

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440076

研究課題名(和文)メカノセンシングによる血管内皮および上皮細胞のアクチン骨格制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the regulation of actin cytoskeleton remodeling through mechanotransduction in endothelial cells and epithelial cells

研究代表者

大橋 一正 (Ohashi, Kazumasa)

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：10312539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、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、機械的刺激に対する応答(メカノストレス応答)に關与する低分子量G蛋白質Rhoファミリーの活性化因子Rho-GEFの網羅的探索を行い、11種類の分子を同定することに成功した。その中の一つであるSoloは、カドヘリン依存的な細胞間接着からの機械的刺激を仲介して繰り返し伸展刺激による応答に寄与すること、上皮細胞においては、基質との接着部位に負荷された張力によるストレスファイバー形成、RhoAの活性化に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found 11 Rho-GEFs, which are upstream activator of Rho family small GTPases, involved in cyclic stretch-induced cell orientation in vascular endothelial cells. We focused on Solo, which is one of those Rho-GEFs, and found that Solo is required to orient the cells in response to the force derived from cadherin-based cell-cell adhesion. We also showed that Solo is required to activate RhoA and the formation of stress fibers by tensile-force application in epithelial cells.

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 血管内皮細胞 上皮細胞 Rho

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ตอบสนองして形態や運動性を変化させている。アクチン細胞骨格は、細胞の形態と運動を司る最も重要な細胞骨格であり、刺激にตอบสนองするあらゆるシグナル伝達経路と関連してその再構築が制御されている。そのような多様な応答において、アクチン骨格の再構築を時空間的に適切に制御するための多様な結合タンパク質とシグナル伝達分子が存在している。これまで、様々な可溶性の分子や接着分子が細胞膜に存在する受容体や接着分子と結合することによって入力される刺激をモデルにアクチン骨格の再構築制御の研究が行われてきた。しかし、細胞は、様々な機械的な刺激(メカノストレス)にも常にさらされており、これらのメカノストレスに対する応答も細胞の様々な生理的な機能の発現、形態の制御、細胞集団の秩序化、組織の形態形成などに重要であることが明らかとなってきた。アクチン骨格の再構築においても、メカノストレスによって制御されることが明らかとなっているが、その分子機構はほとんど明らかとなっていない。低分子量G蛋白質Rhoファミリーは、アクチン骨格の再構築を司る鍵となるシグナル分子あり、メカノストレス応答にも関与することが明らかとなっている。これに対して、Rhoファミリーの活性化因子であるGDP-GTP交換因子(Rho-GEF)は、非常に多様化した分子群であり、メカノストレスからRhoファミリー分子を時空間的に制御することが考えられるが、これまでにLarg, GEF-H1の2種類の分子が関与することが報告されているのみであった。これらの背景から、さらにメカノストレス応答に関与するRho-GEFを同定することにより、上流のメカノシグナル経路の解明とメカノセンサー分子の実態の解明ができるのではないかと考えた。さらに、これらの研究は、血管内皮細胞のメカノストレスに対する生理的応答の分子メカニズムの解明とともに、上皮組織の形態形成におけるメカノストレス応答の基本的な役割の解明に発展することが期待された。

2. 研究の目的

本研究は、機械的刺激による血管内皮細胞、上皮細胞のアクチン骨格再構築のシグナル伝達機構の解明とメカノセンサーの分子実

態の解明を行い、血管の恒常性維持、上皮管腔構造の形態形成におけるメカノセンシングの意義を明らかにすることを目的とする。血管内皮細胞に対する繰り返し伸展刺激による細胞の形態変化、配向、アクチン骨格の再構築を指標に、Rhoファミリーの活性化因子Rho-GEFであるDbIファミリー63種類の中から関与するものを同定しその機能を解明する。既に、血管内皮細胞の繰り返し伸展刺激による細胞の配向に必要なRho-GEFを複数種類同定し解析を進めている。これらをもとに上流と下流のシグナル経路の探索を行う。得られたRho-GEFを活性化する入力経路を明らかにし、また、下流の標的となるRhoファミリー分子の同定とアクチン骨格の再構築パターンの解析を行いその機能を明らかにする。また、血管内皮細胞だけでなく、上皮細胞に対するメカノストレス応答においても同定したRho-GEFの機能解析を行う。これらの解析を通して、秩序だった細胞集団(細胞シートや管腔)における力の受容から応答に至るメカノセンシングの分子基盤とその役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 繰り返し伸展刺激による細胞の配向に関与するRho-GEFの探索

ヒトDbIファミリーの63種類のcDNA配列に対して2種類のshRNA発現プラスミドを作製した。これらのshRNA発現プラスミドを導入したヒト血管内皮細胞をシリコンチャンバーに播種し、20%の伸展率で1 Hz、1時間の繰り返し伸展刺激を与え、その後細胞を固定し、細胞の形態から細胞の配向とアクチンストレスファイバーの方向を計測した。伸展方向に対する垂直方向の両側20度の角度以内に配向する細胞、ストレスファイバーの割合を計測し、2種類のshRNAを導入した細胞の割合の平均が50%以下のものについてその阻害効果があるものとした(文献2)。

(2) 繰り返し伸展刺激による細胞間接着依存的な細胞配向の解析

血管内皮細胞を低密度でシリコンチャンバーに播種し、繰り返し伸展刺激を行い、細胞間接着を形成していない細胞を対象として細胞の配向角度を測定した。また、血管内皮細胞がシート状になる密度でシリコンチャンバーに播種し、EGTAを添加して培地中のカルシウムイオンをキレートしてカドヘ

リン依存的な細胞間接着を阻害した条件、または、siRNAによってVE-カドヘリンの発現を抑制して細胞間接着を阻害した条件において繰り返し伸展刺激を行い、細胞の配向角度を測定した。これらの条件において、siRNAによりSoloの発現抑制を行い、繰り返し伸展刺激による細胞の配向への影響を解析した。

(3) 繰り返し伸展刺激、張力の負荷によるRhoAの活性化の検出

血管内皮細胞をシリコンチャンパーに播種し、繰り返し伸展刺激を行い、繰り返し伸展刺激を1分間与え、直後に細胞を溶解し、RhotekinのRhoA結合ドメインとGSTの融合蛋白質により活性型RhoAを沈降させ、沈降した活性型RhoAをWestern blotにより検出しその量を測定した。また、MDCK細胞に対してE-カドヘリンを固相化した磁気ビーズを接着させ、永久磁石を培養ディッシュの上に乗せて磁気ビーズを上方向に3分間、又は10分間引っ張り、張力の刺激を負荷した。直後に細胞を溶解し、上記と同様の方法で活性型RhoAの量を測定した。

(4) 細胞への張力負荷によるストレスファイバー形成の可視化

アクチン線維に結合する配列を付加したYFP(YFP-Li feact)を恒常的に発現するMDCK細胞を樹立した。シリコン薄膜を付着させ、表面をファイブロンコートしたガラスボトムディッシュをこの細胞を播種した。このディッシュを37度に保温した共焦点顕微鏡のステージにのせ、エッペンドルフ社製のマイクロマニピュレーターとマイクロインジェクション用のガラスニードルを用いて、細胞の近傍のシリコン膜を引き延ばし、細胞を引き延ばした。この過程におけるアクチン骨格の変化を5秒毎のタイムラプス観察により観察し、ストレスファイバーの変化を定量した。

4. 研究成果

(1) 繰り返し伸展刺激による細胞の配向に関するRho-GEF、Soloの同定と局在解析

繰り返し伸展刺激による血管内皮細胞の伸展方向に対する垂直方向への配向をモデルに、このメカノストレス応答に関するRho-GEFとして11種類のDblファミリー分子を同定することに成功した。この中で、ゼブラフィッシュのオルソログが原腸陥入に関与することが報告されているSoloに注目し

て研究を進めた。ヒトSoloのcDNAをクローニングし、YFPを付加して血管内皮細胞に発現させその局在を解析した。その結果、Soloは細胞の基底面と細胞間接着部位の一部に集積する特徴的な局在を示すことが明らかとなった(図1)。そのSoloの集積する基底面と細胞間接着部位ではアクチン線維が集積し、収縮力が働く部位であることが予想された。また、GEF活性を失うことが予想されるSoloの変異体(L1217E)を発現させた結果、Soloの集積する局在とアクチン線維の集積は、SoloのGEF活性に依存していることが明らかとなった(図1)。

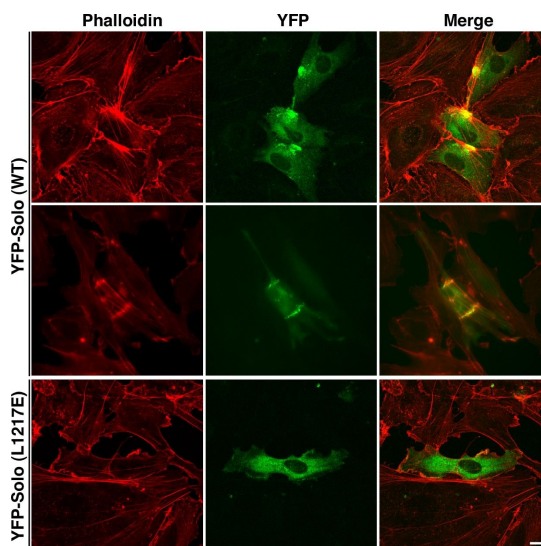


図1. 血管内皮細胞に発現させたYFP-Soloの局在とアクチン骨格への影響。血管内皮細胞に野生型YFP-SoloとLeu-1217をGluに変異させた不活性型変異体(L1217E)を発現させた細胞を固定し、アクチン骨格をRhodamine-Phalloidinによって染色した。Scale bar: 10 μ m. 文献2より改変。

(2) 細胞間接着依存的な細胞配向におけるSoloの機能解析

Soloは、細胞基底面と細胞間接着部位の張力や収縮力が働く部位に集積することが予測されたため、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においてこれらの張力に依存したシグナルの下流で細胞の配向に寄与していると考えられた。そこで、細胞-基質間接着と細胞間接着のどちらからのシグナルに依存して血管内皮細胞の配向に寄与しているかを検討した。Soloを発現抑制した血管内皮細胞の密度を変えて、細胞間接着がない状態と細胞が細胞間接着を形成してシート状になった状態で繰り返し伸展刺激を行い細胞の配向への影響を観察した。その結果、細胞の配向には細胞間接着が大きく

く寄与していることが明らかとなり、Soloの発現抑制は細胞間接着が無い細胞の配向には影響しないことが明らかとなった(図2)。また、シート状の血管内皮細胞においてVE-カドヘリンの発現抑制をした場合、また、培地中のカルシウムイオンをキレートして細胞間接着を阻害した場合、繰り返し伸展刺激による配向が部分的に抑制され、Soloの発現抑制の効果が見られなくなることが明らかとなった。これらの結果から、Soloは、繰り返し伸展刺激による血管内皮細胞の配向においてカドヘリンに依存した細胞間接着からのメカノストレスに依存して働くことが明らかとなった。

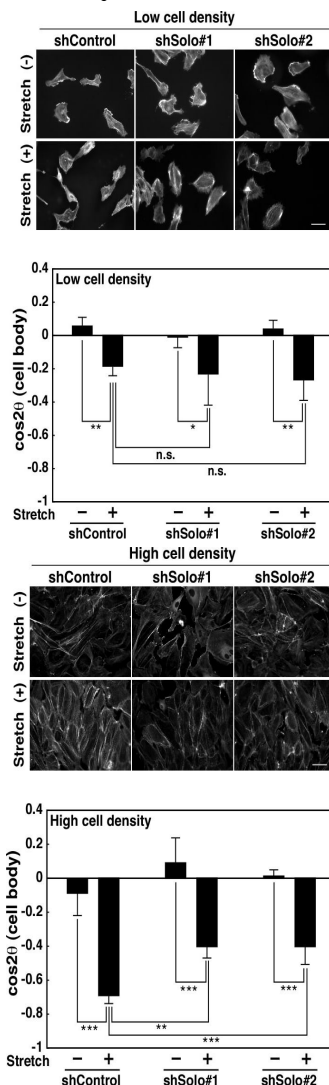


図2. 血管内皮細胞の繰り返し伸展刺激による配向の細胞間接着の寄与とSolo発現抑制の効果。(上)コントロールshRNA又はSoloのshRNA 2種を導入した血管内皮細胞を低密度培養し、繰り返し伸展刺激を行い細胞間接着を形成していない細胞を選択してその配向角度を測定した。(下)同条件の細胞を細胞がシート状になる密度の条件下で繰り返し伸展刺激を行い、細胞の配向角度を測定した。Scale bar: 50 μ m. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001, n.s., not significant.文献2より改変。

(3) 繰り返し伸展刺激によるRhoAの活性化におけるSoloの機能解析

Soloは、RhoAとRhoCのGEFであることがこれまでに報告されている。繰り返し伸展刺激においてもSoloはRhoAの活性化を介して細胞の配向に寄与することが考えられるため、繰り返し伸展刺激によるRhoAの活性化に対するSoloの働きを発現抑制によって検討した。その結果、繰り返し伸展刺激によるRhoAの活性化は、Soloの発現抑制によって減弱することが明らかとなった(図3)。

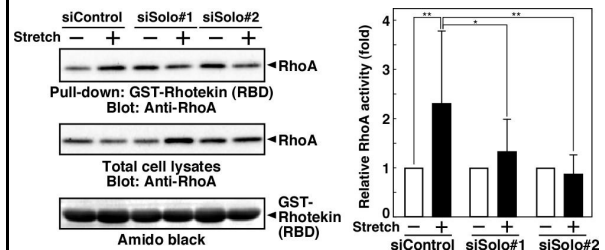


図3. コントロールsiRNA又はSoloのsiRNA 2種を導入した血管内皮細胞に対して繰り返し伸展刺激を1分間加え、細胞を溶解して活性型RhoAをGST-Rhotekin-RBDによって沈降させた。抗RhoA抗体により、総RhoA量と活性型RhoA量を定量した。*P<0.05; **P<0.01,文献2より改変。

(4) 張力の負荷によるRhoAの活性化におけるSoloの機能解析

Soloは、血管内皮細胞だけでなく、広い組織に発現していることが明らかとなっている。上皮細胞においてもメカノストレスによるRhoAの活性化やその下流で引き起こされるアクチン骨格の再構築に与ることが考えられることから、イヌ腎上皮由来のMDCK細胞におけるSoloの機能解析を行った。Soloは、張力の負荷によって活性化されることが予測されたため、MDCK細胞にE-カドヘリンを付着させた磁気ビーズを付着させ、永久磁石によってビーズに張力を与えた際のRhoAの活性化に対するSoloの機能を発現抑制によって解析した。その結果、張力の負荷によるRhoAの活性化をSoloが必要であることが明らかとなった(図4)。

(5) 張力の負荷によるストレスファイバー形成におけるSoloの機能解析

Soloは、細胞間接着部位だけでなく細胞の基底部位に集積することから、細胞-基質間接着部位からのメカノシグナルにおいても機能することが考えられた。その機能を解析するために、YFP-Lifeactを恒常的に発現させたMDCK細胞をガラスボトムディッシュ上に形成させたシリコンゴムの薄膜上に

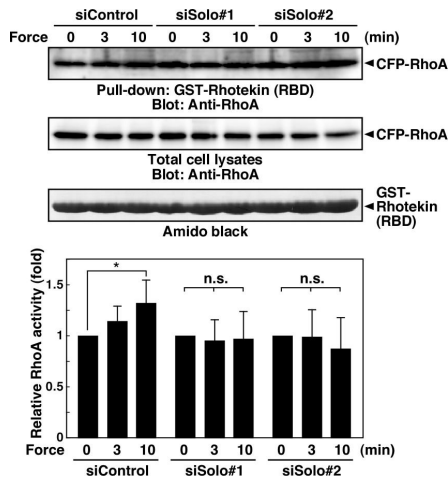


図4. 張力の負荷によるRhoAの活性化に対するSoloの発現抑制の効果。コントロールsiRNA、又はSoloのsiRNA 2種を導入したMDCK細胞にE-カドヘリンをコートしたビーズを附着させ、永久磁石によって張力を3分間、又は10分間負荷した。図3と同様に活性化したRhoAの量を定量した。 $*P<0.05$; n.s., not significant. 文献2より改変。

播種し、シリコンゴムを引き延ばすことで細胞を引き延ばし、細胞内のアクチン骨格の変化をリアルタイムで観察する方法を開発した。この方法で細胞を引き延ばす張力を負荷すると張力の方向と平行な方向のアクチンストレスファイバーが増強されることが観察された。この張力に対するストレスファイバーの増強はSoloの発現抑制によって有意に減弱することが明らかとなった(図5)。これらの結果から、Soloは、張力に依存してRhoAを活性化してストレスファイバー形成に寄与することが明らかとなった。

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11件)

Fujiwara, S., Ohashi, K., T. Mashiko, 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)

Abiko, H., Fujiwara, S., Ohashi, K., Hiataru, R., Mashiko, T., Sakamoto, N., Sato, M., and Mizuno, K., Rho-guanine nucleotide exchange factors involved in cyclic-stretch induced reorientation of vascular endothelial cells., **J. Cell Sci.**, 128, 1683-1695, 2015, DOI: 10.1242/jcs.157503 (査読有)

Ohashi, K., Roles of cofilin in development and its mechanisms of regulation., **Develop. Growth Differ.**, 57, 275-290, 2015, DOI: 10.1111/dgd.12213 (査読有)

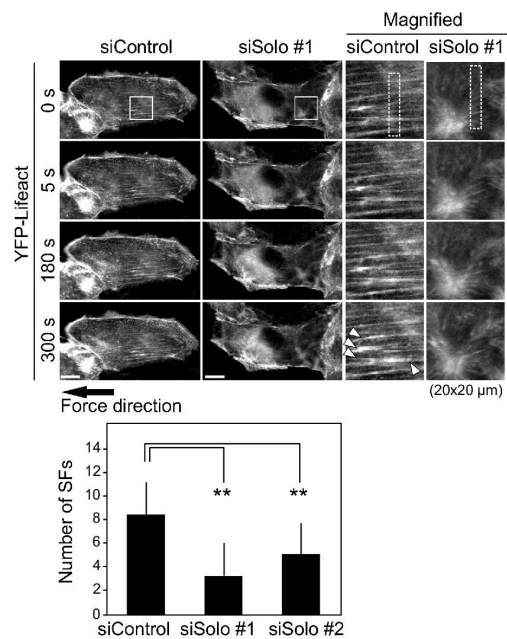


図5. 張力の負荷によるストレスファイバーの増強とSoloの発現抑制の効果。(上)コントロールsiRNA又はSoloのsiRNAを導入したYFP-Lifect発現MDCK細胞をシリコン膜上に播種し、細胞に張力を負荷して細胞内のアクチン骨格の変化を5分間経時観察した。Scale bar: 20 μ m. (下) 張力負荷後の5分間で1細胞あたりの増強されるストレスファイバーの数を測定した。 $**P<0.01$. 文献1より改変。

Growth Differ., 57, 275-290, 2015, DOI: 10.1111/dgd.12213 (査読有)

Fujiwara, S., Ohashi, K., T. Mashiko, 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)

Abiko, H., Fujiwara, S., Ohashi, K., Hiataru, R., Mashiko, T., Sakamoto, N., Sato, M., and Mizuno, K., Rho-guanine nucleotide exchange factors involved in cyclic-stretch induced reorientation of vascular endothelial cells., **J. Cell Sci.**, 128, 1683-1695, 2015, DOI: 10.1242/jcs.157503 (査読有)

Ohashi, K., Roles of cofilin in development and its mechanisms of regulation., **Develop. Growth Differ.**, 57, 275-290, 2015, DOI: 10.1111/dgd.12213 (査読有)

Homma, Y., Kanno, S., Sasaki, K., Nishita, M., Yasui, A., Asano, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Insulin receptor substrate-4 binds to Slingshot-1 phosphatase and promotes cofilin dephosphorylation., **J Biol Chem.**, 289, 26302-26313, 2014, DOI:

10.1074/jbc.M114.565945 (査読有)

Ohashi, K., Damnacanthal, an effective inhibitor of LIM-kinase, inhibits cell migration and invasion., **Mol. Biol. Cell**, 25, 828-840, 2014, DOI:

10.1091/mbc.E13-09-0540 (査読有)

Ohashi, K., Mizuno, K., A novel pair of split venus fragments to detect protein-protein interactions by in vitro and in vivo bimolecular fluorescence complementation assays., **Methods in Mol. Biol.**, 1174, 247-262, 2014, DOI: 10.1007/978-1-4939-0944-5_17

Saito, A., Miyajima, K., Akatsuka, J., Kondo, H., Mashiko, T., Kiuchi, T., Ohashi, K., and Mizuno, K., CaMKII γ -mediated LIM-kinase activation plays a crucial role in BDNF-induced neurite outgrowth., **Genes Cells**, 18, 533-543, 2013, DOI: 10.1111/gtc.12054 (査読有)

Hayashi, A., Hiataru, R., Tsuji, T., Ohashi, K., and Mizuno, K. : p63RhoGEF-mediated formation of a single polarized lamellipodium is required for chemotactic migration of breast carcinoma cells., **FEBS Lett.**, 587, 698-705, 2013, DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.043 (査読有)

[学会発表](計9件)

藤原 佐知子、安彦 日和、大橋一正、増子寿弥、近藤 洋志、佐藤 正明、水野 健作、Rho-GEF Soloによる細胞骨格の制御と力覚応答における機能、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学大会、2015.12.1-4、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

大橋一正、The role of Solo, a Rho-GEF involved in mechanotransduction, in the dynamical ordering of epithelial cell populations、The Second International Meeting for Epithelial Tubulology、2015.8.22-23、北海道大学医学部 学友会館フラテホール(北海道・札幌市)

大橋一正、藤原佐知子、増子寿弥、安彦日和、佐藤正明、水野健作、RhoA/RhoC特異的GEFであるSoloの力覚応答における役割、第67回日本細胞生物学会、2015.6.30-7.2、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

Mashiko, T., Fujiwara, S., Kondo, H., Abiko, H., Sato, M., Ohashi, K., Mizuno, K., Identification and functional analysis of Rho-GEFs involved in cyclic stretch-induced cell orientation of vascular endothelial cells, 第37回日本分子生物学会、2014.11.25-27、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

高橋克宣、菅野新一郎、大橋一正、水野健作、ゲルゾリンはアクチンオリゴマーによるスリングショットの活性化を介してコフィリンの脱リン酸化を亢進する、第87回日本生化学大会、2014.10.15-18、国立京都国際会館(京都府・京都市)

梶紀子、萱場敦子、高橋将太、大橋一正、水野健作、Farp1はインテグリンを介した細胞接着に関与する、第66回日本細胞生物学会、2014.6.11-13、奈良県新公会堂(奈良県・奈良市)

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、細胞外基質の硬さ依存的な乳腺上皮細胞の形質転換におけるFarp1の機能、第36回日本分子生物学会、2013.12.3-6、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

藤原佐知子、増子寿弥、近藤洋志、安彦日和、佐藤正明、大橋一正、水野健作、細胞の力覚応答に関わるRho-GEFとして同定したSoloの機能解析、第36回日本分子生物学会、2013.12.3-6、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

Ohashi, K., Hayashi, A., Hiataru, R., Tsuji, T., and Mizuno, K., p63RhoGEF is required for chemotactic migration of breast carcinoma cells by forming a single polarized lamellipodium., 第65回日本細胞生物学会大会、2013.6.19-21、ウインク愛知(愛知県・名古屋市)

[その他]

ホームページ等

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

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