

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月5日現在

機関番号：35309

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011年～2012年

課題番号：23650250

研究課題名（和文） LINC複合体を介した細胞内力学伝達が細胞応答に及ぼす役割の解明

研究課題名（英文） STUDY ON ROLE OF INTRACELLULAR FORCE TRANSMISSION VIA LINC COMPLEX IN CELL RESPONSES

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

細胞核とアクチンフィラメントを結合する Linker of nucleus and cytoskeleton (LINC) 複合体構成タンパク質の一つである Nesprin の細胞核への力学伝達における力学的役割を調べた。その結果、Nesprin を介したアクチンフィラメント-細胞核間の力学伝達は内皮細胞の形態応答に対して必須の働きを持つことが明らかになり、細胞核も力覚機構において重要な役割を持つことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, the author investigated the mechanical role of nesprin, a component of linker of nucleus and cytoskeleton (LINC) in force transmission from actin filaments to the nucleus. Results showed that force transmission between actin filaments and nuclei via nesprin is required for stretch-induced morphological response of endothelial cells, suggesting that nuclei play an important role in mechano-sensing of cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオメカニクス、生物・生体工学、細胞核、細胞骨格、架橋タンパク質、細胞内力学伝達

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の多くは力を感じ（メカノセンシング）、細胞内で生化学的なシグナルへと変換し（メカノトランスダクション）、最終的に形態的・機能的応答を示す。これまでの力学応答メカニズムに関する研究の多くは、力学刺激が直接作用する細胞膜表面に発現するタンパク質分子が力学刺激のセンサおよび変換器としての役割を担うと考えてきた。一方で、細胞表面に作用した力学刺激は細胞内部に存在する細胞骨格により細胞内部の構造物にも伝達される。これまで細胞内構造物として最も大きな細胞核は細胞全体に比べ

約10倍以上硬いと報告されていることから、力学刺激により変形しないと考えられていた。しかし、研究代表者は流れによるせん断応力を作用した血管内皮細胞の変形挙動を解析した結果、細胞核は細胞質と同程度に変形していること初めて報告している。この結果は、細胞内部において細胞核に対しても細胞膜と同様な力学刺激が伝達されて作用していることを示しており、細胞核もメカノセンシングおよびメカノトランスダクションに関与する可能性を示唆させる。近年になり細胞骨格と細胞核は LINC (Linker of Neucleoskeleton and Cytoskeleton) 複合体によ

り結合されていることが解明されつつあり、細胞核に対する力学刺激の伝達に関して注目を集めてきており、力学伝達の重要性を示唆する総説も主要な国際誌に掲載されるようになってきている。しかし、LINC 複合体を介して細胞核へ伝達された力学刺激が細胞の力学応答に果たす役割についてその詳細は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

感覚器細胞のみに限らず多くの非感覚器細胞も周囲の力学的な刺激や環境に対して形態的または機能的に応答することが知られている。力学刺激は細胞骨格さらに細胞骨格-核骨格架橋タンパク質である LINC 複合体を介して細胞核に伝達されている。LINC 複合体のうち、細胞骨格に直接結合する Nesprin には Nesprin-1 から-4 の 4 種類が存在し、特に Nesprin-1/2 は細胞骨格のうちアクチンフィラメントに結合することが報告されている。アクチンフィラメントは細胞形態の維持・変化に重要な役割を担い、LINC 複合体を介して細胞外からの力学刺激を細胞核に直接伝達すると考えられている。そのため細胞核自身または LINC 複合体も力学刺激を直接感知し応答している可能性が考えられるが、細胞の力学応答への細胞核の関与は不明である。本研究では LINC 複合体を介した力学刺激の伝達が力の感知および細胞応答に果たす役割を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト臍帯静脈内皮細胞 (継代 4-7 代目) を実験に用いた。細胞培養液には抗生物質、10ng/ml ヒト塩基性繊維芽細胞増殖因子、ウシ胎児血清を含む Medium 199 用いた。アクチンフィラメントと結合する Nesprin-1 もしくは Nesprin-2 に対する siRNA を導入することにより、Nesprin の発現を特異的に抑制した。Nesprin-1 および-2 の発現の抑制、また LINC 複合体構成タンパク質発現を免疫蛍光染色法により確認した。また、Nesprin 発現量変化をウエスタンブロッティング法を用いて確認した。

(2) ファイブロネクチンコーティングを予め施したストレッチチャンバに Nesprin 発現抑制した細胞を播種し、繰り返し伸展刺激負荷装置を用いて伸展率 10%、周波数 0.5Hz で伸展刺激を 18 時間負荷した。その後、アクチンフィラメントを Alexa Fluor 546 phalloidin、細胞核を DAPI、また細胞輪郭を可視化するため細胞間接着タンパク質である VE-cadherin を蛍光染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞の蛍光画像を取得した。得られた画像から画像解析ソフト ImageJ を用いて細胞の輪郭を手動的にトレ

ースし、伸展刺激負荷方向を 0°として 90°までの範囲で細胞の配向角を算出した。60°から 90°の配向角を示した細胞を配向した細胞と定義した。

(3) 細胞核への力学伝達指標として伸展刺激負荷に伴う細胞核変形を評価した。ストレッチチャンバ内で培養した生細胞内の細胞核を Hoechst33342 で蛍光標識した後、共焦点レーザー顕微鏡ステージに設置した伸展刺激負荷装置を用いてストレッチチャンバに 20%の伸展を負荷した。負荷前後で取得した細胞核中心付近の横断面画像から細胞核の高さおよび水平方向の幅を測定した。伸展刺激負荷前後の値から細胞核のひずみを算出した。Nesprin-1 に対する siRNA で処理した細胞に加え、細胞全体のアクチンフィラメント構造が細胞核変形に及ぼす影響を評価するため、アクチン重合阻害剤である CytochalasinD で予め処理した細胞も用いた実験も行った。

(4) アクチンフィラメントから細胞核への力学伝達特性を評価するため、さらに原子間力顕微鏡を用いてアクチンフィラメントと細胞核の結合力評価を行った。低張液で処理することにより Nesprin 発現抑制した細胞から細胞核を単離した。アクチンフィラメントと特異的に結合する phalloidin で修飾したカンチレバーを、単離した細胞核に対して押しつけ、細胞核表面のアクチンフィラメントとカンチレバー先端を結合させた。その後、カンチレバーをゆっくりと引き離し、カンチレバー先端と細胞核間距離とカンチレバーに負荷された力の関係を表すフォースカーブを得た。フォースカーブから得られる力の最大値をアクチンフィラメントと細胞核の結合力とした。

## 4. 研究成果

(1) 静置培養状態において、siRNA で処理した細胞と無処理の細胞 (Wild type, WT 細胞) との間で形態に差は見られなかった。免疫蛍光染色の結果、WT 細胞では Nesprin-1 および-2 とともに細胞核周囲に局在する様子が見られた。siRNA 処理で処理した細胞では細胞核周囲の Nesprin 局在が減少する様子が見られた。ウエスタンブロッティングの結果においても siRNA 処理による Nesprin 発現量の減少が確認された。

Nesprin 発現抑制が他の LINC 複合体構成タンパク質である Lamin A/C および Sun1/2 の発現に与える影響を免疫蛍光染色法により調べた。その結果、WT 細胞だけでなく、Nesprin を発現抑制した細胞においても Lamin A/C および Sun1/2 が細胞核周囲に局在する様子を確認され、siRNA 処理が他の LINC 複合体構

成タンパク質発現に影響を与えないことが確認された。

細胞核周囲でのアクチンフィラメント発現を詳細に観察した結果、細胞の頂面部と底面部ではWT細胞およびsiRNA処理細胞との間でアクチンフィラメントの分布に変化は見られなかった。一方、細胞の中央部において、WT細胞では細胞核周囲へのアクチンフィラメントの局在が見られたが、Nesprinの発現を抑制した細胞では細胞核周囲に局在するアクチンフィラメントが減少した。

(2) 伸展刺激負荷後、WT細胞は伸展方向に対して垂直方向への配向を示し、細胞内においても垂直方向へ太いアクチンフィラメント構造の形成が見られた(図1)。一方、Nesprin-1またはNesprin-2の発現を抑制した細胞では伸展刺激負荷前に比べ細胞形態およびアクチンフィラメント構造に変化は見られなかった。配向角を調べた結果、60%以上のWT細胞が伸展刺激に対して配向性を示したが、Nesprin発現抑制細胞では伸展刺激負荷による配向角変化が見られなかった。この結果はNesprinを介したアクチンフィラメントから細胞核への力学伝達が内皮細胞の形態応答に必要であることを示唆する。

(3) 伸展に伴いすべての条件で細胞質が伸展方向に変形する様子が観察された。WT細胞およびNesprin-1発現抑制の細胞では伸展に伴う細胞核の変形が見られたが、Cytochalasin Dで処理した細胞では細胞核に顕著な変形は見られなかった。さらに、Cytochalasin Dで処理した細胞では伸展していない状態において細胞核の断面像が円形に近くなる様子が見られた。変形量を比較した結果、WT細胞に比べNesprin-1発現抑制細胞では細胞核の変形量が大きくなった。一方、Cytochalasin Dで処理した細胞では細胞核の変形量が他の条件に比べて小さく変化が見られなかった。

静置培養状態においてNesprin-1の発現を抑制した細胞とCytochalasin Dで処理した細胞では、WT細胞と比較して水平方向長さが減少した。また、Cytochalasin Dで処理した細胞ではNesprin-1発現を抑制した細胞よりも細胞核の水平方向長さの減少が大きかった。Cytochalasin Dで処理した細胞ではWT細胞よりも高さが増加したが、Nesprin-1発現を抑制した細胞ではWT細胞と比較して高さの変化に有意差はなかった。

伸展刺激負荷時の細胞核の水平方向のひずみに関して、WT細胞に比べNesprin-1発現を抑制した細胞では増加し、Cytochalasin Dで処理した細胞ではひずみが減少した。一方、垂直方向のひずみに関してはどの条件でも平均値が負の値となり、細胞核に垂直方向の

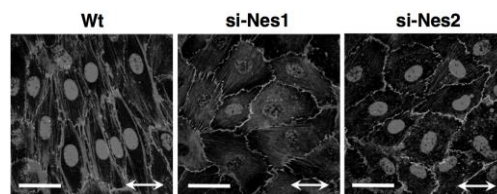


図1 繰り返し伸展刺激を負荷した内皮細胞の蛍光画像(Wt, WT細胞; si-Nes1, Nesprin-1発現抑制細胞; si-Nes2, Nesprin-2発現抑制細胞. バーは30 $\mu$ m, 矢印は伸展方向を示す.)

圧縮変形が生じる傾向が得られた。

この結果はNesprin-1発現抑制により細胞核に結合するアクチンフィラメントの張力から細胞核が解放され伸展前に細胞核の変形余裕が増加し、伸展時にアクチン皮層により細胞核が圧縮されたことを示唆している。

(4) 単離細胞核に対してNesprin-1/2およびアクチンフィラメントの蛍光染色を行い、細胞核構造およびアクチンフィラメントの細胞核への結合を確認した。WT細胞から単離した細胞核では、Nesprin-1/2が単離細胞核の周囲に局在する様子が確認された。アクチンフィラメントも同様に細胞核の周囲に局在する様子が見られ、アクチンフィラメントが結合した状態で細胞核が単離されていることを確認した。Nesprin発現を抑制した単離細胞核では、抑制されたNesprinの細胞核周囲での蛍光輝度が減少する傾向が観察された。発現抑制しない一方のNesprinにおいては蛍光の輝度に変化はなかった。Nesprin-1および-2を同時抑制した細胞核では両方のNesprinの蛍光輝度減少がみられた。Nesprin発現抑制によりアクチンフィラメントの蛍光輝度減少も見られた。

WT細胞から単離した細胞核において得られたフォースカーブの最大値は400pN程度であった。Nesprinの発現抑制した細胞核から得られたフォースカーブは、WT細胞のフォースカーブと比べ結合力が減少する傾向が得られた。Nesprin-1またはNesprin-2を発現抑制した細胞核において得られた結合力の平均値はそれぞれ222, 190pNであり、2つの値に有意な違いは見られなかった。Nesprin-1およびNesprin-2両方の発現を抑制した細胞では結合力は108pN程度であった。これらの結果は、Nesprin発現抑制により細胞核-アクチンフィラメントをつなぐ結合数が減少したことによると考えられ、また細胞核表面のアクチンフィラメントがNesprin-1/2との結合を介し細胞核に力学伝達を生じることを示唆する。

## 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 1 件)

- (1) T. Anno, N. Sakamoto, M. Sato, Role of Nesprin-1 in Nuclear Deformation in Endothelial Cells under Static and Uniaxial Stretching Conditions, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 424 (1), 94-99, 2012, 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.073

[学会発表] (計 5 件)

- ① N. Sakamoto, T. Anno, S. Chubachi, S. Deguchi, M. Sato, Role of Nucleus-Actin Filament Binding in Endothelial Cell Responses to Cyclic Stretching, International Symposium on Bio Medical Engineering Interface, 2013 年 3 月 15 日, 仙台
- ② 坂元尚哉, 阿武俊郎, 中鉢辰也, 出口真次, 佐藤正明, 内皮細胞における細胞核とアクチンフィラメント結合の生体力学的検討, 日本生体医工学会専門別研究会バイオメカニクス研究会 146 回研究会, 2013 年 1 月 25 日, 徳島
- ③ 中鉢辰也, 阿武俊郎, 坂元尚哉, 出口真次, 佐藤正明, 原子間力顕微鏡を用いた細胞核-アクチンフィラメント結合の評価, 日本機械学会第 25 回バイオエンジニアリング講演会, 2013 年 1 月 10 日, つくば
- ④ 中鉢辰也, 阿武俊郎, 坂元尚哉, 出口真次, 佐藤正明, 細胞核-細胞骨格結合が内皮細胞の力学応答に果たす役割, 第 46 回日本生体医工学会東北支部大会, 2012 年 11 月 17 日, 仙台
- ⑤ N. Sakamoto, T. Anno, M. Sato, Mechanical Role of Nesprin-1 in Nuclear Shape in Vascular Endothelial Cells Subjected to Stretching, Biomedical Engineering Society 2012 Annual Meeting, 2012 年 10 月 26 日, Atlanta (USA)

[その他]

研究室ホームページ  
(<https://sites.google.com/site/sakamotonlab/>)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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