

令和元年6月6日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07335

研究課題名(和文) RhoGEF, Soloと中間径フィラメントを介するメカノシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of RhoGEF, Solo and intermediate filaments in mechanosignal transduction

研究代表者

大橋 一正 (Ohashi, Kazumasa)

東北大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号：10312539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、メカノシグナル伝達に関するRhoGEF, Soloの細胞集団の秩序化、細胞へ負荷される機械的力における応答機構を解析した。3次元培養下の上皮細胞集団が形成する管腔構造において、Soloは、中間径フィラメントのケラチン8/18繊維の管腔の長軸方向への配向に寄与し、また、管腔の内腔側、基底側の両方で発生する収縮力の発生に寄与し管腔の形状を制御することを明らかにした。また、上皮細胞集団の集団移動において、移動速度を減速させる働きを持つことを見出した。また、Soloが、細胞-基質間接着において収縮力を発生する部位に集積し、その部位の収縮力の発生に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、上皮細胞集団が秩序を形成し管腔構造を形成する過程や集団移動する現象において、その形態や運動を決定する機械的な力を制御する機能蛋白質とその作用機構の一端を明らかにした。これは、上皮組織の恒常性の維持や形態形成の新たな基本的な制御機構の発見であり、疾患発症の新たな原因解明につながることを期待される。また、人為的に細胞集団の形状を操作する技術につながり、再生医療や細胞工学に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the roles of RhoGEF, Solo, involved in mechanotransduction, on ordering of epithelial cell population. We showed that Solo contributes to align of keratin-8/keratin-18 intermediate filaments along the long axis of epithelial tubules of MDCK cells, which are cultured in 3D collagen gels. We also showed that Solo is required for the generating contractile forces in the lumen and basal regions of the epithelial tubules. Furthermore, we found that knockdown of Solo increases the velocity of collective cell migration of MDCK cells on collagen gel, but has no effect on the velocity of migration of solitary cultured cells. We showed that Solo accumulates in the basal region where contractile force is generated and functions in generating the contractile forces.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：メカノシグナル RhoGEF アクチン骨格 中間径フィラメント 上皮細胞集団 Rho Solo

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

私たちの体は運動や重力などで機械的な力（メカノストレス）が常に作用しており、組織を構成する細胞は、その力に適切に応答することで組織のリモデリングや恒常性の維持等の様々な生理的応答を行っている。例えば、運動による筋肉や骨の発達、血圧の調節、さらに、臓器や組織の形の維持や変化は個々の細胞が外環境のメカノストレスに対して適切な応答を行うことで成り立っている。また、これらの機構が破綻することが循環器や癌などの種々の疾患の原因になると考えられる。細胞に作用するメカノストレスは、機械的刺激感受性チャネル、細胞接着分子、細胞骨格等を介して感知されることが明らかになっている。しかし、そのシグナル（メカノシグナル）伝達の分子機構については未だ多くの部分が不明であり、その解明は重要な意義を持つ。私たちは、これまでアクチン骨格の再構築を制御するメカノシグナルの分子機構の研究を進めてきた。アクチン骨格の再構築は、低分子量G蛋白質Rhoファミリー分子群がスイッチ蛋白質として働きメカノストレス応答に重要であることは明らかであった。しかし、そのスイッチを細胞内で時空間的に制御するRhoファミリー分子の活性化因子であるRhoGEFについてほとんど不明であった。そのため、私たちは血管内皮細胞に対する繰り返し伸展刺激による細胞の方向転換をモデルにメカノストレス応答に寄与するRhoGEFを網羅的にスクリーニングし、11種類のRhoGEFを同定することに成功した。その一つであるSoloについて解析を進め、繰り返し伸展刺激によるRhoAの活性化にSoloが必要であることや細胞の整列において細胞間接着からのメカノシグナルにSoloが寄与することを明らかにした。さらに、細胞への引張刺激によるアクチンストレスファイバー形成誘導においてSoloが必要であることを明らかにし、細胞-基質間接着からのメカノストレスによるRhoAの活性化にもSoloが寄与することを明らかにした。また、Soloの結合蛋白質をプロテオミクス解析によって探索し、単層上皮細胞特異的なケラチン8とケラチン18からなる中間径フィラメントとSoloが結合していることを見出した。中間径フィラメントは、細胞に対するメカノストレスに抵抗して細胞形態を維持する働きがあることは古くから知られており、メカノシグナル伝達において重要な要素であることは明らかであるがその分子機構は不明な点が多く残されている。中間径フィラメントの細胞内ネットワークは、デスモソーム（細胞間接着）とヘミデスモソーム（細胞-基質間接着）に連結され細胞の隅々まで張り巡らされた安定な構造であることから、これらの接着部位や細胞内においてメカノストレスによる細胞の変形により発生する力の部位、強さと方向の情報もった支点となると考えられる。私たちのこれまでのSoloについての研究と中間径フィラメントの特性から、中間径フィラメントに作用するメカノストレスがSoloを直接、又は、間接的に活性化して細胞に作用するメカノストレスに対してベクトルを持った対抗する力を発生させるアクチン繊維とミオシンIIから成るアクトミオシンの形成に寄与している可能性が考えられた。さらに、Soloは、細胞-基質間、細胞間接着部位の一部に集積し、アクトミオシンとケラチン8/18繊維束の集積を引き起こすことが明らかになり、細胞内において張力の作用する部位に抵抗する力を発生させる機能があることが示唆された。これらの研究から、Soloとケラチン8/18繊維ネットワークに関連する細胞間や細胞-基質間接着部位でのメカノストレス応答の分子機構とその細胞および細胞集団における役割を解明することは重要な意義を持つと考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内のケラチン8/18繊維により構成される中間径フィラメントのネットワーク構造とSoloを介したメカノストレス応答の分子機構およびその機能を解明することを目的とする。まず、上皮細胞集団の集団移動や管腔形成をモデルに、Soloによるケラチン8/18繊維ネットワークの形成制御が担う細胞間接着部位におけるメカノストレス応答の細胞集団の秩序化における役割を解明する。また、細胞-基質間接着部位において、細胞への張力負荷が引き起こすストレスファイバーの形成促進におけるSoloとケラチン8/18繊維ネットワークの相互作用の役割を解明する。これらの解析から、Soloによるメカノストレス応答の生物学的意義を解明する。

3. 研究の方法

(1) 上皮細胞の管腔形成モデルの構築

イヌ腎上皮MDCK細胞を2 mg/mlのコラーゲンゲル上に播種し、その上に、0.1 mg/mlのコラーゲンをゲル化させた。増殖培地を用いてコラーゲンゲルをゲル化させるとともに、細胞培養開始後、肝細胞増殖因子(HGF)を終濃度10 ng/mlで添加し管腔形成を誘導した。培養開始から4日後に細胞を4%パラホルムアルデヒドにより固定し、アクチン骨格、リン酸化ミオシン軽鎖のリン酸化

を蛍光染色して可視化し解析した。ケラチン8/18繊維ネットワークの構造は、YFPを融合したケラチン18を恒常的に発現するMDCK細胞を用いた。Soloの機能解析は、Soloを特異的に発現抑制するsiRNAを用いて行った。

(2) 上皮細胞の細胞集団移動のモデルの構築と動態解析

1.6 mg/mlのコラーゲンゲル上の一部にガラスシリンダーを置いて、その中にイヌ腎上皮MDCK細胞を高密度で播種し12時間培養してシリンダー内で細胞シートを形成させた。シリンダーを取り除くことで細胞シートの縁の細胞集団が外側に向かって移動しフィンガー様の細胞集団の突起が形成される。この突起部位の細胞集団移動を10分毎のタイムラプス観察を5-7時間を行い個々の細胞の動態を観察した。siRNAによるSolo、ケラチン18およびブラコグロビンの発現抑制を行ったMDCK細胞を用いてこの解析を行い、細胞集団内の個々の細胞の移動の軌跡から移動速度等を測定して発現抑制した因子の機能を解析した。

(3) 上皮細胞の基質における張力発生部位の可視化

細胞が接着面にシワを形成できる硬さのシリコン薄膜を作製し、細胞が付着できるように表面をプラズマ処理により親水化した。親水化したシリコン薄膜にヒト乳腺上皮MCF10A細胞とヒト骨肉腫U2OS細胞を播種し、細胞基底部分で細胞が形成したシリコン膜のしわとYFP-Soloの局在、しわの形状に対するSoloの発現抑制の効果を解析した。

(4) 上皮細胞への引張刺激によるアクチン骨格再構築の可視化

ガラスボトムディッシュにシリコン薄膜を固化させプラズマ処理により親水化した。その表面に、アクチン骨格を可視化することができるYFP-lifeactを発現させたMDCK細胞を播種し、共焦点顕微鏡の顕微鏡ステージに置き、37°Cに維持した状態で細胞近傍のシリコン膜をマイクロマンピュレーターに取り付けたガラス針で引き伸ばした。引き伸ばした後、5秒毎のタイムラプス観察を5分間行い、細胞内のアクチンストレスファイバーの動態を観察した。この実験系にて、Soloを発現抑制と共にSoloの野生型およびN末端ドメインのケラチン8/18繊維との結合活性を失った点変異体を発現させた細胞を用い、張力刺激に対するストレスファイバー増強に対するSoloとケラチン8/18繊維の結合の機能を解析した。

4. 研究成果

(1) Soloとケラチン8/18繊維ネットワークの上皮管腔形成における機能解析

MDCK細胞をコラーゲンゲル内で3次元培養し、HGFを添加することによってCystを管腔様に伸長させるモデルを構築した。MDCK細胞が発現するSoloをsiRNAによって発現抑制した結果、コントロールに比べて管腔と内腔(Lumen)の形状が有意に短く太くなることを見出した。管腔を形成する細胞集団における中間径フィラメントのケラチン8/18繊維ネットワーク構造を解析した結果、正常では管腔の長軸に平行にケラチン8/18繊維束が配向するのに対して、Soloの発現抑制した管腔では、ケラチン8/18繊維束の配向が顕著に乱れていることが明らかになった(図1)。さらに、管腔において細胞がアクチン骨格とミオシンIIによって発生させている収縮力をミオシン調節軽鎖(MLC)のリン酸化を指標に解析し、Soloの発現抑制によって、管腔の基底側と内腔側の両面でMLCのリン酸化が減少し、収縮力の発生が低下していることを明らかにした。さらに、ケラチン18を発現抑制してケラチン8/18繊維ネットワーク形成を乱した結果、Soloの発現抑制と同様に、MLCのリン酸化が減少することを見出した。これらの結果から、Soloは、上皮細胞の管腔形成において、ケラチン繊維の配向を制御し、これらと共に管腔の基底側と内腔側の両面でMLCのリン酸化を促進し、アクチンとミオシンIIによる収縮力の発生に寄与することを明らかにした。この働きによって、Soloは、管腔形成において、管腔を細く維持する働きを持つことが示唆された(発表論文②)。

(2) Soloとケラチン8/18繊維ネットワークの上皮細胞集団移動における機能解析

上皮細胞集団の秩序化におけるSoloとケラチン8/18繊維ネットワークの機能を解析するために、MDCK細胞のコラーゲンゲル上の細胞集団移動をモデルに解析を行った。コラーゲンゲル上でMDCK細胞集団をシートにして培養すると、シートの辺縁においてリーダー細胞が出現し、リーダー細胞

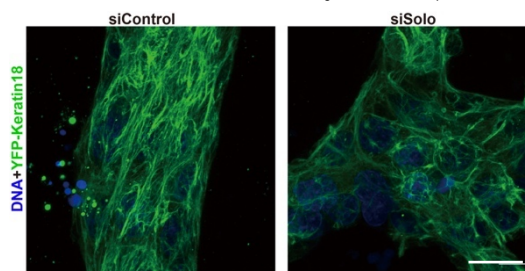


図1. MDCK細胞の管腔形成におけるケラチン8/18ネットワーク構造に対するSolo発現抑制の効果。Soloの発現抑制により、ケラチン繊維の長軸方向に対する配向が乱れ、ネットワークの密度が低下する傾向が観察された。(Scale bar = 50 μm) 文献②より改変。

胞を先頭にしたフィンガー様の細胞集団の突起が形成される。siRNAによってSoloを発現抑制したMDCK細胞を用いてこの集団移動を観察した結果、移動する個々の細胞の移動極性や配置に影響は見られなかったが、その移動速度が有意に加速することが明らかになった(図2)。MDCK細胞を細胞間接着を形成しない低密度でコラーゲンゲル上に培養して観察した結果、単一細胞の移動速度は集団移動時の倍以上速く、しかし、細胞の移動速度、運動性にSoloの発現抑制は影響しないことが明らかになった。また、ケラチン18や、細胞間接着構造であるデスモソームにおいて中間径フィラメントの係留に寄与するプラコグロビンを発現抑制した結果、Soloと同様に集団移動速度が加速することが明らかになった。これらの結果から、Soloは、集団移動において細胞間に働く力の発生に関与し、集団移動におけるブレーキとして働くことが示唆された(論文準備中)。

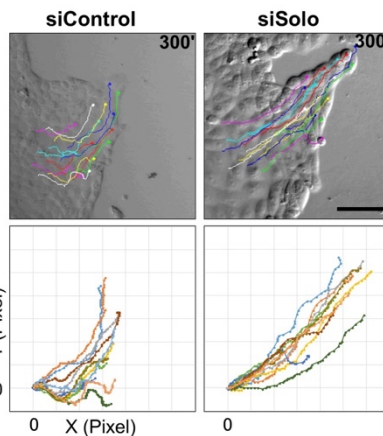


図2. MDCK細胞のコラーゲンゲル上の集団移動におけるSolo発現抑制の効果。(上)コントロールsiRNAまたはSoloに対するsiRNAを導入したMDCK細胞集団がフィンガー構造を形成して移動する様子を10分毎に6時間観察した。写真は6時間後の形態。個々の細胞の軌跡を重ねてプロットした。(下)上の写真にプロットした個々の細胞の移動の軌跡を集計した。(Scale bar = 50 μm)

(3) Soloの上皮細胞の細胞-基質間における収縮力発生における機能解析

Soloは、細胞間接着部位だけでなく細胞-基質間接着部位におけるメカノストレス応答にも関与することをこれまでに見出しており、Soloが張力負荷によるストレスファイバーの増強に必要であることを明らかにしてきた。さらに、Soloが、細胞基底膜の一部に集積することから、細胞-基質間接着部位において細胞に作用する張力、又は、細胞が発生する収縮力を可視化するCell contraction assayを大阪大学の基礎工学部の出口教授との共同研究により行って解析した。その結果、細胞が基底膜において細胞外基質との接着を支点に収縮力を発生させる部位にSoloが集積することを明らかにした(図3)。(発表論文③)

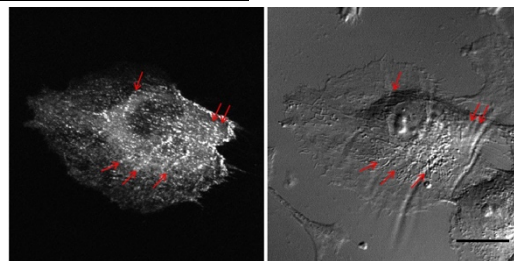


図3. 細胞の基底部位における収縮力発生部位のCell contraction assayによる解析。(上)YFP-Soloを発現させたMCF10A細胞を軟らかいシリコン薄膜上に播種した。YFPの蛍光像(左)と微分干渉像(右)を示す。(下)Cell contraction assayの原理のモデル(Scale bar = 20 μm)文献③より改変。

(4) Soloとケラチン8/18繊維の結合のメカノストレス応答における機能解析

張力の負荷によるSoloを介したストレスファイバー形成において、ケラチン8/18繊維ネットワークとの結合の重要性についてはいまだ不明であった。Soloにはケラチン8/18繊維との結合部位を少なくとも3箇所存在することが明らかになっていた。他のケラチン結合蛋白質の配列を参考にSoloのN末端部位のケラチン結合配列を予想し、14番目と17番目のLeu、又は、49番目と52番目のLeuがケラチン8/18繊維との結合に関与すると予想された。そのため、これらをArgに変異させた点変異体を作製しケラチンとの結合を検討した。その結果、これらの変異を加えたN末端部位はケラチン8/18繊維と結合活性が著しく低下していることが明らかになった。MDCK細胞への引張刺激によるストレスファイバー形成誘導におけるSoloの発現抑制の効果に対してこれらの変異体を用いた相補解析を行ったところ、この点変異体は他のケラチン結合部位が正常であるにも関わらず、張力の負荷に対するストレスファイバー形成誘導を回復することができなかった(図4)。これらの結果から、Soloは、細胞内でケラチン繊維にN末端を含む複数の箇所と結合していることがメカノストレス応答への機能発現に必要であることが強く示唆された。

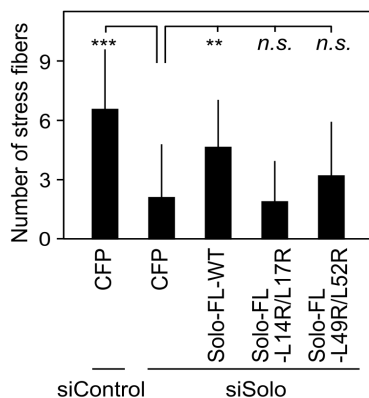


図4. YFP-lifeactを発現させアクチン骨格を可視化できるMDCK細胞に対して内在性Soloを発現抑制し、CFP及びCFPを付加したSoloとその変異体が発現させた。コントロール細胞と共に各々の細胞をシリコン薄膜上に播種し、細胞近傍のシリコン膜をガラス針によって引き伸ばし細胞に引張刺激を与えた。グラフは、引張刺激5分後に引張刺激前より増強されたストレスファイバーの本数を示す。siControlを導入した細胞において増強されるSFの本数はSoloの発現抑制(siSolo/CFP)によって有意に低下し、野生型Soloの発現で回復する。これに対し、Solo変異体(L14R/L17R又はL49R/L52R)では回復しない。文献①より改変。

(発表論文①)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 6 件）

- ① Fujiwara S, Matsui TS, Ohashi K, Mizuno K, Deguchi S, Keratin-binding ability of the N-terminal Solo domain of Solo is critical for its function in cellular mechanotransduction. **Genes Cells**, 24, 390-402 (2019) DOI:10.1111/gtc.12682 (査読有)
- ② Nishimura R, Kato K, Fujiwara S, Ohashi K, Mizuno K, Solo and keratin filaments regulate epithelial tubule morphology., **Cell Struct. Funct.**, 43, 95-105 (2018) DOI:10.1247/csf.18010 (査読有)
- ③ Fujiwara S, Matsui TS, Ohashi K, Deguchi S, Mizuno K, Solo, a RhoA-targeting guanine nucleotide exchange factor, is critical for hemidesmosome formation and acinar development in epithelial cells., **PLoS One**, 13, e0195124 (2018) DOI:10.1371/journal.pone.0195124 (査読有)
- ④ Ohashi K, Fujiwara S, Mizuno K, Roles of the cytoskeleton, cell adhesion, and Rho signaling in mechanosensing and mechanotransduction., **J. Biochem.**, 161, 245-254 (2017) DOI:10.1093/jb/mvw082 (査読有)
- ⑤ Fujiwara S, Ohashi K, Mashiko T, Kondo H, Mizuno K, Interplay between Solo and keratin filaments is crucial for force-induced stress fiber reinforcement., **Mol. Biol. Cell**, 27, 954-966 (2016) DOI:10.1091/mbc.E15-06-0417 (査読有)
- ⑥ Morita R, Kihara M, Nakatsu Y, Nomoto Y, Ogawa M, Ohashi K, Mizuno K, Tachikawa T, Ishimoto Y, Morishita Y, Tsuji T, Coordination of cellular dynamics contributes to tooth epithelium deformations., **PLoS One**, 11, e0161336 (2016) DOI:10.1371/journal.pone.0161336 (査読有)

〔学会発表〕（計 25 件）

- ① 藤原佐知子、松井 翼、大橋一正、マギン トーマス、水野健作、出口真次、上皮細胞のメカノトランスダクションとヘミデスモソーム形成における Rho-GEF Solo の役割、第 41 回日本分子生物学会、2018
- ② 磯崎友亮、酒井高輝、藤原佐知子、水野健作、大橋一正、Solo (ARHGEF40) はケラチン 8/18 ネットワークの再構築に関与し細胞集団移動の速度を制御する、第 41 回日本分子生物学会、2018
- ③ 二宮小牧、水野健作、大橋一正、Functional analysis of PLEKHG4B, a Rho-GEF involved in the cell-cell junction formation 細胞間接着形成に関与する Rho-GEF, PLEKHG4B の機能解析、第 91 回日本生化学会大会、2018
- ④ 磯崎友亮、藤原佐知子、水野健作、大橋一正、A Rho-GEF, Solo, regulates the velocity of collective epithelial cell migration RhoA-GEF Solo は上皮細胞の集団移動速度を制御する、第 91 回日本生化学会大会、2018
- ⑤ 佐藤博紀、山下和成、菅野新一郎、水野健作、大橋一正、Identification of interacting proteins of Solo, involved in mechanotransduction, using the BioID method、第 91 回日本生化学会大会、2018
- ⑥ Ninomiya K, Mizuno K, Ohashi K, Functional roles of Rho-GEF PLEKHG4B in the formation of adherens junctions, 第 70 回日本細胞生物学会（日本発生生物学会合同大会）、2018
- ⑦ Ohashi K, Identification and functional analysis of solo, a Rho-GEF involved in mechanotransduction, 3rd International Symposium on Mechanobiology (ISMB 2017) (招待講演) (国際学会), 2017
- ⑧ 大橋一正、磯崎友亮、西村亮祐、酒井高輝、藤原佐知子、水野健作、力覚応答に関与する Rho-GEF, Solo の同定とアクチン骨格再構築における機能解析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (招待講演)、2017
- ⑨ 二宮小牧、水野健作、大橋一正、Rho-GEF, PLEKHG4B によるアクチン骨格再構築と細胞間接着形成における機能、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017
- ⑩ 磯崎友亮、酒井高輝、藤原佐知子、水野健作、大橋一正、力覚応答に関与する Rho-GEF, Solo の上皮細胞の集団移動における機能解析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017
- ⑪ Mizuno K, Fujiwara S, Ohashi K, Rho-GEF 'Solo' and Keratin Filaments Play Crucial Roles in Force-Induced Stress Fiber Formation, 新学術領域研究「動的秩序と機能」第 5 回国際シンポジウム (国際学会), 2017

- ⑫ 西村亮祐、加藤 輝、藤原佐知子、大橋一正、水野健作、Solo はミオシン II を介して上皮管腔組織の形態を制御する、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017
- ⑬ Dangya Wang、大澤千尋、大橋一正、水野健作、ATP 飢餓によるコフィリンロッド形成における Slingshot の関与、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017
- ⑭ 二宮小牧、大橋一正、水野健作、PLEKHG4B のアクチン骨格再構築、細胞間接着における機能、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017
- ⑮ 磯崎友亮、藤原佐知子、大橋一正、水野健作、RhoA 活性化因子 Solo による上皮細胞の集団移動の制御機構、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017
- ⑯ 藤原佐知子、勝野真美、大橋一正、水野健作、上皮細胞の細胞- 基質間接着と腺房形成における Rho-GEF Solo の機能、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017
- ⑰ 二宮小牧、水野健作、大橋一正、アクチン骨格再構築及び細胞間接着形成における Rho-GEF、PLEKHG4B の機能解明、日本生化学会東北支部 第 83 回例会、2017
- ⑱ 磯崎友亮、藤原佐知子、水野健作、大橋一正、力覚応答に関与する RhoGEF, Solo の上皮細胞の集団移動における機能解析、日本生化学会東北支部 第 83 回例会、2017
- ⑲ 西村亮祐、大橋一正、藤原佐知子、水野健作、上皮管腔組織の形成制御における Rho-GEF, Solo の役割、2017 年生体運動研究合同班会議、2017
- ⑳ 大橋一正、西村亮祐、藤原佐知子、水野健作、力覚応答に関与する Rho-GEF, Solo の上皮細胞の管腔形成における機能解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016
- ㉑ 水野健作、藤原佐知子、大橋一正、動物細胞の力覚応答における細胞骨格の役割、第 39 回日本分子生物学会年会（招待講演）、2016
- ㉒ Ohashi K, The function of Solo, a Rho-GEF involved in mechanoreponse, in the ordering of epithelial cell populations, 5th Japanese-German University Presidents' Conference（日独 6 大学学長会議（HeKKSaGOn German-Japanese University Network）（国際学会）, 2016
- ㉓ 藤原佐知子、大橋一正、水野健作、上皮細胞の力覚応答と細胞骨格制御に対する Rho-GEF Solo の機能、第 68 回日本細胞生物学会大会、2016
- ㉔ 西村亮祐、大橋一正、藤原佐知子、水野健作、メカノストレス応答に関与する Rho-GEF, Solo の上皮管腔組織形成における役割、第 68 回日本細胞生物学会大会、2016
- ㉕ 西村亮祐、大橋一正、藤原佐知子、水野健作、上皮管腔組織形成における Solo の機能解析、日本生化学会東北支部第 82 回例会・シンポジウム、2016

【その他】

ホームページ等

http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/ts_ohashi/

http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/ohashi_lab/index.html