

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460370

研究課題名(和文) 小胞輸送とアクチン細胞骨格再編成から観る脳の高次構造・機能構築のダイナミズム

研究課題名(英文) Conformational plasticity of single molecule regulates actin cytoskeletal rearrangement leading to dynamics in higher structure and function of brain

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(医学系)・助教

研究者番号：60509777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず、バイオインフォマティクスと生化学を組み合わせた手法によってJRABのRab13依存的な構造変化を証明することができた。さらに、細胞生物学的解析に加えて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駆使した多角的解析によってJRABの構造変化が時間や場所に応じたアクチン細胞骨格の再編成を制御し、その結果として細胞集団の局所での方向性や速度、細胞集団の先頭で生み出される牽引力を調節することを証明した。すなわち、JRABの構造の可塑性が高次細胞機能のダイナミズムを生み出すことを見出し、本研究結果が脳の高次構造・機能構築のダイナミズムの理解にも繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We generated a structural model of JRAB/MICAL-L2 through a combination of bioinformatic and biochemical analyses and thereby revealed how JRAB/MICAL-L2 interplays with Rab13 and how its conformational change occurs. Moreover, we elucidated that the conformational plasticity in JRAB/MICAL-L2 causes spatiotemporal actin cytoskeletal rearrangement to control direction and speed of cell movement and traction force of the cell through a robust approach combining cell biology, live imaging, computational biology, and biomechanics. Thus, our multidisciplinary approach brings a novel concept that the conformational plasticity of a single molecule provides dynamics in higher cellular function. These findings will be of help to understand the dynamics in higher structure and function of brain.

研究分野：生化学、細胞生物学、分子生物学

キーワード：脳の高次構造・機能 小胞輸送 アクチン細胞骨格の再編成 Rab13-JRAB系

1. 研究開始当初の背景

脳の高次構造の構築および高次機能の獲得におけるシナプス形成・成熟過程では様々な分子群の機能部位への小胞輸送とそれに伴ったアクチン細胞骨格の再編成が非常に重要な役割を担っている。本研究は、脳の高次構造の構築から高次脳機能の獲得に至るまでのダイナミズムを Rab13 に依存した JRAB の構造変化とそれに伴う蛋白質-蛋白質間の相互作用の変化が制御する小胞輸送とアクチン細胞骨格再編成という観点から明らかにすることを目指したものである。

研究代表者の所属するグループは、これまでに神経細胞と同様に極性を有する上皮細胞の細胞間接着形成を支える小胞輸送について研究してきた。そこでは上皮細胞において接着分子の細胞膜への輸送を制御する分子として、代表的な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 に注目した研究を進めてきている。Rab13 の標的蛋白質として JRAB/MICAL-L2 が同定され、さらに、Rab13-JRAB 系が細胞間接着形成過程においてタイトジャンクションを構成する接着分子群の細胞膜への輸送に重要な役割を果たすことが明らかになっている。そのアナロジーから研究代表者は、Rab13-JRAB 系によるシナプス結合の制御に注目するに至った。また、JRAB が *Drosophila* で神経回路形成に関わる MICAL に類似することや Rab13 の発現が神経再生時に増加するという報告からも Rab13-JRAB 系のシナプス結合の制御への関与が予想された。実際、これまでに研究代表者は、神経様細胞株である PC12 細胞を用いた解析から Rab13-JRAB 系がアクチン細胞骨格の制御を介して神経突起の伸長に関与していることを示している (*Mol. Cell. Biol.*, 2010)。また、その Rab13-JRAB 系が機能する上で、Rab13 との結合による JRAB の構造変化 (open form と closed form) が重要であること (*Mol. Cell. Biol.*, 2010)。さらに、最近、JRAB がその構造変化に基づき、直接的に、または JRAB の結合蛋白質として同定したアクチン結合蛋白質である actinin-4 を介して間接的にアクチン細胞骨格の再編成を二元的に制御することを明らかにしている (*J. Biol. Chem.*, 2012)。このように、Rab13-JRAB 系は機能分子の小胞輸送を制御するだけでなく、アクチン細胞骨格の再編成を JRAB の構造依存的に異なった様式で、かつ時空間的に制御していることが予想され、今、まさに脳の高次構造構築やシナプス形成・成熟過程のダイナミズムを Rab13-JRAB 系により一元的に説明できる可能性がでてきた。

2. 研究の目的

脳の発生、特に大脳皮質形成過程およびシナプス形成・成熟過程においては、アクチン細胞骨格の再編成を基盤とするダイナミックな細胞形態・構造の変化が接着分子等の多

岐にわたる機能分子群の小胞輸送と密接にリンクして連動しながら起こる必要がある。上述したように、Rab13-JRAB 系は接着分子の輸送を介して上皮細胞間接着形成を制御するだけでなく、アクチン細胞骨格のダイナミックな再編成にも寄与しており、まさに脳神経系においても大脳皮質形成からシナプス形成・成熟までの一連の分子機構の解明の鍵を握っていることが予想される。そこで、本研究では、Rab13-JRAB 系の作用機構に注目し、特に小胞輸送とアクチン細胞骨格のクロストーク制御を切り口に研究を展開し、その成果を大脳皮質形成およびシナプス形成・成熟過程の分子基盤の理解への一助とすることを試みた。

3. 研究の方法

これまで、研究代表者は、所属するグループが上皮細胞における細胞間接着分子の分子輸送の制御系として見出していた Rab13-JRAB 系が分子輸送だけでなくアクチン細胞骨格の再編成を時空間的に制御することを明らかにしてきた。脳の高次構造の構築および高次機能の獲得におけるシナプス形成・成熟過程においても機能分子群の小胞輸送とアクチン細胞骨格の再編成のクロストークは非常に重要な役割を担っており、そこでの Rab13-JRAB 系の関与が十分に予想される。実際に、研究代表者らは、これまでに Rab13-JRAB 系の神経突起の形成への関与を示している。また、研究代表者らは、Rab13 との結合に依存して JRAB の構造が変化することを生化学的解析によって見出しており、JRAB の構造変化とそれに伴う蛋白質-蛋白質間の相互作用の変化が多様な細胞機能の発現を可能にするという仮説を提唱している。そこで、本研究では、これまでの成果をもとに、生化学、バイオインフォマティクス、細胞生物学、コンピュータサイエンス、バイオメカニクスを駆使した多角的アプローチで研究を展開し、脳の高次構造の構築からシナプス形成・成熟を基盤とした高次脳機能の獲得に至るまでのダイナミズムにおける JRAB の構造変化の役割・重要性を明らかにすることで本仮説を証明することを試みた。

(1) JRAB の構造変化モデリング

JRAB の Rab13 依存的な構造変化は、主に生化学的な解析から提唱したモデルであったため、その実態を明らかにするために JRAB 単独および Rab13-JRAB 複合体の結晶化解析を試みたが、JRAB 全長のリコンビナント蛋白質の精製が非常に困難であり、これまでのところ成功していない。そこで、医薬基盤研の水口賢司博士のグループとの共同研究で、バイオインフォマティクスの手法を用いた JRAB の構造モデリングを行った。in silico の立体構造モデリングの各過程で、検証のために生化学的実験を行って得られたモデルに修正を加えるという作業を繰り返し、

Rab13-JRAB 複合体の構造モデルの構築を試みた。

(2) 細胞集団内での JRAB の時空間構造変化の証明

JRAB の N 末端側と C 末端側の結合・非結合を感知するシステムである JRAB の FRET プローブを恒常的に発現させた細胞株を用いて実際に動く細胞集団内において JRAB の構造の時空間変化が起こっているか否かを調べた。

(3) 細胞集団の動きにおける JRAB の構造変化の重要性の証明

研究代表者は、これまで、JRAB が open form や closed form に固定された変異体を発現した細胞株を用いて創傷治癒アッセイを行い、JRAB の構造変化の障害が細胞集団の動きの異常につながることを見出ししていた。その際、得られたライブイメージングの動画をもとに理化学研究所の横田秀夫博士のグループとの共同研究で、ポリウムレンダリング、オプティカルフロー等のコンピュータサイエンスの手法により各変異体のライブイメージング像の特徴を抽出してそれらの定量化を行った。さらに、名古屋工業大学(現大阪大学)の出口真次博士との共同研究で、バイオメカニクス的手法を用いた力学的解析を行った。

(4) 細胞集団の動きを支えるアクチン細胞骨格の時空間制御における JRAB の構造変化の役割の証明

動く細胞集団において JRAB の open form と closed form が担う各々の役割を明らかにすることを試みた。(3)と同様に JRAB が open form および closed form の変異体を発現した細胞株を用いた創傷治癒アッセイを行って細胞集団の先頭に位置する細胞と後方の細胞において見られるアクチン細胞骨格の再編成を解析した。

(5) 3次元での細胞集団の動きにおける JRAB の構造変化の重要性の証明

研究代表者は、JRAB が open form や closed form に固定された変異体を発現した MDCK 細胞を作製し、北海道大学の芳賀永教授の開発した3次元培養系を用いて各々のコラーゲンゲル内での細胞集団運動に基づく管腔形成過程を解析し、JRAB の構造変化の3次元環境下での重要性を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

本研究は、脳の高次構造の構築から高次脳機能の獲得に至るまでのダイナミズムを Rab13 に依存した JRAB の構造変化とそれに伴う蛋白質-蛋白質間の相互作用の変化が制御する小胞輸送とアクチン細胞骨格再編成という観点から明らかにすることを目指し

たものである。

本研究では、バイオインフォマティクスと生化学を組み合わせた手法によって JRAB の立体構造における Rab13 の結合領域が明らかになるとともに、JRAB の分子内結合が Rab13 との相互作用により解除されて構造変化 (closed form から open form) が引き起こされるといった JRAB の Rab13 依存的な構造変化モデルを提示することができた。さらに、JRAB の FRET プローブを用いた解析によって細胞が集団で動く際、JRAB は時間や細胞集団内での位置に依存してその構造を変化させていることを証明した。本研究では、細胞生物学的に神経細胞とのアナロジーを有する上皮細胞を用いて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駆使した多角的解析を展開した。ポリウムレンダリング、オプティカルフローといったコンピュータサイエンスの手法を用いた解析によって JRAB の構造の可塑性が細胞集団の局所での方向性や速度を調節することによって効率の良い細胞集団の動きを可能にすることを証明できた。さらには、バイオメカニクス的手法を用いた力学的解析によって JRAB の構造変化が細胞集団の先頭で生み出される牽引力を調節していることを明らかにした。また、JRAB の open form または closed form を発現した細胞集団におけるアクチン細胞骨格の再編成を詳細に解析し、closed form の JRAB が細胞集団の自由縁でアクチン線維の束の形成を促進し、open form の JRAB が細胞間接着部位でのアクチン線維の安定化を制御していることで効率の良い細胞集団の動きが実現していることを示した。コラーゲンゲル内の3次元環境下においても JRAB の構造変化の障害による細胞集団の動きの異常に基づく管腔形成の異常が認められた。したがって、生理的環境に近いコラーゲンゲル内の3次元環境下での細胞運動における JRAB の構造変化の重要性を明らかにすることができた。これらの成果に基づいて、最終的に脳の高次構造の構築から高次脳機能の獲得過程における JRAB の構造変化の重要性を証明するために JRAB の構造変異体のノックインマウスを作製した。本研究期間中に個体レベルの解析を終えることはできなかったが、今後の課題として継続していきたい。

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 1 件)

Sakane, A., Yoshizawa, S., Nishimura, M., Tsuchiya, Y., Matsushita, N., Miyake, K., Horikawa, K., Imoto, I., Mizuguchi, C., Saito, H., Ueno, T., Matsushita, S., Haga, H., Deguchi, S., Mizuguchi, K., Yokota, H. and *Sasaki, T.

Conformational plasticity of JRAB/MICAL-L2 provides ‘law and order’ in collective cell migration.

Mol. Biol. Cell, 27(20), 3095-3108 (2016)
(査読有)

〔その他〕
ホームページ等

プレスリリース（徳島大学、理化学研究所、
医薬基盤・健康・栄養研究所同時発表）

6．研究組織

(1)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・助教
研究者番号：60509777