

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成23年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

|                |   |
|----------------|---|
| 研究課題名          | アクチン重合装置の蛍光単分子イメージングによる機械受容細胞シグナルの可視化<br>解明 |
| 研究機関・<br>部局・職名 | 東北大学・大学院生命科学研究科・教授                          |
| 氏名             | 渡邊 直樹                                       |

### 1. 当該年度の研究目的

細胞内アクチンの主要な重合装置フォルミンファミリーが線維伸長を行うとき、アクチンの二重螺旋構造に沿って回転する性質を単分子蛍光偏光によって捉えた(Science 誌 2011 年発表)。その生理的役割、特に細胞内アクチン線維の安定性への寄与について検証する。また、予備的に見いだされた細胞への物理刺激により活性化されるフォルミンファミリーの性質と活性化機構について、リアルタイム分子動態観察によって解明を進める。具体的には、硬度に自由に調整でき光学特性に優れる polydimethylsiloxane (PDMS) を細胞接着に適した高分子で化学修飾したものを培養基質とし、マイクロマニピュレーターによる物理的(反復)細胞刺激下で分子挙動を捉える観察系を樹立する。分子可視化像の半自動追跡ソフトウェアを米国の研究者と共同で開発する。GFP アクチンで問題となっている、フォルミンファミリーによるプロセッシブなアクチン重合との干渉を生じない蛍光アクチンプローブを探索する。

### 2. 研究の実施状況

細胞を物理刺激しつつ細胞内のフォルミンファミリーのリアルタイム分子動態を観察し、制御メカニズムの解明を進めた。現在のところ、src ファミリーなどに対する複数のタンパク質キナーゼ阻害薬投与や細胞内カルシウムイオン除去においても、物理刺激後速やかに野生型 mDia1 が活性化されプロセッシブにアクチン重合する分子像が確認された(論文投稿中)。この新規のアクチン重合の活性化シグナルの伝播する詳細を可視化するための、変形可能なシリコン(PDMS)基質上に細胞を効率よく接着させ、分子可視化する観察系がほぼ出来つつある。このフォルミンファミリーによるアクチン重合と干渉しない、本研究には必須な蛍光アクチンプローブも開発した(投稿準備中)。これを用い、フォルミンの螺旋回転の性質が細胞内・外でアクチン線維をねじる効果について検証を進めている。また、米国のグループと共同にて、動画データ上の分子トラッキングを半自動化するソフトウェアを開発し、論文として発表するとともに、ウェブ上で一般公開した (<http://athena.physics.lehigh.edu/speckletrackerj>)。また、上記とは異なるアクチン重合因子で、細胞接着斑を結ぶアクチンストレス線維の切断-再生サイクルに関与する VASP とそのパートナーである Zyxin が、Abl キナーゼによる VASP のチロシンリン酸化によって、細胞内局在が制御される新規リン酸化シグナルを同定した。その他、細胞先端端にベール状に広がる葉状仮足(ラメリポディア)先端のアクチン重合のゆらぎに拡散性アクティベータが関与する数理モデルを提唱し、共同研究にて神経軸索伸長に関与する膜たんぱく質 M6a の、アクチン細胞骨格と独立した神経突起への分子集積を証明した。

3. 研究発表等

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <p>雑誌論文</p> <p>計11件</p> | <p>(掲載済み一査読有り) 計9件</p> <p>Ryan, G. L., Petroccia, H. M., <u>Watanabe, N.</u> and Vavylonis, D. Excitable actin dynamics in lamellipodial protrusion and retraction. <i>Biophys. J.</i> 102: 1493–1502 (2012)</p> <p>Ryan, G. L., <u>Watanabe, N.</u>* and Vavylonis, D.* A review of models of fluctuating protrusion and retraction patterns at the leading edge of motile cells. (Review) <i>Cytoskeleton (Hoboken)</i> 69: 195–206 (2012) (*co-corresponding authors)</p> <p>Millius, A., <u>Watanabe, N.</u> and Weiner, O.D. Diffusion, capture, and recycling of SCAR/WAVE and Arp2/3 complexes observed in cells with single-molecule imaging. <i>J. Cell Sci.</i> 125: 1165–1176 (2012)</p> <p>Sakamoto, S., Ishizaki, T., Okawa, K., Watanabe, S., Arakawa, A., <u>Watanabe, N.</u> and Narumiya, S. Liprin-<math>\alpha</math> controls stress fiber formation by binding to mDia and regulating its membrane localization. <i>J. Cell Sci.</i> 125, 108–120 (2012)</p> <p>Maruoka, M.*, Sato, M., Yuan, Y., Ichiba, M., Fujii, R., Ogawa, T., Ishida-Kitagawa, N., Takeya, T. and <u>Watanabe, N.</u>* Abi-1-bridged tyrosine phosphorylation of VASP by Abelson kinase impairs association of VASP to focal adhesions and regulates leukemic cell adhesion. <i>Biochem. J.</i> 441, 889–899 (2012) (*co-corresponding authors)</p> <p>Sato, Y., <u>Watanabe, N.</u>, Fukushima, N., Mita, S. and Hirata, T. Actin-independent behavior and membrane deformation exhibited by the four-transmembrane protein M6a. <i>PLoS ONE</i> 6, e26702 (2011)</p> <p>Kiuchi, T., Nagai, T., Ohashi, K., <u>Watanabe, N.</u> and Mizuno, K. Live-cell imaging of G-actin dynamics using sequential FDAP. (Review) <i>Bioarchitecture</i> 1, 1–5 (2011)</p> <p>Smith, M.B., Karatekin, E., Gohlke, A., Mizuno, H., <u>Watanabe, N.</u> and Vavylonis, D. Interactive, computer-assisted tracking of speckle trajectories in fluorescence microscopy: application to actin polymerization and membrane fusion. <i>Biophys. J.</i> 101, 1794–1804 (2011)</p> <p>水野裕昭, <u>渡邊直樹</u> (2011) 哺乳動物フォルミン mDia1 の回転運動の細胞骨格への役割 (総説、査読あり) <i>生物物理</i> 第51巻 第5号 218–221</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計1件</p> <p><u>Watanabe, N.</u> Fluorescence single-molecule imaging of actin turnover and regulatory mechanisms. <i>Meth. Enzymol.</i> 505, 219–232 (2012)</p> <p>(未掲載) 計1件(印刷中)</p> <p>Mizuno, H. and <u>Watanabe, N.</u> mDia1 and formins: screw cap of the actin filament. (Review) <i>Biophysics</i>, in press.</p> |
| <p>会議発表</p> <p>計6件</p>  | <p>専門家向け 計6件<br/>一般向け 計0件</p> <p><u>Watanabe, N.</u> Formin homology proteins and force on the cell and the actin filament 第63回日本細胞生物学会大会ミニシンポジウム 平成23年6月28日札幌市 北海道大学</p> <p><u>Watanabe, N.</u> Mechanosensitive actin nucleation and polymerization by Formins. CDB-QBic Joint Symposium ‘Towards Innovation in Developmental Cell Biology’ 平成23年7月1日神戸市 理化学研究所</p> <p><u>渡邊直樹</u> 細胞のメカノセンスと分子イメージング 第5回膜生物学グローバル COE 研究討論会 ～生体膜シグナリングと細胞骨格制御による細胞形態形成～ 平成23年7月21日兵庫県淡路市 淡路夢舞台国際会議場</p> <p><u>渡邊直樹</u> フォルミンファミリーを介した細胞の機械受容とアクチン動態の連結 第84回日本生化学会大会シンポジウム「アクチンとミオシンの意外なしくみとはたらき」(企画・司会とも) 平成23年9月21日京都市 京都国際会議場</p> <p><u>Watanabe, N.</u>, Yuan, Y. and Maruoka, M. キナーゼ阻害薬の標的分子へのコンフォメーション作用 第85回日本薬理学会年会ワークショップ 平成24年3月16日京都市 京都国際会議場</p>  |

様式19 別紙1

|                  |   |
|------------------|---|
|                  | Watanabe, N. and Mizuno, H. Formin homology proteins: screw cappers of the actin filament barbed end<br>International Workshop “From Structure to Dynamics: for Our Understanding of Protein-Protein Interactions” 平成24年3月17日名古屋市 名古屋大学野依記念ホール  |
| 図書               | なし  |
| 計0件              |   |
| 産業財産権            | (取得済み) 計0件  |
| 出願・取得状況          | (出願中) 計0件   |
| 計0件              |   |
| Webページ (URL)     | <a href="http://labo.lifesci.tohoku.ac.jp/nwatanabe_lab/">http://labo.lifesci.tohoku.ac.jp/nwatanabe_lab/</a> (ラボホームページ)<br><a href="http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/outline/biomolecular/single-molecule.html">http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/outline/biomolecular/single-molecule.html</a> (研究科の分野紹介ページ)<br><a href="http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/biomolecular/t_watanaben.html">http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/biomolecular/t_watanaben.html</a> (研究科の個人紹介ページ)  |
| 国民との科学・技術対話の実施状況 | <p>平成23年6月4日東京にて、東北大学大学院生命科学研究科 市民公開シンポジウムに参加し、パネルディスカッションのパネリストとして、研究活動について一般の来場者に紹介した。</p> <p>平成23年7月10日東北大学川内キャンパスにて、学都「仙台・宮城」サイエンスデイ 2011 (<a href="http://www.science-day.com/2011/index.php">http://www.science-day.com/2011/index.php</a>) (総来場者数 5811 名) に研究科内の NEXT Program を受けた4つの研究室でチームを結成し共同で参加、小中高校生向けに細胞分裂のビデオ顕微鏡観察の体験指導と、最新動画の展示を行った。本企画へは、40名の子供とその保護者らが参加した。</p> <p>平成23年7月27～28日東北大学青葉山キャンパスにて、オープンキャンパスの展示として、主に高校生向けに顕微鏡動画データなどを紹介した。理学部全体の見学者は、4695名。</p>   |
| 新聞・一般雑誌等掲載       | なし  |
| 計0件              |   |
| その他              | <p>平成23年12月27日 2009年から3年間支援を受けたヒューマンフロンティアサイエンスプログラム(HFSP)のウェブサイト、受賞事例集(<a href="http://jhfsp.jsf.or.jp/about-us/jirei.html">http://jhfsp.jsf.or.jp/about-us/jirei.html</a>) (4～5頁) が掲載された。平成23年11月18日 HFSP のウェブサイトに成果が「Tracking single molecules with the new open source tool Speckle TrackerJ」として紹介された。<br/>(<a href="http://www.hfsp.org/frontier-science/awardees-articles/tracking-single-molecules-new-open-source-tool-speckle-trackerj">www.hfsp.org/frontier-science/awardees-articles/tracking-single-molecules-new-open-source-tool-speckle-trackerj</a>)</p> |

4. その他特記事項

該当なし。

## 実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

|      | ①交付決定額      | ②既受領額<br>(前年度迄の<br>累計) | ③当該年度受<br>領額 | ④(=①-②-<br>③)未受領額 | 既返還額(前<br>年度迄の累<br>計) |
|------|-------------|------------------------|--------------|-------------------|-----------------------|
| 直接経費 | 133,000,000 | 56,000,000             | 0            | 77,000,000        | 0                     |
| 間接経費 | 39,900,000  | 16,800,000             | 0            | 23,100,000        | 0                     |
| 合計   | 172,900,000 | 72,800,000             | 0            | 100,100,000       | 0                     |

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

|      | ①前年度未執<br>行額 | ②当該年度受<br>領額 | ③当該年度受<br>取利息等額<br>(未収利息を除<br>く) | ④(=①+②+<br>③)当該年度<br>合計収入 | ⑤当該年度執<br>行額 | ⑥(=④-⑤)<br>当該年度未執<br>行額 | 当該年度返還<br>額 |
|------|--------------|--------------|----------------------------------|---------------------------|--------------|-------------------------|-------------|
| 直接経費 | 55,787,539   | 0            | 0                                | 55,787,539                | 55,787,539   | 0                       | 0           |
| 間接経費 | 16,755,000   | 0            | 0                                | 16,755,000                | 16,755,000   | 0                       | 0           |
| 合計   | 72,542,539   | 0            | 0                                | 72,542,539                | 72,542,539   | 0                       | 0           |

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

|         | 金額         | 備考                        |
|---------|------------|---------------------------|
| 物品費     | 40,145,703 | 特殊顕微鏡照明装置、フリーザー、実験試薬等     |
| 旅費      | 615,590    | 成果発表(日本細胞生物学会、生化学会、薬理学会等) |
| 謝金・人件費等 | 13,729,760 | 博士研究員謝金、実験補助謝金等           |
| その他     | 1,296,486  | 画像解析ソフトウェアアップデート費用等       |
| 直接経費計   | 55,787,539 |                           |
| 間接経費計   | 16,755,000 |                           |
| 合計      | 72,542,539 |                           |

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

| 物品名                 | 仕様・型・性能<br>等         | 数量 | 単価<br>(単位:円) | 金額<br>(単位:円) | 納入<br>年月日 | 設置研究機関<br>名 |
|---------------------|----------------------|----|--------------|--------------|-----------|-------------|
| 超純水製造装置             | アドバンテック<br>RFU685DA  | 1  | 1,013,250    | 1,013,250    | 2011/5/23 | 東北大学        |
| 超低温フリーザー            | サンヨー製 MDF-<br>U33V   | 1  | 1,428,000    | 1,428,000    | 2011/6/1  | 東北大学        |
| バイオクリーンベンチ          | サンヨー製 MCV-<br>B91S   | 1  | 796,950      | 796,950      | 2011/6/15 | 東北大学        |
| 紫外可視分光光度<br>計       | 島津製作所 UV-<br>2450    | 1  | 1,466,713    | 1,466,713    | 2011/6/17 | 東北大学        |
| バイオクリーンベンチ          | サンヨー製 MCV-<br>B131S  | 1  | 1,005,900    | 1,005,900    | 2011/6/30 | 東北大学        |
| 小型超遠心機              | 日立工機製 CS<br>150GX II | 1  | 9,203,250    | 9,203,250    | 2011/8/31 | 東北大学        |
| 2分岐TIRFM投光<br>管システム | オリンパス製特<br>注         | 1  | 13,030,500   | 13,030,500   | 2011/9/21 | 東北大学        |