

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 9日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22616001

研究課題名（和文）メカノセンシングにおけるアクチン骨格再構築制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation mechanisms of mechanostress-induced actin cytoskeleton reorganization

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・准教授

研究者番号：10312539

研究成果の概要（和文）：本研究において、細胞に対する機械的な力の作用によって引き起こされるアクチン骨格の再構築機構の解明を行った。血管内皮細胞に対する繰り返し伸展刺激による細胞の配向と乳腺上皮細胞の3次元培養下における外環境の硬さ依存的な上皮間葉転換様の形質転換に関与する Rho ファミリーの活性化因子 Rho-GEF を網羅的に探索し、前者で8種類、後者で5種類の Rho-GEF の同定に成功した。さらに、細胞移動における極性形成に p63RhoGEF が重要な役割を持つことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the molecular mechanisms of mechanostress-induced actin cytoskeleton remodeling. We succeeded in identifying 8 Rho-GEFs involved in cyclic stretch-induced cell alignment of vascular endothelial cells and 5 Rho-GEFs involved in the rigidity of extracellular matrix-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like transformation in mammary epithelial cells. We also revealed that p63RhoGEF is plays a crucial role in the polarized cell migration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：メカノバイオロジー

キーワード：アクチン骨格、Rho-GEF、メカノセンシング、血管内皮細胞、乳腺上皮細胞

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は、様々な外環境からの刺激に応答して形態や運動性を変化させている。このような細胞の形態変化は、細胞内アクチン骨格の再構築によって行われており、細胞全体のバランスを保ちながら適切なタイミングで局所の形態を変化させるために多様なアクチン

結合蛋白質と複雑なシグナル伝達経路によって時空間的に厳密に制御されている。これまで、液性因子などの刺激から受容体を介した細胞応答におけるアクチン骨格の再構築制御機構が研究されてきたが、私達の体は、重力、圧力などの様々な力をうけており、組織を構成する細胞が外環境からの機械的な力の

作用によってもアクチン骨格再構築のシグナル伝達経路を作動させて応答していると考えられる。実際に、組織を構成する細胞において、力を感知して応答する力覚（メカノセンシング）が血管などの循環器、骨や筋組織の形成と維持等に深く関与していることは知られている。血管内皮細胞に対する力負荷刺激の研究は比較的進んでおり、血管内皮細胞に対する流れ負荷刺激は細胞が力学的に安定した形態をとるためにアクチンストレスファイバーと共に形態を流れ方向に配向させ、また、繰り返し伸展刺激に対しては、伸展方向に対して垂直に配向させる。これらの応答の過程で細胞は時空間的に異なる多段階のアクチン骨格の再構築を行っていることが示唆される。しかし、細胞外からの力を細胞が感知し、化学的な細胞内シグナルへ変換し、アクチン骨格再構築を制御する分子機構は未知の部分が多く残されている。これまで私たちは、アクチン脱重合因子であるコフィリンの活性を制御するリン酸化酵素 LIMキナーゼ、脱リン酸化酵素 Slingshotの機能、低分子量G蛋白質Rhoファミリーを介するシグナル経路の役割を明らかにしてきた。これらのアクチン骨格の再構築制御機構が細胞のメカノセンシングにおいてどのように機能しているかを解明することは、細胞の機械的力に対する応答の分子機構と共に、組織の恒常性維持や形態形成の分子機構の解明にもつながる重要な研究であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、メカノセンシングによるアクチン骨格の再構築制御機構を解明するために、力負荷刺激によって低分子量G蛋白質Rhoファミリーを活性化するRho-GEFを同定する。さらに上流シグナルを探索し、メカノセンサーの分子基盤を解明することを目的とする。本研究において、血管内皮細胞や乳腺上皮細胞に対する繰り返し伸展刺激、外環境の硬さの変化に対する応答をモデルとし、アクチン骨格の再構築制御のシグナル伝達機構とその役割を生化学的解析と生細胞のイメージング解析により解明する。Rhoファミリー構成分子を活性化するシグナル伝達経路とメカノセンサーの本体を探索するために、力負荷刺激に応答するRhoファミリーの活性化因子Rho-GEFを網羅的発現抑制実験によって同定する。同定したRho-GEFのメカノセンサーとしての働きを検証すると共に、プロテオーム

解析によって同定したRho-GEFの結合蛋白質を探索し、メカノセンサーの本体の分子基盤を解明する。本研究の遂行によるメカノセンシングにおけるアクチン骨格の再構築のシグナル伝達経路とメカノセンサー本体の分子基盤を解明することで、生体内の血管の形成、維持、細胞の極性形成や癌細胞の移動形態の制御の分子機構の解明に寄与し、血管循環器や癌の浸潤・転移等の様々な疾患を抑制する応用研究の基礎となることを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) Rho-GEFの発現抑制プラスミドライブラリーの作製

ヒトDb1ファミリーの69種類のcDNA配列に対して、程博士らの方法を参考に19塩基の標的配列を2箇所選定し、shRNAとなるように配列を付加したオリゴDNAを合成し、これらをpSUPERプラスミドのH1プロモーターの下流に組み換えた。発現抑制の効果は、各々のDb1ファミリーの標的配列を含むcDNA断片をルシフェラーゼ発現プラスミドに組換え、これらのプラスミドとshRNA発現プラスミドをヒトT細胞由来Jurkat細胞に共発現させルシフェラーゼの発現量を定量して測定した。コントロールに対してルシフェラーゼの活性を40%以下に抑制するshRNAプラスミドを効果のあるものとして用いた。また、14種類のRhoA特異的マウスDb1ファミリーに対するshRNA発現プラスミドをEnzymatic production of RNAi library (EPRIL)法を用いて作製した(文献12)。

### (2) 血管内皮細胞に対する繰り返し伸展刺激とRho-GEF発現抑制の効果の測定

ヒト血管内皮細胞に対してコントロール及び各shRNA発現プラスミドをトランスフェクションし、翌日にフィブロネクチンコートしたシリコン製のストレッチチャンバーに細胞を播種し、24時間後にストレッチチャンバーを20%の伸展率で1 Hz、1 hの繰り返し伸展刺激を行った。刺激後直ちに固定し、Rhodamine-Phalloidinによってアクチン骨格を染色した。細胞の配向角度は、細胞の輪郭をトレースし、ImageJソフトウェアによって楕円に近似後、長軸と伸展方向とのなす角度として測定した。

### (3) 乳腺上皮細胞の3次元培養とRho-GEF発現抑制の効果の測定

ヒト乳腺上皮MCF10A細胞に対してコントロ

ール及び各shRNA発現プラスミドをトランスフェクションし、翌日に1 mg/ml (約100 Pa)と3 mg/ml (約250 Pa)の異なる硬さのコラゲンゲル内で3次元培養を行った。10日間培養を行いシスト又はコロニーを形成させた。柔らかいゲル内ではシストを形成し、硬いゲル内では細胞は形質転換して増殖が促進し細胞のコロニーが形成される。細胞の形質転換は、増殖促進によって細胞数が増加するため、細胞塊の大きさを各々の条件で測定し判定した。

#### (4) 細胞遊走実験とRho-GEF発現抑制の効果の測定

ヒト乳癌MDA-MB-231細胞に対してコントロール及び各shRNA発現プラスミドをトランスフェクションし、2日後にトランスウェル上層に細胞を播種し、10%牛胎児血清を下層の培養液にのみ、又は、上下層に添加して4-8時間培養した。細胞の移動度の定量は、トランスウェルの膜の上層と下層に付着した全細胞を染色し、全細胞数を数えた後、上層側の細胞をぬぐい取って下層側に移動した細胞を数え、総細胞数に対する下層に移動した細胞の比率を算出する方法で行った。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞内平面極性に関するRho-GEFの同定とシグナル経路の解析

細胞内平面極性(PCP)は、ショウジョウバエの羽の毛の向きが一方向に揃って生えることなどに代表される細胞極性の形態であり、卵発生時の原腸陥入における細胞集団の収束伸長とも共通した分子機構であると考えられている。これらの現象は、細胞間に働く機械的力の作用が重要であることが示唆されており、アクチン骨格の再構築がこれに関与することが明らかになっている。液性因子であるWntはPCPを制御しており、受容体のFrizzledからDishevelledを介してRhoAを活性化することでPCPを制御するPCP経路が知られているが、RhoAを活性化するRho-GEFは不明であった。このため、Dblファミリーの中からRhoA特異的なRho-GEFとして知られる14種類について神経芽腫N1E-115細胞においてshRNAによる発現抑制を行い、Wnt3a刺激によるRhoA依存的な神経突起退縮に対する抑制効果を指標にスクリーニングを行った。その結果、p114RhoGEFとLfc(GEF-H1)が関与することが明らかとなった

(図1)。さらに、p114RhoGEFとGEF-H1が、Dishevelledに結合するDaam1と結合することを明らかにした(文献12)。

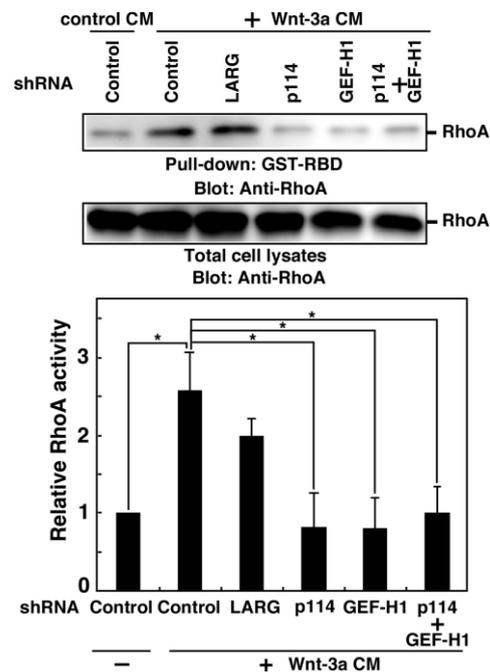


図1. 神経芽腫N1E-115細胞に対するWnt3a刺激によるRhoAの活性化に対するLarg, GEF-H1, p114RhoGEFの発現抑制の効果。GEF-H1とp114RhoGEFの発現抑制のみでWnt3a添加によるRhoAの活性化が抑制された。同じRhoAのGEFであるLargの発現抑制ではRhoAの活性化は抑制されなかった(文献12)。

(2) 血管内皮細胞に対する繰り返し伸展刺激による細胞配向に関するRho-GEFの同定  
機械的な力負荷による細胞応答のモデルを用いてメカノセンサーの実態を探索するために、連携研究者の坂元と協力し、血管内皮細胞に対する繰り返し伸展刺激による細胞の伸展方向に対して垂直に配向する応答に関与するアクチン骨格の再構築制御機構の解析を行った。これまで繰り返し伸展刺激によるRhoAの活性化が配向に必要であることが明らかとなっており、また、他のRhoファミリー構成因子が関与することも示唆されていたが、メカノセンサーからRhoAやその他のRhoファミリー分子を活性化するシグナル伝達機構は不明であった。そのため、Rhoファミリーの活性化因子Rho-GEFであるDblファミリー69種類に対するshRNA発現プラスミドライブラリーを構築し、ヒト血管内皮細胞に対して各々のRho-GEFを発現抑制し、繰り返し伸展刺激による細胞の配向角度に対する影響を指標にスクリーニングを行った。その結果、GEF-H1、Larg、Soloを含む8種類のRho-GEFを同定することに成功した(図2)。

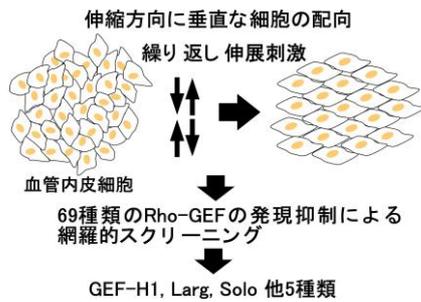


図2. 血管内皮細胞に対する繰り返し伸張刺激による細胞の配向に關与するRho-GEFの同定。Rho-GEFであるDb1ファミリー構成因子69種類を網羅的に発現抑制し、繰り返し伸張刺激による細胞の配向に必要な8種類のRho-GEFを同定した。

### (3) 3次元培養下の乳腺上皮細胞の細胞外基質の硬さ依存的な形質転換に關与するRho-GEFの同定

メカノセンシングに關与する細胞応答として、形態形成と癌化の關与を考え、3次元培養下の乳腺上皮MCF10A細胞が細胞外基質の硬さ依存的に上皮間葉転換様の形質転換を引き起こす現象に注目した。この応答においても、RhoAの活性依存的な細胞の収縮力の増加と増殖シグナルの亢進が明らかとなっているが、メカノセンサーからのシグナルを受けてRhoAを活性化するRho-GEFは不明であった。そのため、前述のDb1ファミリー69種類に対するshRNA発現プラスミドライブラリーを用いてMCF10A細胞の細胞外基質の硬さ依存的な形質転換に關与するRho-GEFのスクリーニングを行った。その結果、Farp-1 (CDEP) を含む5種類のRho-GEFを同定することに成功した(図3)。

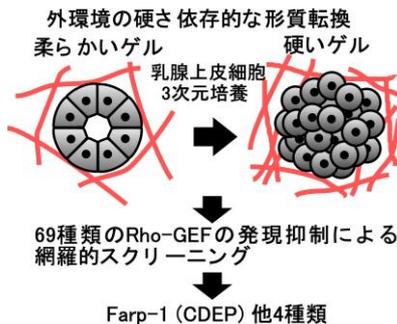


図3. 3次元培養下の乳腺上皮MCF10A細胞の細胞外基質の硬さ依存的な形質転換に關与するRho-GEFの同定。Rho-GEFであるDb1ファミリー構成因子69種類を網羅的に発現抑制し、細胞外基質の硬さ依存的な形質転換に必要な5種類のRho-GEFを同定した。

さらに、Farp-1に結合する蛋白質をプロテオミクス解析によって探索した結果、インテグリンが結合していることが明らかとなった。これらの結果から、乳腺上皮細胞は、細胞外基質の硬さをインテグリンを介して感知し、

Farp-1を介してアクチン骨格の再構築と細胞増殖を制御していることが示唆された。

### (4) 細胞遊走に關与するRho-GEFの同定と機能解析

乳腺上皮細胞の形質転換は細胞の運動性を増加させることが知られている。そのため、癌細胞の移動におけるアクチン骨格の再構築制御についてRhoファミリーの構成因子を時空間的に制御するRho-GEFを探索した。高転移性のヒト乳癌MDA-MB-231細胞においてDb1ファミリー69種類に対するshRNA発現プラスミドライブラリーを用いて、牛胎児血清に対する走化性に關与するものをスクリーニングした。その結果、p63RhoGEFを含む6種類のRho-GEFを同定した。p63RhoGEFはRhoA特異的なGEFとして知られており、p63RhoGEFの発現抑制は、細胞移動の先端端となるラメリポディアが細胞周囲の多方向に形成される異常が見られ、また、血清刺激による運動性の亢進は抑制しないが走化性を阻害することが明らかとなった(図4)。これらの結果から、p63RhoGEFはRhoAの活性を時空間的に制御し、細胞移動時の極性の形成・維持に機能することが明らかとなった(文献2)。

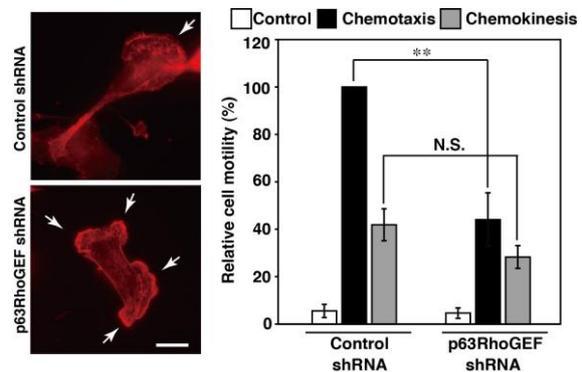


図4. p63RhoGEFは乳癌由来MDA-MB-231細胞の血清に対する走化性において移動極性の形成に必要である。(左)MDA-MB-231細胞の血清刺激による移動時のラメリポディア形成において、p63RhoGEFの発現抑制は一方へのラメリポディア形成を阻害し多方向にラメリポディアを突出する異常が生じる。矢印はラメリポディアを示す。スケールバーは20 μmを示す。(右)MDA-MB-231細胞のトランスウェルにおける移動実験において、血清刺激無し(Control)、下層に血清を添加(Chemotaxis)、上下層に血清を添加(Chemokinesis)した場合に、p63RhoGEFの発現抑制は、血清の濃度勾配が生じるChemotaxisの場合にのみ細胞の移動を阻害した。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 21 件)

- ① Saito, A., Miyajima, K., Akatsuka, J., Kondo, H., Mashiko, T., Kiuchi, T., Ohashi, K.,

- Mizuno, K.: CaMKII $\beta$ -mediated LIM-kinase activation plays a crucial role in BDNF-induced neuritogenesis. **Genes Cells**, in press., 2013., DOI: 10.1111/gtc.12054 (査読有)
- ② Hayashi, A., Hiataro, R., Tsuji, T., Ohashi, K., Mizuno, K.: p63RhoGEF-mediated formation of a single polarized lamellipodium is required for chemotactic migration in breast carcinoma cells. **FEBS Lett.** 587: 698-705, 2013., DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.043 (査読有)
- ③ Ikeda, M., Chiba, S., Ohashi, K., Mizuno, K.: Furry Protein Promotes Aurora A-mediated Polo-like Kinase 1 Activation. **J. Biol. Chem.** 287: 27670-27681, 2012., DOI: 10.1074/jbc.M112.378968 (査読有)
- ④ Ohashi, K., Kiuchi, T., Shoji, K., Sampei, K., Mizuno, K.: Visualization of cofilin-actin and Ras-Raf interactions by bimolecular fluorescence complementation assays using a new pair of split Venus fragments. **Biotechniques** 52: 45-50, 2012., DOI: 10.2144/000113777 (査読有)
- ⑤ Anno, T., Sakamoto, N., Sato, M.: Role of Nesprin-1 in Nuclear Deformation in Endothelial Cells under Static and Uniaxial Stretching Conditions. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 424: 94-99, 2012., DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.073. (査読有)
- ⑥ Huang, W., Sakamoto, N., Miyazawa, M.R., Sato, M.: Role of paxillin in the early phase of orientation of the vascular endothelial cells exposed to cyclic stretching. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 418: 708-713, 2012., DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.01.083. (査読有)
- ⑦ 大橋一正, 辻 拓史、水野健作: Wnt の細胞内平面極性シグナルによる Rho ファミリーの活性化とアクチン細胞骨格制御機構: **生体の科学**, 63 巻 3 号 177-182, 2012. (査読無)
- ⑧ Ohashi, K., Fujiwara, S., Watanabe, T., Kondo, H., Kiuchi, T., Sato, M., Mizuno, K.: LIM-kinase has a dual role in regulating lamellipodium extension by decelerating the rate of actin retrograde flow and the rate of actin polymerization. **J. Biol. Chem.** 286: 36340-36351, 2011., DOI: 10.1074/jbc.M111.259135 (査読有)
- ⑨ Kiuchi, T., Nagai, T., Ohashi, K., Mizuno, K.: Measurements of spatiotemporal changes in G-actin concentration reveal its effect on stimulus-induced actin assembly and lamellipodium extension. **J. Cell Biol.** 193: 365-380, 2011., DOI: 10.1083/jcb.201101035. (査読有)
- ⑩ Sakamoto, N., Kiuchi, T., Sato, M.: Development of an Endothelial-Smooth Muscle Cell Coculture Model Using Phenotype-Controlled Smooth Muscle Cells. **Ann. Biomed. Eng.** 39: 2750-2758, 2011., DOI: 10.1007/s10439-011-0372-8. (査読有)
- ⑪ Oya, K., Sakamoto, N., Ohashi, T., Sato, M.: Combined stimulation with cyclic stretching and hypoxia increases production of matrix metalloproteinase-9 and cytokines by macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 412: 678-682, 2011., DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.08.024. (査読有)
- ⑫ Tsuji, T., Ohta, Y., Kanno, Y., Hirose, K., Ohashi, K., Mizuno, K.: Involvement of p114-RhoGEF and Lfc in Wnt-3a- and Dishevelled-induced RhoA activation and neurite retraction in N1E-115 mouse neuroblastoma cells. **Mol. Biol. Cell** 21: 3590-3600, 2010., DOI: 10.1091/mbc.E10-02-0095. (査読有)
- ⑬ Mishima, T., Naotsuka, M., Horita, Y., Sato, M., Ohashi, K., Mizuno, K.: LIM-kinase is critical for the mesenchymal-to-amoeboid cell morphological transition in 3D matrices. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 392: 577-581, 2010., DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.01.075. (査読有)
- [学会発表] (計 30 件)
- ① Ohashi, K., Abiko H., Kondo H., Fujiwara S., Mashiko K., Sakamoto, N., Sato M., Mizuno K.: Identification of Rho-GEFs involved in mechano-biological responses of vascular endothelial cells., International Symposium on Biomedical Engineering Interface, 仙台、2013. 3. 14-15
- ② 高橋将太、大橋一正、北谷佳那恵、直塚萌、佐藤圭一、阿部彰子、萱場敦子、梶紀子、水野健作: Db1ファミリーRho-GEFである

- CDEPは乳腺上皮細胞の細胞外マトリックスの硬さ依存的な形質転換に関与する、第85回日本生化学会大会、福岡、2012.12.14-16
- ③ Kondo, H., Ohashi, K., Abiko, H., Hiatari, R., Sakamoto, N., Sato, M., Mizuno, K.: Identification of Rho-GEFs Involved in Cyclic Stretch-induced Mechanosensing of Vascular Endothelial Cells. 第35回日本分子生物学会、福岡、2012.12.11-14
- ④ Kondo, H., Ohashi, K., Abiko, H., Hiatari, R., Sakamoto, N., Sato, M., Mizuno, K.: Identification of Rho-GEFs involved in mechanosensing of vascular endothelial cells. 第45回日本発生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会、神戸、2012.5.28-31
- ⑤ Kitatani, K., Naotsuka, M., Sato, K., Abe, S., Ohashi, K., Mizuno, K.: Identification of Rho-GEFs involved in ECM rigidity-induced transformation of mammary epithelial cells. 第34回日本分子生物学会、横浜、2011.12.13-12.16
- ⑥ Hiatari, R., Tsuji, T., Hayashi, A., Ohashi, K., Mizuno, K.: Identification of Rho-GEFs involved in breast cancer cell migration. 第34回日本分子生物学会、横浜、2011.12.13-12.16
- ⑦ Hayashi, A., Tsuji, T., Hiatari, R., Ohashi, K., Mizuno, K.: Identification and functional roles of Rho-GEFs that are involved in cell migration. 第84回日本生化学会大会、京都、2011.9.21-24
- ⑧ Ohashi, K., Saito, A., Kondo, H., Miyajima, K., Akatsuka, J., Kiuchi, T., Mizuno, K.: Phosphorylation and activation of LIMK1 by CaMKIIbeta in BDNF-induced dendritogenesis. 第84回日本生化学会大会、京都、2011.9.21-24
- ⑨ 大橋一正、齋藤聡彦、宮島健、赤塚淳一、木内泰、水野健作: Activation of LIMK1 by CaMKIIb is required for BDNF-induced dendritogenesis in rat cortical neurons. 第63回日本細胞生物学会大会、札幌、2011.6.27-6.29
- ⑩ Ohashi, K., Abiko, H., Tsuji, T., Naotsuka, M., Hiatari, R., Sakamoto, N., Sato, M., Mizuno, K.: Identification of Rho-GEFs that are involved in mechanotransduction of vascular endothelial cells. The 6th International Symposium on Biomechanics in Vascular Biology and Cardiovascular Disease, Rotterdam, The Netherlands, 2011.4.14-15
- ⑪ Abiko, H., Tsuji, T., Naotsuka, M., Hiatari, R., Sakamoto, N., Sato, M., Ohashi, K., Mizuno, K.: Identification of Rho-GEFs involved in mechanotransduction of vascular endothelial cell 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会 合同大会、神戸、2010.12.7-12.10
- ⑫ 安彦日和、辻拓史、直塚萌、大橋一正、坂元尚哉、佐藤正明、水野健作: メカノストレス応答に関わるRho-GEFの網羅的探索、日本分子生物学会第10回春季シンポジウム、松島、2010.6.7-6.8
- ⑬ 大橋一正、宮島健、齋藤聡彦、赤塚淳一、水野健作: BDNFによるラット皮質神経細胞の樹状突起形成におけるCaMKキナーゼ依存的LIMキナーゼ活性化の役割、第62回日本細胞生物学会大会、大阪、2010.5.19-21

[その他]

ホームページ等

[http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/ts\\_oohashi/](http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/ts_oohashi/)

[http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno\\_lab/](http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno_lab/)

## 6. 研究組織

### (1) 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・准教授  
研究者番号: 10312539

### (2) 連携研究者

坂元 尚哉 (Sakamoto Naoya)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・准教授  
研究者番号: 20361115