

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06838

研究課題名(和文) アクチン細胞骨格制御における蛋白質の構造ダイナミクスとdisorder領域の役割

研究課題名(英文) Role of protein conformational dynamics and disorder regions in the regulation of the actin cytoskeleton

研究代表者

坂根 亜由子 (SAKANE, Ayuko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授

研究者番号：60509777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、研究代表者は、Junctional Rab13-binding protein (JRAB)の活性型 Rab13低分子量G蛋白質との結合を介した1分子構造ダイナミクスがアクチン細胞骨格の時空間制御に関与することを明らかにしてきた。本研究では、さらにJRABのN末端とC末端に挟まれた中央の広範囲にわたるdisorder領域が、アクチンやアクチン結合蛋白質と結合するだけでなく、安定的な構造を形成しない特性を活かしてJRABとその結合蛋白質群の複合体の構造ダイナミクスを引き起こすことでアクチン細胞骨格の多面的制御機構において中心的な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞の運動、接着、形態形成等の細胞機能においてJRABあるいはJRABとその結合蛋白質群との複合体の構造ダイナミクスが、如何にしてアクチン細胞骨格を多面的に制御するのかを明らかにすることを目的とした。近年、蛋白質の構造において安定的な構造を形成しないdisorder領域の機能が注目されているが、本研究では、JRABが有するdisorder領域がその本体であることを明らかにした点に学術的意義がある。得られた成果が蛋白質複合体による細胞機能の制御機構の破綻によって引き起こされる疾患の病態の解明に繋がることも十分予想され、医学・医療分野への大きな波及効果が期待される。

研究成果の概要(英文)： We have previously shown that the single molecule conformational dynamics of the multi-domain protein, Junctional Rab13-binding protein (JRAB), is involved in the spatiotemporal regulation of the actin cytoskeleton. Recently, the function of the disorder region, which does not form a stable structure in the protein structure, has attracted much attention. JRAB also has an extensive disorder region between the N- and C-termini, involvement of the region in functional expression is expected. Therefore, in this study, we attempted to elucidate the multifaceted regulatory mechanism of the actin cytoskeleton in terms of dynamics of JRAB and JRAB-JRAB binding protein complexes and novel roles of the disorder region.

研究分野：生化学

キーワード：アクチン細胞骨格制御 蛋白質の構造ダイナミクス Disorder領域

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに、研究代表者の所属する研究室では、細胞内小胞輸送の制御系として知られる Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質のメンバーである Rab13 の標的蛋白質として Junctional Rab13-binding protein (JRAB) を同定している。JRAB は、N 末端側に calponin-homology (CH) ドメイン、LIM ドメイン、C 末端に coiled-coil (CC) ドメインを持つマルチドメイン蛋白質である。発見当初、研究分担者の佐々木は、JRAB が Rab13 と共に細胞間接着分子群の輸送を介して上皮細胞間接着形成を制御することを見出していたが、その後、研究代表者は、JRAB がアクチン細胞骨格制御にも関与することを明らかにした。具体的には、JRAB の LIM ドメインと N 末端と C 末端の間に挟まれた disorder 領域 (MID ドメイン) の一部分がアクチン線維と直接結合し、それぞれアクチン線維の脱重合の抑制およびアクチン線維の束化に関与することを見出した。さらに、CH ドメインと MID ドメインは、それぞれアクチン結合蛋白質である Filamin や Actinin と結合することも明らかにした。また、研究代表者は、JRAB が N 末端側の LIM ドメインと C 末端側の CC ドメインで分子内結合することで closed form をとり、Rab13 との結合に依存して分子内結合が解除されて open form へと構造を変化させるという構造変化モデルを提唱し、生化学とバイオインフォマティクスを組み合わせた手法により、その実体を明らかにしてきた。さらに、その成果をもとに、常に open form あるいは closed form をとる 2 種の JRAB の構造変異体を創出し、各々が異なる場所で異なるアクチン細胞骨格制御を示すことを見出した。加えて複数の細胞が細胞間接着を介して集団を維持しながら移動する集団的細胞運動を検証モデルとして、生化学および細胞生物学にライブイメージング、コンピュータサイエンスやバイオメカニクスを組み合わせた学際的研究を展開し、効率の良いバランスのとれた細胞集団の動きの実現には JRAB の時空間的構造変化が必要であることも証明している。以上の研究成果の蓄積により、JRAB の各ドメインの役割および細胞機能における JRAB の構造ダイナミクス的重要性を示すことができた。しかし、JRAB あるいは JRAB とその結合蛋白質群との複合体の構造ダイナミクスがどのように統合的に調節され、それぞれ closed form および open form の JRAB に特異的なアクチン細胞骨格制御に至るのかは未だ明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞の運動、接着、形態形成等の細胞機能において JRAB あるいは JRAB とその結合蛋白質群との複合体の構造ダイナミクスが、如何にしてアクチン細胞骨格を多面的に制御するのかを JRAB の disorder 領域の新規役割といった観点から明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

最近では、液-液相分離が普遍的な分子調節機構であるという見方が出てきており、そこでの disorder 領域の重要性が多数報告されている。実際にこれまでの研究代表者の研究成果から JRAB も disorder 領域を介して液滴を形成し、Rab13 と同様、JRAB に結合する Rab8 とともにオルガネラ膜変形に寄与することが明らかになっている。そこで、本研究では、JRAB が形成する液滴のアクチン細胞骨格の多面的制御機構における役割を明らかにするため、in cellulo の実験系を用いた細胞生物学的解析に加え、in vitro の再構成系で高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) を用い

た JRAB 液滴の性状や JRAB 液滴によるアクチン線維束の形成過程の解析(名古屋大学 内橋貴之先生との共同研究)や電子顕微鏡解析による JRAB あるいは JRAB とその結合蛋白質複合体が形成するアクチン線維束の質的解析(岡山大学 竹居孝二先生、山田浩司先生との共同研究)を行なった。

#### 4 . 研究成果

生命現象を支える細胞の運動、接着、形態形成等の細胞機能では、アクチン細胞骨格がダイナミックに制御される必要がある。これまで、研究代表者は、マルチドメイン蛋白質である JRAB の 1 分子構造ダイナミクスがアクチン細胞骨格の時空間制御に関わることを明らかにしてきた。しかし、各ドメインの機能活性が JRAB の構造変化によってどのように調節され、構造特異的な細胞機能を発現するのかについての統合的な理解には至っていない。最近、蛋白質の構造において安定的な構造を形成しない disorder 領域の機能が注目を集めている。JRAB も N 末端と C 末端に挟まれた広範囲に disorder 領域を有しており、その構造特異的な機能発現への関与が予想される。そこで、本研究では、JRAB の構造ダイナミクスの統合的理解と JRAB の disorder 領域の新規役割といった観点から、アクチン細胞骨格の多面的制御機構の解明を目指した。Disorder 領域を有する蛋白質の多くは液-液相分離によって液滴を形成することが知られる。実際、研究代表者は、JRAB が disorder 領域に起因する液-液相分離によって液滴を形成し、細胞内分子輸送に関わるリサイクリングエンドソームの膜変形を誘導し、その機能を調節することを明らかにしている。本研究では、細胞生物学的解析、生化学的解析に加えて電子顕微鏡、HS-AFM、全反射照射蛍光顕微鏡(TIRF)-AFM を用いた解析を組み合わせたアプローチでアクチン細胞骨格制御機構においても JRAB 液滴が重要な役割を担っていることを示唆する研究成果が得られた。本研究では、JRAB 液滴がアクチン線維束形成において促進的に働くことを明らかにし、さらに、JRAB 液滴をハブとして JRAB と Rab13、Actinin や Filamin といった JRAB 結合蛋白質群が協調し、アクチン線維束の質的变化を時空間的に制御している可能性を提示することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 #Sakane A, Yano T, Uchihashi T, Horikawa K, Hara Y, Imoto I, Kurisu S, Yamada H, Takei K and #Sasaki T. (#Corresponding author)	4. 巻 4
2. 論文標題 JRAB/MICAL-L2 undergoes liquid-liquid phase separation to form tubular recycling endosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 551-551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02080-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yano TA, Kajisa T, Ono M, Miyasaka Y, Hasegawa Y, Saito A, Otsuka K, Sakane A, Sasaki T, Yasutomo K, Hamajima R, Kanai Y, Kobayashi T, Matsuura Y, Itonaga M, Yasui T	4. 巻 12
2. 論文標題 Ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein using large gold nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 1060-1060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-05036-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakakibara S, Sakane A, Sasaki T, Shinohara M, Maruo T, Miyata M, Mizutani K, Takai Y	4. 巻 298
2. 論文標題 Identification of lysophosphatidic acid in serum as a factor that promotes epithelial apical junctional complex organization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 102426-102426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102426.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Maruo T, Mizutani K, Miyata M, Kuriu T, Sakakibara S, Takahashi H, Kida D, Maesaka K, Sugaya T, Sakane A, Sasaki T, Takai Y, Mandai K	4. 巻 299
2. 論文標題 s-Afadin binds to MAGUIN/Cnksr2 and regulates the localization of the AMPA receptor and glutamatergic synaptic response in hippocampal neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 103040-103040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.103040.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyamura S, Oe R, Nakahara T, Koresawa H, Okada S, Taue S, Tokizane Y, Minamikawa T, Yano TA, Otsuka K, Sakane A, Sasaki T, Yasutomo K, Kajisa T, Yasui T	4. 巻 13
2. 論文標題 Rapid, high-sensitivity detection of biomolecules using dual-comb biosensing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 14541-14541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-41436-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hara Y, Ichiraku A, Matsuda T, Sakane A, Sasaki T, Nagai T, Horikawa K	4. 巻 7
2. 論文標題 High-affinity tuning of single fluorescent protein-type indicators by flexible linker length optimization in topology mutant	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 705-705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-024-06394-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 坂根亜由子、佐々木卓也
2. 発表標題 The role and significance of JRAB/MICAL-L2-mediated molecular complex formation and dissociation in the regulation of membrane structure and function
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐々木 卓也  (SASAKI Takuya)  (40241278)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (医学域)・教授   (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------