

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2010

課題番号：20200057

研究課題名（和文）細胞内蛋白質の時空間的ダイナミクス調節による細胞応答制御機構の解明

研究課題名（英文）The analysis of the role of spatio-temporal dynamics of intracellular proteins in cell responses.

研究代表者

大橋 一正 (Ohashi Kazumasa)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号：10312539

研究成果の概要（和文）：細胞内アクチン骨格の動的な状態は様々なアクチン結合タンパク質に依存したアクチンの重合と脱重合によって制御されている。本研究において私たちは、光活性化蛍光タンパク質を用いた FDAP 解析を用いて細胞内の遊離したアクチンやコフィリンの濃度を測定した。その結果、コフィリンは、細胞内の遊離アクチンの半分を生成していることやコフィリンが非常に速い速度でアクチン線維と結合・解離を行っていることを見出し、このような動的状態が細胞の運動量を決定していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Actin cytoskeleton dynamics are regulated by a variety of actin-binding proteins, which cooperatively act in the assembly/disassembly and reorganization of actin filaments in cells. In this study, we have assessed the concentration of actin monomer or cofilin in the cytoplasm of living cells by the fluorescence decay after photobleaching (FDAP) assay. We found that cofilin is involved in the generation of more than half of the actin monomers in the cytoplasm. We also found that cofilin exhibits fast turnover between cytoplasm and actin filaments. These results suggest that the degree of dynamics of actin or cofilin determines the capacity of cell motility.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
年度			
総計	23,000,000	6,900,000	29,900,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞構造・機能、細胞骨格、情報伝達、イメージング技術、アクチン、コフィリン

## 1. 研究開始当初の背景

刺激に対する細胞の形態変化や運動は、細胞内のシグナル伝達に伴うシグナル分子

の活性化や局在変化とそれに続く細胞骨格の再構築によって引き起される。このような細胞内のシグナル伝達分子は動的に局在

を変化させ、標的となる部位への局在と離脱を繰り返している。シグナル伝達分子は、その分子の活性化状態と共に、働く場所に存在する時間によってその働きは大きく異なると考えられ、また、細胞骨格においては、構築された構造の構成分子のターンオーバー速度によって同じ形でもその役割が多様に変化することが推測される。このような細胞活動の複雑な分子メカニズムを正確に理解するためには分子の活性変化と共にその局在やターンオーバー速度といったダイナミクスを考慮した時空間的な解析が必須である。私たちは、アクチン線維の脱重合因子であるコフィリンをリン酸化して不活性化するLIMキナーゼを発見し、さらに、活性化する脱リン酸化酵素Slingshotの同定に成功し、コフィリンによるアクチン骨格の再構築制御機構を解明してきた。さらに、コフィリンのアクチン骨格ダイナミクスに対する作用を解析するために、可逆的に蛍光の退色と発色が可能な光活性化蛍光タンパク質であるDronpaを用いて細胞内のG-アクチンとF-アクチンの存在比率の変化を測定する方法の開発に成功した。また、Dronpaの退色と発色を何度でも繰り返し行うことができるという特性を活かして、局所におけるタンパク質の存在量の時間的変化を定量的に測定することに成功した。この方法を用いることで、細胞内のタンパク質の細胞内骨格や細胞膜に対する結合と解離の平衡状態を追跡することが可能であり、細胞内の様々な分子に対して応用することで、細胞内のタンパク質の動的状態（ダイナミクス）が持つ意義を明らかにしていくことが可能であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、可逆的な光活性化蛍光タンパク質Dronpaを用いた融合タンパク質の生細胞内局所における存在量のリアルタイム定量測定とターンオーバー速度の測定方法の開発と細胞内分子の時空間的な流動性（ダイナミクス）の調節によって細胞骨格リモデリングやシグナル伝達の作用を変化させる新たな制御機構の解明を目的とする。最初に、細胞骨格についてアクチンをモデルとして、増殖因子刺激や極性形成を促した細胞における細胞内の単量体として遊離したG-アクチンと重合して繊維状となったF-アクチンの局所と存在量の変化、また、そのターンオーバー速度をDronpa-アクチンを用いてリアルタイムで測定する。また、Dronpa-コフィリンを用いて、局所のアクチン骨格におけるコフィリンの存在量とそのターンオーバー速度の変化とアクチン骨格ダイナミクスの相関を解析する。さらに、脱重合されたG-アクチンの再重合の時空間

的制御を明らかにする。これらの解析によって、アクチン線維の構造のダイナミクスと重合と脱重合の制御が細胞形態、移動や極性形成に寄与するメカニズムを明らかにする。次に、この手法を用いて微小管を構成するチューブリン分子の重合と脱重合のダイナミクスの変化を解析し、細胞運動や細胞分裂時における微小管ダイナミクスの生理学的意義を明らかにする。さらに、神経細胞の樹状突起の発達における伸展や分岐におけるアクチン骨格のダイナミクス調節を解析し、樹状突起の形成とその可塑性における細胞骨格のダイナミクスの役割を解明する。また、細胞内シグナル伝達におけるシグナル分子のダイナミクスがもつ意味を明らかにするために、細胞外刺激に応じて細胞質から細胞膜に局在を変化させる低分子量Gタンパク質や核内へ移行するキナーゼ、核内外シャトルするタンパク質について各部位における存在量、シャトルの流量を測定しその生物学的意義を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) Dronpaを用いた細胞内遊離アクチン濃度の測定

蛍光発色と退色を可逆的に変換できる蛍光タンパク質Dronpaを融合したアクチンをヒト乳癌由来MCF-7細胞に発現させた。最初に細胞内の全てのDronpaを488 nmの励起光により退色させ、その後、任意の関心領域(ROI)内を458 nmの励起光を照射しDronpaの蛍光発色を回復させると同時にDronpaの蛍光の分布を経時観察した。Dronpaはアクチンの挙動と一致しROI内の蛍光強度の減衰はG-アクチン濃度に依存するため、蛍光減衰パターンからROI内の相対的G-アクチン濃度を算出した。この Fluorescence Decay After Photoactivation (FDAP) 解析により細胞内のG-アクチン濃度を定量測定した。さらに、このFDAP解析を繰り返す Sequential-FDAP (s-FDAP) 法を用いて細胞内のG-アクチン濃度変化を測定した (研究成果 (1) 参照)。

### (2) 神経細胞の神経突起形成とLIMキナーゼの機能解析

Neuro2aマウス神経芽腫細胞に対して、カルシウムイオノフォアであるイオノマイシンを終濃度1.5  $\mu\text{M}$ で添加し、48時間後に細胞を固定して神経突起の形成を観察した。LIMキナーゼの発現抑制は、マウスのcDNA配列より標的配列を選定し(5'-GAAGGACTACTGGGCCCGC-3') shRNA発現プラスミドを作製した。これをNeuro2a細胞に導入し、上記の神経突起形成の誘導を行った。

### (3) コフィリンの細胞内におけるダイナミクスの計測

コフィリンに Dronpaを融合させ、COS細胞に発現させた。Dronpa-アクチンで行ったFDAP解析を細胞内の細胞質、アクチンの重合部位で行い、遊離したコフィリンの相対量、拡散速度を測定した。同時に、YFPを付加したコフィリンを用いてFluorescent Recovery After Photobleaching (FRAP)解析を行い、コフィリンのアクチン線維への結合と解離のターンオーバー速度を測定した。

#### (4) 微小管のダイナミクスに対するFurryの機能解析

Furryの発現抑制を行い細胞分裂におけるFurryの機能を解析した。ヒトFurryのcDNA配列より標的配列を選定し(5'-AATGGCTCCAGTCACAGAA-3') shRNA発現プラスミドを作製した。これをHeLa細胞に導入し、染色体の分離、紡錘体の形状に対する影響を解析した。さらに、Furryに結合するタンパク質を質量分析機を用いたプロテオミクス解析によって解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞内遊離アクチン濃度変化の測定方法の確立

細胞内におけるDronpa-アクチンの蛍光発色後の拡散による蛍光強度の減衰から局所における遊離アクチン濃度の測定を行うDFAP解析をさらに発展させ、FDAP解析を連続して繰り返し、細胞内のROIにおける遊離アクチン濃度の変化を測定するSequential-FDAP (s-FDAP)法を開発した(図1A)。Dronpaアクチンを発現させた細胞に対して全体を退色させ、局所のROIを発色後、その直後のROI内の蛍光強度と40ミリ秒後の蛍光強度を測定し、その差を拡散するG-アクチンの相対的な濃度とした。10秒毎にこのサイクルを繰り返しROIにおけるアクチン濃度変化をリアルタイムに計測した(図1B, C)。その結果、各時間の観測点で発色直後と40ミリ秒後の安定した蛍光強度の差が測定され、細胞内のアクチンの状態を反映していることが示唆された。この結果をもとに、細胞内のG-アクチン濃度の変化を測定できることを検証するためにアクチン脱重合阻害剤であるJasplakinolideを用いて解析を行った。その結果、Jasplakinolideの濃度依存的に添加後の細胞内のG-アクチン濃度の低下が観察された(図2)。これらの結果から、この方法によって細胞内のG-アクチン濃度の変化をリアルタイムに計測できることが明らかになった(文献4)。

#### (2) 刺激依存的な細胞運動における遊離アクチン濃度変化と運動量の相関解析

細胞内遊離するタンパク質の濃度変化を測定する方法が確立されたため、細胞に対する

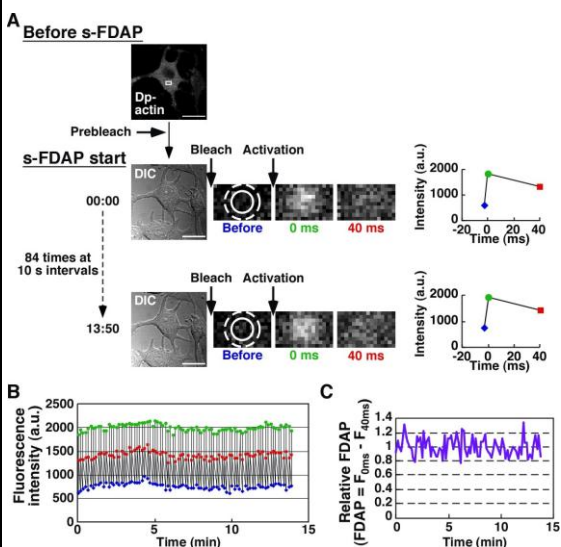


図1. s-FDAP法による細胞内G-アクチン濃度変化の測定. A. s-FADP解析の操作手順. B. ROI内の蛍光輝度変化. 緑: 光活性化直後のROI内の蛍光輝度、青: 光活性化40 ms後のROI内の蛍光輝度、赤: 光活性化40 ms後と光活性化直後のROI内の蛍光輝度の差.

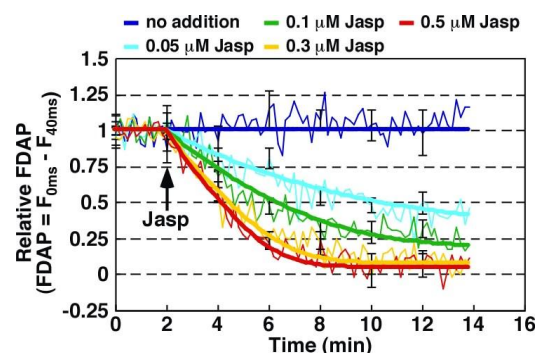


図2. Jasplakinolideによる細胞内G-アクチン濃度変化の測定. Dronpa-アクチンを発現させたMCF-7細胞に対してJasplakinolideを示した各濃度で添加後、s-FDAP法によりG-アクチン濃度の変化を測定した。

生理的な刺激による細胞運動の誘導時における細胞内G-アクチン濃度の変化と細胞運動におけるその役割を解析した。MCF-7細胞に対してEGF様の増殖因子であるNeuregulinを添加して運動性を亢進させ、細胞内G-アクチンの濃度変化と細胞の形態変化との相関を解析した(図3)。その結果、刺激後90秒程度で急激なG-アクチン濃度の低下が観察され、刺激依存的なアクチンの重合が促進し、約5分後までにG-アクチンの40%が重合されることが明らかとなった。また、細胞の形態変化による面積の変化を同時に観察した結果、細胞形態の変化はG-アクチン濃度が低下した後で増加を始めることが明らかとなった。これらの結果から、初期のアクチン重合は細胞周辺から突出する葉状仮足形成を行っているのではなく、葉状仮足はその後のア

クチンのターンオーバーによって形成されていることが強く示唆された(図3下段、文献4)。

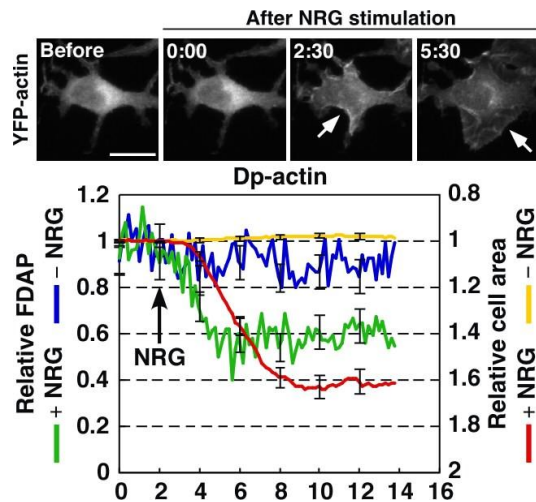


図3. Neuregulin刺激によるMCF-7細胞の運動性亢進(葉状仮足形成)と細胞内G-アクチン濃度変化の相関解析. 上段. Neuregulin刺激依存的な葉状仮足形成の経時観察. MCF-7細胞に対してYFP-アクチンを発現させ、Neuregulin (NRG)を50 ng/mlで添加した。細胞形態はYFP-アクチンにより可視化した。Bar, 20  $\mu$ m. 下段. Neuregulinの添加によるG-アクチン濃度の低下(右側縦軸)と細胞の面積増加(左側縦軸)の経時変化。

次に、刺激依存的なG-アクチンの濃度変化と細胞の形態変化(葉状仮足の突出)の相関を解析した。MCF-7細胞に対してJasplakinolideを添加し、細胞内のG-アクチン量をJasplakinolideの濃度依存的に低下させ、その後、Neuregulinを添加して細胞運動を誘導した(図4A)。その結果、Jasplakinolideによる細胞内のG-アクチン濃度の低下と共に刺激依存的なG-アクチン濃度の低下量は減少し(図4A)、刺激により突出する葉状仮足の面積が減少した(図4B)。刺激依存的なG-アクチン濃度の低下量と葉状仮足の面積の相関を解析すると強い正の相関が得られ、刺激依存的な一過的アクチン重合の量がその後続く細胞形態変化の量を決定していることが強く示唆された(文献4)。

### (3) 神経突起形成における LIM-キナーゼの機能解析

LIM キナーゼによる細胞内アクチン骨格の動的状態の制御の役割を明らかにするために、培養神経細胞の神経突起形成における機能を解析した。Neuro2A 神経芽細胞はカルシウムイオノフォアの刺激によって神経突起形成が促進されるため、LIM キナーゼの発現を shRNA によって抑制し、カルシウムイオノフォアの刺激を行った。その結果、刺激依存的な神経突起の増加が抑制された(図5, 文献

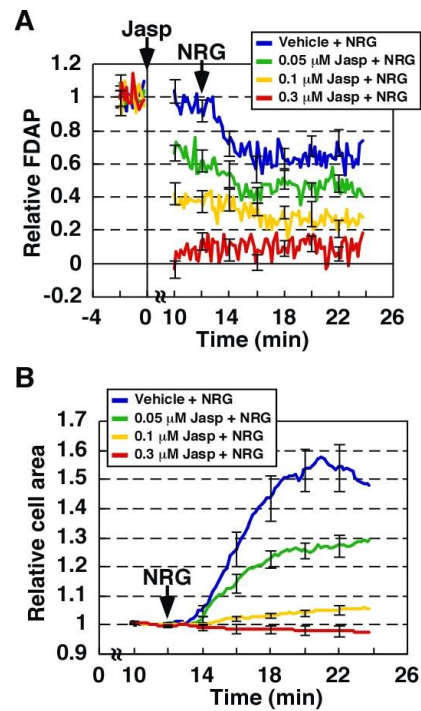


図4. Jasplakinolide による G-アクチン濃度の低下後の Neuregulin 刺激による細胞内 G-アクチン濃度変化と葉状仮足形成の相関解析. A. 各濃度の Jasplakinolide 添加後の G-アクチン濃度の低下とその後の Neuregulin 刺激依存的な G-アクチン濃度変化. B. 各 Jasplakinolide 添加後の Neuregulin 刺激依存的な細胞の面積増加の経時変化。

6)。さらに、そのシグナル経路を解析した結果、CaMKIV が LIM キナーゼを直接リン酸化して活性化していることが明らかとなった(文献6)。

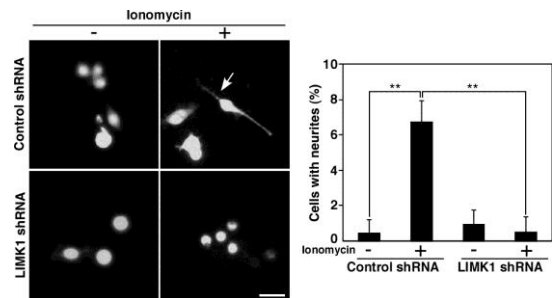


図5. マウス神経芽腫 Neuro2a 細胞に対するイオノマイシン刺激による神経突起形成の誘導と LIM キナーゼ発現抑制の効果. 左. イオノマイシン刺激によるコントロール shRNA 発現細胞の神経突起の形成(矢印)と LIM キナーゼ1 (LIMK1)の発現抑制による阻害. Bar, 10  $\mu$ m. 右グラフ. コントロール shRNA 発現細胞と LIMK1 発現抑制細胞におけるイオノマイシン刺激により神経突起を形成した細胞数。

### (4) コフィリンの動的状態の測定と細胞内における状態の解析

細胞内のタンパク質のダイナミクスの変化の細胞応答への寄与を解析するために、アクチン線維に結合しアクチン線維を切断・脱重合する活性をもつコフィリンを対象に検討を行った。コフィリンに Dronpa を融合させ、COS 細胞に発現させた後、アクチンで行った FDAP 解析を同様に行った結果、コフィリンは G-アクチンに対して非常に速い速度で拡散していることが明らかとなった。また、アクチン線維に結合しているコフィリンもミリ秒のオーダーで結合と解離のターンオーバーを行っていることが明らかとなった(未発表)。これらの結果から、コフィリンは非常に早い速度でアクチン繊維と結合することにより動的なアクチン線維の脱重合を可能にしていることが示唆された。また、コフィリンはこれまで考えられてきた G-アクチンへの結合による隔離作用はあまり大きくなく、アクチン線維の切断・脱重合によるアクチン線維のターンオーバーの促進に寄与することが強く示唆された。

コフィリンの核内-細胞質間をシャトルするターンオーバー速度を測定することを試みたが核内のコフィリン量が少ないため定量的な解析が困難であり、その意義については今後の検討が必要である。

#### (5) 微小管の安定化に寄与する Furry の機能解析

チューブリンが重合して形成される微小管について、その動的状態の意義を解析するために、微小管結合タンパク質である Furry の機能解析を行った。その結果、Furry は安定化したアセチル化された微小管に強く局在し、細胞分裂時の染色体の分離に重要な役割を担うことが明らかとなった(文献 7)。さらにプロテオミクスによる解析を進め、Furry が微小管のアセチル化を制御する可能性を見出した(未発表)。

#### 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)

- ① Ohashi K., Kiuchi T., Shoji K., Sampei K., and Mizuno K.: Visualization of cofilin-actin and Ras-Raf interactions by bimolecular fluorescence complementation assays using a new pair of split Venus fragments., *Biotechniques*, 52 (1), 45-50 (2012) (査読有り)
- ② Kiuchi T., Nagai T., Ohashi K., Watanabe N., and Mizuno K.: Live-cell imaging of G-actin dynamics using sequential FDAP, *BioArchitecture*, 1 (5), 1-5 (2011) (査読有り)
- ③ Ohashi K., Fujiwara S., Watanabe T.,

Kondo H., Kiuchi T., Sato M., and Mizuno K.: LIM-kinase has a dual role in regulating lamellipodium extension by decelerating the rate of actin retrograde flow and the rate of actin polymerization., *J. Biol. Chem.*, 286: (42) 36340-36351 (2011) (査読有り)

- ④ Kiuchi T., Nagai T., Ohashi K., and Mizuno K.: Live-cell measurements of spatiotemporal changes in G-actin concentration reveal its essential role in stimulus-induced actin assembly and cell extension., *J. Cell Biol.*, 193 (2), 365-380 (2011) (査読有り)
- ⑤ Tsuji T., Ohta Y., Kanno Y., Hirose K., Ohashi K., and Mizuno K.: Involvement of p114-RhoGEF and Lfc in Wnt-3a- and Dishevelled-induced RhoA activation and neurite retraction in N1E-115 mouse neuroblastoma cells., *Mol. Biol. Cell*, 21 (20), 3590-3600 (2010) (査読有り)
- ⑥ Takemura M., Mishima T., Wang Y., Kasahara J., Fukunaga K., Ohashi K., and Mizuno K.: Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV-mediated LIM-kinase activation is critical for calcium signal-induced neurite outgrowth., *J. Biol. Chem.*, 284 (42), 28554-28562 (2009) (査読有り)
- ⑦ Chiba S., Ikeda M., Katsunuma K., Ohashi K., and Mizuno K., MST2- and Furry-Mediated Activation of NDR1 Kinase Is Critical for Precise Alignment of Mitotic Chromosomes., *Curr. Biol.*, 19, 675-681 (2009) (査読有り)
- ⑧ Kurita S., Watanabe Y., Gunji E., Ohashi K., and Mizuno K., Molecular dissection of the mechanisms of substrate recognition and F-actin-mediated activation of cofilin-phosphatase slingshot-1., *J. Biol. Chem.*, 283 (47), 32545-32552 (2008) (査読有り)

[学会発表] (計 20 件)

- ① Ohashi K., Saito A., Kondo H., Miyajima K., Akatsuka J., Kiuchi T., Mizuno K., Phosphorylation and activation of LIMK1 by CaMKIIbeta in BDNF-induced dendritogenesis, 第 84 回日本生化学会大会、京都、2011. 9. 21-24
- ② 大橋一正、斎藤聡彦、宮島健、赤塚淳一、木内泰、水野健作、Activation of LIMK1 by CaMKIIβ is required for BDNF-induced dendritogenesis in rat cortical neurons, 第63回日本細胞生物学会大会、札幌、2011. 6. 27-6. 29

- ③ 高橋克宣、吉田圭一、梅原里奈、大橋一正、水野健作、細胞移動時の接着斑のターンオーバーにおけるSlingshotファミリーの機能解析、第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会合同大会、神戸、2010.12-7-12.10
- ④ Ikeda M., Chiba S., Ohashi K., Mizuno K., Regulation of Furry localization to spindle microtubules, 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会合同大会、神戸、2010.12-7-12.10
- ⑤ Saito A., Miyajima K., Akatsuka J., Ohashi K., Mizuno K., LIMK1 is required for BDNF-induced dendritogenesis through the PLC  $\gamma$ -CaMK II  $\beta$  signaling pathway, 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会合同大会、神戸、2010.12-7-12.10
- ⑥ Abiko H., Tsuji T., Naotsuka M., Hiataro R., Sakamoto N., Sato M., Ohashi K., Mizuno K., Identification of Rho-GEFs involved in mechanotransduction of vascular endothelial cell, 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会合同大会、神戸、2010.12-7-12.10
- ⑦ 安彦 日和、辻 拓史、直塚 萌、大橋一正、坂元 直哉、佐藤 正明、水野 健作、メカノストレス応答に関わるRho-GEFの網羅的探索、日本分子生物学会第10回春季シンポジウム、宮城県 松島、2010.6.7-6.8
- ⑧ 永井 友朗、木内 泰、大橋一正、水野健作、細胞内アクチンモノマー濃度と刺激依存的なラメリポディア形成との強い相関関係、第62回日本細胞生物学会大会、大阪、2010.5.19-5.21
- ⑨ Ohashi K., Cofilin phosphorylation play a critical role in cell motility and neuriteogenesis, The 1<sup>st</sup> UCL-Tohoku University Symposium, London, 2010.3.15-16
- ⑩ 佐上彩、太田裕作、栗田宗一、大橋一正、水野健作、Identification of filamin A as the Slingshot-binding protein, 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009.12.9-12.12
- ⑪ 三嶋利明、直塚萌、堀田祐司、大橋一正、水野健作、癌細胞のMesenchymal-amoeboid transitionにおけるLIMキナーゼの役割、第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009.12.9-12.12
- ⑫ Shoji K., Ohashi K., Sanpei K., Kiuchi T., and Mizuno K., High-throughput screening for low-molecular weight inhibitors of protein-protein interactions using BiFC probes, 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009.12.9-12.12
- ⑬ 辻拓史、太田裕作、菅野祐哉、大橋一正、水野健作、Wnt-PCP 経路による RhoA 活性化と神経突起退縮に關与する Rho-GEF の同定、第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009.10.21-24
- ⑭ 水野健作、千葉秀平、池田真教、大橋一正、NDR キナーゼの活性制御機構と染色体整列における機能、第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009.10.21-24
- ⑮ 永井友朗、木内泰、大橋一正、水野健作、生細胞内アクチンモノマー濃度変化測定のための FDAP タイムラプスイメージング法の開発とラメリポディア形成過程におけるコフィリン、アクチンモノマーの重要性、第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009.10.21-24
- ⑯ 大橋一正、水野健作、コフィリンホスファターゼ Slingshot の活性制御機構と細胞遊走、細胞分裂における機能、第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009.10.21-24
- ⑰ Ohashi K., Uchiumi N., Sanpei K., Nakagawa M. and Mizuno K., Effects of novel LIM-kinase-specific inhibitors on migration and invasion of tumor cells, 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009.10.1-3
- ⑱ Ohashi K., Miyajima K., Saito A., Kiuchi T., Akatsuka J., and Mizuno K., Role of cofilin phosphorylation in BDNF-induced dendritogenesis, 第 52 回日本神経化学会大会 (招待講演)、伊香保、2009.6.21-24
- ⑲ 永井友朗、木内泰、大橋一正、水野健作、ラメリポディア形成過程における細胞内 G-アクチン濃度のタイムラプスイメージング-Dronpa-アクチンの FDAP 解析を用いて、BMB2008 第 81 回日本生化学会大会 第 31 回日本分子生物学会年会、合同大会、神戸、2008.12.9-12.12

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/biomolecular/ts\\_ohashi.html](http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/biomolecular/ts_ohashi.html)

[http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno\\_lab/](http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno_lab/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大橋 一正 (Ohashi Kazumasa)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授  
研究者番号：10312539