

平成22年 5月31日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17079004

研究課題名（和文）G蛋白質シグナルによる細胞構造改変プロセスの単分子イメージング解析

研究課題名（英文）Single-molecule imaging analysis of cell structural reorganization processes downstream of G protein signaling

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（和文）：アクチン細胞骨格のリモデリングプロセスを直接 1 分子ごとに可視化する手法を用い、細胞内の単量体アクチンの濃度変動によって迅速に活性化される、フォルミンファミリーによるアクチン線維のフィードバック回生機構を見出した。また、高頻度のアクチン線維切断の存在を定量的に証明した。関連して、線維芽細胞における Rho ファミリーG蛋白質の役割、阻害薬結合が誘発する標的キナーゼ Abl の分子コンフォメーション変化など、細胞イメージングを駆使することで、動的な細胞シグナル、細胞運動の制御分子機構について新知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：Using fluorescence single-molecule imaging which directly visualizes remodeling processes of the actin cytoskeleton, this research project has revealed a novel actin polymer regeneration mechanism by which an increase in the cellular monomeric actin concentration provokes rapid actin nucleation by Formin homology proteins. This project has also quantitatively proved the frequent actin filament disruption in the cell. In addition, through various types of cell imaging analysis, the roles of Rho family GTPases in cell migration and inhibitor-induced conformational regulation of a protein kinase, Abl, have been elucidated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	8,800,000	0	8,800,000
2006 年度	14,300,000	0	14,300,000
2007 年度	12,000,000	0	12,000,000
2008 年度	11,100,000	0	11,100,000
2009 年度	8,300,000	0	8,300,000
総計	54,500,000	0	54,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医化学一般・細胞医化学

キーワード：細胞・組織、一分子計測、G蛋白質、フォルミンファミリー、Rho ファミリー

1. 研究開始当初の背景

細胞シグナル研究の発展に伴い、多くの分子

機構が知られるに至ったが、生体内におけるそれらの複雑な相互作用を理解することが、生命科学の次なる課題となりつつある。

RhoファミリーG蛋白質は、種々のエフェクター分子を介して、異なるアクチン細胞骨格形成を制御する分子スイッチであることが、90年代以降明らかにされてきた。例えば、Rhoは、mDiaやROCKを介し、アクトミオシンの活性化とアクチンストレス線維形成を促し、Rac/Cdc42は、WAVE/WASPファミリーを介し、Arp2/3複合体による細胞先端の樹状アクチンネットワーク形成を促進する。しかし、これらの分子機構のもつ活性は、実際の細胞内では複雑に絡み合うため、例えば、実践的にある因子の活性を変動させた場合に、それがどこまでの生化学パラメータに影響するのか予測困難であるなど、個々の分子機構のもつ特異的役割について、正確に把握することは困難であった。この細胞骨格改変を制御するG蛋白質シグナルの役割の解明に取り組むうえで、細胞内蛍光単分子イメージング手法は、その高い時空間分解能とともに、細胞内という複雑系の中で、特定の分子の挙動変化といった特異点を捉えられる点で、高い潜在能力をもっている。

更に、本研究の先行研究にて、Rhoのエフェクター、mDia1がアクチン線維の重合端に結合しながら、プロセッシブに分子移動することが細胞内単分子イメージングによって明らかにされた (*Science* 303, 2007-10, 2004)。この手法を発展させることにより、G蛋白質シグナル関連分子のうち細胞内構造への会合が予想されるものや、下流の細胞骨格動態をリアルタイムで分子可視化することで、G蛋白質シグナルの働きの細胞以下の微細レベルでの解明が期待される。

2. 研究の目的

細胞シグナル研究では、多様な分子機構がおりなす複雑な相互作用を細胞内で把握することが、大きな課題となっている。われわれが2002年世界に先駆け導入した細胞内蛍光単分子イメージング手法は、細胞骨格系に会合する分子の挙動変化を通して、微小なシグナルを捉えるのに向いている。特に、上述したように、RhoのエフェクターmDia1によるプロセッシブな高速アクチン重合端伸長が細胞内分子可視化により発見されたこと、それを含めた複数の分子種によるG蛋白質シグナル下流の細胞骨格改変現象を可視化することができる分子プローブライブラリーの樹立が先行研究により進行していた。そこで、細胞内構造への会合が予想されるより多様な分子機構に蛍光単分子イメージングを発展させ、更には、薬剤やリガンドが誘発する迅速な分子挙動変化をスクリーニングすることで、リアルタイムのG蛋白質シグナルの作用点と作用機序の解明を目指した。また、

新たな細胞シグナル研究手法の樹立が試みられた。

3. 研究の方法

われわれの手によって見出させた、アクチン重合をプロセッシブに加速するRhoの標的分子で、フォルミン蛋白質の1つ、mDia1を中心的观察対象とし、伸展する細胞先端を特異的に会合するVASP/Enaファミリー、反矢じり端キャッパーであるキャッピングプロテイン、RacやCdc42の下流で細胞先端の葉状仮足のアクチンネットワークを形成するArp2/3複合体、コフィリンと結合するAIP1など種々のアクチン重合・脱重合制御分子の動態を生細胞内で単分子イメージングを用い観察することで、アクチン重合端形成の細胞内分布、伸長ベロシティ、線維崩壊のキネティクスなどを捕捉する手法を確立する。それを踏まえ、G蛋白質シグナルの作用機序や細胞動態の解明を進めた。

先行研究で明らかにされたように、アクチン重合因子の1つでフォルミンファミリーに属するmDia1は、活性化型Rhoの微量注入によってその分子内結合が開裂、アクチン重合端に沿った分子移動を開始する。これを応用し、蛍光単分子可視化された野生型mDia1の標識体の分子移動を指標に種々の外的刺激や薬剤処理を試すことで、Rho-mDia1シグナルの生理的活性化機構を検索した。また、細胞先端の主要なアクチン調節因子であるArp2/3複合体やキャッピングプロテインの葉状突起での活性化部位やその解離速度の計測に成功しつつあった。これらの知見をもとに、細胞外刺激やプラスミドの微量注入・RNA干渉法などでG蛋白質のうち、葉状仮足のアクチン改変を制御するRac, Cdc42のシグナルを変動させ、細胞遊走のキネティクスに対するG蛋白質シグナルの基本的な影響をDunnチャンバーを用いた細胞イメージングにて捉えた。更に、発展的に、アクチン線維の脱重合因子であるコフィリンやその補因子AIP1、細胞骨格制御因子へ会合が知られるキナーゼなどのシグナル因子、共同研究にて神経細胞の突起伸展に関わる分子群などの細胞内分子挙動を可視化捕捉したうえで、それらの細胞環境の変化や薬剤への反応をリアルタイムで捉え、Gタンパク細胞シグナルに関連する、アクチン骨格系の動的な制御様式の解明を進めた。

4. 研究成果

以前、われわれはG蛋白質Rhoの標的分子mDia1が、細胞内アクチン重合端に結合し、

線維伸長に従い移動することを分子可視化によって発見したが、その活性誘導のメカニズムの解明を目指し、種々の生理活性物質、薬剤の影響を、細胞内蛍光分子イメージングを用い、スクリーニングを遂行した。予想外にも latrunculin B などの単量体アクチン阻害剤によって mDia1 の分子移動が細胞内で高頻度惹起されることを見出した。薬物動態シミュレーションにより、薬から遊離したアクチン単量体が急上昇する逆説的薬物作用がこの現象を引起すことが判明した。関連して、アクチン脱重合因子コフィリンの捕因子 AIP1 が細胞内で集積する部位に一致して、mDia1 によるアクチン重合の亢進が確認された。これらの結果から、線維崩壊によって生じた単量体アクチンの濃度不均一性が mDia1 を活性化する「フィードバック線維回生機構」を提唱した。その後の研究により、細胞が物理ストレスを受けた際にこの機構が働き、線維再生に貢献することを見出し、その詳細について解析を進めている。また、線維芽細胞の増殖因子への走化性における Rho ファミリー G 蛋白質の役割について網羅的解析を行い、Rac1, Cdc42, RhoG による協調的な細胞遊走、特にその速度への制御を見出した。また、関連してコフィリンの穂因子 AIP1 が介在するアクチン線維切断が、細胞先端端の仮足において Arp2/3 複合体によるアクチン重合核形成の 15 倍もの高頻度で起きることを分子可視化によって結論づけた。更に、プロトオンコジーン Abl キナーゼが慢性骨髄性白血病の分子標的薬と結合することでコンフォメーションが変化し、それが細胞先端端でのシグナル分子との複合体形成を促進することも見出した。これら一連の成果によって、細胞運動の方向性を決める G 蛋白質を中心とした細胞シグナルを明らかにし、それを受けたアクチン細胞骨格システムの可塑性と組み換えを制御する分子機構の動態を直接捉えることに成功した。

また、奈良先端大の稲垣らと共同で、彼らが神経細胞の成長円錐伸展を増加させる分子として以前報告した Shootin-1 がアクチンの求心性流動に会合することを発見し、神経突起の伸展メカニズムにおける Shootin-1 とアクチン流動とのリンクが果たす役割の解明にも貢献した。

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 8 件) (すべて査読あり)

① Watanabe, N. (2010) Inside view of cell locomotion through single-molecule: fast

F-/G-actin cycle and G-actin regulation of polymer restoration. *Proc. Jpn. Acad. B. Phys. Biol. Sci.* 86: 62-83.

② Monypenny, J., Zicha, D., Higashida, C., Ocegüera-Yanez, F., Narumiya, S. and Watanabe, N. (2009) 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.

③ Tsuji, T., Miyoshi, T., Higashida, C., Narumiya, S. and Watanabe, N. (2009) An order of magnitude faster AIP1-associated actin disruption than nucleation by the Arp2/3 complex in lamellipodia. *PLoS ONE* 4: e4921.

④ Fujita, A., Shishido, T., Yuan, Y., Inamoto, E., Narumiya, S. and Watanabe, N. (2009) 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.

⑤ Higashida, C., Suetsugu, S., Tsuji, T., Monypenny, J., Narumiya, S. and Watanabe, N. (2008) G-actin regulates rapid induction of actin nucleation by mDia1 to restore cellular actin polymers. *J. Cell Sci.* 121: 3403-3412.

⑥ Shimada, T., Toriyama, M., Uemura, K., Kamiguchi, H., Sugiura, T., Watanabe, N., and Inagaki, N. (2008) Shootin1 interacts with actin retrograde flow and L1-CAM to promote axon outgrowth. *J. Cell Biol.* 181: 817-829.

⑦ Watanabe, S., Ando, Y., Yasuda, S., Hosoya, H., Watanabe, N., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (2008) 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.

⑧ Miyoshi, T., Tsuji, T., Higashida, C., Hertzog, M., Fujita, A., Narumiya, S., Scita, G. and Watanabe, N. (2006) Actin turnover-dependent fast dissociation of capping protein in the dendritic nucleation actin network: evidence of frequent filament severing. *J. Cell Biol.* 175:

947-955.

[学会発表] (計 14 件)

① 渡邊直樹 細胞内分子イメージングと低分子化合物研究の融合に向けて 第2回定量生物の会 (平成22年1月10日大阪)

② Watanabe N., Higashida C., Mizuno H. A Role of G- and F-actin Homeostasis in Actin Polymer Restoration. Symposium on Watching Biomolecules in Action. (平成21年12月15日大阪)

③ Watanabe N., Higashida C., Mizuno H. Rapid actin polymer restoration against mechanical force: Roles of G- and F-actin homeostasis and mDia1. 第61回日本細胞生物学会大会 (平成21年6月3日名古屋)

④ 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)

⑤ 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)

⑥ 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)

⑦ 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8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)

⑧ 渡邊直樹 細胞内 G&F アクチンのホメ

オスターシス 「アクチン・ミオシン: 分子と細胞を如何にして結び付けるか」の会 (特定領域研究「生体ナノシステムの制御」主催: 平成19年11月10日東京・早稲田大学)

⑨ Tsuji T., Higashida C., Watanabe N. (○: speaker) Molecular kinetics of AIP1, a cofilin-dependent actin barbed end interacting protein, in lamellipodia: Evidence for frequent filament severing. SEMM Workshop on Cell Migration: from Molecules to Organisms and Diseases. 平成19年5月13日イタリアミラノ (口演)

⑩ Watanabe N., Higashida C. (joint speaker) Lessons from single-molecule microscopy of cellular actin systems. Part1: frequent severing-annealing of filaments. Part 2: acute filament restoration by mDia1. 英国癌研究所 (Cancer Research UK) 平成19年5月10日イギリスロンドン (招待講演)

⑪ 渡邊直樹 Acute actin polymerization mechanisms by mDia1 in living cells. 日本分子生物学会 2006 フォーラム (平成18年12月6日名古屋)

⑫ 渡邊直樹 単分子イメージングによる細胞内アクチン重合機構の解析 第14回日本バイオイメージング学会学術集会 (平成17年10月27日東京)

⑬ Miyoshi T., Higashida C., Watanabe N. (○: speaker) Evidence of constitutive actin filament severing in lamellipodia. 第58回日本細胞生物学会大会 (平成17年6月17日埼玉県大宮)

⑭ Miyoshi T., Higashida C., Watanabe N. (○: speaker) Molecular Kinetics of the Arp 2/3 Complex and Capping Proteins at the Leading Edge. Keystone Symposia, Cell Migration and Adhesion. (平成17年4月10日米国ユタ州スノーバード)

[図書] (計 15 件)

① Narumiya, S. and Watanabe, N. (2009) Migration without a clutch. *Nat. Cell Biol.* 11: 1394-1396 (News and Views)

② Watanabe, N. and Higashida, C. (2009) 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

③ 渡邊直樹 (2007) アクチン細胞骨格のダイナミクスの可視化 非侵襲・可視化技術ハンドブックーナノ・バイオ・医療から情報システムまでー (NTS 出版) 第 8 章 第 10 節 843-850

④ 木下専, 渡邊直樹 (2007) 生理活性物質のケミカルバイオロジーを開拓した論文 Mayer, T. U. et al.: *Science* 286, 971-974 (1999) 蛋白質 核酸 酵素 2007年10月増刊 第 52 巻 第 13 号 1796-1799

⑤ 渡邊直樹 (2007) アクチン重合システムを解く分子イメージング: みえない脱重合反応をとらえる 分子細胞治療 第 6 巻 第 4 号 77-82

⑥ 辻貴宏, 渡邊直樹 (2007) 単分子イメージングが明らかにした生細胞内アクチン重合機構 日本臨床 第 65 巻 第 2 号 235-241

⑦ 渡邊直樹 (2006) 単分子スペックル顕微鏡によるアクチンダイナミクス観察 実験医学 第 24 巻 第 13 号増刊 形と運動を司る細胞のダイナミクス 186-193

⑧ 馬淵一誠, 渡邊直樹, 寺崎朝子, 高稲正勝, 斧正一郎 (2006) アクチン細胞骨格とアクチン調節タンパク質 実験医学 第 24 巻 第 13 号増刊 形と運動を司る細胞のダイナミクス 64-75

⑨ 渡邊直樹 (2006) アクチンダイナミクス蛋白質 核酸 酵素 2006 年 5 月号増刊 細胞骨格と接着 第 51 巻 第 6 号 522-528

⑩ 渡邊直樹, 東田知陽, 三好拓志 (2005) アクチン重合が駆動する細胞運動の謎に挑む単分子イメージング 生物物理 第 45 巻 第 6 号 292-296

⑪ 東田知陽, 三好拓志, 渡邊直樹 (2005) 単分子スペックル顕微鏡によるアクチン生化学の単分子イメージング 蛋白質 核酸 酵素 第 50 巻 第 11 号 1436-1442

⑫ 渡邊直樹, 東田知陽 (2005) mDia1 と Formin ファミリー: アクチン伸長端をサーフィンするプロセッシブキャッパー 生化学 第 77 巻 第 2 号 136-140

⑬ 渡邊直樹 (2005) 単分子スペックル顕微鏡がみせるアクチン重合の細胞内分子キネティクス 日本薬理学雑誌 第 125 巻 第 2 号 103-108

⑭ 渡邊直樹, 東田知陽 (2005) アクチン重合駆動モーター“Formin ファミリー” 化学と工業 第 58 巻 第 2 号 150-152

⑮ 渡邊直樹 (2005) 細胞の中を分子でのぞくーLess is more と Serendipityー 学術月報 第 58 巻 第 5 号 389-391

[その他]

ホームページ等

<http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/outline/bio-molecular/single-molecule.html>

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