

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H01020

研究課題名(和文)分子を観ることで解き明かすメカノトランスダクション

研究課題名(英文)Elucidation of mechanotransduction mechanisms with visualization of molecules

研究代表者

渡邊 直樹 (Watanabe, Naoki)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：80303816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、蛍光単分子可視化法を用い細胞力覚の分子機構を解明した。まず、細胞先端に接するアクチン重合端が牽引力に向け細胞を伸展させるブラウンラチェット型メカノセンサーとして働くことを発見した。また、先端端で重合したアクチンの15%が0.5秒以内に脱重合する「動的不安定様」動態を見出した。個体の微細構造を可視化する独自の多重超解像顕微鏡IRISについては、プローブの迅速作製法を複数樹立した。Srcががん治療薬として用いられる複数のキナーゼ阻害薬によって接着斑に移動、SRC遺伝子に薬剤抵抗性変異が入ると阻害薬が早期解離しFAKのリン酸化、Erkの活性化、細胞増殖を逆に促進することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞先端に接するアクチン重合端が単に押す力を発生するのみならず、力のセンサーとして細胞伸展を制御するしくみの発見は、細胞・組織再生の力学的制御への応用開発に潜在的な可能性がある。また、がん治療薬の予期せぬ副作用のメカニズムの発見は、使用上の注意を促すだけでなく、低分子量阻害薬の特異性スペクトラムをどう改良すべきについての再考を促すとともに、阻害薬をベースとした細胞シグナルの部分的活性薬開発の可能性も示唆している。IRIS用プローブの既存のモノクローナル抗体からの迅速改良法と合わせ、今後個体レベルの解析・臨床応用が期待される複数の原理が、細胞分子イメージングによる直接観察から得られた。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to elucidate mechanotransduction mechanisms by fluorescence single-molecule imaging. First, the actin plus-end in contact with the leading-edge plasma membrane was found to function as a Brownian ratchet-based force sensor, driving cell protrusion in response to traction force. Second, at the leading edge, newly-polymerized actin was found to disassemble quickly (~15% within a half second), which shares similarity with dynamic instability of microtubules. Third, several methods to develop fluorescent probes optimized for original multi-target super-resolution microscopy IRIS have been devised. Fourth, anti-cancer kinase inhibitors were found to allosterically activate its target c-Src and promote the complex formation with FAK at focal adhesions. In cells harboring drug-resistant mutation in SRC gene, kinase inhibitors prematurely dissociate from the Src-FAK complex, leading to tyrosine phosphorylation of FAK and paradoxical cancer cell proliferation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：メカノトランスダクション アクチン重合 ブラウンラチェット 動的不安定性 超解像可視化用プローブ がん治療キナーゼ阻害薬 逆説的標的分子活性化 アロステリック作用

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体は様々な物理ストレスに曝される。しかし、われわれは大きな衝撃や外傷を受けない限り、意識することなく過ごすことができる。一方、発生、特に心血管形成過程や骨格系のホメオスタシスにおいて、力学作用が大きな役割を果たすことが知られている。これまでの蛍光単分子イメージングを用いた申請者の先行研究により、数ミクロンの細胞表層の歪みストレスにより秒単位で活性化する、アクチン線維崩壊とその回生を司るフォルミンファミリー全般の活性化や、力学的作用により制御される細胞内アクチン線維の安定化とその分子機序が明らかとなった。これらの成果において重要なことは、直接細胞骨格の再編に働く分子の動態を1つ1つ可視化する手法を確立することによって、外部からフェノタイプを観察しているだけでは解らなかった、秒単位で起こる細胞内現象やその変化を捉えた点にある。他の細胞やその構造の形態学的所見に基づく研究では、分単位・時間単位のフェノタイプの変化と関与する分子の阻害効果を検証するのが一般的であるが、それに比べると、個々の分子機構の役割をリアルタイムに捕捉可能である単分子イメージング法は、機能補完に惑わされずに分子の働きを直接捕捉できるため、その優位性は極めて大きい。本研究では、細胞内にかかる力学作用と構造変換、その細胞外マトリクスへの伝播、個体レベルの力学制御分子機構の役割について、細胞内単分子可視化 eSiMS 顕微鏡および独自の IRIS 多重超解像顕微鏡を用いた分子動態捕捉と高分解能生体構造可視化によって、細胞から個体レベルの多階層において解明することを目標とした。

### 2. 研究の目的

細胞や個体における物理刺激の影響について、フェノタイプに主眼をおいた研究では捉えきれない、細胞骨格の改変キネティクスやそのリアルタイムの変動・応答を捉え、メカノトランスダクションの本態にせまることを目的とする。本研究では、これまでの自験例で培われてきた、細胞表層のアクチン細胞骨格系の分子群、その主要な制御分子、さらにアクチンと細胞外基質を連結する接着分子群や、それらを制御する受容体を含めた細胞シグナル分子の挙動を、物理的に揺動をかけた細胞内で捉え、分子の応答メカニズムを解明する。また、リアルタイム分子可視化の特長を生かした、細胞シグナルの刺激や薬物へのリアルタイムの分子応答を明らかにする。これらの知見をもとに、組織や生体のメカノトランスダクションを検証するモデルの構築や超解像顕微鏡 IRIS を応用した生体組織改変の可視化にも挑む。これらを組合せることで、分子レベルでの機械刺激による細胞機能制御や力の伝播のしくみを明らかにするとともに、生体の複雑系でのメカノトランスダクション検証の道を開く。

### 3. 研究の方法

アクチン系と細胞接着系の構成分子・制御分子を、力学的にゆさぶりをかけた細胞内で可視化することで、メカノトランスダクションの分子レベル・リアルタイムの制御の解明に取り組む。可動性基質 (PDMS) 上で培養した細胞内の蛍光単分子を可視化しながら、外部からの牽引力を加える実験系を構築し、細胞先端部の舵取り装置、葉状仮足におけるアクチンがどのように応答するのかをリアルタイムで可視化し捕捉する。これを発展させ、細胞の基質の変型度合いと向きが、アクチン線維の安定性やフォルミンファミリーによる重合核形成や、Arp2/3 複合体とその制御因子 WAVE 複合体、Ena/VASP タンパク質などの挙動変化や役割についても検証する予定である。また、既に確立済み赤外蛍光単分子観察用プローブを導入することにより、三次元培養やオルガノイド深部における細胞骨格改変動態の解析やその力学制御についても検証可能か挑む。ずり応力についても、脈動を押さえた灌流システムを構築しており、基質面からの力学刺激との比較検証を行う。得られた知見に基づいて、細胞伸展を促す機械刺激条件のスクリーニングのための多ウェル培養プレートでの観察系構築にも取り組む。

上記とは別に、接着斑において接着分子がアクチン流動と同じ速度で流動し「滑る」現象を捉えつつある。接着斑周囲の線維の配向性の変化を可視化する手法も構築しており、アクチンリモデリングと比較し力学的な制御を検証する。これらについては、先行研究で確立した高輝度蛍光アクチンの高精度分子トラッキングを応用し、分子や構造にかかる力の伝播様式やその役割について解析を進める。また、国際共同研究で取り組んでいる数理モデルとの比較を行い、細胞構造の力学制御のしくみを解明する。

個体レベルの生体構造改変については、独自の多重・高密度標識超解像顕微鏡 IRIS によって、組織構造改変を可視化することを糸口にメカノトランスダクションを解析する。IRIS はとりこぼしのない、多分子種の同一標本内の高分解能可視化を可能とするが、その運用のためには個別の標的に対するプローブ作りが必要となる。生体構造改変の可視化に向け、内在性分子に対するプローブやタグ付加分子を可視化するプローブを迅速に開発する手法を樹立しつつ、マウス等動物標本での応用解析にも着手する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 細胞先端で牽引力を感知するアクチン反矢じり端のブラウンラチェット型力学センサーの発見

古くより、牽引力が初代培養神経細胞の軸索様突起伸展を誘導すること(Dennis Bray, Dev. Biol. 102:379-389, 1984 等)や、硬い培養基質へ向って繊維芽細胞が遊走する Durotaxis といった現象(Yu-li Wang の研究グループ, Biophys. J. 79:144-152, 2000)が知られる。いずれも、周囲からの物理刺激が局所の細胞伸展を誘導するが、その分子メカニズムは明らかではなかった。

本研究では、牽引力を与える際に直接細胞に触れない実験法を開発した。以前われわれが報告したとおり(2013年 Nature Cell Biol. 誌)細胞表面を歪める物理操作はフォルミンファミリー全般のアクチン重合核形成を著明に亢進し、アクチンを先端から細胞中央へスチールする危険がある。これを避けるため、薄層(50ミクロン厚)のPDMSでできたシリコンラバーに細胞を植え、近傍の基質を引っ張る間接的な細胞牽引法を構築した。深部焦点に適したシリコン対物と高輝度蛍光色素(DL550)標識アクチンの電気穿孔による細胞導入(2014年 MBoC 誌に発表)を組合せ、ラバー越しに細胞内蛍光単分子を可視化することに成功した(図1)。

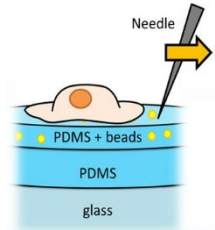


図1 実験の模式図。微小ビーズで牽引速度をモニターする。

結果は、①牽引力は4秒以内に細胞先端でアクチン重合を亢進し、葉状仮足の内部の重合には影響しない、牽引速度(先端にかかる力の低減量に比例)と重合頻度の上昇には、ブラウンラチェット(BR)理論で予測される指数関数的関係が存在する(図2)。牽引後静止した状態でも、恐らく基質の硬化を介して先端アクチンにかかる負荷が低減し、アクチン重合亢進の遷延がBR理論の関係性で説明可能、重要なことに、牽引処置によって細胞先端は基質に対してより前方へ伸展する(図3:単に牽引された空間への重合上昇のみを反映しているわけではない)、主要なアクチン重合促進機構 WAVE 複合体およびEna/VASPファミリー非存在下でも牽引時先端重合誘発が起こることが判明した。これらの所見は、古くから想定されてきたアクチン重合速度と先端端を押す力におけるBR理論に沿った関係性を初めて明らかにするとともに、アクチン重合端が細胞を牽引力に向かって伸展・遊走させるための

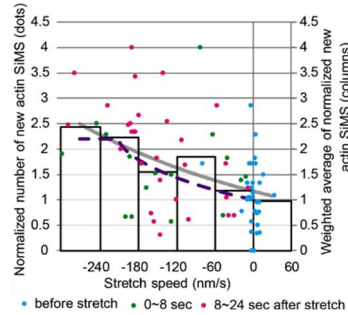


図2 牽引速度と細胞単分子可視化で明らかにされた先端アクチン重合頻度はBR理論に符合。

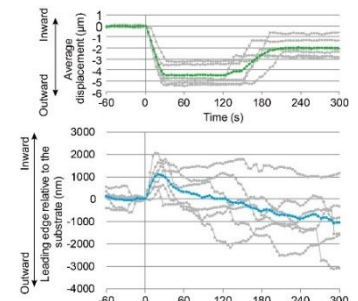


図3 牽引量(上)と先端位置(下)の関係。牽引量を超え先端が前方へ突出する。

力覚センサーとして機能することを解明した(Koseki et al. Genes Cells 24:705-718, 2019)。

本研究の所見は、葉状仮足先端に接するアクチン重合端がもっとも原始的かつ普遍的な機械受容機構である可能性も示唆している。運動する動物細胞に普遍的にみられる葉状仮足は形態学的に独特で、その厚さは180ナノメートルほどで一定であり、1mM近いアクチンが密集した線維を形成する。先端に接する重合端は1ミクロン幅あたりおよそ250本ある。一方、このアクチン網はレトログレードフローと呼ばれる求心性流動で絶えず内向きに運ばれている。これらの条件は、個々の重合端には1~3pN程度の弱い力と速い重合(毎秒~30サブユニット)がバランスする状態を実現する(図4)。この関係性は、わずかな力の変動に対して、重合速度を過敏に変化させ、牽引力に向かって細胞を伸展させるメカノセンス機構を実現する。アクチンは1つ重合するたびにATPを1分子消費するため、先端端を押す力にはそのエネルギーのわずか数%しか利用できていない。おそらく、動物細胞がこのような一見無駄なATPを消費し、巨大なレトログレードフローを維持しつづけるの理由の1つは、牽引力や周囲の硬さに応じて迅速に突出し遊走するメカノセンス機構を作動させることにありと考えられる。

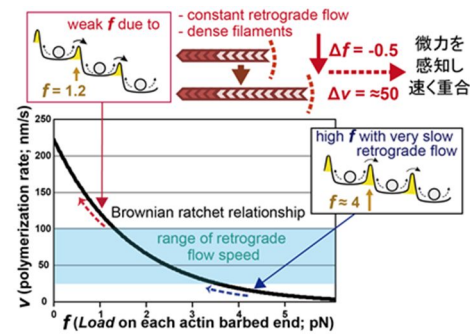


図4 重合端が微弱な力変化で大きな重合速度変化を来すBRフォースセンサー。

BRを介するしくみは、近年情報とエネルギーとの変換機構‘Information ratchet’として注目されている。本研究の機構は、Information ratchetとは異なるが、牽引力が直接重合を引っ張る仕事を与えるのではなく、そのratchetを超えるためのエネルギー障壁の高さを上下させ、重合頻度を制御している点に類似性がある。この性質によって、牽引力は通常のマクロの世界の機械が力に比例した仕事をするとは対照的に、力が非線形の重合速度促進作用をもたらすことが実現される(図4の挿入ボックス内)。Information ratchetのコンセプトを拡張しうる重要な示唆を含む発見と考えられる(生化学 第92巻 84-93, 2020年に総説;“Plasma Membrane Shaping”Elsevier社に解説を出版予定。図4は同誌掲載予定図より改変)。



(2) 葉状仮足先端近傍でのアクチン線維反矢じり端のサブ秒の短い寿命の(最終)証明

以前の研究者の成果から、細胞先端端に形成されるアクチンネットワーク内では、アクチン線維寿命が非常に短いこと(およそ 1/3 が 10 秒以内に脱重合する: Science 295:1083, 2002)が知られている。その後解明されたアクチン調節分子の動態、特にアクチン重合端に結合するキャッピングプロテインが脱重合依存的に半減期 1.2 秒の速い解離を示すこと(J Cell Biol.誌に 2006 年報告)から、研究者はアクチン反矢じり端(速い重合端)近傍での頻度の高い脱重合と再重合のサイクルの存在を提唱してきた。今回、理論生物学者の米国 Lehigh 大学 Vavylonis 教授らとの共同研究で葉状仮足内のアクチン動態の三次元シミュレーションを構築したところ、反矢じり端近傍で線維切断を亢進させると実測のアクチン寿命分布をうまく説明できる結果を得た。この所見に触発され、短時間寿命のアクチンの存在を検証したところ、葉状仮足先端近くでは、約 15%の線維が 0.5 秒以内に脱重合するといった予想を超えた所見を見出した(図6)(eLife 印刷中)。

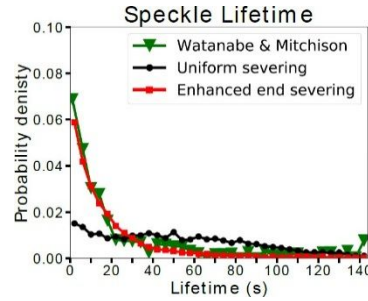


図5 3Dシミュレーションによるアクチン線維寿命分布。反矢じり端近傍での速い線維切断を組込むと、実測された寿命分布をうまく説明できる。

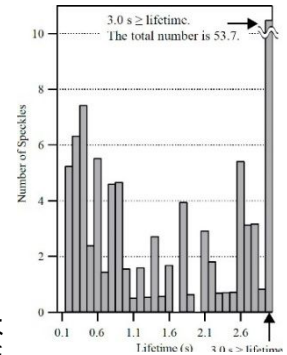


図6 高輝度蛍光アクチンを用い証明された短寿命アクチン線維の存在。

アクチン線維は片側が伸び、反対側が縮むトレッドミリングが基本であると考えられてきたが、葉状仮足内では、重合端が伸長と崩壊を繰り返す、微小管系に似た動的不安定性様の挙動を取ることが今回の成果ではっきりと示された。(1)で見出された重合端に形成する力覚センサーとの関連や、cofilin, AIP1, coronin, twinfilin といった脱重合加速装置の関わりが注目される。

(3) がん治療に用いられるキナーゼ阻害薬による Src の自己抑制構造の解除、および阻害薬が Src を活性化し細胞増殖シグナルを惹起する逆説的阻害薬副作用の発見

世界で最初に同定されたがん関連キナーゼ c-Src は、様々な増殖因子受容体や細胞接着分子と協働し細胞の増殖や浸潤を促進し、キナーゼ阻害薬の抵抗性獲得への関与も示唆されてきた。そこで、c-Src (c-Src-EGFP) の挙動を細胞で観察したところ、細胞膜に局在する c-Src が阻害薬投与により接着斑へ 1 分以内に移動することが明らかとなった(図7)。阻害薬は c-Src を活性化型構造に変化させ、FAK と結合を促進することで接着斑へ移動させる。低親和性の Src 阻害薬では投与後に洗い流すことによって、高親和性の阻害薬では細胞の SRC 遺伝子に薬剤抵抗性の変異が入ることによって、c-Src/FAK 複合体から阻害薬が早期に外れることにより、c-Src が FAK をリン酸化、Grb2 が結合、Erk のリン酸化を上昇させる、いわゆる「接着依存性細胞増殖シグナル」を惹起することが判明した(図8)。これは、阻害薬がかえって標的であるキナーゼを活性化しがん細胞を増殖させることを示している(Higuchi et al. Cell Reports 34:108876, 2021)。一般に、薬剤抵抗性変異を獲得したキナーゼには、単に阻害薬が効かないと考えられているが、阻害薬が逆説的に活性化薬と働く可能性が判明した。この逆説的活性化は、弱くクロスする本来の標的とはされていないキナーゼに起こりやすい性質であることも注意を要する。

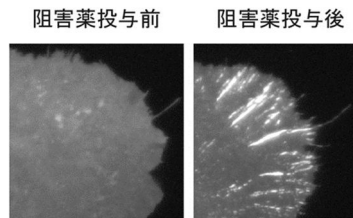


図7 Abl/Src 阻害薬ダサチニブの投与後、接着斑への顕著な局在変化を示す c-Src-EGFP。

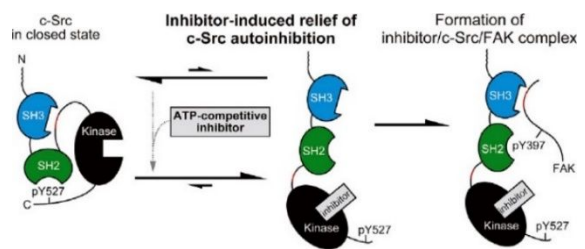


図8 キナーゼ阻害薬がもつ Src へのアロステリック効果。親和性の弱い薬剤や Src に薬剤抵抗性の変異がある場合、阻害薬の早期解離が起き、細胞増殖シグナルを惹起する。

以前の研究者の報告(2009年 Mol. Pharmacol.誌)での c-Abl をはじめ、がんに関連する BRAf や Akt でもキナーゼ阻害薬誘発性の細胞内局在変化が報告され、活性化様の分子構造変化や二量体化が示されてきた。これらを合わせると、ATP 競合キナーゼ阻害薬によって自己抑制構造が解けるキナーゼは多数存在する可能性が高いため、アロステリック効果を受けるキナーゼの検索を続けている。また、がん治療等に用いられるキナーゼ阻害薬のスペクトラムをどう調節すべきかについては不明な点が多い。本成果の見出した阻害薬のアロステリック効果と逆説的標的キナーゼの活性化・下流シグナルの惹起の性質は、臨床において副作用を避ける治療法の選択においてのみならず、治療薬開発の方向性を導くうえで、重要なコンセプトとなる可能性が高い。

(4) 多重・高密度標識超解像蛍光顕微鏡 IRIS 用プローブ作製のための迅速モノクローナル抗体単離法の開発とその後の改良

可視化する標的に迅速に結合・解離を繰り返す蛍光プローブと PALM/STORM 法に準じた分子ローカリゼーション法を組み合わせた独自の超解像顕微鏡 IRIS (2015 年 Nature Methods 誌に発表) は、無制限の多重染色を実現するとともに、サンプリング定理によって標識体(抗体など)のサイズの2倍以下の構造パターンを可視化できない通常の超解像顕微鏡が抱える分解能限界を超えた、微細構造可視化能力を秘めている。しかし、個別の標的に対する蛍光プローブ開発が必要な点がボトルネックである。本研究では、任意の標的分子に対し速い解離速度を示すモノクローナル抗体を半自動顕微鏡下でスクリーニングする方法を開発した(図9)。得られた抗体の Fab 断片に蛍光色素を付加、複数分子を単一標本内で超解像可視化することに成功した (Miyoshi et al. Cell Reports 34:108708, 2021 および STAR Protocols 2: 100967, 2021)。

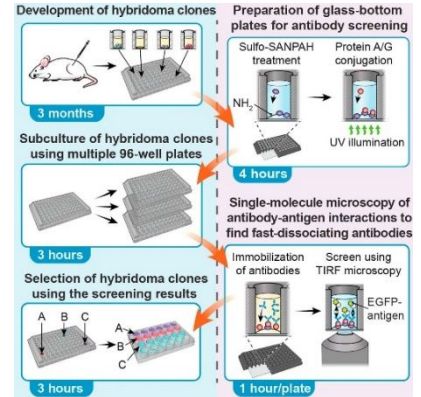


図9 迅速解離モノクローナル抗体の半自動顕微鏡スクリーニングの概略。

加えて、本研究で問題となった最適な抗体が得られる歩留まりの悪さや抗体の断片化・蛍光標識過程での品質低下の問題を解決すべく、抗体断片のリコンビナント化と配列改変によるプローブの最適化手法の開発に取り組んだ(リバイス中)。既存のモノクローナル抗体の配列から迅速に IRIS 用プローブへ変換する目処が立ちつつあり、多数の抗体資産を利用した生体構造の形成・改変過程を可視化するツールの収集が実現しそうである。

(5) 葉状仮足のレトログレードフローが引き起こすアクチン結合型プローブの局在異常

細胞の分化、遊走、組織構築の多くはアクチン細胞骨格の形態変化を伴っており、アクチン動態のモニタリングは盛んに用いられる。特に、LifeAct に代表されるアクチン線維に強く結合するプローブは、細胞内機構に影響を与えないプローブとして、重用される。われわれは、細胞の伸展部の葉状仮足において、実際のアクチン局在と LifeAct の局在が一致せず、後方に偏ることに気づいた。ファロイジンについても局在ミスがより強く観察された。葉状仮足には高密度のアクチン線維網が存在し、絶え間なく細胞の辺縁から中心に向かって流動する。流動に起因する分子勾配モデル (convection-induced gradient distribution model) を偏微分方程式で解析したところ、LifeAct のように結合・解離の速い(半減期 30 ミリ秒)プローブでも、アクチン流動によってプローブの分布が強く影響されることが判明した(図10)。理論での予測に一致して、レトログレードフローの速度に応じた局在異常の増大も認められた (Biophys. J. 116:142-150, 2019; 関連する総説 J. Muscle Res. Cell Motil. 41:163-173, 2020)。

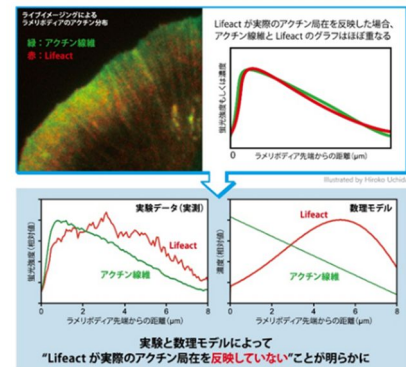


図10 葉状仮足のアクチン線維と LifeAct プローブの分布の違いと数理モデルの予測グラフ。細胞固定後は LifeAct の結合位置の分布がアクチン線維の分布と一致(右上)。

この知見の意外なポイントは、LifeAct が一度の結合で 1, 2 ナノメートルだけ後方に運ばれる一方、次の結合まで 50 ナノメートル程の距離を自由拡散する性質をもっているにもかかわらず、明白な後方への分布バイアスが懸かる点である。この局在異常が極性形成などを課題とする基礎生物学研究において、間違った知見を与えてきた可能性を本知見は指摘しており、学术界に重大な警鐘を鳴らす成果と考えられる。生体分子においても、アクチン線維側方に結合する分子群は、例えその結合が一過性であっても後方への強い勾配を葉状仮足内で形成することが必然的に予想される。細胞先端端や葉状仮足先端には、細胞シグナルを受け細胞伸展を制御する分子が多く存在するが、それらが構造先端に集積するためには、アクチン線維との結合を抑制しつつ細胞内を移動するなんらかのしくみを、分子ごとに備える可能性も示唆する知見である。

(6) その他の成果や取り組み

共同研究にて、免疫シナプスでの T 細胞受容体 (TCR) シグナルの活性化におけるフォルミンファミリー mDia1 および mDia3 の重要性を解明した (Sci. Adv. 6:eaay2432, 2020)。ここでは、TCR 動態のライブセル解析に部分的に協力した。

接着分子については、複数の分子の細胞内動態可視化に取り組み、接着斑を介する力の伝播のしくみや個々の分子の活性制御、外部および細胞内部からの力による分子動態制御、細胞増殖刺激による分子応答などについて検証を進め、いくつかの新知見を見出しつつある(投稿中および投稿準備中)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 6件 / うちオープンアクセス 8件）

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Holz Danielle, Hall Aaron R, Usukura Eiji, Yamashiro Sawako, Watanabe Naoki, Vavylonis Dimitrios  | 4. 巻<br>11                    |
| 2. 論文標題<br>A mechanism with severing near barbed ends and annealing explains structure and dynamics of dendritic actin networks   | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>eLife   | 6. 最初と最後の頁<br>-               |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.7554/eLife.69031   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する                  |
| 1. 著者名<br>Miyoshi Takushi, Friedman Thomas B., Watanabe Naoki   | 4. 巻<br>2                     |
| 2. 論文標題<br>Fast-dissociating but highly specific antibodies are novel tools in biology, especially useful for multiplex super-resolution microscopy   | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>STAR Protocols  | 6. 最初と最後の頁<br>100967 ~ 100967 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.xpro.2021.100967  | 査読の有無<br>無                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する                  |
| 1. 著者名<br>Miyoshi Takushi, Zhang Qianli, Miyake Takafumi, Watanabe Shin, Ohnishi Hiroe, Chen Jiji, Vishwasrao Harshad D., Chakraborty Oisorjo, Belyantseva Inna A., Perrin Benjamin J., Shroff Hari, Friedman Thomas B., Omori Koichi, Watanabe Naoki | 4. 巻<br>34                    |
| 2. 論文標題<br>Semi-automated single-molecule microscopy screening of fast-dissociating specific antibodies directly from hybridoma cultures  | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Cell Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>108708 ~ 108708 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.celrep.2021.108708  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する                  |
| 1. 著者名<br>Higuchi Makio, Ishiyama Kenichi, Maruoka Masahiro, Kanamori Ryosuke, Takaori-Kondo Akifumi, Watanabe Naoki  | 4. 巻<br>34                    |
| 2. 論文標題<br>Paradoxical activation of c-Src as a drug-resistant mechanism  | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Cell Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>108876 ~ 108876 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.celrep.2021.108876  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                     |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>山城佐和子、渡邊直樹                               | 4. 巻<br>72      |
| 2. 論文標題<br>細胞内蛍光単分子イメージングによるミオシン張力依存的なアクチン線維安定化の証明 | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>生体の科学                                    | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし                     | 査読の有無<br>無      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難             | 国際共著<br>-       |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Koseki Kazuma, Taniguchi Daisuke, Yamashiro Sawako, Mizuno Hiroaki, Vavylonis Dimitrios, Watanabe Naoki | 4. 巻<br>24              |
| 2. 論文標題<br>Lamellipodium tip actin barbed ends serve as a force sensor  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Genes to Cells  | 6. 最初と最後の頁<br>705 ~ 718 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/gtc.12720   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する            |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Li Huiping, Miki Takao, Almeida Gl?cia Maria de, Hanashima Carina, Matsuzaki Tomoko, Kuo Calvin J., Watanabe Naoki, Noda Makoto | 4. 巻<br>19              |
| 2. 論文標題<br>RECK in Neural Precursor Cells Plays a Critical Role in Mouse Forebrain Angiogenesis   | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>iScience  | 6. 最初と最後の頁<br>559 ~ 571 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.isci.2019.08.009  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する            |

|   |                        |
|---|------------------------|
| 1. 著者名<br>Thumkeo D., Katsura Y., Nishimura Y., Kanchanawong P., Tohyama K., Ishizaki T., Kitajima S., Takahashi C., Hirata T., Watanabe N., Krummel M. F., Narumiya S. | 4. 巻<br>6              |
| 2. 論文標題<br>mDia1/3-dependent actin polymerization spatiotemporally controls LAT phosphorylation by Zap70 at the immune synapse  | 5. 発行年<br>2020年        |
| 3. 雑誌名<br>Science Advances  | 6. 最初と最後の頁<br>eaay2432 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1126/sciadv.aay2432  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する           |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Yamashiro Sawako, Watanabe Naoki  | 4. 巻<br>41              |
| 2. 論文標題<br>Quantitative high-precision imaging of myosin-dependent filamentous actin dynamics | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Muscle Research and Cell Motility  | 6. 最初と最後の頁<br>163 ~ 173 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s10974-019-09541-x  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>渡邊 直樹、山城 佐和子                                     | 4. 巻<br>92            |
| 2. 論文標題<br>アクチンネットワークを駆け巡る力学作用の分子可視化                       | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>生化学  | 6. 最初と最後の頁<br>84 ~ 93 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.14952/SEIKAGAKU.2020.920084 | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)                     | 国際共著<br>-             |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>山城 佐和子、渡邊 直樹                         | 4. 巻<br>45            |
| 2. 論文標題<br>蛍光単分子イメージングが解き明かすミオシン張力によるアクチン線維安定化 | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>メディカル・サイエンス・ダイジェスト                   | 6. 最初と最後の頁<br>434-437 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし                 | 査読の有無<br>無            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難         | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>渡邊直樹、樋口牧郎                         |
| 2. 発表標題<br>チロシンキナーゼ阻害薬が引き起こす逆説的Src活性化とがん細胞増殖 |
| 3. 学会等名<br>第95回日本薬理学会年会                      |
| 4. 発表年<br>2022年                              |



|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>渡邊直樹                   |
| 2. 発表標題<br>抗がんキナーゼ阻害薬が標的を活性化する危険性 |
| 3. 学会等名<br>2022年生体運動研究合同班会議       |
| 4. 発表年<br>2022年                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>白倉英治、山城佐和子、渡邊直樹  |
| 2. 発表標題<br>Motion Analysis Of Actin Oligomer In Lamellipodia By SiMS Microscopy |
| 3. 学会等名<br>2022年生体運動研究合同班会議   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ying LIU, Sawako YAMASHIRO, Naoki WATANABE  |
| 2. 発表標題<br>Single-molecule speckle (SiMS) analysis of vinculin-actin interaction in lamellipodia |
| 3. 学会等名<br>2022年生体運動研究合同班会議  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Naoki Watanabe and Makio Higuchi   |
| 2. 発表標題<br>Paradoxical Src activation and cancer cell proliferation induced by tyrosine kinase inhibitors |
| 3. 学会等名<br>CellBio Virtual 2021 (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>山城佐和子、劉穎、渡邊直樹                       |
| 2. 発表標題<br>アクチン線維流動と接着斑分子ダイナミクスの定量的単分子イメージング解析 |
| 3. 学会等名<br>第44回日本分子生物学会年会                      |
| 4. 発表年<br>2021年                                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>渡邊直樹                             |
| 2. 発表標題<br>抗がん薬による逆説的な細胞増殖促進&先導端アクチンの動的不安定性 |
| 3. 学会等名<br>「認識と形成」研究会                       |
| 4. 発表年<br>2021年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Naoki Watanabe   |
| 2. 発表標題<br>Contemplation on ' spare molecules ' in G/F-actin homeostasis and formin homology proteins |
| 3. 学会等名<br>第73回日本細胞生物学会大会（招待講演）   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>山城佐和子、劉穎、渡邊直樹                         |
| 2. 発表標題<br>高精度単分子イメージングによるアクチン線維流動 - 接着斑連関の可視化解明 |
| 3. 学会等名<br>第73回日本細胞生物学会大会                        |
| 4. 発表年<br>2021年                                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Sawako Yamashiro, Ying Liu, Dimitrios Vavylonis, Naoki Watanabe  |
| 2. 発表標題<br>New insights into the retrograde F-actin flow associated motions of focal adhesion molecules visualized by single-molecule speckle (SiMS) microscopy |
| 3. 学会等名<br>第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Sawako Yamashiro, Ying Liu, Naoki Watanabe   |
| 2. 発表標題<br>Retrograde actin flow-associated motions of focal adhesion molecules visualized by single-molecule speckle (SiMS) microscopy |
| 3. 学会等名<br>American Society for Cell Biology/EMBO Meeting (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Naoki Watanabe  |
| 2. 発表標題<br>Translation of mechanical forces through cellular actin systems |
| 3. 学会等名<br>The 11th TOYOTA RIKEN International Workshop (招待講演) (国際学会)      |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Naoki Watanabe   |
| 2. 発表標題<br>Single-Molecule Dissection of Physico-Biochemical Coupling in Actin System |
| 3. 学会等名<br>ZEISS-iCeMS Innovation Core Founding Commemorative Symposium (招待講演)        |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>渡邊 直樹                                   |
| 2. 発表標題<br>無制限多重染色と高精細画像を実現した超解像顕微鏡IRIS            |
| 3. 学会等名<br>JASIS 2019 ライフサイエンスイノベーションゾーン基調講演（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2019年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>通山 潔、山城 佐和子、渡邊 直樹  |
| 2. 発表標題<br>Visualizing the rotation of single actin filaments in living cells |
| 3. 学会等名<br>第92回日本薬理学会年会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>渡邊 直樹、山城 佐和子            |
| 2. 発表標題<br>ラメリボディアが動物細胞に普遍的に存在する理由 |
| 3. 学会等名<br>生体運動研究合同班会議 2020        |
| 4. 発表年<br>2020年                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>山城 佐和子、劉 穎、渡邊 直樹                     |
| 2. 発表標題<br>単分子イメージングによるアクチン線維流動-接着斑分子連結機構の可視化解明 |
| 3. 学会等名<br>第19回日本蛋白質科学会・第71回日本細胞生物学会合同年次大会      |
| 4. 発表年<br>2019年                                 |



|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yamashiro S, Taniguchi D, Tanaka S, Kiuchi T, Vavylonis D, Watanabe N.    |
| 2. 発表標題<br>Retrograde flow-induced biased distribution of actin probes in live cells |
| 3. 学会等名<br>The 11th TOYOTA RIKEN International Workshop (国際学会)                       |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yamashiro S, Liu Y, Watanabe N   |
| 2. 発表標題<br>Coupling between actin retrograde flow and focal adhesion molecules visualized by single-molecule speckle microscopy |
| 3. 学会等名<br>American Society for Cell Biology / EMBO 2019 meeting (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kiyoshi Tohyama, Sawako Yamashiro, Naoki Watanabe  |
| 2. 発表標題<br>The change of the direction of F-actin caused by the filament disassembly around focal adhesions |
| 3. 学会等名<br>第57回日本生物物理学会年会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計2件

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Naoki Watanabe   | 4. 発行年<br>2022年 |
| 2. 出版社<br>Elsevier   | 5. 総ページ数<br>-   |
| 3. 書名<br>Plasma Membrane Shaping: "Brownian ratchet force sensor at the contacting point between F-actin barbed end and lamellipodium tip plasma membrane" |                 |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>渡邊 直樹、清末 優子（秋山 徹、河府 和義 編）          | 4. 発行年<br>2019年 |
| 2. 出版社<br>羊土社                                | 5. 総ページ数<br>648 |
| 3. 書名<br>決定版 阻害剤・活性化剤ハンドブック 「アクチン細胞骨格系阻害薬」の項 |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

|   |
|---|
| <p>Vavylonis Group, Dept. Physics, Lehigh University<br/> <a href="https://www.lehigh.edu/~div206/research.htm">https://www.lehigh.edu/~div206/research.htm</a></p> <p>日経バイオテク「キナーゼ阻害薬は両刃の剣か？ 抵抗性変異との遭遇で細胞を増殖」<br/> <a href="https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/column/16/052000031/042800058/">https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/column/16/052000031/042800058/</a></p> <p>令和4年6月26日日本経済新聞（全国版）紹介記事掲載予定</p> |
|---|

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関                       |  |  |
|---------|-------------------------------|--|--|
| 米国      | National Institutes of Health |  |  |
| 米国      | Lehigh University             |  |  |