

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06663

研究課題名（和文）力学刺激が活性化するプロテインキナーゼ群による初期胚外胚葉の間葉上皮転換様制御

研究課題名（英文）Mechanically activated protein kinases regulate mesenchymal-epithelial transition-like reaction in early embryonic ectoderm

研究代表者

木下 典行（Kinoshita, Noriyuki）

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・准教授

研究者番号：30300940

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：動物の胚発生における形態形成の過程では、組織の移動や伸張、収縮、屈曲など様々な運動が起こる。そしてこれらの運動は物理的な力を生み出している。本研究は、アフリカツメガエル胚とマウス胚・子宮組織を用いて、力学的な刺激が細胞によってどのように感受され、応答反応を引き起こすかを、プロテイン・キナーゼを中心に解析したものである。その結果、アフリカツメガエルでもマウスでも、力学刺激にはERKの活性化が起こり、その上流には受容体型チロシン・キナーゼが存在することが明らかになった。また、ERKの力学応答の役割として、上皮細胞のタイトジャンクション・タンパク質ZO-1の局在制御が重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の力学応答の仕組みの研究はまだ始まったばかりであり、多くの謎が残された研究分野である。本研究は、アフリカツメガエル胚に機械刺激を与え、その変化をリン酸化プロテオミクスにより解析するという独自の系を端に発し、その知見から、力学刺激に応じたプロテインキナーゼ活性化による細胞接着制御を明らかにした点が新しく、学術的意義のある点であると考えられる。力学刺激は、たとえば力学負荷による骨の増強など、医学分野への関わりも明らかになりつつあり、社会的にも意義深いと考えている。

研究成果の概要（英文）：During the morphogenesis process in animal embryo development, various movements such as tissue movement, extension, contraction, and bending occur. These movements generate physical forces. In this study, I used *Xenopus* embryos and mouse embryos and uterine tissues to analyze how cells sense mechanical stimuli and trigger responses, focusing on protein kinases. As a result, I found that in both *Xenopus* and mouse, mechanical stimuli activate ERK, and that a receptor tyrosine kinase exists upstream of ERK. I also found that the role of ERK in the mechanical response is important in controlling the localization of the tight junction protein ZO-1 in epithelial cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：アフリカツメガエル胚 力学刺激 細胞接着 ERK

1. 研究開始当初の背景

動物の胚発生における形態形成の過程では、組織の移動や伸張、収縮、屈曲など様々な運動が起こる。そしてこれらの運動は物理的な力を生み出しているはずである。そのような力学的刺激が周囲の組織・細胞に作用し変化をもたらすメカニズムが、正常な形態形成を行う上でも重要だということがわかってきた。

私は、アフリカツメガエル原腸胚の外胚葉にストレッチ刺激を与えるとタンパク質リン酸化に大きな変化が現れることを、質量分析によるリン酸化プロテオミクス解析により見出した。その中でもタイトジャンクションの構成タンパク質のリン酸化が大きく変化していた。このことから、機械刺激応答において、プロテイン・キナーゼの活性の変化が重要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、機械刺激によってリン酸化状態が変化するタンパク質として、ジャンクション構成タンパク質の一つであるZO-1タンパク質に注目した。ZO-1タンパク質は、刺激によりリン酸化されるとともに、細胞内局在も変化する。すなわち、刺激前は細胞質で顆粒状に存在し、刺激によりタイトジャンクションへと移行することがわかった。さらに私は、機械刺激が間葉細胞と上皮細胞の転換に関わることも見出ししていた。このことから、機械刺激が制御するジャンクションや細胞接着の変化に関わるプロテイン・キナーゼを同定し、その役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、アフリカツメガエルの初期胚、培養細胞、マウスの胚盤胞と胚盤胞着床期の子宮組織を用いた。アフリカツメガエルの胚を用いる実験では、原腸胚に機械刺激として、低速度の遠心や上からの圧縮、機械的な引き伸ばし(ストレッチ)刺激を与え、細胞の変化やZO-1の動態、プロテイン・キナーゼの活性化を観察した。培養細胞を用いる場合は、ZO-1にビオチン化酵素 Turbo-ID を融合した遺伝子を発現させ、ZO-1の局在制御に関わるタンパク質のスクリーニングを行なった。

マウスの実験では、胚盤胞に対してウワバイン処理により浸透圧刺激を行い、ZO-1の動態を観察した。また、胚盤胞と子宮の相互作用、すなわち着床に伴う子宮上皮組織の形態変化とメカニカルな環境制御について、質量分析を用いてプロテイン・キナーゼを中心に解析を行なった。

4. 研究成果

アフリカツメガエル原腸胚に機械刺激を与えることにより、特に上皮細胞系の細胞接着やジャンクションにかかわるタンパク質がリン酸化されることを我々は報告していた (Hashimoto, Kinoshita et al., Cell Systems 2019)。そこでこの中でも顕著なリン酸化の上昇を示した、タイトジャンクション・タンパク質であるZO-1に着目し、その動態とリン酸化の関係の研究を行なった。ZO-1はカエル胚外胚葉で発現しており、原腸形成前半では細胞内顆

粒として存在し、原腸形成後半の外胚葉伸展 (epiboly) に伴って、細胞内顆粒に局在していた Z0-1 がタイトジャンクションへと局在を変化させることを見出した。この局在変化は Erk プロテイン・キナーゼ阻害剤により阻害されることから、Z0-1 の細胞顆粒とジャンクションの局在制御に、ERK キナーゼが関わっていることが明らかとなった。さらにこの ERK キナーゼを活性化する上流因子を阻害剤のスクリーニングで探索したところ、細胞内にチロシン・キナーゼ活性をもつ FGF 受容体が、機械刺激による ERK 活性化と Z0-1 の局在制御に関わっていることも明らかにした (Kinoshita et al., Cell Reports 2020)。さらに Z0-1 の細胞内顆粒が、液液相分離 (LLPS) によって形成された液滴であり、ジャンクションと細胞質のシャトリングが液液相分離により制御されていることも明らかにした。このことから、機械刺激が FGF 受容体-ERK のシグナルカスケードを通して Z0-1 の液液相分離を制御し、それによって上皮細胞のジャンクション形成を制御していることを明らかにした (Kinoshita et al., iScience 2022)。

Z0-1 の液液相分離の制御機構をさらに詳細に明らかにするため、培養細胞において近接標識法による Z0-1 相互作用因子の探索を行なった。これは Z0-1 にピオチン化酵素 (TurboID) を融合させた遺伝子を発現して、Z0-1 液滴中のタンパク質を探索する方法である。その結果、Z0-1 と相互作用するプロテイン・キナーゼとして、Raf と FAK (focal adhesion kinase) という二つのキナーゼが得られた。Raf は ERK キナーゼの上流因子であり Raf-ERK と Z0-1 の液液相分離の相互作用を示唆するものである。FAK についてはその意義は明らかではなく、今後の課題である (論文準備中)。

この機械刺激による ERK 活性化と Z0-1 の LLPS を介した局在制御は、マウスにおいても保存されていることを我々は明らかにした (Kinoshita et al., Cell Reports 2020)。すなわち、胚盤胞の栄養外胚葉において、ERK 依存的に Z0-1 の局在が制御されていた。さらに胚盤胞が着床する場である子宮内膜上皮においても、着床時に ERK が活性化していることが、リン酸化 ERK 抗体を用いた免疫染色により明らかとなった。また、着床時には子宮内腔が閉じる現象があるが、ERK の活性化は、内腔が閉鎖した場所で特に活性化が起こることから、上皮組織が接触することが刺激となり ERK が活性化していると考えられる。この内腔閉鎖において細胞表面のタンパク質が機械刺激受容に関わると考え、内膜上皮表面タンパク質のピオチン化を行い、質量分析を行なった。その結果、上皮表面にインテグリンとそのリガンドである細胞外基質タンパク質や EGF 受容体が存在することが明らかとなった (Sakurai, Kinoshita et al., BioRxiv 2023, 論文投稿中)。インテグリンは ILK (integrin-linked kinase) や FAK を介して ERK キナーゼを制御していることが知られている。EGF 受容体は細胞内ドメインにチロシン・キナーゼを持ち FGF 受容体同様、ERK を活性化する。着床時において、ERK を活性化する上流因子を阻害剤スクリーニングで調べたところ、予想通り EGF 受容体の阻害剤を処理することで、着床時の ERK 活性化が抑制された。このことから、EGF 受容体が組織の接触という機械刺激を受けて活性化し、ERK の活性化を行なっていることが明らかとなった。この EGF 受容体-ERK 経路の意義を明らかにすることが今後の課題である。

< 論文 >

Hashimoto, Kinoshita et al., Cell Systems (2019). Mechanical Force Induces Phosphorylation-Mediated Signaling that Underlies Tissue Response and Robustness in *Xenopus* Embryos

Yutaka Hashimoto, Noriyuki Kinoshita, Todd M. Greco, Joel D. Federspiel, Pierre M. Jean Beltran, Naoto Ueno, Ileana M. Cristea

Cell Systems 8(3) 226-241.e7

Kinoshita et al., Cell Reports (2020). Mechanical Stress Regulates Epithelial Tissue Integrity and Stiffness through the FGFR/Erk2 Signaling Pathway during Embryogenesis
Noriyuki Kinoshita, Yutaka Hashimoto, Naoko Yasue, Makoto Suzuki, Ileana M. Cristea, Naoto Ueno

CELL REPORTS 30(11) 3875-+

Kinoshita et al., iScience (2022). Force-dependent remodeling of cytoplasmic ZO-1 condensates contributes to cell-cell adhesion through enhancing tight junctions
Noriyuki Kinoshita, Takamasa S. Yamamoto, Naoko Yasue, Chiyo Takagi, Toshihiko Fujimori, Naoto Ueno

iScience 25(2) 103846-103846.

Sakurai, Kinoshita et al., BioRxiv (2023). Mechanical transapical coupling of endometrial epithelial cells during implantation
Jun Sakurai, Noriyuki Kinoshita, Tetsuhisa Otani, Hiroshi Koyama, Mikio Furuse, Toshihiko Fujimori

BioRxiv DOI: 10.1101/2023.12.12.571398

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nguyen Thanh Phuong, Otani Tetsuhisa, Tsutsumi Motosuke, Kinoshita Noriyuki, Fujiwara Sachiko, Nemoto Tomomi, Fujimori Toshihiko, Furuse Mikio	4. 巻 223
2. 論文標題 Tight junction membrane proteins regulate the mechanical resistance of the apical junctional complex	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202307104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202307104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakurai Jun, Kinoshita Noriyuki, Otani Tetsuhisa, Koyama Hiroshi, Furuse Mikio, Fujimori Toshihiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Mechanical transapical coupling of endometrial epithelial cells during implantation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 571398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.12.12.571398	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kinoshita, Noriyuki Yamamoto, Takamasa S. Yasue, Naoko Takagi, Chiyo Fujimori, Toshihiko Ueno, Naoto	4. 巻 25
2. 論文標題 Force-dependent remodeling of cytoplasmic ZO-1 condensates contributes to cell-cell adhesion through enhancing tight junctions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.103846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Kei, Miura Haruko, Ishida Motohiko, Mii Yusuke, Kinoshita Noriyuki, Takada Shinji, Ueno Naoto, Sawai Satoshi, Kondo Yohei, Aoki Kazuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Optogenetic relaxation of actomyosin contractility uncovers mechanistic roles of cortical tension during cytokinesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-27458-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 HIRANO Sayuki, KINOSHITA Noriyuki, AOKI Kazuhiro, UENO Naoto
2. 発表標題 Regulation of collective cell migration via ZO-1 phase separation
3. 学会等名 日本発生生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Noriyuki Kinoshita, Takamasa Yamamoto, Naoko Yasue, Chiyo Takagi, Toshihiko Fujimori, and Naoto Ueno
2. 発表標題 Force-dependent remodeling of a tight junction protein ZO-1 is regulated by phase separation
3. 学会等名 日本発生生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞間接着の新たな制御機構の発見 https://www.nibb.ac.jp/press/2022/02/25.html

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------