

課題番号	LS013
------	-------

**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24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 解明
研究機関・ 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

前年度までに、細胞内アクチンの主要な重合装置であるフォルミンファミリーが、連続的な線維伸長を行う際、アクチンの2重らせんに沿って回転する姿を分子蛍光偏光観察によって捉えることに成功した (Science 2011)。他に、細胞接着斑の補強に関与する VASP と Zyxin のリン酸化による結合制御、分子可視化データ解析用のオープンソースソフトウェアなどを論文にまとめ発表した。24年度はこれらの知見を発展させ、①デバイスを改良し、種々の細胞変形刺激下でフォルミンファミリーの分子活性化機構を解明、②フォルミンファミリーに悪影響しないアクチン重合可視化用の新規プローブの開発、③細胞内と顕微鏡下で、フォルミンファミリーによるアクチンのねじれ重合の機能的役割の解明、④細胞接着や細胞先端の伸長と局在する制御分子の動態の相関解析など、複数の方法を用い、フェノタイプに基づく従来の解析では捉えられなかった迅速な分子制御機構の解明を進める。

2. 研究の実施状況

24年度は、細胞の機械刺激時に主要なアクチン重合因子の1つ、フォルミンファミリーが急速に活性化され、アクチンを迅速に重合させる細胞シグナルの全貌を明らかにした (Nature Cell Biology 誌 2013年)。このシグナルは、mDia1 のみならず複数のフォルミンファミリーで見られること、既知のメカノセンス機構であるカルシウムイオンやタンパク質リン酸化シグナルとは独立した新規の経路であることを分子イメージングによって証明した。さらに、研究室の木内助教らが2007年より開発してきた s-FDAP 法を改良することで、物理刺激後、細胞内単量体アクチンが速やかに増加することを捕捉し、「アクチン線維-単量体ホメオスタシスからのフォルミンファミリーの活性化」による新規の機械受容機構を証明した。2011年に我々が Science 誌に発表したフォルミンによるアクチン二重螺旋に沿った回転重合の知見とあわせ、細胞が物理ストレスに抵抗するため巧妙なアクチン重合メカニズムをフォルミンファミリーが供することが示唆された。

関連して、フォルミンファミリーのアクチン重合作用と干渉しない蛍光色素標識アクチンプローブを開発した。これは、既存の蛍光タンパク質より輝度・安定性とも優れ、細胞接着周辺などのアクチンネットワークの微視的な変形を8ナノメートルの誤差で再現性良く超解像解析できることも判明した (論文投稿中)。

その他、細胞先端のアクチン重合について、単分子観察とフォトブリーチング法の比較 (Biophys. J. 2013) や、単分子動態データの数理解析 (Cytoskeleton 2013) から、アクチンの脱重合から再重合へのリサイクリングの経路への線維切断の関与が支持される結果が得られ、論文にまとめ発表した。

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 10 件</p> <p><u>Watanabe, N.</u>, Yamashiro, S., Vavylonis, D. and Kiuchi, T. Molecular viewing of actin polymerizing actions and beyond: Combination analysis of single-molecule speckle microscopy with modeling, FRAP and s-FDAP (sequential fluorescence decay after photoactivation). (Review) <i>Dev Growth Differ.</i> doi: 10.1111/dgd.12060. [Epub ahead of print] (2013)</p> <p>Higashida, C., Kiuchi, T., Akiba, Y., Mizuno, H., Maruoka, M., Narumiya, S., Mizuno, K. and <u>Watanabe, N.</u> F- and G-actin homeostasis regulates mechanosensitive actin nucleation by formins. <i>Nat. Cell Biol.</i> 15, 395-405 (2013)</p> <p>Miyoshi, T. and <u>Watanabe, N.</u> Can filament treadmill alone account for the F-actin turnover in lamellipodia? <i>Cytoskeleton (Hoboken)</i> 70: 179-190 (2013)</p> <p>Smith, M.B., Kiuchi, T., <u>Watanabe, N.</u> and Vavylonis, D. Distributed actin turnover in the lamellipodium and FRAP kinetics. <i>Biophys. J.</i> 104: 247-257 (2013)</p> <p>Ryan, G. L., <u>Watanabe, N.</u> and Vavylonis, D. Image analysis tools to quantify cell shape and protein dynamics near the leading edge. <i>Cell Struct. Funct.</i> 38: 1-7 (2013)</p> <p>Koizumi, K., Takano, K., Kaneyasu, A., Watanabe-Takano, H., Tokuda, E., Abe, T., <u>Watanabe, N.</u>, Takenawa, T. and Endo, T. RhoD activated by fibroblast growth factor induces cytoneme-like cellular protrusions through mDia3C. <i>Mol. Biol. Cell</i> 23:4647-4661 (2012)</p> <p>Mizuno, H. and <u>Watanabe, N.</u> mDia1 and formins: screw cap of the actin filament. (Review) <i>Biophysics</i> 8: 95-102 (2012)</p> <p>Murata, K., Kitaori, T., Oishi, S., <u>Watanabe, N.</u>, Yoshitomi, H., Tanida, S., Ishikawa, M., Kasahara, T., Shibuya, H., Fujii, N., Nagasawa, T., Nakamura, T. and Ito, H. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. <i>PLoS ONE</i> 7: e37163 (2012)</p> <p>Mizuno, H. and <u>Watanabe, N.</u> mDia1 and formins: screw cap of the actin filament. (Review) <i>Biophysics</i>, 8: 95-102 (2012)</p> <p><u>渡邊直樹</u>, 水野裕昭 フォルミンタンパク質のアクチン二重螺旋に沿った回転重合 <i>化学と生物</i> 第 50 巻 第 11 号 801-806 (2012)</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 1 件</p> <p>山城佐和子, 圓岡真宏, 水野裕昭, <u>渡邊直樹</u> アクチン研究の最新動向—構造から調節, 恒常性, 可視化, モデリングまで <i>実験医学</i> 第 30 巻 第 18 号 2998-3005 (2012)</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表</p> <p>計 3 件</p>	<p>専門家向け 計 3 件</p> <p><u>Watanabe, N.</u> New mechanotransduction mechanism involving G/F-actin homeostasis and formins. (招待講演) The 10th NIBB-EMBL Symposium 2013 “Quantitative Bioimaging” 平成25年3月17日愛知県岡崎市 岡崎カンファレンスセンター</p> <p><u>Watanabe, N.</u> and Mizuno, H. Screw capping by formin homology proteins and its possible functions as revealed by single-molecule imaging. (招待講演) 平成24年7月5日韓国ウルサン市 Ulsan National Institute of Science and Technology</p> <p>Yamashiro, S., Mizuno, H., Smith, M.B. Ryan, G.L., Vavylonis, D. and <u>Watanabe, N.</u> (発表者) Improved single-molecule speckle (SIMS) microscopy methods which enable lifetime measurement of various cellular actin structures. 12th HFSP Awardees Meeting 平成24年7月4日韓国テグ市 Daegu Exhibition &amp; Convention Center</p> <p>一般向け 計 0 件</p>

様式19 別紙1

図書 計0件	
産業財産権 出願・取得状 況 計0件	(取得済み) 計0件  (出願中) 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) <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) <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	平成24年7月15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 2012 ( <a href="http://www.science-day.com/purpose.php?y=2012#">http://www.science-day.com/purpose.php?y=2012#</a> ) (総来場者数 6311 名) に研究科内の NEXT Program を受けた3つの研究室の共同で参加、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。  平成24年7月30～31日東北大学青葉山キャンパスにて、東北大学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、5757名。  その他、研究成果についてプレスリリースを大学と研究科のウェブページを通じ公表した。
新聞・一般雑 誌等掲載 計0件	
その他	平成24年6月5日、ヒューマンフロンティアサイエンスプログラムのウェブサイト的成果が「Cellular hokey pokey: Excitable actin dynamics at the leading edge [with video]」として紹介された。 <a href="http://www.hfsp.org/frontier-science/awardees-articles/cellular-hokey-pokey-excitable-actin-dynamics-leading-edge-video">http://www.hfsp.org/frontier-science/awardees-articles/cellular-hokey-pokey-excitable-actin-dynamics-leading-edge-video</a>  平成25年3月12日、ヒューマンフロンティアサイエンスプログラムのウェブサイト的成果が「Breaking the actin treadmill [with Video]」として紹介された。 <a href="http://www.hfsp.org/frontier-science/awardees-articles/breaking-actin-treadmill-video">http://www.hfsp.org/frontier-science/awardees-articles/breaking-actin-treadmill-video</a>

4. その他特記事項

該当なし。

## 実施状況報告書(平成24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 (前年度迄の累計)	③当該年度受領額	④(=①-②-③)未受領額	既返還額(前年度迄の累計)
直接経費	133,000,000	56,000,000	42,100,000	34,900,000	0
間接経費	39,900,000	16,800,000	12,630,000	10,470,000	0
合計	172,900,000	72,800,000	54,730,000	45,370,000	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執行額	②当該年度受領額	③当該年度受取利息等額 (未収利息を除く)	④(=①+②+③)当該年度合計収入	⑤当該年度執行額	⑥(=④-⑤)当該年度未執行額	当該年度返還額
直接経費	0	42,100,000	0	42,100,000	42,100,000	0	0
間接経費	0	12,630,000	0	12,630,000	12,630,000	0	0
合計	0	54,730,000	0	54,730,000	54,730,000	0	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	22,709,528	顕微鏡用カメラ1台、2分岐TIRFMアドオン1式等
旅費	1,690,440	成果発表旅費(米国細胞生物学会、韓国UNIST等)
謝金・人件費等	16,383,820	博士研究員人件費、実験補助謝金等
その他	1,316,212	論文校正費・出版費、DNA解析費、カメラ修理費
直接経費計	42,100,000	
間接経費計	12,630,000	
合計	54,730,000	

## 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・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
顕微鏡カメラユニット	ローパー-Evolve 512 Excelon	1	5,943,000	5,943,000	2012/8/29	東北大学
2分岐TIRFM(561nm)アドオンシステム	オリンパス社製	1	6,657,000	6,657,000	2013/3/19	東北大学
				0		