

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370089

研究課題名(和文)ダイナミンファミリー分子の多機能性と統合的制御の機構

研究課題名(英文)Multi-functionality of dynamin family and mechanism of integrated control

研究代表者

竹居 孝二 (Takei, Kohji)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：40322226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：ダイナミン/コルタクチン複合体による新規アクチン制御機構を明らかにした。この複合体はリング状で、ダイナミンGTP加水分解に伴うリング開閉によりアクチン線維束を形成、安定化した。このアクチン制御機構は神経細胞成長円錐や遊走細胞の仮足の形成や安定化に働く。さらに、アクチン制御を阻害する新規ダイナミン阻害剤としてN'-[4-(dipropylamino)benzylidene]-2-hydroxybenzohydrazide (DBHA)を同定した。DBHAはがん細胞株の仮足先端部へのダイナミン2の動員やラッフル膜形成を抑制した。さらに、DBHAは細胞遊走、浸潤、細胞増殖に対する抑制効果も認められた。

研究成果の概要(英文)：We have clarified a novel regulatory mechanism of actin dynamics by dynamin/cortactin complex. The complex is ring-shaped and it changed the conformation upon dynamin GTP hydrolysis, from open ring to close ring. By the open-close motion, the complex bundled F-actins and stabilized the actin bundles. Furthermore, we identified N'-[4-(dipropylamino)benzylidene]-2-hydroxybenzohydrazide(DBHA) as a dynamin inhibitor that suppress dynamin-dependent actin regulation. DBHA inhibited recruitment of dynamin to the leading edge of migrating cancer cell line and ruffle formation. It also showed inhibitory effect in cell migration, invasion, and proliferation.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・細胞生物学

キーワード：ダイナミン コルタクチン アクチン 成長円錐 フィロポディア 阻害剤

### 1. 研究開始当初の背景

われわれはエンドサイトーシス機能タンパクであるダイナミンが、微小管ダイナミクスの制御に関わることを見だし (Tanabe and Takei J. Cell Biol. 2009)、さらにコルタクチンと協同してアクチン線維を束化することを発見した。しかし、ダイナミンによる細胞骨格制御機構の詳細は不明であったので、本研究によりその機構を分子レベルで明らかにすることを目指して本研究を開始した。

### 2. 研究の目的

ダイナミンによる細胞骨格制御の分子機構を解明するとともに、ダイナミンによる制御機構が細胞機能に果たす役割を明らかにする。

(1) ダイナミン/コルタクチン複合体によるアクチンダイナミクス制御機構解明

ダイナミン/コルタクチン複合体のリング状構造とリング開閉機構の解明

ダイナミン/コルタクチン複合体リングによるアクチン線維束形成機構の解明

(2) 細胞におけるダイナミン依存性アクチン制御の解明

神経細胞の突起伸長、成長円錐におけるダイナミン依存性アクチン制御の解明

細胞走化、仮足形成におけるダイナミン依存性アクチン制御の解明

(3) ダイナミン依存性アクチン制御を阻害するダイナミン阻害剤の探索

### 3. 研究の方法

#### (1) in vitro 解析

精製タンパクを用いて、ダイナミン/コルタクチン複合体を作り、さらにアクチン線維束を構成させる in vitro 再構成系を用いて、生化学的解析、アクチン重合解析と、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡による形態的解析を行なった。

#### (2) in vivo 解析

神経細胞の成長円錐、細胞走化における仮足形成を実験系として、細胞骨格と機能タンパクの局在と動態を、全反射顕微鏡、共焦点顕微鏡による形態的観察と生化学的解析を行なった。

### 4. 研究成果

(1) ダイナミン/コルタクチン複合体による新規アクチン制御機構 (in vitro 解析)

ダイナミン/コルタクチン複合体がリング状であり、グアニンヌクレオチドの状態により複合体リングの開閉することを明らかにした。ダイナミン GTP 加水分解に伴って複合体リングが開閉することにより、メカニカルにアクチン線維束を形成、安定化することが示された。

ダイナミン/コルタクチン複合体の GTP 加水分解に伴うコンフォメーション変化を明らかにするために、原子間力顕微鏡を用いたリアルタイム観察を試験的に開始し、金沢大学安藤敏夫教授との共同研究に発展させた。

PKC によるコルタクチンのリン酸化が、ダイナミン/コルタクチン依存性アクチンダイナミクス制御に関与することを見いだした。

リン酸化による調節機構を変異解析により調べるため、質量分析法により同定されたリン酸化部位に対して、アラニン変異およびリン酸化模倣変異を導入した変異体を作成した。

(2) ダイナミン/コルタクチン複合体による新規アクチン制御機構 (in vivo 解析)

ダイナミン/コルタクチン複合体は、アクチン線維束形成により、神経細胞成長円錐フィロポディア形成、安定化に機能することを SH-SY5Y 細胞 (培養神経芽細胞腫株) を用いて明らかにした。

仮足形成におけるアクチン線維束形成の動態を観察するために、U2OS 細胞 (骨肉腫細胞株)、H1299 細胞 (ヒト非小細胞肺癌細胞株) ライファクトを発現させ、全反射顕微鏡によりリアルタイム観察した。

(3) ダイナミン依存性アクチン線維束安定化を阻害する新規ダイナミン阻害剤の探索 in vitro アクチン重合を指標にした小分子スクリーニングにより、

N'-[4-(dipropylamino)benzylidene]-2-hydroxybenzohydrazide (DBHA) による阻害効果を見いだした。細胞における DBHA の影響を調べた結果、U2OS 細胞 (骨肉腫細胞株) における仮足先端部へのダイナミン 2 の動員、H1299 細胞 (ヒト非小細胞肺癌細胞株) におけるラッフル膜形成に対する抑制効果が認められた。さらに、H1299 細胞の細胞遊走と浸潤を約 70% 抑制し、in vivo における PC3 細胞 (前立腺癌細胞株) の増殖抑制効果が認められた。

### 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 10 件)

1. Yamada, H., Abe, T., Li, S. A., Tago, S., Huang, P., Watanabe, M., Ikeda, S., Ogo, N., Asai, A., Takei, K. (2013). N'-[4-(dipropylamino)benzylidene]-2-hydroxybenzohydrazide is a dynamin GTPase inhibitor that suppresses cancer cell migration and invasion by inhibiting actin polymerization. *Biochem Biophys Res Commun* 443, 511-517. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.118. 査読有
2. Yamada, H., Abe, T., Satoh, A., Okazaki, N., Tago, S., Kobayashi, K., Yoshida, Y., Oda, Y., Watanabe, M., Tomizawa, K., Matsui, H., and Takei, K. (2013). Stabilization of actin bundles by a dynamin 1/cortactin ring complex is necessary for growth cone filopodia. *J Neurosci* 33, 4514-4526. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2762-12.2013. 査読有
3. Hirata, T., Watanabe, M., Kaku, H., Kobayashi, Y., Yamada, H., Sakaguchi, M., Takei, K., Huh, N.H., Nasu, Y., Kumon, H. (2012). REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector as a potentially

effective therapeutic agent for bladder cancer. *Int J Oncol* 41: 559-564. doi: 10.3892/ijo.2012.1503. Epub 2012 May 31. 査読有

4. Ueki, H., Watanabe, M., Kaku, H., Huang, P., Li, S.A., Ochiai, K., Hirata, T., Noguchi, H., Yamada, H., Takei, K., Nasu, Y., Kashiwakura Y., and Kumon H. (2012). A novel gene expression system for detecting viable bladder cancer cells. *Int J Oncol* 41, 135-140. 査読有
5. Suzuki, M., Tanaka, H., Tanimura, A., Tanabe, K., Oe, N., Rai, S., Kon, S., Fukumoto, M., Takei, K., Abe, T., Matsumura I., Kanakura, Y., and Watanabe, T. (2012). The clathrin assembly protein PICALM is required for erythroid maturation and transferrin internalization in mice. *PLoS One* 7, e31854. doi: 10.1371/journal.pone.0031854. Epub 2012 Feb 21. 査読有
6. Ohashi, E., Tanabe, K., Henmi, Y., Mesaki, K., Kobayashi, Y., and Takei, K. (2011). Receptor sorting within endosomal trafficking pathway is facilitated by dynamic actin filaments. *PLoS One* 6, e19942. doi: 10.1371/journal.pone.0019942. Epub 2011 May 20. 査読有
7. Mesaki, K., Tanabe, K., Obayashi, M., Oe, N., and Takei, K. (2011). Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement. *PLoS One* 6, e19764. 査読有
8. Ishida, N., Nakamura, Y., Tanabe, K., Li, S.A., and Takei, K. (2011). Dynamin 2 associates with microtubules at mitosis and regulates cell cycle progression. *Cell Struct Funct* 36, 145-154. 査読有
9. Henmi, Y., Tanabe, K., and Takei, K. (2011). Disruption of microtubule network rescues aberrant actin comets in dynamin2-depleted cells. *PLoS One* 6, e28603. doi: 10.1371/journal.pone.0028603. Epub 2011 Dec 12. 査読有

[学会発表](計 18 件)

1. 竹居孝二、熱帯熱マラリア原虫ダイナミン GTPase の膜動態制御、第 83 回日本寄生虫学会大会、H.26.03.27~28、愛媛大学
2. 山田浩司、熱帯熱マラリア原虫ダイナミン GTPase の膜動態制御と構造機能相関、「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」研究領域 CREST/さきがけ合同キックオフミーティング及び研究成果報告会、H.25.12.19~20、滋賀県守山市ラフォーレ琵琶湖
3. 竹居孝二、ダイナミン GTPアーゼは生体膜とアクチン細胞骨格をメカニカルに制御する、「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」研究領域 CREST/さきがけ合同キックオフミーティング及び研究成果報告会、H.25.12.19~20、滋賀県守山市ラフォーレ琵琶湖
4. 阿部匡史、

N'-(4-(dipropylamino)benzylidene)-2-hydroxybenzohydrazide is a dynamin GTPase inhibitor and suppresses cancer cell migration and invasion by inhibiting actin polymerization、第 86 回日本生化学会大会、H.25.09.11~13、横浜市、パシフィコ横浜

5. 竹居孝二、A novel mechanism of actin bundle formation supporting the formation of filopodia、第 65 回日本細胞生物学会大会、H.25.06.19~21、名古屋市ウインクあいち
6. 山田浩司、Mechanochemical regulation of actin dynamics by a Dynamin 1 / Cortactin ring complex、第 5 回日本生物物理学会中国四国支部大会、H.25.05.25~26、香川県直島ベネッセハウス
7. 竹居孝二、Dynamin GTPase / Cortactin ring complex is a mechanical device stabilizing actin bundles、第 38 回生体エネルギー研究会、H.24.12.22~24、岡山大学
8. 岡崎奈奈、Dynamin を標的にした抗がん剤の開発、第 85 回日本生化学会大会、H.24.12.14~16、福岡国際会議場マリンメッセ福岡
9. 山田浩司、Phosphorylation of cortactin by PKC is a key factor for filopodia formation of growth cones、第 85 回日本生化学会大会、H.24.12.14~16、福岡国際会議場マリンメッセ福岡
10. 逸見祐次、ダイナミン 2 は微小管を介してアクチンコメットを制御する、第 53 回日本生化学会中国・四国支部例会、H.24.05.18、岡山大学
11. 田邊賢司、ホスファチジルイノシトール-4-キナーゼ II は初期エンドソームにおける選別輸送を制御する、第 53 回日本生化学会中国・四国支部例会、H.24.05.18、岡山大学
12. 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、H.23.12.03~07、米国デンバー
13. 竹居孝二、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、第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、H.23.11.24~25、岡山大学
14. 山田浩司、Phosphorylation of Cortactin by PKC alpha is involved in formation of filopodia of growth cones、第 84 回日本生化学会大会、H.23.09.21~24、国立京都国際会館
15. 逸見祐次、Receptor Sorting Within Endosomal Trafficking Pathway Is Facilitated By Dynamic Actin Filaments、第 63 回日本細胞生物学会大会、H.23.06.27~29、北海道大学
16. 田邊賢司、Phosphatidylinositol 4-kinase II alpha is required for

receptor sorting at early endosomes、第  
63 回日本細胞生物学会大会、H.23.06.27～  
29、北海道大学

〔図書〕(計 1 件)

1. Takei, K. and Tanabe, K. (2012).  
Etiological role of dynamin in  
Charcot-Marie-Tooth disease. "Peripheral  
Neuropathy - Advances in Diagnostic and  
Therapeutic Approaches", InTech (Rijeka,  
Croatia), p3-20, ISBN 978-953-51-0066-9

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

1. 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：2012 年 6 月 19 日
2. 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：2012 年 11 月 30 日

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹居 孝二 (TAKEI KOHJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40322226

(2)研究分担者

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

(平成 23 年-平成 24 年 7 月 研究分担者)

田邊 賢司 (TANEBE KENJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80423341

(3)連携研究者

( )

研究者番号：