

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22616004

研究課題名(和文) 機械刺激依存的アクチン骨格再構成を支えるダイナミンナノクリップの役割

研究課題名(英文) The relationship between actin bundling by dynamin/cortactin complex and stretch-activated cation channel on actin cytoskeleton

研究代表者

山田 浩司 (YAMADA HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80325092

研究成果の概要(和文)：

細胞膜の変形を認識する伸展刺激依存性機械受容チャネルの細胞内アクチン動態への関与を調べた。細胞遊走の際に形成されるラッフル膜に機械受容チャネル由来のカルシウムイオンの流入が見られた。がん細胞株の機械受容チャネルをRNAi法により発現抑制すると、細胞内カルシウム濃度の上昇が顕著に低下すると共に、細胞遊走能が減少した(未発表)。従って、チャネルを介したカルシウム流入と遊走に必要なラッフル膜形成との関連が示唆された。ダイナミン・コルタクチンもまたラッフル膜形成に必要なタンパクである。ダイナミン・コルタクチン複合体によるアクチン制御機構を明らかにした。ダイナミン・コルタクチン複合体は、数本のアクチン線維をクリップし、アクチン線維の安定性を促進する。このアクチン制御機構は、神経細胞突起伸長、がん細胞の遊走に必要であった。これら結果をまとめ神経突起伸長における重要性につき、J. Neuroscience誌に発表した。得られた知見は、神経再生、がん細胞の転移治療の基盤になると期待される。

研究成果の概要(英文)：

The function of stretch-activated cation channel on actin dynamics was investigated. Calcium ion concentration in the ruffle membrane was increased during cell migration. Knockdown of the channel in cancer cell line resulted in marked reduction of both calcium influx via the channel and serum-stimulated ruffle formation, which were required for cell migration. These results suggest that stretch-activated cation channel in cancer cell is involved in cell migration possibly by regulating actin dynamics. Furthermore, we identified the function of dynamin/cortactin complex in the regulation of actin dynamics. The dynamin/cortactin complexes bundled several actin filaments and the bundling stabilized actin filaments. The actin bundling by dynamin/cortactin complex was necessary for formation of growth cone filopodia and cell migration. These findings might be crucial for the study for neuronal regeneration and cancer cell migration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：メカノバイオロジー

キーワード：アクチン、ダイナミン

1. 研究開始当初の背景

我々の体を構成する細胞は、成長や移動、或いは食作用などの場面で、ダイナミックに形態を変化させ、その細胞機能を発揮する。細胞膜の形態変化には、アクチン細胞骨格の再構成が必須である。しかしながら、細胞膜のダイナミックな動きが、如何にしてアクチン再編成を制御するかについては明らかにされていない。我々は、細胞膜形態変化に伴う細胞外からの Ca^{2+} 流入がアクチン再構成に大きく関わることを見だし、一方で、アクチンの再構成には、ダイナミンナノクリップによるアクチン線維の束化が不可欠であることを見いだした。これらが、どのように相関して細胞機能を発揮するのかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、細胞の形態変化における機械受容チャンネルやダイナミンを介したアクチン再構成機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞およびがん細胞を用いた機械受容チャンネルの欠失によるアクチン骨格再構成の変化を調べる。

(2) ダイナミン・コルタクチン複合体によるアクチン細胞骨格制御機構を調べる。

の小課題に沿って生化学的、細胞生物学的手法を用いて検討する。

4. 研究成果

本研究では、細胞膜の動きを認識する伸展刺激依存性の機械受容チャンネルが、神経細胞の突起及びがん細胞の遊走時の細胞先端部に局在することを発見した。さらに、がん細胞の遊走はチャンネルの発現減少により顕著に抑制されることも見いだした。今後、詳細なチャンネルによる遊走制御機構を解析することにより、新たな創薬の標的が明らかになると考えられる。

また、ダイナミン・コルタクチン複合体によるアクチン線維安定化機構を世界で初めて明らかにした。ダイナミンは、長らくアクチン制御に働くことが示唆されていたが、その実体は不明であった。ダイナミン・コルタクチンは、複合体として、数本のアクチン線維を束化しアクチン線維の安定性を促進する。この機構は、神経細胞の突起伸長、がん細胞の遊走に重要である。これら発見により、ダイナミンを標的とした抗がん剤の開発が可能になった。平成24年度、「ダイナミン阻害剤の抗がん剤としての応用」として、特許申請を2点行った。このように、本研究で得られた結果は、神経再生分野、制がん分野に重要な知見を与えるものと考えられ、その波及効果は大きい。今後、機械受容チャンネルから細胞内に伝えられたシグナルがどのようにしてアクチン制御に関わっていくのか、さらにダイナミン・コルタクチンの機能に関わっていくのかを明らかにしていく予定である。

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4件)

- ① Yamada H, Abe T, (他10人、1番目) : Stabilization of actin bundles by a Dynamin 1 / Cortactin ring complex is necessary for growth cone filopodia. 査読有 33, 4514-4526, 2013, DOI 10.1523/JNEUROSCI.2762-12.2013.
- ② Ueki H, Watanabe M, (他11人、9番目) : A novel gene expression system for detecting viable bladder cancer cells. Int. J. Oncol. 査読有, 41, 135-140, 2012, DOI: 10.3892/ijo.2012.1417
- ③ Hirata T, Watanabe M, (他8人、5番目) : REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector as a potentially effective therapeutic agent for bladder cancer. Int. J. Oncol. 査読有, 41, 559-564, 2012, DOI: 10.3892/ijo.2012.1503
- ④ Zhang, K., Watanabe, M, (他17人、12番目) : Expression pattern of REIC/Dkk-3 in various cell types and the implications of the soluble form in prostatic acinar development. Int. J. Oncol. 査読有, 37, 1495-1501, 2010 DOI: 10.3892/ijo_00000802

[学会発表] (計8件)

- ① 竹居 孝二、Dynamin GTPase / Cortactin ring complex is a mechanochemical device stabilizing actin bundles、日

本生体エネルギー研究会 第38回討論
会、平成24年12月23日、岡山大学
薬学部 (岡山)

- ② 岡崎 奈奈、Dynamin を標的にした抗遊走、浸潤薬の開発、第85回日本生化学会大会、平成24年12月16日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡)
- ③ 山田 浩司、Phosphorylation of cortactin by PKC is a key factor for filopodia formation of growth cone、第85回日本生化学会大会、平成24年12月15日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡)
- ④ 竹居 孝二、PKC phosphorylation of cortactin is implicated in the regulation of actin dynamics、第51回米国細胞生物学会大会、平成23年12月4日、デンバー (米国)
- ⑤ 山田 浩司、成長円錐糸状仮足形成におけるCortactinのPKC α によるリン酸化とアクチン制御の可能性、第84回日本生化学会大会、平成23年9月22日、国立京都国際会館
- ⑥ 山田 浩司、Actin bundle formation by dynamin-cortactin complexes is important for filopodium stability of growth cones.、日本薬学会第131年会、平成23年3月30日
- ⑦ 竹居 孝二、Dynamin 1/Cortactin complex mechanically bundles actin filaments and supports the formation of filopodia.、第33回日本神経科学、第

53回日本神経化学、第20回日本神経回路学会合同年会、平成22年9月3日、神戸国際会議場

- ⑧ 山田 浩司、Amphiphysin 1 とN-WASPの動的な相互作用はアクチン重合を制御する、第33回日本神経科学、第53回日本神経化学、第20回日本神経回路学会合同年会、平成22年9月2日、神戸国際会議場

〔図書〕(計1件)

- ① Takei K, Yamada H, Abe T. Use of liposomes to study vesicular transport., Methods in Molecular Biology, 606, 531-542, 2010

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

- ① 名称: 「フルボキサミンを配合することを特徴とする分子標的型抗癌剤 (特に抗脳腫瘍治療薬剤: 第二医薬品用途)」

発明者: 道上宏之、林圭一郎、松井秀樹、山田浩司、竹居孝二、宮地弘幸、浅井章良
権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願2012-263317

出願年月日: 24年11月30日

国内外の別: 国内

- ② 名称: 「抗浸潤薬の新規スクリーニング法および抗浸潤剤」

発明者: 山田浩司、竹居孝二、道上宏之、松井秀樹、浅井章良
権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願2012-137489

出願年月日: 24年6月19日

国内外の別: 国内

〔その他〕

報道発表

- ① 「神経伸長制御の仕組みを解明」

山陽新聞、平成25年3月30日

- ② 「神経細胞をつなげる2種のたんぱく質」

読売新聞、平成25年4月8日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 浩司 (YAMADA HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授

研究者番号: 80325092

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者