

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293042

研究課題名(和文)多機能分子の細胞内活性の統合と制御—PI3Kの光操作を用いた研究

研究課題名(英文)Optogenetic study of multi functional signaling molecules such as RAC1 CDC42 and PI3K

研究代表者

中田 隆夫 (NAKATA, TAKAO)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：50218004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：PIP3の下流にあるアクチン細胞骨格の制御について検討した。低分子G蛋白RAC1およびCDC42それぞれの光スイッチでアクチンの挙動はどう異なるのかについて検討した。RAC1はラメリポディアを活性化した。CDC42ではlocalなポジティブフィードバックによるアクチンの活性化が起きるとされている。ところが、我々の光スイッチでは、RAC1でむしろ排他的にラメリポディアを形成、CDC42ではラメリポディアを含む様々な構造ができた。

研究成果の概要(英文)：Actin cytoskeletons play an important role in cell structure, division, motility, development and signaling. Overexpression of the mutant GTPases as well as their gene-knock out studies revealed that RAC1 and CDC42 might regulate these processes, but cells might accommodate to the newsituation, resulting in less phenotypes. We performed acute-activation of photoactivatable (PA)-GTPases and observed the early phenotypes using life-act mCherry marker for F-actin in typical polygonal-shaped COS7 cells before/after light stimulation. RAC1 mainly acted on sides and formed laterally long lamellipodia (LP), while CDC42 polymerized actin filaments mainly at some vertexes (tips) of the cell and the actin bundles protrude into LP at the tips. Accordingly, the bundles were parallel to cell margins.

研究分野：細胞生物学

キーワード：シグナル伝達 G蛋白 細胞骨格 細胞運動

1. 研究開始当初の背景

がん遺伝子である ras とホモロジーの高い ras superfamily の中で、その変異遺伝子を過剰発現すると、アクチン細胞骨格に異常をきたすことがわかった。rho family 蛋白は一夜にして、アクチン制御のシグナル分子として、あるいは他の低分子 G 蛋白のモデルとして分子細胞生物学研究の中心に躍り出た。その後 25 年、rho ファミリー蛋白がアクチン系を制御するくらいまではよいが、CDC-フィロポディアの機能、RAC-ラメリポディアなどの機能という紋切り型でいつまでもよいのだろうか？とだれしも思うころ、それぞれのノックアウトマウスができ、これまで言われてきたほとんどの表現型が否定された。しかし、それでもこの仮説？は続くのである。一体、どのような実験では何がいえるのかということを考え直したい。

2. 研究の目的

変異蛋白の過剰発現、遺伝子のノックアウトと比較して、光遺伝学の特徴を考え、それをもとにそれぞれの蛋白の本来の機能について考える。

3. 研究の方法

野生型蛋白の光スイッチを作成し、暗い状態で発現させ、アクチンプローベを長波長で観察しながら短波長 (458nm) の刺激を行う。このため RAC1 の光スイッチ PA-RAC1 及び CDC42 の光スイッチ PA-CDC42 を、アクチンマーカーである LifeAct-mCherry とともに COS7 細胞に発現する。COS7 細胞を 559nm で観察すると、アクチン線維の分布は見えるが光スイッチは励起されない。しかし 458nm で観察すると光スイッチは励起されて ON になる。これを 10 秒おきに繰り返し観察して表現型を見ることで、それぞれの表現型の違いについて見る。

4. 研究成果

これまでの研究の問題点は 2 つであった。第 1 には、これまでの研究は基本的に変異蛋白の生産あるいは、野生型蛋白のターンオーバーに多くの時間が掛かる慢性実験であり、細胞の側が適応してしまう (シグナルカスケードの変化あるいは発現遺伝子量の変化) ため、見かけ上の表現型がはっきりしないことが多いと考えられた。今回は常に急性実験 (<300 sec) とした。第 2 には、刺激を加えない状態でも、細胞同士での形状の違いが大きいため、たとえ有意と考えら

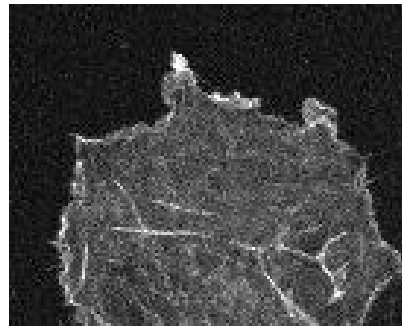
れる表現型をとっても、細胞間のばらつきのため、グループ間の違いが出なくなってしまう。このため、同一細胞を刺激前と後とで比較し変化が起きたか、否かをカウントした。この結果、RAC1 と CDC42 で対照的な表現型が出て、しかもこれまでの報告とも対応するものであった。

(1) PA-RAC1 photoswitch

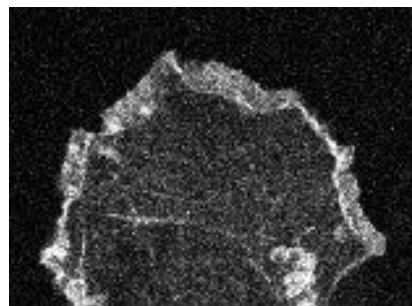
OFF から ON にすると細胞を多角形とするとその辺に相当してラメリポディアが伸長することが分かった。

(2) PA-CDC42 Photoswitch

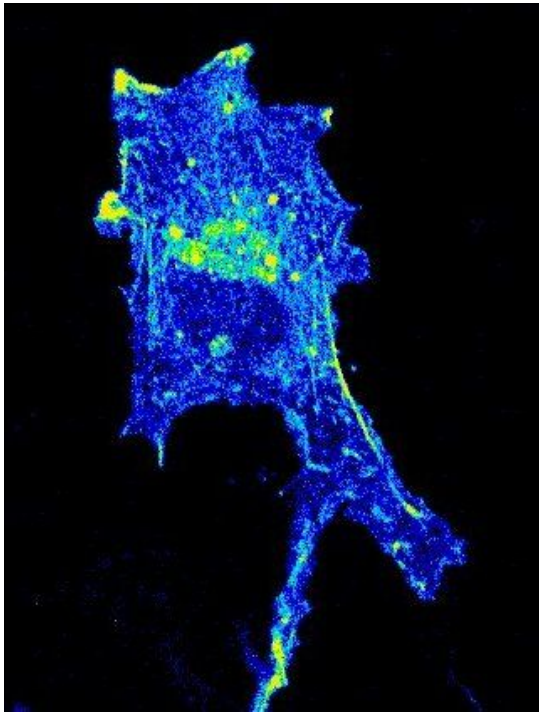
多角形に光をあてると頂点に対応してアクチンが重合し、その頂点から新しい突起が出るか、あるいは両辺に対してアクチンが重合していくかであった。CDC42 シグナルでラメリポディアができる場合は排他的にかつ連続的にできることが分かった。



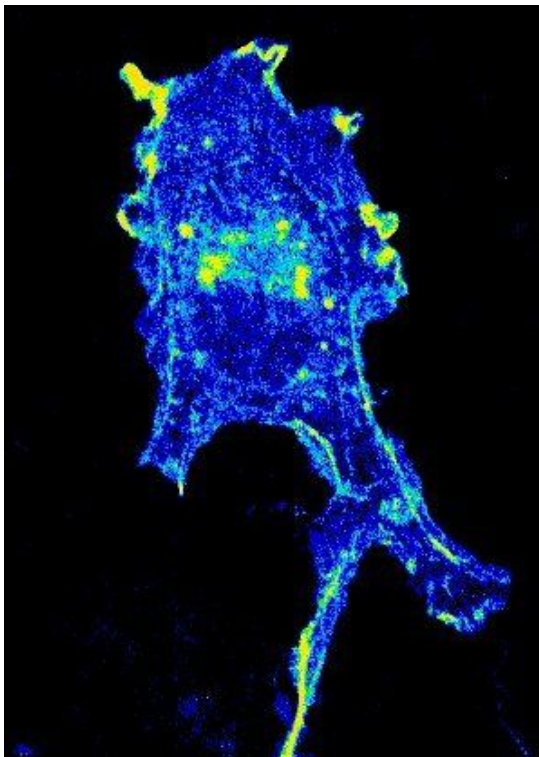
RAC1 光刺激前：細胞の輪郭に沿ってアクチンの縁が見られる。また底面の部分には、短い様々な方向に向かって走るアクチンバンドル状の構造が見える。これらは Stress fiber に相当する。



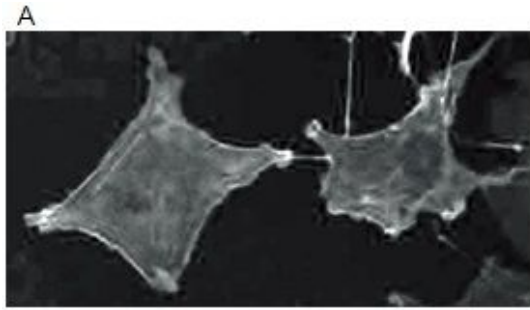
RAC1 光刺激後：同一細胞の光刺激を始めて 100 秒 (10 回) 刺激後の写真である。何よりも大きな違いは、刺激前の縁であった部分にアクチン線維が豊富な縁ができている。場所によっては縦に走る線維も見えるので microspikes であろうと同定される。



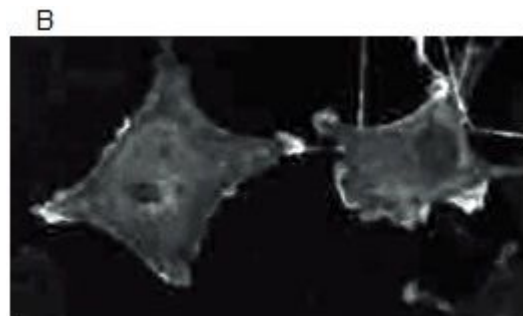
CDC42 光刺激前 : pseudo color 16 色によるアクチン線維、突起の先端にアクチンは多いが、刺激後ほどではなく、アクチンも束などを作っていない。



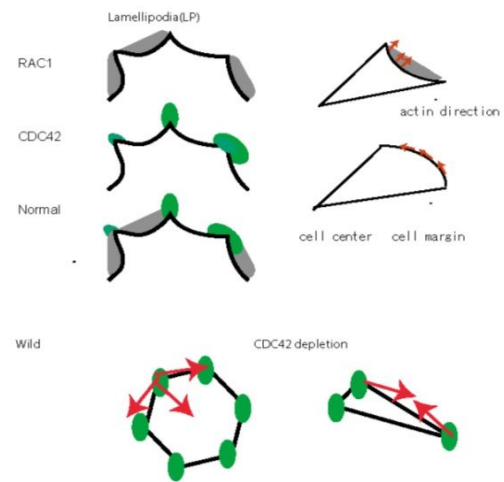
CDC42 光刺激後 : 同じ細胞の光刺激前に比べ、アクチンが集まる突起の先端も多く、アクチン自体の集積の仕方も強い。



A: CDC42+ LifeAct- mCherry 光刺激前
COS7 細胞に PA-CDC42 と LifeAct- mCherry を加えた、細胞の光刺激前のもので phenotype が RAC1 型に近いものを選ぶ。



B: 光刺激後
細胞質のアクチンが減り、突起の先端のアクチンが増えている (2つの細胞共に)



まとめの図

RAC1 のみの場合 :
辺の部分にラメリポディアができるがその中のアクチン線維の方向は辺に対して垂直である。

CDC42 のみの場合 :
頂点の部分にアクチンが集積し、そこから左右の辺に向かう線維ができるが、線維の方向は辺に平行である。

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)

[学会発表](計 1 件)

中田隆夫: 光遺伝学を用いた分泌経路の研究
第 120 回日本解剖学会総会全国学術集会
2015 年 3 月 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/cbio/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中田 隆夫 (NAKATA TAKAO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授

研究者番号: 50218004

(2)研究分担者

井上 明宏 (INOUE AKIHIRO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・准教授

研究者番号: 80322080

石井 智浩 (ISHII TOMOHORO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教

研究者番号: 60549947