

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25年度)**

本様式の内容は一般に公表されません

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

前年度までの研究において、細胞の物理刺激に反応して、主要なアクチン重合因子フォルミンファミリーが急速にアクチンを重合させる細胞シグナルを発見、報告した(Nature Cell Biology 誌オンライン公開)。この反応は、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経路であり、初めて物理刺激から直接アクチン重合へつながる細胞内シグナル経路の解明する画期的な成果となった。本成果は、2011年にわれわれが 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メカニズムをフォルミンファミリーが供していることを可視化解明するものである。25年度は、本所見を発展させ、アクチン線維の回生反応から物理ストレスへ細胞骨格が抵抗する道筋と関連する分子メカニズムの詳細を解明する。今回、見出されたフォルミンファミリーによるアクチン線維再生の新機構を分子可視化解析する手法を軸に、関連する細胞生理を制御する細胞情報伝達系との関連を深く検証するための顕微鏡観察系や物理ストレスの負荷装置を多方面で改良し、より広い病態生理における役割を知る手がかりを得ることを目的とする。

2. 研究の実施状況

細胞内アクチンは、物理ストレス、シナプスにおける記憶、増殖因子への反応や遊走など様々な機能発現の際、急速に組みかわるため、その動態が注目されてきた。しかし、GFP など蛍光タンパク質を用いた標識アクチンは、mDia1 を含むフォルミンファミリーの機能と干渉するため、現在知られるアクチン動態は、主要な部分が見逃されていることが危惧されてきた。本研究では、この問題を解決する新しい蛍光標識アクチン(DyLight-actin)を見出した。また、電気穿孔法によって、ほぼ 100%の細胞に単分子可視化に適した低濃度の標識タンパク質の導入を実現、米国 Lehigh 大学と共同開発したソフトウェアと組合せ、アクチン流動を 8 ナノメートル精度で再現良く追跡できる手法を報告した。そして、細胞の接着斑周囲でアクチンが「つかみ取る」運動をすることを発見した(MBoC 25: 1010-1024, 2014)。また、微細な物理ストレスを画像化するため超解像顕微鏡に多重染色を組合せる新手法(投稿準備中)や、細胞の培養基質側から非接触で物理ストレスをかけ、細胞内蛍光単分子可視化できる PDMS 基質の改良に成功し、物理ストレスが様々な細胞骨格制御因子に伝播し、細胞運動の方向を左右する分子メカニズムについて解析を進めている。また、フォルミンファミリーがらせん回転重合する知見を発展させ、その働きによってアクチン線維にねじれの力をかけることで、細胞内とインビトロでアクチン線維の安定化に寄与する機構を見出した(投稿準備中)。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計6件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計5件 Yamashiro, S., Mizuno, H., Smith, M. B., Ryan, G. L., Kiuchi, T., Vavylonis, D. and <u>Watanabe, N.</u> (2014) New single-molecule speckle microscopy reveals modification of the retrograde actin flow by focal adhesions at nanometer scales. <i>Mol. Biol. Cell</i> 25, 1010–1024. <u>Watanabe, N.</u>, Yamashiro, S., Vavylonis, D. and Kiuchi, T. (2013) 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> 55, 508–514 Higashida, C., Kiuchi, T., Akiba, Y., Mizuno, H., Maruoka, M., Narumiya, S., Mizuno, K. and <u>Watanabe, N.</u> (2013) F- and G-actin homeostasis regulates mechanosensitive actin nucleation by formins. <i>Nat. Cell Biol.</i> 15, 395–405. <u>渡邊直樹</u>, 木内泰 (2013) 蛍光単分子可視化と他の分子動態解析法の融合による細胞内アクチン重合機構の解明 顕微鏡 第48巻 第2号 84–89. <u>渡邊直樹</u> (2013) アクチン線維の物理ストレス制御とフォルミンファミリーによる線維回生 生化学 第85巻 第8号 687–691. (掲載済み一査読無し) 計1件 Mizuno, H. and <u>Watanabe, N.</u> (2014) Rotational movement of formins evaluated by using single-molecule fluorescence polarization. <i>Meth. Enzymol.</i> 540, 73–94. (未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計6件</p>	<p>専門家向け 計6件 <u>Watanabe, N.</u> Allosteric pseudo-activation of Abelson kinase by imatinib and other inhibitors. (英語口頭) NIH-Tohoku International Symposium 平成25年5月9日 宮城県仙台市 <u>Watanabe, N.</u> Direct viewing of single-molecule behavior elucidates fine tuning of cell mechanics. (招待講演) NSF International Conference on “Stem Cell Differentiation: The Influence of Biomaterials and Biomechanics”. 平成25年6月5日 中国上海市 <u>Watanabe, N.</u>, Kiuchi, T., Akiba, Y., and Mizuno, H. Mechanosensitive F-actin regeneration involving G/F-actin homeostasis and formins. 第65回日本細胞生物学会 シンポジウム Cell mechanics to motility and functions (英語での口頭発表に加え、本シンポジウムの企画、および座長を務めた) 平成25年6月21日 愛知県名古屋市 <u>渡邊直樹</u> 物理ストレスに対抗する細胞骨格機構を可視化するリアルタイム分子イメージング解析 (招待講演) 大阪大学数理医学研究会主催 平成25年7月25日 大阪府豊中市 <u>渡邊直樹</u> アクチンターンオーバーとフォルミンファミリーによる新しいメカノセンス機構 (招待講演) 平成25年9月25日 広島大学理学部(広島県東広島市) 水野裕昭、山城佐和子、<u>渡邊直樹</u> 一分子蛍光偏光を用いたアクチン線維の螺旋構造に沿ったフォルミンの回転運動の可視化 日本顕微鏡学会第57回シンポジウム 顕微鏡による解析 平成25年11月16日 愛知県名古屋市 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)	http://labo.lifesci.tohoku.ac.jp/nwatanabe_lab/ (ラボホームページ) http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/outline/biomolecular/single-molecule.html (研究科の分野紹介ページ) http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/biomolecular/t_watanaben.html (研究科の個人紹介ページ) https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2013/03/press20130301-02.html (研究成果・プレスリリース) http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research_ja/15019/ (研究成果・プレスリリース)
国民との科 学・技術対話 の実施状況	・平成25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数は 5695 名。 ・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	

4. その他特記事項

該当なし。

実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

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	98,100,000	34,900,000	0	0
間接経費	39,900,000	29,430,000	10,470,000	0	0
合計	172,900,000	127,530,000	45,370,000	0	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	34,900,000	0	34,900,000	34,900,000	0	0
間接経費	0	10,470,000	0	10,470,000	10,470,000	0	0
合計	0	45,370,000	0	45,370,000	45,370,000	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	15,849,576	蛍光顕微鏡、照明装置、培養消耗品、生化学試薬等
旅費	1,057,806	成果発表(NSF国際カンファレンス、細胞生物学会等)
謝金・人件費等	17,347,824	博士研究員謝金、実験補助謝金等
その他	644,794	論文出版費、電子顕微鏡調整費等
直接経費計	34,900,000	
間接経費計	10,470,000	
合計	45,370,000	

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
電動長作動距離コ ンデンサ 他	オリンパス社製	1	1,162,350	1,162,350	2013/5/27	東北大学
特注2分岐ミラーユニ ット 他	オリンパス社製	1	1,277,850	1,277,850	2013/6/10	東北大学
倒立用リサーチ顕 微鏡 1式	オリンパス社製	1	8,842,785	8,842,785	2013/6/25	東北大学