

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23612002

研究課題名(和文)細胞内1分子計測法を用いた機械刺激によるSrcキナーゼ活性化機構の解析

研究課題名(英文) Dynamics of myristoylated amino-terminal domain of Src in the plasma membrane of mechano-stimulated cells studied by single molecule imaging

研究代表者

小林 剛 (KOBAYASHI, Takeshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40402565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：細胞が機械刺激を受けるとシグナル伝達分子であるSrcファミリーチロシンキナーゼ(SFK)が直ちに活性化することが知られている。しかし、その仕組みは不明な点が多い。本研究では、生きた細胞における1分子イメージングによってSFKのN末端の脂質修飾鎖プローブが接着斑近傍で機械刺激依存的・コレステロール依存的に一時的に停留することを見出した。SFK分子内のSH2やSH3ドメインを介した分子間相互作用の他に、細胞膜の脂質マイクロドメインと脂質鎖の相互作用によりSFK分子は接着斑近傍へ集積し、機械刺激によるSFK活性化が制御されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Src is a critical signaling molecule for mechanotransduction. Mechanical stimuli applied on the cell can induce a rapid Src activation, but it remains largely unknown how mechanical stimuli activates Src molecules. Here, we observed fluorescently labeled myristoylated amino terminus of Src in the plasma membrane of living cells at the single molecule level to examine the role of lipid moiety of the amino terminus of Src on its dynamics and activation. Most probes were observed to diffuse rapidly in the membrane, but that significant fraction of the molecules exhibited temporal immobilization. We also found that the immobilization of them occurred frequently in the proximity of focal adhesions (FAs), and that it was mechano- and cholesterol-dependent. These results suggest that lipid moiety of the amino terminus of Src may play a critical role in the dynamics and activation of Src molecules around FAs through the interaction with lipid micro domains of the plasma membrane.

研究分野：細胞生物物理学

科研費の分科・細目：メカノバイオロジー

キーワード：シグナル伝達 生物物理 1分子計測

1. 研究開始当初の背景

細胞は、常に、重力・張力・圧力・ずり応力などの機械刺激にさらされており、それらを感じて応答反応を示す。その際、細胞は、受けた機械刺激を感じてシグナル伝達系の情報に変換する。例えば、機械刺激受容チャネルによる  $Ca^{2+}$  スパイクや MAP キナーゼなどの各種キナーゼの活性化が起きる。中でも、non-receptor type のチロシン・キナーゼである Src を含めた Src family kinase (SFK) は、機械刺激を受けた直後に活性化し、かつ、第二波の活性化誘導も起き、様々な基質をリン酸化して各種シグナル伝達の中核を担い、形態変化・遊走・増殖といった応答反応へ大きな役割を果たしている (Wang Y et al., 2005)。機械刺激による直後の SFK 活性化は細胞外から力を伝える接着部位、そして、それに細胞骨格を介して連なる部位で起きるが、その活性化の仕組みの多くは不明である。SFK は、不活性化状態では分子内相互作用により閉じた構造をとり、C 末近くのリン酸化チロシン残基が脱リン酸化されると構造が開き、キナーゼが自己リン酸化し活性化する (図 1)。同時に、SH3 や SH2 などのドメイ

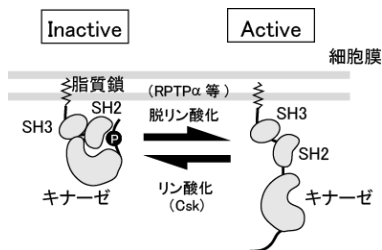


図 1 . Src の活性化制御 N 末の脂質鎖で細胞膜に局在化する Src は、不活性化状態では、C 末のリン酸化チロシン残基と SH2 の間の分子内相互作用で閉じた状態にあり、その残基が脱リン酸化されると、開状態になり活性化する。

ンを介して他の分子と相互作用する。一般的な SFK 活性化の最初のステップでは、SFK が RPTPalphα などのフォスファターゼと相互作用し脱リン酸化されること、や、局所的に SFK が集積すること、が必要であることが生化学的手法により明らかになっている。機械刺激による接着斑近傍での SFK の活性化も、同様に SFK 分子の集積やフォスファターゼとの相互作用の亢進により起きている可能性が考えられる。最近、p130Cas 分子が、直接、機械刺激により伸展し、SFK によるリン酸化を受けやすくなること、が澤田らにより明らかにされた (Sawada Y et al., 2006)。しかし、p130Cas は SFK の基質であり、機械刺激により誘導される SFK 活性化の最初のステップでの寄与は少ないと考えられる。SFK の細胞内の動態制御には、前述の SH3 や SH2 ドメインを介した分子間相互作用の他に、この N 末の脂質鎖による制御が重要で

あると考えられている。SFK 分子はこの脂質鎖で膜にアンカーしているが、実際、この脂質鎖を含む N 末部分が細胞膜のコレステロールに富む脂質マイクロドメイン (ラフト) にコンパートメント化されていることが示されている (Zacharias DA et al., 2002)。また、脂質マイクロドメインがフォスファターゼによる SFK の活性化に寄与している可能性が示唆され (Vacaresse N et al., 2008)、そして、他の接着斑近傍での integrin の細胞内取り込み・Rac 活性化制御などの様々な細胞活動に脂質マイクロドメインが寄与していることも明らかとなっている (del Pozo MA et al., 2004)。従って、脂質マイクロドメインを介して接着斑近傍で SFK やフォスファターゼの動態制御が行われ、機械刺激による SFK 活性化が起きている可能性が考えられる。しかし、従来の生化学手法やイメージング法では時間・空間分解能が十分でなく、機械刺激前後の接着斑近傍での SFK、フォスファターゼの動態やそれらの相互作用、そして SFK 活性化の解析は困難であった。

2. 研究の目的

細胞が機械刺激を受けると Src を含む SFK が直ちに活性化することが知られている。しかし、その仕組みは不明な点が多い。本研究は、「生きた細胞において SFK の各分子内ドメインを 1 分子イメージングし、機械刺激により誘導される SFK 活性化の仕組みを明らかにすること」を目的とした。特に、SFK 分子内の SH2 や SH3 ドメインを介した分子間相互作用の他に、N 末端の脂質修飾鎖による接着斑近傍への集積制御を解析し、脂質マイクロドメイン (ラフト) が接着斑近傍での機械刺激による SFK 活性化を制御している可能性に注目して解析を進めた。

3. 研究の方法

「機械刺激による SFK 活性化に、SH2 や SH3 ドメインを介した分子間相互作用の他に、N 末端の脂質鎖による SFK の接着斑近傍への集積制御が寄与している」という作業仮説を検証するために、下記の 2 項目を検討した。

(1) SFK の脂質鎖や SH3 ドメインなどの蛍光プローブ (図 2) を作製し、培養細胞に

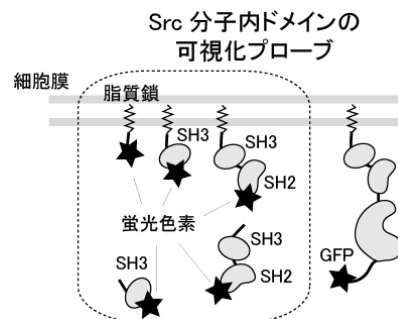


図 2 . 本研究で使用した分子内ドメインの可視化プローブ 点線枠内の Src 各ドメインを

Halo-tag (Promega 社)と融合し発現し、テトラメチルローダミンで標識し観察した。

接着斑マーカー (GFP 融合 vinculin、paxillin) と共発現させ、多分子レベル、あるいは、1分子レベルで同時観察した。その際に、Belbistatin や Y-23642 処理により接着斑にかかる張力を低下させ、機械刺激前後の接着斑における SFK の動態制御を解析した。また、蛍光 1 分子観察用の全反射顕微鏡に、光ピンセットの装置を組み込み、細胞に接着した ECM コートしたビーズを牽引し、細胞に力を負荷し、そのビーズ近傍での各種プローブのダイナミクスを観察、解析した。SFK の中で、Src 分子は、N 末にミリスチン酸が付加されるが、Lck や Fyn では、加えてパルミチン酸も付加されており、その脂質鎖を介した動態制御は Src と異なる可能性がある。そのために、Fyn に関しても、Src 同様のプローブを作製し、その接着斑近傍でのダイナミクスを Src と比較しながら観察・解析を行った。

(2) SFK 活性化制御に携わるフォスファターゼの動態を解析した。SFK の活性化に関しての寄与が確立しているフォスファターゼとしては膜貫通型の RPTPalph (Receptor Protein Tyrosine Phosphatase alpha) と SHP2 がある。本研究では、機械刺激時のシグナル伝達への関与と接着斑への刺激依存的な targeting が報告されている RPTPalph を、接着斑における機械刺激による SFK 活性化へ第一の有力候補として考え、そのイメージング解析を行った。すなわち、Halo-Tag 融合 RPTP alpha を細胞に発現し、RPTP alpha の細胞内での動態を(1)のように 1 分子イメージング法により観察し解析した。また、機械刺激前後の接着斑における FRET による SFK との相互作用の検出に取り組んだ。

#### 4. 研究成果

(1) 機械刺激前後における生細胞の細胞膜上での SFK プローブ動態のイメージング解析

培養細胞に Src と Fyn の N 末端の脂質鎖や SH3 ドメインを含む蛍光プローブを接着斑のプローブと共発現し、生細胞の細胞膜上において多分子ト 1 分子レベルでライブ観察し接着斑近傍での動態を解析した。その結果、SH3 ドメインを含むプローブは通常の蛍光顕微鏡観察においても接着斑に強く局在するのが認められた。1 分子レベルの観察では、接着斑上にそのプローブ分子が数秒間停留している様子が観察された。さらに、細胞に押し付けた微小ガラス針を動かしたり、細胞に接着したファイブロネクチンでコートしたビーズを介し光ピンセットで力を負荷した場合、接着斑以外の細胞膜上で停留するプローブが刺激後 1 分をピークに一過的に増

加した。

一方、N 末端の脂質鎖のみを含むプローブは、マクロレベルでは細胞膜表面全体に分布していた (図 3)。すなわち、通常の観察法では時間・空間分解能が不十分で、接着斑に特異な脂質プローブの動態の特徴は検出で

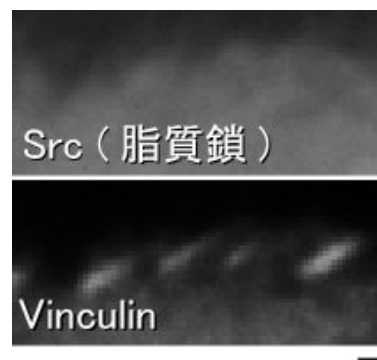


図 3. 細胞膜上での Src 脂質鎖プローブの多分子レベルでの観察画像 Src の N 末の脂質鎖のプローブと GFP 融合 vinculin を共発現させた培養細胞の細胞膜を蛍光観察した。プローブの接着斑への集積は見られなかった。Bar は 5  $\mu\text{m}$ 。

きなかった。しかし、1 分子レベルで観察すると、大部分のプローブ分子が脂質分子と同等な早い拡散運動を示したが、170 ミリ秒ほど一時的に停留している分子が存在することが分かった (図 4)。停留を示す分子の割

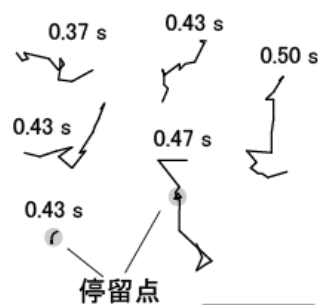


図 4. 生きた細胞の細胞膜上での Src 脂質鎖プローブの 1 分子観察 Src の N 末の脂質鎖のプローブと 1 分子レベルで見た脂質鎖のプローブの細胞膜上での軌跡とその観察時間。一部の軌跡には、0.17 秒以上の停留点が見られた。Bar は 5  $\mu\text{m}$ 。

合は、細胞のコレステロールを除去する操作により有意に低下したので、脂質プローブの停留は細胞膜の脂質マイクロドメインとの相互作用に起因することが示唆された。さらに、GFP 融合 vinculin や paxillin との同時観察を行ったところ、Src の N 末の脂質プローブの停留は、接着斑近傍で頻度高く起きることが分かった (図 5)。その停留する分子数は、薬剤処理により接着斑にかかる張力を低下させると減少した (図 5)。逆に、細胞

に押し付けた微小ガラス針を動かしたり、細胞に接着したファイブネクチンでコートしたビーズを介し光ピンセットで力を負荷した場合、接着斑近傍で停留するプローブが刺激後1分をピークに一過的に増加した。



図5 . Src 脂質鎖プローブ停留点の分布

1分子イメージングで観察された Src 脂質鎖プローブの細胞膜上の軌跡のうち停留部分(黒いドットあるいはライン)と GFP 融合 vinculin で見た接着斑(グレー)(40秒間)。定常状態では60%以上の停留点は接着斑上/近傍にあった(左)。停留点は blebbistatin 処理直後に有意に減少した(右)。Bar は 2  $\mu$ m。

Srcに加えて、FynのN末脂質鎖プローブのイメージング解析も行ったが、拡散運動しているプローブの運動性はSrcのプローブより低かったが、同様に接着斑近傍で一時的に停留している分子が存在し、接着斑にかかる張力に依存して停留する分子数が増減することが観察された。

これらの結果により、SrcなどのSFK分子の接着斑でのダイナミクスが、そのSH3などによる分子間相互作用の他に、N末の脂質鎖を介して細胞膜マイクロドメインにより制御されている、という可能性を示された。

(2) 機械刺激前後における生細胞の細胞膜上でのRPTPalphaプローブ動態のイメージング解析

培養細胞にSFK(SrcとFyn)あるいは、ホスファターゼRPTPalphaの蛍光プローブを接着斑のプローブと共発現し、生細胞の細胞膜上において多分子と1分子レベルの両方でライブ観察し接着斑近傍での動態を解析した。機械刺激負荷に関しては、細胞に接着したビーズを介し光ピンセットで力を直接負荷する方法に加え、低分子量Gタンパク質Rhoを薬理的に活性化し、ストレス線維の張力を高め、接着斑に対する牽引力を増加させる方法も用いた。機械刺激を付加していない定常状態で、SFKのSH3ドメインを含むプローブやRPTPalphaのプローブは通常の蛍光顕微鏡観察においても接着斑に強く局在するのが認められた。1分子レベルの観察では、接着斑上にそれらのプローブ分子が数秒

間停留している様子が観察された。さらに、力を負荷した場合、接着斑に加え、他の細胞膜上でも停留する頻度が刺激後1分をピークに一過的に増加した。

## 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2件)

Ueyama T, Son J, Kobayashi T, Hamada T, Nakamura T, Sakaguchi H, Shirafuji T, Saito N: Negative Charges in the Flexible N-Terminal Domain of Rho GDP-Dissociation Inhibitors (RhoGDIs) Regulate the Targeting of the RhoGDI-Rac1 Complex to Membranes. *J. Immunol.* 191: 2560-2569, 2013. (査読有)

Ueyama T, Nakakita J, Nakamura T, Kobayashi T, Kobayashi T, Son J, Sakuma M, Sakaguchi H, Leto TL, Saito N: Cooperation of p40<sup>phox</sup> with p47<sup>phox</sup> for Nox2 activation during Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis --- Mechanism for acquisition of p40<sup>phox</sup> PI(3)P binding---. *J. Biol. Chem.* 286: 40693-40705, 2011. (査読有)

[学会発表](計4件)

小林 剛, 近藤茂忠, 二川 健, 曾我部正博 「細胞骨格に働く張力を利用した細胞の微小重力環境感知の分子モデル」第26回日本宇宙生物学会大会 2012年9月27日 - 29日 阿波観光ホテル(徳島市)

Kobayashi T, Sokabe M “Cellular Substrate Rigidity Sensing: Possible Role of Mechanosensitive Ion Channels with Stress Fibers and Focal Adhesions” International Symposium on Innovative Nanobiodevices 2012 (ISIN 2012) Toyota Auditorium (Nagoya Univ.), Nagoya, Mar. 21-22, 2012.

Kobayashi T, Sokabe M “Sensing Substrate Rigidity by Mechanosensitive Ion Channels with Stress Fibers and Focal Adhesions” International Symposium on Mechanobiology (the 5th Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular Biology), Mini Symposium I: Mechanobiology of actin cytoskeletons Shanghai-Hangzhou, China, Nov. 4-8, 2011.

Kobayashi T, Tanaka M, Takeda Y, Ito G, Sokabe M “Sensing the substrate rigidity: possible roles of stress fibers, focal adhesion and mechanosensitive channel” 8th International Congress on Comparative Physiology and Biochemistry (ICCPB 2011), Nagoya Congress Center, Nagoya, May. 31-Jun. 5, 2011.

〔図書〕(計 1 件)

木戸秋悟、小林 剛 「再生工学におけるメカノバイオロジーII」、曾我部 正博 編集 「メカノバイオロジー」 化学同人(第 4 部:医工学におけるメカノバイオロジー 第 2 3 章) 印刷中 2014.

〔その他〕

ホームページ等

[http:// www.med.nagoya-u.ac.jp/physiol2](http://www.med.nagoya-u.ac.jp/physiol2)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小林 剛 (KOBAYASHI , Takeshi )  
名古屋大学・医学系研究科・助教  
研究者番号： 4 0 4 0 2 5 6 5

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし