

平成21年 5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570174

研究課題名（和文）アクチン骨格ダイナミクスにおけるコフィリンの作用機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the function of cofilin in actin cytoskeleton dynamics.

研究代表者

大橋 一正 (Ohashi Kazumasa)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号：10312539

研究成果の概要：アクチン線維の切断・脱重合因子コフィリンは、細胞運動の動的な変化に必須な蛋白質であり、その働きはリン酸化酵素 LIM キナーゼによって負に制御される。本研究において、GFPを用いた LIM キナーゼ阻害剤の探索方法を開発し、LIM キナーゼ特異的な阻害剤を発見した。この化合物は癌細胞の移動を阻害することが明らかとなった。また、ラメリポディア形成においてコフィリンは遊離アクチンの産生において寄与し、LIM キナーゼはアクチン線維の伸長において寄与していることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞骨格・運動、アクチン、コフィリン、LIM キナーゼ、蛍光蛋白質、阻害剤

1. 研究開始当初の背景

アクチン骨格は細胞内でダイナミックに再構築され、細胞の移動や分裂、形態変化といったあらゆる細胞応答において力を発生させ速い動きに対応する細胞骨格である。その制御は細胞内の様々なシグナル伝達経路に連動し時間的・空間的に厳密に制御されている。アクチン線維の切断・脱重合因子であるコフィリンは、アクチン骨格のダイナミクスを制御する最も重要な因子の一つである。コフィリンは3番目のセリンのリン酸化によって活性が制御され、細胞内で分単位でリン酸化（不活性化）と脱リン酸化（活性化）を繰り返す状態にあり、様々

な刺激によってリン酸化レベルを変動させている。このようなコフィリンの活性変化がアクチン構造の流動的な変化を可能にしていると考えられる。私たちは、コフィリンを不活性化するリン酸化酵素 LIM キナーゼ (LIMK) を発見し、さらに、LIMK は低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリー Rho の下流エフェクター ROCK によって Thr-508 がリン酸化され活性化されることを明らかにした。さらに、コフィリンを再活性化する脱リン酸化酵素である Slingshot を京都大学の丹羽、上村らとの共同研究によって同定した。これらの成果によってコフィリンの正と負の活性調節の両面における細胞内の働きを解析することが可能となった。LIMK

と Slingshot の細胞における機能解析を進め、LIMK, Slingshot によるコフィリンの活性制御が神経突起伸張・退縮、細胞質分裂に働くことや、細胞の移動に LIMK が必要であり、Slingshot は細胞の方向性を持った移動に必要であることを明らかにした。また、p38MAPキナーゼから LIMK に至る新たなシグナル伝達経路を発見し、VEGF による血管新生に LIMK が促進的に働くことを明らかにした。しかし、コフィリンは、アクチン線維に対して切断活性と脱重合活性を持ち、アクチン線維の崩壊に働く場合と新たな重合末端の形成によるアクチン重合の促進に働く場合があると考えられている。また、コフィリンは単量体(G-)アクチンにも結合活性を持つことからアクチンの隔離蛋白質としても機能していると考えられている。そのため細胞応答におけるアクチン骨格へのコフィリンの働きは様々な説明が可能となり、実際の作用機序は不明な点が多く残されている。これまでに明らかにしたコフィリンの細胞における働きの作用機序を理解するためには、生細胞内におけるコフィリンによるアクチンの脱重合、切断活性の定量的で時空間的な解析が必要であった。そのために、分割した蛍光蛋白質が再会合して蛍光を発色することを原理とし、Yellow Fluorescence Protein (YFP) を分割してコフィリンとアクチンにそれぞれを付加してコフィリンとアクチンの結合依存的に YFP 分子が再構成され蛍光を生じるプローブを開発した。このプローブは一度 YFP が会合すると YFP の安定した構造により再解離せず不可逆的なプローブであったため、この性質を利用して LIMK の阻害剤の探索を着想した。この方法とは別に、宮脇博士らによってサンゴ由来の蛍光蛋白質から開発された、蛍光の発光と消光が繰り返し可能な Dronpa をアクチンに付加した Dronpa-アクチンを用いて、コフィリンの活性変化におけるアクチンの動態を定量的に解析する方法を確立した。これらの背景から、これまで作製した新たな解析手法をさらに発展させ、LIMK 阻害剤の探索とコフィリンの機能解析を行なうことを計画した。

2. 研究の目的

本研究は、これまでの研究を進展させ、コフィリンとアクチンの結合をモニターする蛍光プローブを用いた LIMK 特異的阻害剤の探索と、細胞が移動する先端のラメリポディアにおけるアクチン動態の変化を生細胞内で時空間的に解析し、コフィリンの活性制御の役割を解明することを目的とする。得られた LIMK 阻害剤は、その効果を確認し、細胞移動や癌細胞の運動性に対する効果を検証する。このような有用物質の探索を行う一方、YFP-アクチンを用いて細胞内のアクチンダイナミクスを可視化し、Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 法を用いたアクチン線維のダイナミクスの定量的な解析方法と Dronpa-アクチンを用いた Fluorescence Decay

After Photoactivation (FDAP) 解析による遊離アクチン動態の定量的な解析方法によりコフィリンのアクチン構造に対する時空間的な作用とリン酸化制御の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 分割 YFP プローブを用いた LIMK の阻害剤の探索

これまでに作製したコフィリンとアクチンの結合を検出する分割 YFP プローブが不可逆的であることを利用し、LIMK の特異的阻害剤の探索を行なった。コフィリンとアクチンの分割 YFP プローブ、LIMK をバキュロウイルスによる昆虫細胞の発現系で組換え蛋白質として大量精製した。精製した LIMK により *in vitro* でコフィリン分割 YFP プローブをリン酸化させ、その後、アクチン分割 YFP プローブと混合して発色させた場合の蛍光発色の抑制度から LIMK 活性を測定した。薬剤スクリーニングは、96 穴プレート上でコフィリン分割 YFP プローブを LIMK によってリン酸化する時に化合物を共存させ、その後、アクチン分割 YFP プローブを加えた。蛍光光度計によって輝度を測定し、LIMK の活性を阻害しコフィリンとアクチンの結合依存的な YFP の再構成が起きて輝度を上昇させる化合物を選別した。この方法は、YFP が蓄積されるため、非常に高感度に測定できる特徴を持つ。

(2) FRAP 法によるコフィリンのラメリポディアにおけるアクチンダイナミクス制御の解析

移動する細胞の先端端であるラメリポディア内では、アクチン線維が先端で重合して内側へと送られていくレトログレードフローが観察される。神経芽腫 N1E-115 細胞に低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーである Rac の活性型を発現させると大きく安定したラメリポディアを形成させることができる。同時に YFP-アクチンを発現させてラメリポディア内のアクチン線維を可視化し、共焦点顕微鏡を用いた関心領域 (ROI) のレーザー光による蛍光退色 (Photobleach) を行なってレトログレードフロー速度を測定した (Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 法)。同時に、ラメリポディアの長さを測定した。上記の条件で、LIMK1 やコフィリンの過剰発現、LIMK1 の発現抑制による効果を測定した。

(3) LIMK 阻害剤によるアクチン骨格の再構築、癌細胞の移動における効果の検証

LIMK 特異的阻害剤の細胞における効果を検証するため、活性型 Rac と野生型 LIMK を共発現させた N1E-115 細胞のラメリポディア内のアクチンレトログレードフロー速度を指標に効果を測定した。LIMK の活性はレトログレードフロー速度の変化により検出するこ

とが可能である。この条件で、新たに発見した LIMK 阻害剤(MD-018)を添加し、レトログレードフロー速度の回復率から阻害剤の効果を検証した。また、高浸潤性の乳癌細胞である MDA-MB-231 細胞についてトランスウェルを用いた血清に対する走化性実験により癌細胞の移動性に対する MD-018 の効果を検証した。

(4) Dronpaを用いたアクチン骨格ダイナミクスのコフィリンによる制御の解析

蛍光発色と退色を可逆的に変換できる蛍光蛋白質 Dronpa をアクチンに融合し、細胞内の遊離アクチン (G-アクチン) 濃度を測定する方法を確立した (図 7)。この方法は、ある特定の領域のアクチン分子を発色させ、そのアクチン分子の拡散速度から細胞内の G-アクチン濃度を生細胞内で測定するものである。この方法を用いてコフィリンを不活性化させた細胞における G-アクチン濃度の変化を測定し、ラメリポディア形成におけるコフィリンの機能を解析した。

4. 研究成果

(1) LIMK の特異的阻害剤の発見

分割 YFP によるコフィリンとアクチンの結合をモニターするプローブと LIMK を昆虫細胞より大量生成し、LIMK 阻害剤のハイスループットスクリーニング方法を確立した (図 1, 2)。

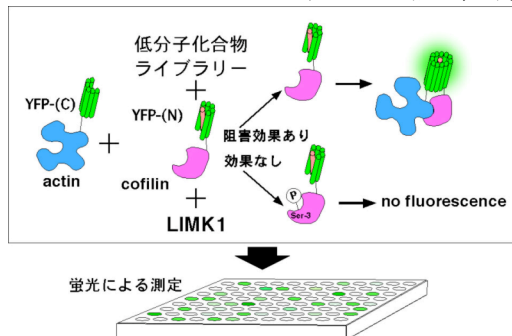


図 1. 分割 YFP によるハイスループット LIMK 阻害剤スクリーニング法

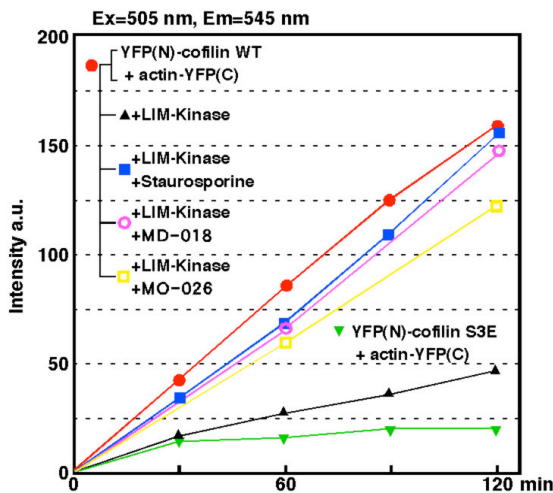


図 2. 昆虫細胞発現系を用いて精製したアクチンとコフィリンの分割 YFP プローブを混合し、YFP の発色を蛍光プレートリーダーによって検出した。●; 野生型コフィリンとアクチン分割 YFP プローブの場合、▼; 野生型コフィリンを LIM キナーゼによってリン酸化した後アクチンと混合した場合、野生型コフィリンを LIM キナーゼによってリン酸化する時に特異性の低いキナーゼ阻害剤である Staurosporine (■) を $1\mu\text{M}$ 又は阻害剤 2 種 (○; MD-018, □; MO-026) を $5\mu\text{M}$ 共存させ、その後、アクチンと混合した場合、▼; 不活性型コフィリン (S3E) とアクチン分割 YFP プローブの場合

これを用いて約 1000 種類の低分子化合物をスクリーニングした結果、LIMK 活性を阻害する 2 種類の化合物 MD-018 と MO-026 を同定することに成功した (図 2)。これらの阻害効果を測定した結果、LIMK1 に対する IC50 は各々約 $0.4\mu\text{M}$ と $5.5\mu\text{M}$ であった (表 1)。その他の LIMK ファミリー (LIMK2, TESK1, TESK2) に対する効果と、他のいくつかのキナーゼに対する効果を測定した。その結果、LIMK ファミリーの中でも LIMK1 及び LIMK2 に特に効果が強く、TESK1, TESK2 には効果が弱く、その他の検討したキナーゼには阻害効果が見られなかった (表 1)。この結果は、これらの阻害剤が LIMK1, LIMK2 に対して特異特異性が高いことを示している。これらは LIMK の働きをさらに詳細に解析する有効なツールとなるだけでなく、癌転移や炎症の抑制剤のシーズとして医療に応用できる可能性を持つ。

Kinase	MD-018	MO-026 (μM)
LIMK1	0.410	5.519
LIMK2	0.543	0.985
TESK1	15.426	14.746
TESK2	10.105	48.121
ROCK	>20	>20
PAK3	>20	>20
PKC α	>20	>20
CaMK1	>20	>20

表 1. MD-018 と MO-026 の LIMK ファミリーとその他キナーゼに対するキナーゼ阻害効果 (IC50)

(2) コフィリンによるラメリポディアのアクチンダイナミクスの制御

神経芽腫 N1E-115 細胞に活性型 Rac を発現させラメリポディアを形成させた細胞に対して LIMK1 を過剰発現させた場合、LIMK1 と常時活性型コフィリン S3A を発現させた場合にラメリポディア内のレトログレードフロー速度とラメリポディアの長さを測定した (図 4)。その結果、LIMK1 の過剰発現によりフロー速度は約 50%低下し、長さが 30%伸長した。これはコフィリン S3A との共発現によって回復した。さらに、内在性の LIMK を発現抑制して同様の測定を行なったところ、レトログ

レードフロー速度は速くなり、長さが短くなった (図 4B, C)。

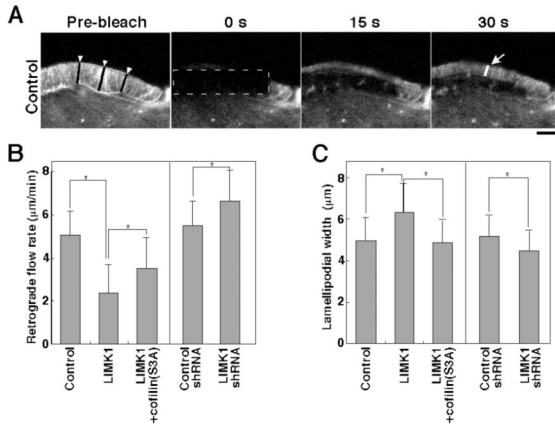


図 4. A. N1E-115 細胞に活性型 Rac と共に YFP-アクチンを発現させてラメリポディアを可視化し、Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 解析によりアクチンレトログレードフロー速度 (30 秒、矢印の白バーの長さ) とラメリポディアの長さ (Pre-bleach、矢頭の 3ヶ所の黒バーの長さの平均値) を計測した。Scale Bar: 5 µm. B. A の条件に LIMK1、活性型コフィリンを発現させた場合と LIMK1 を shRNA によって発現抑制した場合のラメリポディア内のレトログレードフロー速度とラメリポディアの長さの測定値。*, P<0, 0001

これらの結果から、ラメリポディア内のレトログレードフローにはコフィリンの活性が必要であり、LIMK1 はレトログレードフローを抑制しラメリポディアの長さを伸長させる働きがあることが明らかとなった。この結果から、LIMK1 がコフィリンをリン酸化して不活性化することが細胞内でアクチン線維の伸長に寄与することが強く示唆された。

(3) LIMK 阻害剤のアクチン骨格の再構築、癌細胞の移動における効果

① LIMK の阻害剤スクリーニングにより発見された阻害剤のうち効果の強かった MD-018 について細胞内の LIMK1 の働きを抑制する効果を測定した。神経芽腫 N1E-115 細胞に活性型 Rac を発現させてラメリポディアを形成させ、さらに LIMK1 を過剰発現させレトログレードフローを抑制した細胞に対して MD-018 を添加した結果、0.3 µM 以上で有意にレトログレードフロー速度が回復した。この結果から、MD-018 は細胞内で LIMK1 を阻害することを確認した (図 5)。

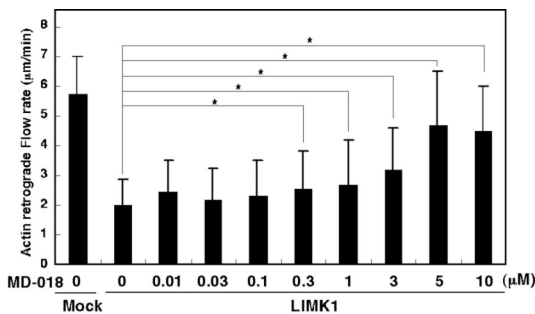


図 5. MD-018 の細胞内における LIMK1 の活性阻害効果。N1E-115 細胞に活性型 Rac と共に YFP-アクチンを発現させてラメリポディアを可視化し、LIMK1 を過剰発現させた細胞に対して MD-018 を濃度を変えて添加しレトログレードフロー速度を測定した。*, P<0, 0001

② 高浸潤性の乳癌細胞株である MDA-MB-231 細胞を用いて、トランスウェルを用いた血清に対する走化性実験を行なった。その結果、3 µM 以上で顕著に移動を抑制することが明らかとなった (図 6)。この結果から、MD-018 は LIMK1 を阻害することで癌細胞の移動を抑制することが明らかとなった。この結果から、MD-018 の癌転移抑制効果が期待される。

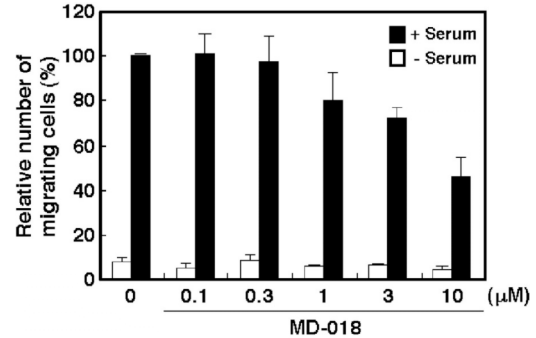


図 6. 乳癌由来 MDA-MB-231 細胞の移動に対する MD-018 の効果。MDA-MB-231 細胞をトランスウェル上に培養し、下層に血清を添加して下層への移動を 3 時間誘導した。MD-018 の各濃度の条件でトランスウェルの下側に移動した細胞数を計測し、コントロール (0 µM) に対する相対値 (%) で示した。

(4) コフィリンのアクチン骨格ダイナミクスにおける役割の解析

可逆的に蛍光の退色と発色が可能な光活性化蛍光蛋白質である Dronpa を用いてアクチン分子のダイナミクスを生細胞内で定量的に解析することを試みた (図 7)。

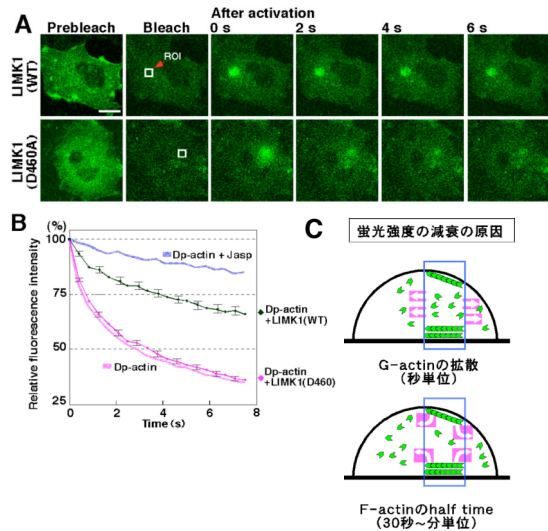


図 7. Dronpa を用いた FDAP 解析による生細胞内の G-アクチン濃度の測定。A. COS 細胞に Dronpa-アクチン (Dp-actin) を発現させ (Prebleach)、細胞全体を退色後 (Bleach)、ROI 領域を光活性化してその

後の変化を観察した。上段；野生型 LIMK1 を過剰発現させコフィリンを不活性化した場合、下段；不活性化型 LIMK1 (D460A) 変異体を発現させた場合。B. 光活性化した ROI 内の蛍光強度の時間変化。Dp-actin+Jasp; アクチン脱重合阻害剤 Jasplakinolide を添加した場合、Dp-actin; Dp-actin のみ発現させた場合。コフィリンの不活性化によって減衰速度が低下する。C. 蛍光減衰の原因。G-アクチンは秒の単位で ROI より拡散し、F-アクチンは分の単位で拡散するため、Dp-actin の発色直後の ROI 内の蛍光減衰は G-アクチン量に比例する。

Dronpa-アクチンを発現させた COS 細胞に対して、全体を bleach 後、局所の関心領域 ROI を光活性化し、その後の ROI 内の蛍光量の減衰を測定した (図 7A)。この減衰曲線は G-アクチンの拡散と線維状アクチン (F-アクチン) のターンオーバーに依存するが、F-アクチンのターンオーバー速度は分の単位で遅いため (図 7C)、数秒間の減衰は G-アクチンの拡散によることが明らかとなった (Fluorescence Decay After Photoactivation (FDAP) 解析)。LIMK1 を過剰発現させたコフィリンの不活性化細胞では、この短時間の蛍光減衰量が極端に低下し、細胞内 G-アクチン濃度が 40%以上低下していることが明らかとなった (図 7B)。また、コフィリンの不活性化による刺激依存的なラメリポディア形成の阻害について蛍光ラベルしたアクチンの顕微注入により解析した結果、ラメリポディア形成阻害の原因は細胞内 G-アクチン濃度の低下によることが明らかとなった。これらの結果より、刺激依存的なラメリポディア形成において、コフィリンは切断活性によるプラス端生成ではなく、G-アクチンの生成と供給によって寄与していることを実験的に初めて証明した (図 8、文献⑥)。

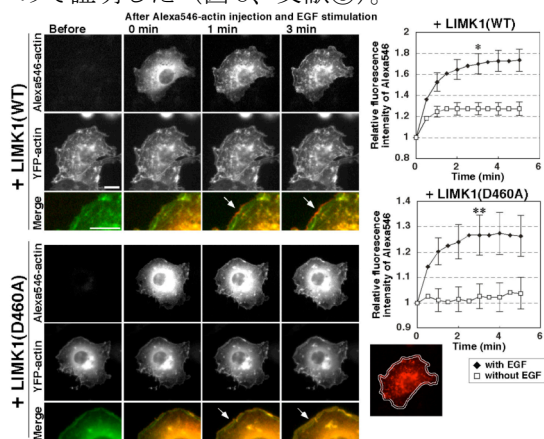


図8. 刺激依存的なラメリポディア形成時に顕微注入した Alexa546-アクチンの重合。野生型 LIMK1 と不活性化型 LIMK1 を YFP-アクチンと共に発現させ、EGF 刺激直後に Alexa546 でラベルしたアクチンを顕微注入し継時観察を行なった。野生型 LIMK1 (コフィリンの不活性化) と不活性化型 LIMK1 発現細胞どちらも EGF 刺激依存的に Alexa546-アクチンが周辺のラメリポディア形成部位に重合した (左パ

ネル)。周囲 (右下写真内の細胞周辺領域) の蛍光輝度の変化を定量した (右グラフ)。ラメリポディア形成時のアクチン重合促進はコフィリンの切断活性に依存しないことを表している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Chiba S., Ikeda M., Katsunuma K., Ohashi K., and Mizuno K., MST2- and Furry-Mediated Activation of NDR1 Kinase Is Critical for Precise Alignment of Mitotic Chromosomes., *Curr. Biol.*, 19, 675-681 (2009) 査読有
- ② Kurita S., Watanabe Y., Gunji E., Ohashi K., and Mizuno K., Molecular dissection of the mechanisms of substrate recognition and F-actin-mediated activation of cofilin-phosphatase slingshot-1., *J. Biol. Chem.*, 283, 32545-32552 (2008) 査読有
- ③ Kato A., Kurita S., Hayashi A., Kaji N., Ohashi K., and Mizuno K., Critical roles of actin-interacting protein 1 in cytokinesis and chemotactic migration of mammalian cells., *Biochem. J.*, 414, 261-270 (2008) 査読有
- ④ Horita Y., Ohashi K., Mukai M., Inoue M. and Mizuno K., Suppression of the invasive capacity of rat ascites hepatoma cells by knockdown of Slingshot or LIM kinase., *J. Biol. Chem.*, 283, 6013-6021 (2008) 査読有
- ⑤ Kurita S., Gunji E., Ohashi K., and Mizuno K., Actin filaments-stabilizing and -bundling activities of cofilin-phosphatase Slingshot-1. *Genes Cells* 12, 663-676 (2007) 査読有
- ⑥ Kiuchi T., Ohashi K., Kurita S., and Mizuno K., Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers., *J. Cell Biol.* 177(3), 465-476 (2007) 査読有
- ⑦ Endo M., Ohashi K., and Mizuno K., LIM kinase and slingshot are critical for neurite extension., *J Biol Chem.* 282, 13692-13702 (2007) 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① Otsuki M., Ikebe C., Ohashi K., and Mizuno K., Phosphorylation of Slingshot-1 by Polo-like kinase-1., The 48th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, San Francisco, 2008. 12.13-12.17
- ② 池田真教、千葉秀平、勝沼功吉、大橋一正、水野健作、MST2, MST3 による NDR1 の活性制御と細胞分裂の制御、BMB2008 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会・合同大会、神戸、2008.12.9-12.12
- ③ 林文、黒沢豪、梶紀子、大橋一正、鎌倉幸子、住本英樹、水野健作、哺乳類細胞の対称分裂における紡錘体位置決定タンパク質の局在とアクチン骨格の関与、BMB2008 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会・合同大会、神戸、2008.12.9-12.12
- ④ 永井友朗、木内泰、大橋一正、水野健作、ラメリポディア形成過程における細胞内 G-アクチン濃度のタイムラプスイメージング、BMB2008 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会・合同大会、神戸、2008.12.9-12.12
- ⑤ Ohashi K., Kiuchi T., Nagai T., and Mizuno K., Analysis of the regulation of actin cytoskeleton dynamics using Dronpa, a photochromic fluorescent protein, MHS2008 (2008 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science)、名古屋、2008.11.6-11.9
- ⑥ Ohashi K., Horita Y., and Mizuno K., Cofilin phospho-regulation plays a critical role in tumor cell motility and invasion., 第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、2008.10.28-10.30
- ⑦ Ohashi K., Akatsuka J., Miyajima K., Endo M., and Mizuno K., Roles of cofilin phosphorylation in neurite outgrowth and dendritogenesis., 第 31 回日本神経科学大会ワークショップ、2008.7.9-7.11、東京
- ⑧ Miyajima K., Akatsuka J., Ohashi K., and Mizuno K., LIM-kinase is required for BDNF-induced dendritogenesis., 第 31 回日本神経科学大会、2008.7.9-7.11、東京
- ⑨ Ohashi K., Horita Y., Kiuchi T., and Mizuno K., Roles of cofilin phospho-regulation in tumor cell migration and invasion., 第 60 回日本細胞生物学会大会、横浜、2008.6.29-7.1
- ⑩ Otsuki M., Kaneto K., Ikebe C., Ohashi

K., and Mizuno K., Phosphorylation of Slingshot-1 by Polo-like kinase-1., 第 60 回日本細胞生物学会大会、横浜、2008.6.29-7.1

- ⑪ Kitatani K., Horita Y., Ohashi K., and Mizuno K., Involvement of cofilin/ADF, Slingshot and LIM-kinase in invadopodium formation of tumor cells., 第 60 回日本細胞生物学会大会、横浜、2008.6.29-7.1
- ⑫ Tsuji T., Ohta Y., Ohashi K., and Mizuno K., Identification of Rho-GEFs that mediate Dishevelled-induced RhoA activation., 第 60 回日本細胞生物学会大会、横浜、2008.6.29-7.1,
- ⑬ 辻拓史、太田裕作、大橋一正、水野健作、Wnt-PCP 経路による神経突起退縮に關与する RhoA-GEF の同定、日本生化学会東北支部例会、盛岡、2008.5.17

[その他]

ホームページ等

http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/biomolecular/ts_ohashi.html

http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno_lab/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 一正 (Ohashi Kazumasa)

東北大学・大学院生命科学研究所・准教授
研究者番号：10312539