

平成21年 5月 21日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007-2008

課題番号：19390075

研究課題名（和文）重合端因子の単分子可視化を用いた急性アクチン重合シグナルの解明

研究課題名（英文）Elucidation of acute actin polymerization signaling using single-molecule imaging of filament-end factors

研究代表者 渡邊 直樹（WATANABE NAOKI）
 京都大学・医学研究科・准教授
 研究者番号：80303816

研究成果の概要：多くの生命機能は細胞の形態変化と密接に関連し、動的なアクチン重合が多く関わっている。まず、アクチン脱重合因子 AIP1 の単分子可視化により、細胞伸展部で毎秒280 アクチン分子長の線維に1回線維が切断されることを見出した。これは主要なアクチン重合端形成機構と考えられた Arp2/3 複合体による重合核形成の15倍の高頻度である。また、フォルミン蛋白質 mDia1 がアクチン単量体増加にトリガーされ、プロセスに線維伸長させるアクチン線維修復機構を見出した。線維崩壊から迅速にアクチン再重合させるフィードバック機構が明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2008年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医化学一般・細胞医科学

キーワード：細胞・組織，一分子計測，生体分子，ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

生命の形づくりは、機能発現の主たる過程の1つであり、個々の細胞の形態変化や移動による巧妙な調整を受ける。例えば、神経のネットワーク形成における突起伸展やシナプス形成、がん細胞の転移・浸潤、免疫細胞の遊走・貪食など、細胞レベルの動的な形態変

化が高次機能と関連する例は多い。この細胞形態を制御する細胞骨格の改変メカニズムは、細胞内外のシグナルを受け、多数の分子機構の化学反応・物理作用によって超分子ネットワークが動的に形成・崩壊する系であり、その特性を理解するためには時空間的なダイナミクスとして把握する必要性が高い。これまでの研究を通じ、われわれは、アクチン

細胞骨格改変に関連した分子動態を生細胞内蛍光単分子イメージングによって可視化し、捉えられることを発見した。そして、予想されなかった速い速度で起きるアクチン改変機構の細胞内での性質を解明してきた。

2. 研究の目的

われわれの先行研究において、蛍光単分子イメージングを応用し、細胞伸展縁の葉状仮足内でアクチン伸長端が 1.2 秒の半減期で高頻度に脱キャップされること、それが高頻度線維切断 - 結合によることが示唆された。また、フォルミン蛋白質の 1 つ mDial によるアクチン線維修復フィードバック機構を見出した。本研究では、これらアクチン重合端因子の生細胞特有の速い分子反応が、どのような時空間的な変動をとるか種々の環境下で比較検討し、細胞の運動や形態形成を制御する分子性質の本態を解明する。複雑系として解析困難な細胞レベルでのシグナル研究や種々の応用研究に有用な、特異性を持った細胞シグナル捕捉手法の拡充を目指し、細胞の形態ダイナミクスを司る分子機構の細胞内性質を解明する。

3. 研究の方法

本研究では、先行研究で見出された生細胞内でのアクチン重合・脱重合制御因子の速い分子変動が、どのように制御され時空間的な動態をとるのかを細胞レベルで明らかにし、細胞の運動や形態形成を制御する分子機構が細胞内でもつ性質の本態を捉え解明することを目標とした。

既に作製した複数のアクチン断端結合因子の蛍光プローブの分子動態、薬剤に対する反応を比較、検討を行った。また、それらの細胞内における分子動態の時空間制御をアクチン脱重合因子、コフィリンの活性をリン酸化や薬剤 (jasplakinolide) にて変動させたときの影響の検証も進めた。まず、速いアクチン重合端を制御、重合促進する分子群として、mDial を含むフォルミンファミリーや VASP、Eps8 といった細胞シグナルに近い重合端結合分子について比較し、シグナルからのアクチン制御と線維切断 - 結合の相互作用や特異的な役割について検討した。また、本研究では特に AIP1 (actin interacting protein 1) というコフィリンによる線維切断活性を反映した線維ネットワークへの会合が予想される分子を取り上げ、その分子の動態解析を通して、線維切断活性をモニターすることを試みた。上記の高頻度線維切断 - 結合仮説はアクチン線維の急な再構築や再配

向などに役立つことが予想される。薬剤動態やアクチン重合 - 脱重合反応動態のシミュレーションについても行い、細胞内での生化学反応、薬物効果の定量的解析も行った。以上、蛍光分子イメージングでの直接捕捉と数理モデル化による定量的解析によって、細胞内のアクチン線維代謝動態とその制御機構の性質を正確に捕捉し、その複雑な相互作用の果たす役割の解明を行った。

4. 研究成果

本研究では、2つのアクチン重合端生成制御について新知見が得られた。1つはアクチン脱重合因子による線維切断に関するものである。以前、われわれは細胞内蛍光単分子イメージングにより、葉状仮足でアクチン重合端阻害分子、キャッピングプロテインが 1.2 秒の半減期で高頻度に脱キャップされることを見出し、高頻度線維切断 - 再結合仮説を提唱した。この仮説検証のため、アクチン脱重合因子コフィリンのコファクターである AIP1 を解析した。まず、AIP1 がコフィリンによる線維切断に依存して線維断端に結合することを細胞内で実証。更に、その分子動態から細胞伸展縁にある葉状仮足では毎秒 280 アクチン分子長の線維に 1 回、AIP1 を介する切断が起きる結果を得た。これはこれまで主要と考えられてきた Arp2/3 複合体によるアクチン重合核形成より 15 倍の頻度であり、アクチン切断点から盛んな線維伸張が起きることが定量的に解明された。また、低用量の単量体アクチン阻害薬が mDial の分子移動を惹起することを見出した。薬物動態シミュレーションや分子可視化によって、これが線維崩壊からアクチン再重合につながるフィードバック機構と働くこと、その細胞内局所での活性制御が明らかとなった。また、胎児線維芽細胞の PDGF 走化性における Rho ファミリー G 蛋白質の役割を網羅的に解析。Rac1、Cdc42、RhoG が協調して働くこと、それらは細胞遊走の速度に必要であるが方向性には重要でないことを見出した。更に、慢性骨髄性白血病の治療薬イマチニブが分子標的 abl キナーゼの細胞伸展縁への移動を誘発する作用を見出し、細胞シグナルの解明のみならず、分子標的薬の細胞内環境での作用評価に単分子イメージングが有用であることを報告した。

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 6 件)

- ① Monypenny, J., Zicha, D., Higashida, C., Ocegüera-Yanez, F., Narumiya, S. and Watanabe, N. Cdc42 and Rac family GTPases regulate mode and speed but not direction of primary fibroblast migration during PDGF-dependent chemotaxis. *Mol. Cell. Biol.* 29: 2730-2747 (2009).
- ② Tsuji, T., Miyoshi, T., Higashida, C., Narumiya, S. and Watanabe, N. An order of magnitude faster AIP1-associated actin disruption than nucleation by the Arp2/3 complex in lamellipodia. *PLoS ONE* 4: e4921 (2009).
- ③ Fujita, A., Shishido, T., Yuan, Y., Inamoto, E., Narumiya, S. and Watanabe, N. Imatinib mesylate (STI571)-induced cell edge translocation of kinase-active and kinase-defective Abelson kinase: requirements of myristoylation and src homology 3 domain. *Mol. Pharmacol.* 75: 75-84 (2009).
- ④ Higashida, C., Suetsugu, S., Tsuji, T., Monypenny, J., Narumiya, S. and Watanabe, N. G-actin regulates rapid induction of actin nucleation by mDia1 to restore cellular actin polymers. *J. Cell Sci.* 121: 3403-3412 (2008).
- ⑤ Shimada T, Toriyama M, Uemura K, Kamiguchi H, Sugiura T, Watanabe N, *Inagaki N. Shootin1 interacts with actin retrograde flow and L1-CAM to promote axon outgrowth. *J. Cell Biol.* 181: 817-829 (2008).

- ⑥ Watanabe S, Ando Y, Yasuda S, Hosoya H, Watanabe N, Ishizaki T, *Narumiya S. mDia2 induces the actin scaffold for the contractile ring and stabilizes its position during cytokinesis in NIH 3T3 cells. *Mol. Biol. Cell* 19: 2328-2338 (2008).

[学会発表] (計 4 件)

- ① Yuan Y., Fujita A., Shishido T., Narumiya S., Watanabe N. (speaker) STI571-induced cell edge translocation of abl kinase. 第82回日本薬理学会年会 (平成21年3月18日横浜) .
- ② Higashida C., Suetsugu S., Narumiya S., Watanabe N. (speaker) Rapid actin polymer restoration mechanism by mDia1 and other actin nucleators regulated by concentration fluctuation of G-actin. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会シンポジウム (企画・主催) (平成20年12月11日神戸) .
- ③ Watanabe N., Higashida C. A paradoxical effect of actin monomer inhibitors to increase drug-free G-actin in cells: an unexpected role of G-actin revealed by pharmacokinetic simulation. The Uehara Memorial Foundation Symposium 2008.; Systems Biology: the Challenge of Complexity. (平成20年7月1日東京) .
- ④ Watanabe N., Higashida C., Tsuji T. Challenging frequent filament severing-annealing hypothesis by single-molecule imaging of AIP1, a cofilin-dependent actin barbed end interacting protein. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会ワークショップ (企画・主催) (平成19年12月11日横浜) .

[図書] (計 1 件)

- ① Watanabe N. and Higashida C. A possible role of homeostasis between monomeric and filamentous actin in filament nucleation revealed by pharmacokinetic modeling. *Systems Biology The Challenge of Complexity*. Springer, 143-149 (2009).

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 直樹 (WATANABE NAOKI)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：80303816

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし