

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Combination Analysis of Fluorescence Single-Molecule Imaging with Other Microscopic
Techniques Elucidates Actin Turnover Mechanisms in Living Cells

渡 邊 直 樹, 木 内 泰

Naoki Watanabe and Tai Kiuchi

東北大学・大学院生命科学研究所・単分子動態生物学分野

要 旨 細胞骨格関連分子の細胞内ダイナミクスを捕捉するうえで、蛍光単分子イメージングは有用な情報を提供する。しかし、直接可視化による高精細な分子動態データが得られても、集団として分子がどのように振る舞うのか直観的に捉えにくいことがある。一方、蛍光消光後回復 (FRAP: fluorescence recovery after photobleaching) など分子全体の分布変化を可視化する方法では、時空間分解能の制約が大きいため、分子の細かい動態や異なる動きをする分子種の存在を捉えることが難しく、ときに誤った解釈を与えてしまう。最近、われわれの研究において、FRAP やアクチン単量体濃度を連続的に定量する s-FDAP (sequential-fluorescence decay after photoactivation) 法のデータと、蛍光単分子イメージングのデータと同じ条件下で比較することで、アクチン重合・脱重合サイクルのより深い理解につながった経験が得られたので、学術的背景とあわせて紹介する。

キーワード: 単分子スペックル顕微鏡法, アクチンターンオーバー, 蛍光消光後回復, s-FDAP 法, フォルミンファミリー

1. はじめに

アクチン細胞骨格は、細胞表層の主要な構成成分である。アクチンは真核生物における最も豊富なタンパク質である¹⁾。アクチンは、単量体アクチン (G アクチン) と線維状アクチン (F-アクチン) の2つの状態の間を行き来しながら、細胞表層を支持する足場として機能する。同時に、ミオシンによる収縮力とアクチン線維が伸長する際に発生する、押し出す力を細胞に提供する。アクチン細胞骨格は、その骨格という言葉が示すような静的な構造ではなく、その構成分子は絶え間なく入れ替わり続ける。G-アクチン、もしくはF-アクチンに結合する数多くの分子が存在し、必要に応じて様々な形態の線維ネットワーク構造を構築する。横紋筋細胞の筋原線維や神経の樹状突起、内耳有毛細胞の不動毛などでは、特有の巨大なアクチン高次構造が形成される。

この制御機構を解明するうえで、アクチン細胞骨格系分子の細胞内分子挙動を捕捉することは有効である。通常の2次元培養条件下では、蛍光単分子スペックル (single-molecule speckle: SiMS) 顕微鏡によって、アクチンネットワークの構築や崩壊、移動の高解像解析が可能である^{2,3)}。

元来、この手法は1990年代後半、Waterman-Storer と Salmon によって報告された蛍光スペックル顕微鏡に由来す

る。当時、低濃度の蛍光標識チューブリンを細胞内に導入し微小管をまだらに標識することで、その軸方向への移動や運搬を可視化できることが報告された⁴⁾。これをアクチンに応用し、さらに蛍光標識体の密度を下げ、1分子ごとに可視化したのが SiMS 顕微鏡である。1~2秒といった比較的長い露光時間を用いることで、蛍光標識アクチンのうち細胞内のアクチン線維と共重合したもののみ点状のシグナルとして可視化できる。この原理によって、アクチンが細胞内のいつどこで重合するか、線維の寿命がどのように分布するかについて高い精度と分解能で捕捉できるようになった。本法は、アクチン調節分子を中心とした他のタンパク質にも応用され、細胞構造への分子の結合・解離動態の解析に用いられている。

この手法が威力を発揮したのは、細胞の先端部に形成される薄いベール状の仮足であるラメリポディア (葉状仮足) (図1) において、「アクチン重合が先端端でのみ起きる」というトレッドミリング仮説⁵⁾の検証においてであった。アクチン線維には極性があり、ATP 存在下で重合させたアクチンは、定常状態に至ると、一方の端 (barbed end, B 端) が伸長し、反対側 (pointed end, P 端) が短縮するトレッドミリングという現象を引き起こす。一方、ラメリポディア内のアクチン線維は、B 端を外向きに向け^{6,7)}、線維が伸長する力によって細胞の先端端を外へ押し出している⁸⁾。また、蛍光アクチンを用いた FRAP により、アクチンネットワークが細胞中心に向かって恒常的に流動するレトログレードフローという現象が観察されてきた⁹⁾。これらの所見から、ア

〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3 理学部生物棟 505 号
E-mail: nwatanabe@m.tohoku.ac.jp
2013年6月28日受付

クチン線維が先端端でのみ重合し、葉状仮足後端で脱重合するというトレッドミリング仮説が支持されていた。ところが、蛍光アクチンを用いたSiMS解析の結果では、ラメリポディア

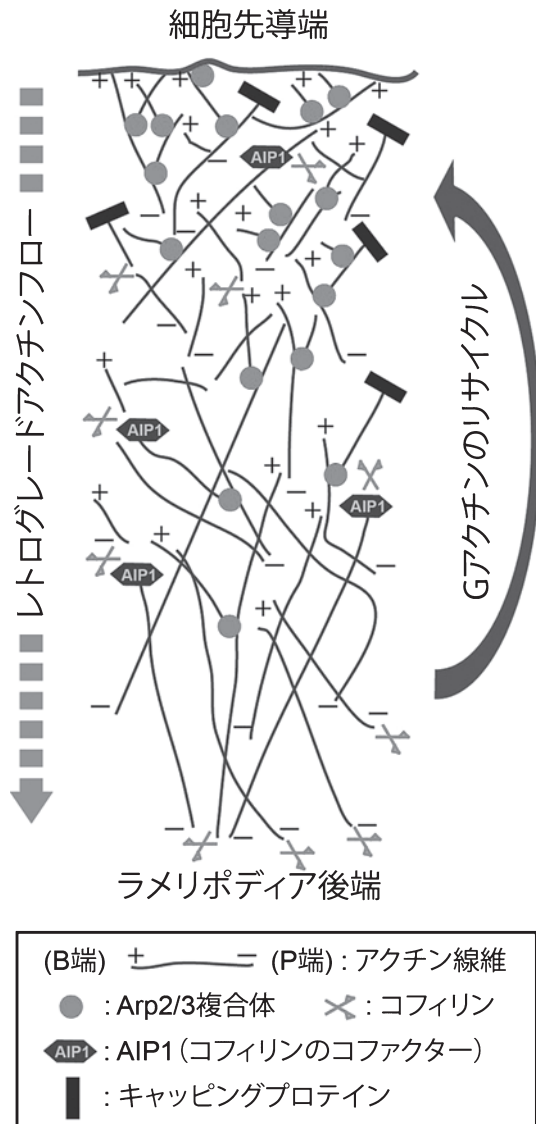


図1 ラメリポディアのアクチンネットワーク (文献20より改変して転載)。先端端の細胞膜直下やその近傍でArp2/3複合体が頻回に活性化され、既存の線維の側方に結合しつつアクチン重合核を形成することで、枝分かれしたアクチンネットワークが形成される。ラメリポディアのアクチン線維はB端を細胞の外向きに配向しており、細胞先端端を外向きに押し出す力を発生する。線維ネットワークは、レトログレードフローと呼ばれる内向きの流動に乗って移動するが、その速度はほぼ一定であり、線維は互いにクロスリンクされていると考えられている。キャッピングプロテインはアクチン線維が無秩序に伸びないようにB端の伸長を制限する。レトログレードフローで移動するアクチン線維は、いずれ脱重合し、拡散によって再度重合する線維へと供給される。この脱重合のステップでは、コフィリンが重要な役割を担っている。コフィリンは、AIP1など他の分子と協調してアクチン脱重合を触媒するが、図に示すように、個々のアクチン線維はP端で脱重合されるのか、或いは線維が切断されその部分が崩壊するかなどについては諸説があり、迅速な脱重合を実現するための分子・構造レベルのメカニズムに関するさまざまな仮説が提唱されている。

全域で多くのアクチン線維が短時間で脱重合すること¹⁰⁾が確認された。つまり、アクチン線維の多くはラメリポディア全長にわたる距離をトレッドミリングしないことが判明した^{2,11)}。

このように、SiMS顕微鏡を用いることで、アクチンやアクチン結合タンパク質の細胞骨格への結合や解離の分子動態を直接解明できるが、奇妙なことに、SiMS解析による結果とFRAPのような従来のイメージング法による結果が一致しないという主張が近年でも存在する¹²⁾。この主張は、われわれがSiMS顕微鏡によるデータを再考するきっかけとなった。

本稿では、SiMS顕微鏡によるデータと、2色FRAPやs-FDAP (sequential-fluorescence decay after photoactivation)¹³⁾といった分子分布動態変動を測定する他のイメージング手法によるデータを比較することにより、細胞内のアクチン線維のターンオーバーのメカニズムをより明確に示した最近のわれわれの研究について紹介する。また、近年汎用されるようになったFRAPにおける潜在的な問題点についても触れる。

2. アクチン線維ターンオーバーにおけるSiMSとFRAPによるデータの見かけ上の相違

上述したように、Rottnerらのグループは、彼らのアクチンFRAPのデータと我々のラメリポディアにおけるFアクチンの速い脱重合成分を明らかにしたSiMS解析のデータ²⁾には矛盾があると指摘している¹²⁾。確かに彼らの画像を一見したところ、細胞先端端に限局的にアクチンが重合するように見える。一方、我々のSiMS解析のデータによれば、新たに重合したアクチンフィラメントのおおよそ1/3が10秒の間に脱重合するので²⁾、それを補う新規のアクチン重合がラメリポディア全域で起きるはずである。

この2つの異なる実験手法によるデータの解釈には、いくつか留意すべきことがある¹⁴⁾。1つは、線維寿命に関して、何を対象に分布を集計するかがSiMSとFRAPでは異なることである。SiMS解析では、一定期間内に出現したスペクルを全て捉え、それらの寿命を集計するため、重合のイベントあたりの線維寿命の分布が表示される。一方、FRAPでは、ある瞬間に存在するアクチン線維を総体としてそれらの崩壊速度を観察する。もし、アクチン線維に寿命の長短が著しく異なるものが混在する場合、FRAPによる解析では、寿命が短く重合・脱重合を繰り返すアクチン線維の割合が、SiMS解析による結果より過小評価される可能性がある。

2つ目は、FRAPの範囲が大きいとアクチンの再取り込みの影響を受けることである。線維の脱重合が非常に速いときやFアクチンがGアクチンより高濃度で存在するとき、FRAPの回復速度は脱重合速度より遅れることが数学モデルによって示されている¹⁵⁾。これは、脱重合によって離脱したプローブが再度、FRAPで標識された領域に取り込まれるためである。ラメリポディアでは、1000 μMものFアクチンが存在し¹⁶⁾、Gアクチンより相当多いと考えられる。上述した数理モデルを用いFRAPの実験をシミュレートすると、FRAPの減衰速度は脱重合速度より2倍近くまで遅くなるこ

とがわかる¹⁴⁾.

3点目として、SiMS解析の問題点について述べる。多様な寿命をもつ線維が混在するラメリポディアの場合、長寿命の線維がどれくらい含まれるかに関しては、SiMS解析では観察数が不足しがちであり、また、フォトブリーチングの補正は可能であるが^{2,3)}、計測のばらつきによって誤差が大きくなることで、長寿命の線維の割合を見誤る可能性がある。近年、EM-CCDなど高感度低ノイズのカメラや高効率の蛍光フィルターの導入によって、長い時間の観察が容易になり、これらの問題点は随分改善された。さらに、われわれの研究室では、EGFPアクチンに代えて、DyLight 550などの安定な蛍光化合物で標識したアクチンを用いることで、ほとんどフォトブリーチングの影響を受けずにアクチンターンオーバーを測定できることも見出している（投稿中）。加えて、ラメリポディアでは、細胞中心に向かってアクチン線維の濃度が減少する勾配が存在するため、線維は長いものでも先端からラメリポディア後端までを橋渡ししているわけではない。先端から出現したアクチンがどれくらいの割合でラメリポディアを横断するかという問題の解決にSiMS顕微鏡を用いた場合、これらの点に留意し、注意深い実験のコントロールとデータの解釈が必要である。

3. SiMSとFRAPデータのずれが暗示するオリゴマーを介したアクチンリサイクル

上述した批判論文¹²⁾では、限られた前提条件のみではあるが、FRAPデータのシミュレーション解析も取り入れ、上記の問題点を回避した形で議論が展開されていた。そこで、われわれはSiMSとFRAPを同じ条件下、同じ細胞系において直接比較することを試みた¹⁷⁾。

まず、われわれの細胞(XTC細胞)を用いて、ラメリポディアにおけるFアクチン動態を通常のFRAP法で調べた。ラメリポディアではFアクチンの密度はレトログレードフローに沿って徐々に減少する場合が多い。よって、細胞先端でフォトブリーチによってつくられたFRAPの領域では、ラメリポディアの後端に達するとき、ときに元の蛍光強度の半分程度にしか回復しない(図2)。このような状況では、フォトブリーチングによるダメージによって局所のアクチンネットワークが部分的に傷つき、回復しないことが起きていても認識しづらい。さらに、FRAPの回復率に関して実験ごとに大きな差があることに気付いた。また、ラメリポディアの後端近傍には、ストレス線維などのFアクチン構造がときに集積しており、FRAPの回復の後半部分を測定しづらいといった問題もあった。

そこで、我々はFLAP (fluorescence localization after photobleaching)¹⁸⁾と呼ばれる手法に順じた二色FRAP法を採用した。この方法では、フォトブリーチさせるGFPアクチンの回復と対比させるためにフォトブリーチしないRFPアクチンを細胞に共発現し、アクチンネットワーク全体像を可視化する。その結果、局所のアクチンネットワークの濃淡

の移り変わりも合わせて経時的に把握することができ、GFPとmCherryアクチンの比率から、FRAPの回復の程度をより明確に捉え、FRAPによる蛍光回復をより正確に解析できるようになった¹⁷⁾。

SiMS解析によるアクチン線維の脱重合解析のデータから得られたパラメーターを用いて、二色FRAPの実験のシミュレーションを行い、実際のデータと比較した。すると、わずかではあるが、実際のFRAPによるデータほうがSiMS解析で得られたパラメーターから予測される回復より遅れることが判明した。その差は何で生まれるのだろうか。1つの可能性としてわれわれは、アクチンは脱重合する際に拡散の遅い、短く切断されたアクチンオリゴマーを経て次の重合へ向けてリサイクルする仮説を提唱している¹⁷⁾。

この仮説は、以前のわれわれの研究¹⁹⁾で見出された、キャッピングプロテインが細胞内のアクチンネットワークから非常に速く離脱する所見に由来する。キャッピングプロテインは、試験管内ではアクチン線維のB端に強く結合し、その離脱は半減期が30分と非常に遅い。ところが、細胞内での離脱速度は 0.57 s^{-1} と速い。アクチン脱重合阻害薬であるjasplakinolideを投与すると、この細胞内での速い離脱が速やかに消失する。これらの所見をもとに、キャッピングプロテインは、コフィリンなどアクチン脱重合因子によって切断された短いアクチンオリゴマーとともに、アクチンネットワークから離脱することを提唱した¹⁹⁾。他にも、コフィリンが切断したアクチン線維のB端に特異的に結合するタンパク質AIP1においても、脱重合阻害薬の投与によってその離脱が遅延することが観察された²⁰⁾。

上述したFRAPとSiMSのデータ比較で見いだされたわずかな差も、このオリゴマー仮説を支持すると考えている。Fアクチンが崩壊する際、部分的にアクチンオリゴマーとして線維ネットワークから離脱するのであれば、FRAPにおいて離脱したアクチンの拡散が部分的に遅くなり、FRAP標識に再び取り込まれる確率が増して、FRAPの回復が見かけ上遅くなることが考えられるためである。このオリゴマー仮説は更なる検証が必要であるが、このような精密なSiMSのデータとの比較検討は、二色FRAPなくしては十分成し遂げなかったと思われる。アクチンネットワーク以外の解析においても、構造全体の形状や観察する分子の分布や濃度が大きくゆらぐような状態で分子動態を検討するときは、単純なFRAPではなく、二色FRAPなど全体の挙動も同時にモニターできる解析法を用いることが望ましいだろう。

4. SiMS解析のコインのうら側を可視化するs-FDAP_{plus} (sequential-fluorescence decay after photoactivation plus)法

われわれは、最近SiMS顕微鏡を用いてmDia1を始めとしたフォルミン相同タンパク質が、物理刺激にさらされた細胞において、盛んにアクチン重合核を形成することを見出した²¹⁾。フォルミンファミリーは、多くの真核生物において細

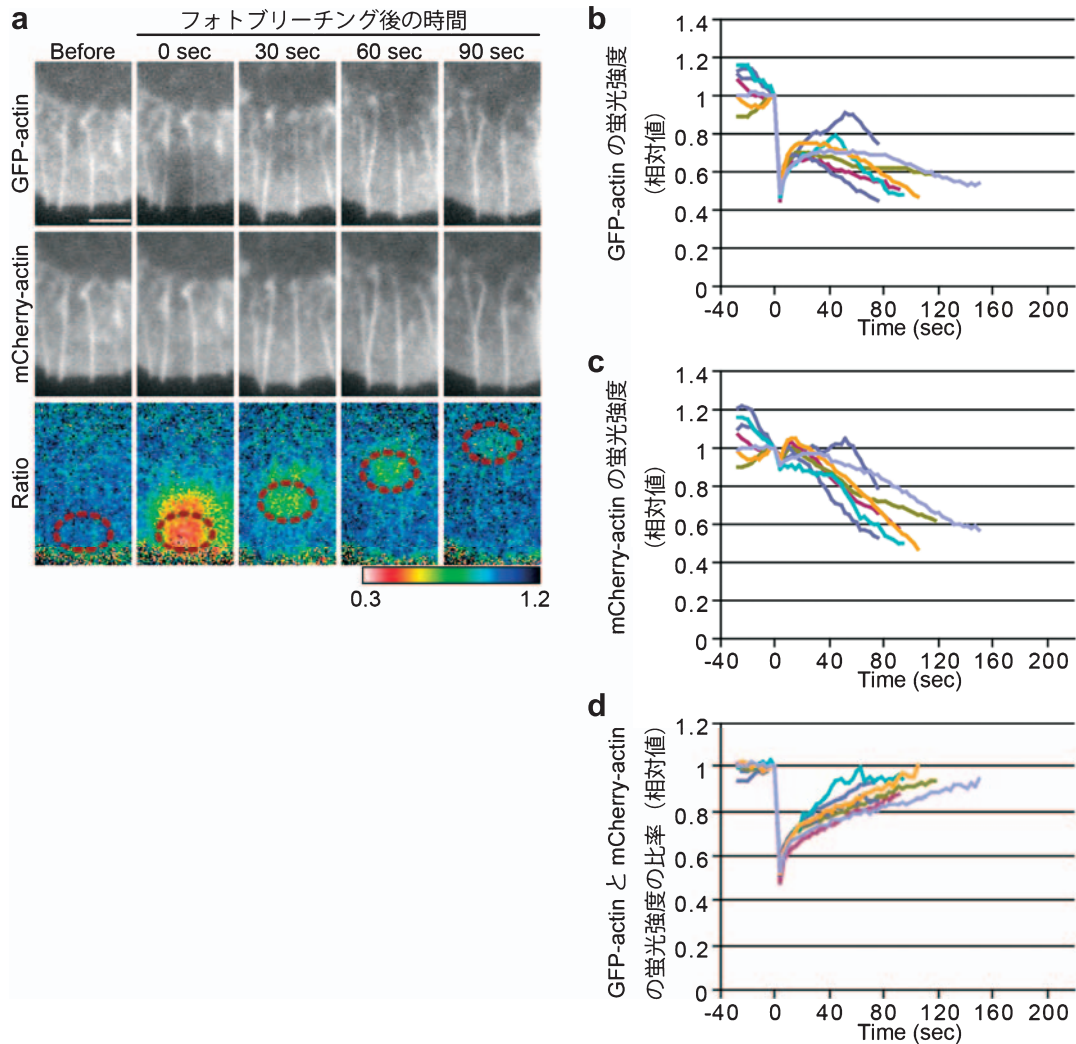


図2 二色 FRAP によるアクチンターンオーバー解析. (a) EGFP アクチンと mCherry アクチンを共発現させた XTC 細胞のラメリポディア先端部で EGFP のみの FRAP を施行した. フォトブリーチされた EGFP アクチン (上段) の蛍光回復はレトログレードフローに沿って徐々に起きる. その移動や蛍光回復の程度は下段に示すように GFP と mCherry の蛍光強度の比率でみるとより明確である. (b) フォトブリーチされた領域 (a の点線) における EGFP-actin の蛍光強度. 異なる 7 細胞のデータを示す. (c) 同じ部位の mCherry-actin の蛍光強度変化. 細胞ごとに異なるアクチン濃度の勾配や不均質さが観察できる. (d) GFP と mCherry の蛍光強度比をグラフにしたもの. b に比べると, 蛍光回復する成分が捉えやすい. 文献 29 より改変して転載.

胞質分裂や初期胚の極性形成に重要な役割をもつアクチン重合核形成因子である²²⁾. フォルミンファミリーは, 重合中のアクチンの B 端に結合したままプロセシブに線維を伸長するユニークな性質をもつ. この性質により長距離にわたってアクチン線維を伸長するフォルミンファミリーの分子の像を, 細胞内で可視化することに, われわれは成功してきた²³⁾. さらに, その性質がいつ, どこで, どのようなアクチン重合を担うのかを検討してきたのだが, マイクロニードルを用いて細胞表面を 3 秒ほどの短時間変形させると, フォルミンファミリーが盛んにプロセシブにアクチンを重合し始めることを見出したのである. この活性化はニードル刺激後 10 秒以内に起こり, 100 秒未満で消失する. この細胞の機械刺激に応答したアクチン重合機構は, カルシウムイオンの上昇もタンパク質リン酸化のシグナルも必要としない. また,

多くのフォルミンファミリーのメンバーが刺激に対して同様の反応を示すことから, 普遍的な新規の機械受容アクチン重合機構の存在が予想された.

さらにいくつかの実験によって, 物理刺激下でのフォルミンファミリーによるアクチン重合核形成の亢進は, G-アクチンの濃度上昇が引き金となることの証拠を得た. 1 つは, 物理刺激が誘発するアクチンストレス線維の崩壊の程度とアクチン重合核形成頻度の増加がよく相関すること, 2 つめは, SiMS 顕微鏡で観察したアクチンに結合する AIP1 が約 20% 増加すること, 3 つめは, LIM キナーゼを過剰発現しコフィリンを不活性化²⁴⁾させると, 物理刺激によるアクチン重合核形成の亢進が阻害されることである. AIP1 はコフィリンによって切断されたアクチン線維の B 端に結合する分子であり^{20,25)}, そのアクチン線維への結合の増加は, コフィリン

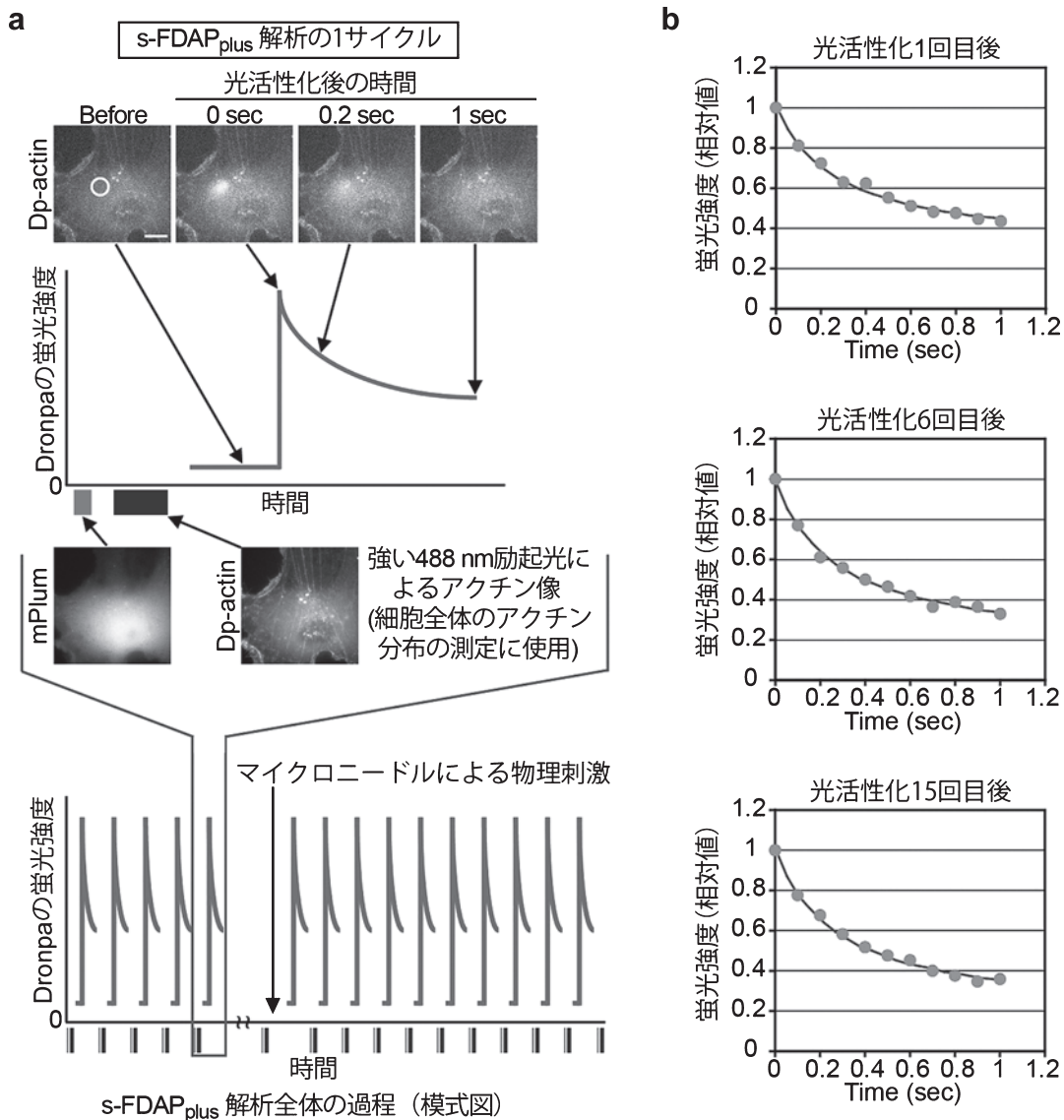


図3 s-FDAP_{plus}法による細胞内Gアクチン濃度変動の計測方法。(a) まず細胞の厚さをみるためのmPlum蛍光像、つぎに細胞全体のアクチン分布をモニターするための消光のための照射中のDpアクチン画像、最後に円で囲った領域のみ390 nmのレーザー光でDpアクチンを光活性化し、その後速いタイムラプスでDpアクチンの減衰を測定する。約4.3秒で1回の計測サイクルを行う。これを5回測定した後、細胞をマイクロニードルで物理刺激し、刺激しなかった細胞と比較を行った。(b) 各計測サイクルにおけるGアクチン分画測定の実例。11点のタイムラプスからDpアクチンの局所強度の減衰を測定し(点で示す)、モデルにフィッティングさせることでGアクチンの分画を正確に測定できる。文献21より改変して転載。

によるアクチン脱重合頻度の増加を反映すると考えられる。

これらの証拠から、物理刺激によるフォルミンファミリーの活性化には、アクチンの脱重合が重要であることがわかった。しかしながら、実際にG-アクチンが増加しているかどうかは未確認であった。そこで、われわれはG-アクチンの細胞内濃度をs-FDAP法によって計測することを試みた。s-FDAP法は、アクチンの自由拡散成分、すなわちGアクチンの濃度変動を連続的に計測するための手法として開発された^{13,26)}。s-FDAP法は、光によってスイッチオン・オフが可能な緑色蛍光タンパク質Dronpa²⁷⁾で標識したアクチン(Dpアクチン)を用いる。細胞局所で光活性化したDpアクチンが速く拡散することによる蛍光強度の減衰を測定すること

で、その部位におけるGアクチンの割合を計算する。単一の細胞において、繰り返しDpアクチンの光活性化と消光を繰り返すことで、数秒おきにGアクチン濃度を捉えることが可能である。

そのs-FDAP法について、Gアクチン濃度の微細な変化も捉えられるようにいくつかの点で改良した(図3)。まず、光活性化されたDpアクチンの拡散成分を推定するうえで、以前は2枚の画像間の蛍光強度の差分を用いたが¹³⁾、改良版であるs-FDAP_{plus}法では、100 msのインターバルで11フレーム撮影した画像のDpアクチンの減衰を測定し数理モデルにフィッティングすることで、Gアクチンの割合を正確に求めた。2つ目は、消光ステップで得られたDpアクチンの蛍光

分布を用い、測定部位にあるアクチン総量を推定した。3つ目は、共発現した赤色蛍光タンパク質 mPlum の蛍光を用い、物理刺激を加えた細胞の厚さの変動をモニターし、補正に加えた。これらの改良によって、測定間のばらつきを2~3%の範囲に収めることに成功した。

これらの改良により、細胞の物理刺激に反応して、G-アクチンが即座に増加することが明らかになった。物理刺激を加えた12細胞のうち、3細胞で20%以上、4細胞で10~20% G-アクチンの増加が計測された。これらのG-アクチンの増加は大幅なものではない。しかしながら、細胞内にはプロフィリンやサイモシン β 4といったG-アクチンを隔離するタンパク質が相当量存在しており、それらとG-アクチンとの結合を平衡状態として計算すると、総G-アクチンが20%程度増加しただけでも、約0.5 μ M程度存在する遊離G-アクチン濃度を2~3倍近くまで上昇させることが予想できる²¹⁾。さらに、フォルミンファミリーでもっともよく解析されている mDia1 の場合、そのアクチン重合核形成効率は、遊離G-アクチン濃度の3乗に比例することが報告されている²⁸⁾。これらの知見をあわせると、s-FDAP_{plus}で測定されたわずかなG-アクチン濃度の上昇でも、十分フォルミンによるアクチン重合核形成反応を顕著に亢進させることが予想される。

このように、細胞構造に結合した分子の動態を直接明らかにするSiMS顕微鏡と、アクチンの速く拡散する成分を捕捉するs-FDAP_{plus}法は、アクチンのターンオーバーサイクルにおけるコインの裏表の現象を照らしたことで、互いに相補的なデータをもたらした。これら両面からのアプローチによって、細胞の物理刺激にตอบสนองしたフォルミンによるアクチン重合核形成の誘発は、これまで知られていなかったFアクチンとGアクチンのホメオスタシスの崩れからGアクチンが上昇する機構が引き金となって惹起されることが強力に裏付けられたのである。

5. おわりに

SiMS顕微鏡は、生細胞内のタンパク質の結合と解離を直接可視化するが、FRAPやs-FDAPなど全体の分子分布変動を可視化するその他の手法とデータを比較することによって、SiMSデータだけではできなかったより深い洞察ができたことを本稿では紹介した。重要なことは、モデル化を通じた定量的な考察が問題の解決に必要な不可欠な役割を果たしたことである。FRAP法は、共焦点顕微鏡に装備されるなど利用の機会が増え、多くの論文で用いられるようになった。多くの事例において、FRAP等の手法によってもたらされた結果を単に記述するだけでなく、分子動態をモデル化するなど定量的な考察を加えることで、背後のメカニズムのいっそうの理解につながるのではないだろうか。

- 1) Dominguez, R. and Holmes, K.C.: *Annu. Rev. Biophys.*, **40**, 169–186 (2011)
- 2) Watanabe, N. and Mitchison, T.J.: *Science*, **295**, 1083–1086 (2002)
- 3) Watanabe, N.: *Meth. Enzymol.*, **505**, 219–232 (2012)
- 4) Waterman-Storer, C.M. and Salmon, E.D.: *Biophys. J.*, **75**, 2059–2069 (1998)
- 5) Small, J.V., Herzog, M. and Anderson, K.: *J. Cell Biol.*, **129**, 1275–1286 (1995)
- 6) Small, J.V., Isenberg, G. and Celis, J.E.: *Nature*, **272**, 638–639 (1978)
- 7) Narita, A., Mueller, J., Urban, E., Vinzenz, M., Small, J.V. and Maeda, Y.: *J. Mol. Biol.*, **419**, 359–368 (2012)
- 8) Forscher, P. and Smith, S.J.: *J. Cell Biol.*, **107**, 1505–1516 (1988)
- 9) Wang, Y.L.: *J. Cell Biol.*, **101**, 597–602 (1985)
- 10) Theriot, J.A. and Mitchison, T.J.: *Nature*, **352**, 126–131 (1991)
- 11) Miyoshi, T. and Watanabe, N.: *Cytoskeleton*, **70**: 179–190 (2013)
- 12) Lai, F.P., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H.G., Stradal, T.E., Dunn, G.A., Small, J.V. and Rottner, K.: *EMBO J.*, **27**, 982–992 (2008)
- 13) Kiuchi, T., Nagai, T., Ohashi, K. and Mizuno, K.: *J. Cell Biol.*, **193**, 365–380 (2011)
- 14) Watanabe, N.: *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **86**, 62–83 (2010)
- 15) Tardy, Y., McGrath, J.L., Hartwig, J.H. and Dewey, C.F.: *Biophys. J.*, **69**, 1674–1682 (1995)
- 16) Abraham, V.C., Krishnamurthi, V., Taylor, D.L. and Lanni, F.: *Biophys. J.*, **77**, 1721–1732 (1999)
- 17) Smith, M.B., Kiuchi, T., Watanabe, N. and Vavylonis, D.: *Biophys. J.*, **104**, 247–257 (2013)
- 18) Zicha, D., Dobbie, I.M., Holt, M.R., Monypenny, J., Soong, D.Y., Gray, C. and Dunn, G.A.: *Science*, **300**, 142–145 (2003)
- 19) Miyoshi, T., Tsuji, T., Higashida, C., Hertzog, M., Fujita, A., Narumiya, S., Scita, G. and Watanabe, N.: *J. Cell Biol.*, **175**, 947–955 (2006)
- 20) Tsuji, T., Miyoshi, T., Higashida, C., Narumiya, S. and Watanabe, N.: *PLoS ONE*, **4**, e4921 (2009)
- 21) Higashida, C., Kiuchi, T., Akiba, Y., Mizuno, H., Maruoka, M., Narumiya, S., Mizuno, K. and Watanabe, N.: *Nat. Cell Biol.*, **15**, 395–405 (2013)
- 22) Goode, B.L. and Eck, M.J.: *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 593–627 (2007)
- 23) Higashida, C., Miyoshi, T., Fujita, A., Ocegüera-Yanez, F., Monypenny, J., Andou, Y., Narumiya, S. and Watanabe, N.: *Science*, **303**, 2007–2010 (2004)
- 24) Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E. and Mizuno, K.: *Nature*, **393**, 809–812 (1998)
- 25) Okada, K., Blanchoin, L., Abe, H., Chen, H., Pollard, T.D. and Bamburg, J.R.: *J. Biol. Chem.*, **277**, 43011–43016 (2002)
- 26) Kiuchi, T., Ohashi, K., Kurita, S. and Mizuno, K.: *J. Cell Biol.*, **177**, 465–476 (2007)
- 27) Ando, R., Mizuno, H. and Miyawaki, A.: *Science*, **306**, 1370–1373 (2004)
- 28) Li, F. and Higgs, H.N.: *Curr. Biol.*, **13**, 1335–1340 (2003)
- 29) Watanabe, N., Yamashiro, S., Vavylonis, D. and Kiuchi, T.: *Development*, **131**, 508–514 (2004)