

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

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

【研究目的】

生きものの形づくりは、生命の様々な機能発現の重要な過程である。細胞は、生理活性物質の刺激のみならず、周囲の環境の硬度といった物理特性の違いや張り応力・伸展刺激などの外力による刺激に反応して、遊走や増殖、分化の方向といった性質を大きく変化させることが近年明らかとなり注目されてきた。細胞周囲の物理特性の変動に反応して、細胞表層に発達するアクチン細胞骨格はその構造を大きく改変する。この細胞メカノセンスのしくみに関しては、従来の研究により Rho ファミリーGTPアーゼやカルシウムイオンの上昇、タンパク質リン酸化カスケードなど種々の細胞内情報伝達機構の関与が示されてきた。しかし、機械受容をうけた細胞におけるアクチン線維の改変が、実際にどの分子機構によって実現されるのか、細胞内のどのような場所や時間経過を経て機能するかについては多くのことが不明であった。

本研究グループは、蛍光標識されたアクチンとその制御分子を高感度顕微鏡を用いた生きた細胞内で1分子ごとに可視化し得ることを見出し、アクチンダイナミズムの解明を進めてきた。細胞運動のかじ取り装置である葉状仮足内では、重合後の3分の1のアクチン線維が10秒以内に崩壊すること（2002年サイエンス誌）、RhoGTPアーゼのエフェクターでフォルミンファミリーの一員である mDia1 が毎秒720個のアクチン分子を連続的に重合すること（2004年サイエンス誌）、インビトロより3桁も速いアクチン重合端の脱キャップ反応が細胞内で起きること（2006年ジャーナルオブセルバイオロジー誌）など、細胞の中の想定以上に速いアクチン重合・脱重合動態を複数発見した。さらに、先行研究の予備的なデータとして、細胞表層に微小ピペットを接触させ物理刺激を与えると、mDia1 が急速に活性化され、盛んにアクチン重合する現象を見出した。本研究では、細胞内蛍光単分子イメージングを応用し、細胞メカノセンスに関わる分子群の挙動変化をリアルタイム・定量的に可視化解析することにより、細胞の機械受容のしくみを解明する。個別には、

- ① 主要なアクチン重合機構である mDia1 や近縁のフォルミンファミリータンパク質が、物理ストレス刺激下においてどのような細胞シグナルを受け、アクチン重合を促進するか可視化解明する。
- ② 既知のカルシウムイオン増大やタンパク質リン酸化などの他の細胞メカノセンス機構との関係について、各種阻害薬や指示薬の効果を比較し検証する。
- ③ 硬度を自由に变化でき光学特性に優れる polydimethylsiloxane (PDMS) 基質に、

細胞接着に適した高分子を効果的にコートする手法を開発し、マイクロマニピュレーターによる反復・定量的な物理刺激を細胞に触れずに負荷しつつ細胞骨格制御分子の挙動を可視化できるデバイスを開発する。

- ④ フォルミンファミリーは線維端に結合したまま連続的にアクチンを重合させる際、らせん回転重合を行うことわれわれは見出した。本機構による線維軸まわりのねじれの力が、主要なアクチン脱重合因子コフィリンの活性と相互作用することが予想される。その可能性について、細胞単分子イメージング、および顕微鏡下でのアクチン重合再構成系を用い検証する。
- ⑤ 慢性骨髄性白血病の細胞接着制御に関して、アクチン重合端の制御因子 VASP がチロシンリン酸化されることによって分子分布と細胞接着制御が変化するデータが得られつつある。VASP とアクチン、および接着斑との相互作用の生化学制御を検証し、細胞運動・接着・増殖制御を解明する。
- ⑥ 物理応答シグナルが細胞の分化や癌化に伴い、いかに変化するかについて、種々の細胞系、立体的細胞培養や細胞共培養系といった環境下でも可能な蛍光単分子イメージング手法を開発する。
- ⑦ 高い時空間精度での分子・細胞構造観察系を確立し、機械受容シグナルの発生部位や、機械刺激下での細胞内アクチン構造の微細な変化について高精度観察を行い解明する。

以上の個別の課題に取り組むことで、細胞の機械受容から細胞骨格制御に至る制御分子機構を直接可視化することで明らかにするとともに、それらの生理的な役割の検証を進めた。

【総合評価】

○	特に優れた成果が得られている
	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

① 総合所見

東日本大震災で被害を受けたにもかかわらず、適切に研究実施体制が生まれ、また順調に研究成果を得ている。本研究成果として、これまで十分に解析できていなかった物理的な刺激に対する細胞の非常に早い反応をアクチンやアクチン関連タンパク質を蛍光標識することによって、優れた時間分解能で解析した成果が含まれている。また、本法でしか解明できなかったフォルミンファミリーによるアクチンの急速な重合反応や、アクチン重合時にフォルミンファミリー分子がアクチン線維に沿って回転しているなど、驚くべき事実を明らかにしている。世界的に見ても大変独創的な研究であり、高い先進性・優位性があると考えられる。

当初の研究計画は、血管内皮細胞や平滑筋細胞の病態モデルや新薬の開発も含め壮

大なものであったが、諸般の事情により、研究目的をしぼって研究を進めたようである。分子機構については、重要な発見、技術的な改良も行った。

質の高い原著論文、総説論文を発表しており、また一般市民対象の啓蒙活動にも積極的な姿勢が伺える。今後の研究方向で述べられているように、細胞から細胞集団である組織における物理的な刺激に対する反応の解析や、病態モデルも含めた研究を、新しい研究環境で発展させていただきたい。

② 目的の達成状況

・所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

本研究課題は、機械的刺激に対して細胞が示す挙動を可視化して、分子機構を解明するというものである。そのために、分析技術の向上、システムの改善も行ってきている。具体的には、アクチンやアクチン関連タンパク質を蛍光標識し、その動態を物理的ストレス下で生きた細胞内でリアルタイムに解析しようとするものであり、世界的に見ても大変独創的な研究目的を掲げている。本補助事業期間中に細胞が物理ストレスに対抗するための新しいアクチン重合活性化機構を発見する等、目的を確実に達成している。また細胞内リアルタイムイメージングを実施するために機器やソフトウェアの開発も共同研究として実施しており、これらも波及効果が広い研究成果であると考えられる。

研究目的の2) PDMSを用いた細胞実験系、5) 物理応答シグナルの細胞分化、病的状態への関与の解明、6) 機械受容を変化させる細胞外刺激因子や薬剤のスクリーニングについては、実験条件や共同研究により、研究推進の目処が得られており、当初の計画通りの目標をほぼ達成したと考えられる。

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、連続的な繊維伸長を行う際に、アクチンの二重らせんに沿って回転する姿を分子蛍光偏光解析によって捉えることに成功し、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、本研究の主要部分に関しては適切かつ迅速に研究を遂行している。

研究グループ内での実験条件の検討が進んでいるだけでなく、国内外の他の研究グループとの共同研究を取り入れることにより、研究を展開しようとする努力が見られる。研究進展過程で新たに生じた課題や病態モデルへの適用は重要であり、研究体制も整ってきたこともあり、今後の更なる進展を期待する。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

分子重合は以前想像していた速度よりも遥かに速いことを明らかにしたのは、新しい概念の提出と言える。しかも、技術的な優位性、先進性が認められる。具体的には、これまで十分に解析できていなかった物理的な刺激に対する細胞の非常に早い反応をアクチンやアクチン関連タンパク質を蛍光標識することによって、優れた時間分解能で解析しており、本法でしか解明できなかったフォルミンファミリーによるアクチンの急速な重合反応や、アクチン重合時にフォルミンファミリー分子がアクチン線維に沿って回転しているなど、驚くべき事実を明らかにしている。世界的に見ても大変独創的な研究であり、高い先進性・優位性があると考えられる。

前述の様に、研究代表者が開発したリアルタイムのイメージング技術により、外部の物理学的な刺激に対して細胞が非常に素早い反応を起こしていることが明らかになっており、これまで明らかにされていなかった画期的な成果であると評価される。

東日本大震災による被害という困難な状況に直面しながら、研究を進めていることを考えれば、研究の大幅な進展は評価されるべきである。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

本研究課題は、細胞への機械的刺激に対する分子機構の解明というきわめて独創的な視点の研究であり、非常に広い範囲の他分野の研究に影響を及ぼすことが期待される。また、技術的な改善によって他の実験系へ適用することが将来的には期待され、関連する研究分野の進展への寄与が大きくなることが期待される。

病態モデルや新規薬品の開発に関しては、目標どおりの研究の進捗がみられないことから、社会的貢献へは期待は大きくない。例えば、病態生理モデルの培養系に応用されれば、がんや血管疾患の病態解明にも貢献することが期待される。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

研究代表者は、教授として東北大学に移って間もない時に、東日本大震災という災難を受けた。本研究は測定機械に多く依存するので、施設や機械などの破損により、大きな被害を受けたと思われる。それを乗り越えて、若手教授として、大学院生8名を含むしかるべき研究体制を構築しており、適切なマネジメントが行われている。

Science 2011 や Nat Cell Biol. 2013 を始めとして、約30編の原著論文と、総説論文などを発表しており、積極的に成果の発信をしたことが伺える。また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での発表も高く評価できる。

大学のオープンキャンパスや学都「仙台・宮城」サイエンスデイなどの行事を通して、高校生や一般市民に直接対話できる機会を設けており、十分な努力が行われていると考えられる。