*, **26**, 2607–2620.
- 8) Ihara, S. & Nishiwaki, K. (2008) *FEBS J.*, **275**, 4296–4305.
- 9) Apte, S.S. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 31493–31497.
- 10) Kubota, Y., Kuroki, R., & Nishiwaki, K. (2004) *Curr. Biol.*, **14**, 2011–2018.
- 11) Kubota, Y., Ohkura, K., Tamai, K.K., Nagata, K., & Nishiwaki, K. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 20804–20809.
- 12) Blemloch, R. & Kimble, J. (1999) *Nature*, **399**, 586–590.
- 13) Hesselson, D., Newman, C., Kim, K.W., & Kimble, J. (2004) *Curr. Biol.*, **14**, 2005–2010.

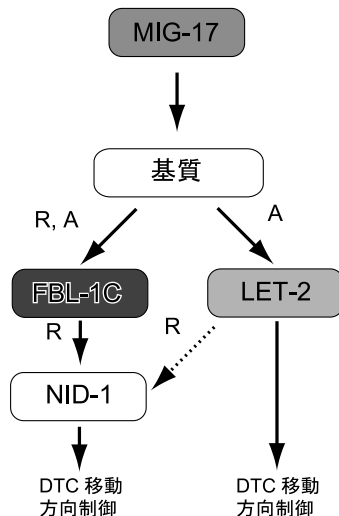


図 7 MIG-17 の下流カスケードのモデル

MIG-17 は未同定の基質を分解し、FBL-1C をリクルートさらに活性化する。活性化 FBL-1C は NID-1 を基底膜にリクルートし、DTC 移動を制御する。MIG-17 依存的なタンパク質分解は LET-2 の活性化も行い、NID-1 依存的および非依存的な経路を誘導する。R：リクルートメント，A：活性化