

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20620

研究課題名(和文)細胞メカノセンシング機構における微小管情報伝達の役割

研究課題名(英文)A role of microtubule cytoskeleton for mechanosensing

研究代表者

西村 有香子(Nishimura, Yukako)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師

研究者番号：90360619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞には外環境の機械的性質や力作用を感知し応答する「メカノセンシング機構」が備わっており、接着斑という構造が感知・応答の中核を担うことが知られている。しかし外部からの機械的刺激が接着斑の構造と機能を制御する仕組みの理解は未だに不足している。本研究では、細胞骨格の一つ微小管と接着斑のクロストークがメカノセンシングに果たす役割解明を目指した。顕微鏡によるイメージングと画像解析により、微小管結合能を持つRhoA活性化因子の微小管上の動態と、RhoGTPaseをはじめとする下流因子群との関連を明らかにした。現在メカノセンシングが誘導する細胞移動中において、これら関連分子群の挙動の解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メカノセンシング機構は細胞増殖や分化、細胞移動などのさまざまな生体現象で重要な役割を果たしていることが近年の研究で分かってきた。本研究では細胞内外の環境を操作するための細胞工学技術と高解像度イメージング・画像解析を組み合わせた独自の手法により、これまでに観察されてこなかった新しいシグナル伝達機構を可視化した。本研究で着目した因子群は、多くの癌細胞で過剰に活性化・発現していることが報告されているため、本研究をさらに推進することでメカノセンシングの原理解明だけでなく、メカノセンシングと癌発生との関連性についても新たな知見が得られることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cells have an ability to sense and react mechanical forces. This is called 'mechanosensing' which is essential for many biological events such as proliferation, differentiation and cancer metastasis. Focal adhesions are considered one of the 'sensors' of mechanosensing, however, how the mechanical cues from the extracellular environment regulate turnover of focal adhesions have not been fully understood. In this project, we have investigated a function of microtubule cytoskeleton, which are thought to physically target and induce adhesion turnover, for mechanosensing. High-resolution time-lapse imaging and its image analysis have revealed that cross-correlations among microtubules, microtubule-binding RhoGEF GEFH1 and its downstream signaling molecules. We are now testing molecular dynamics and their functions of these factors during durotaxis, a cell migration process guided by rigidity gradients from extracellular environment.

研究分野：細胞生物学

キーワード：メカノバイオロジー 微小管 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

細胞が外部環境の機械的性質を認識するには、感覚器官として接着斑を利用する。接着斑は細胞外基質と細胞内構造を結びつける高次構造体で、細胞外から細胞内に情報伝達するメカノセンシングの中心拠点を担っている。しかし、機械的力刺激が接着斑の構造と機能を制御するメカニズムの理解は未だに不足している。

細胞接着斑は、膜貫通型受容体のインテグリンとその結合因子群から構成される高次構造体であり、細胞外基質と細胞内アクチン骨格を繋げることで、細胞内外にかかる張力を感知する。接着斑は、細胞が移動する時に形成と崩壊を繰り返すが、その時空間制御には謎が多い。我々はこれまでに、接着斑の再編成が微小管によって制御される分子機構を明らかにした。微小管は、アンキリンリピート配列分子 KANK を介して接着斑と連結する。これにより、低分子量 G タンパク質 RhoA の活性化因子 GEF-H1 の不活性化が誘導されることで、RhoA 依存的に起こるアクチン骨格の収縮力が障害され、接着斑の崩壊を誘導する。この微小管-接着斑の連結構造の崩壊と形成は非常に動的であり、そのダイナミクスは細胞運動の制御に必須であることが明らかとなった。そこで、この微小管が誘導する接着斑のダイナミックな再編成が、外環境の機械的性質を細胞が感知・応答するシグナル伝達機構にも関与する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本提案研究では、これまでに先行研究で明らかになった「微小管が誘導する接着斑の再編成メカニズム」が細胞メカノセンシングへ及ぼす作用とその分子メカニズムについて調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) メカノセンシングを誘導できる“硬軟度勾配”を持つ細胞外環境を作成し、さらにマイクロプリンティング技術によって硬軟度勾配を特異的な形状に整形することで、durotaxis を誘導できる細胞外基質を作成する(九州大学・木戸秋研究室との共同研究)。光学顕微鏡観察により細胞の動態と細胞内の分子の振る舞いを観察する。

(2) 微小管-接着斑の連結を一過的に阻害したり誘導するツールを作成し、メカノセンシング機能や細胞移動の方向の人為的操作を目指す。

(3) 微小管-接着斑連結構造の下流シグナル伝達経路を同定する。微小管結合能を持つ RhoA 活性化因子 GEF-H1、その下流因子である RhoGTPases、アクチン、ミオシン細胞骨格等について高解像度のイメージングと解析により相関関係を明らかにする。

4. 研究成果

(1) メカノセンシングによる細胞移動を誘導させる目的で、硬軟度グラディエントを持った細胞外基質を構築し、細胞移動の観察を行った。幾つかの細胞株において極性を持った細胞移動(デュロタキシス)が観察された(図1)。デュロタキシスを起こしている細胞内での分子ライブイメージングと分子機能阻害を現在行っており、これらの因子との関連性について調べている。

(2) 微小管と接着斑の連結を人為的に阻害・誘導するための光遺伝学技術を導入した遺伝工学的ツールを作製した。このツールを実際に細胞内に導入、発現させ、光照射によって微小管と接着斑の相互作用を操作できるか検討した。その結果、ツールが細胞内で発現し、局在が見られることは確認できたが、光照射による接着斑と微小管の相互作用は確認できなかった。今後、ツールの改良を行い、細胞一部分を局所的に光照射できる顕微鏡を観察に導入することで微小管と接着斑の連結を人為的に阻害・誘導できる系を立ち上げる。

(3) 微小管-接着斑連結の下流で作用するシグナル伝達経路を同定する目的で、微小管結合能を持つ RhoA 活性化因子 GEF-H1 の活性化メカニズムについての解析を行った。顕微鏡観察とそのイメージング解析により、この分子の微小管上の動態が明らかとなった。一分子レベルでの計測では、GEF-H1 が微小管から結合・解離する様子に加えて、微小管上を滑る様子が観測できた。また、フォトリチングを利用したダイナミクス解析では、この分子が微小管から素早く解離・結合する様子が明らかになった。さらに、微小管脱重合剤、重合促進剤による機能阻害を行

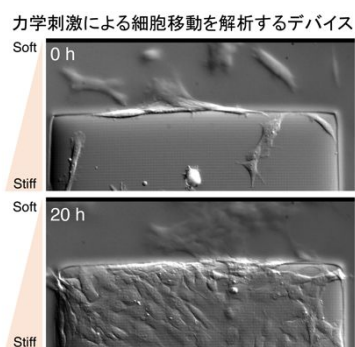


図1 硬軟度グラディエントを持った細胞外基質上における細胞移動の様子。デュロタキシスが誘導されていることが確認できた。

い、重合状態を変化させた微小管上の GEF-H1 の動態についても検討した。GEF-H1 の下流因子である Rho GTPase、アクチン、ミオシンなどの細胞骨格の動態についても併せて観察した。これらの下流因子群と GEF-H1 のダイナミクスとの関係については、今後は数理的な解析を行い相関について明らかにしていく予定である。

本研究で着目した、微小管と接着斑を繋ぐ因子 GEF-H1 と Rho GTPase は、多くの癌細胞で過剰に活性化・発現していることが報告されている。今後、本研究をさらに推進することで、メカノセンシングの原理解明のみならず、癌細胞特有のメカノセンシング機構の解明及び新しい視点からの創薬開発に繋がると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西村有香子
2. 発表標題 A cross-talk between microtubules and focal adhesions regulates dynamics of actin cytoskeleton
3. 学会等名 第17回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村有香子、Tassaneeya Kuboki、木戸秋悟、茂木文夫
2. 発表標題 Cross-talk between focal adhesions and microtubules in directed cell migration
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村有香子、Tassaneeya Kuboki、木戸秋悟、茂木文夫
2. 発表標題 微小管とアクチン骨格クロストークの時空間制御機構
3. 学会等名 日本機械学会第35回バイオエンジニアリング講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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			
シンガポール	Mechanobiology Institute			