

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06932

研究課題名(和文) 蛍光タンパク質ノックインによる上皮メカノセンサーの分子数計測

研究課題名(英文) Determination of protein composition of the epithelial mechanosensing complex by CRISPR/Cas9-mediated fluorescent protein knock-in

研究代表者

栗栖 修作 (KURISU, Shusaku)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：40525531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞には外部から加えられた力を感知し応答する(メカノセンシング)能力が備わっている。これにより上皮組織は形や強度などを柔軟に変え、外部刺激から我々のからだを守っている。メカノセンシングを担う分子装置はE-cadherinを中心とした巨大なタンパク質複合体であるが、構成する個々のタンパク質がどう変化することで応答しているのか多くが不明であった。本研究ではこの巨大複合体を構成する個々のタンパク質の量の変化を追跡し、alpha-actininやZO-1についてこれまで知られていなかった挙動を明らかにした。これにより上皮メカノセンシングの動作原理の解明の足がかりを得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮細胞には外部から加えられた力を感知し応答する能力が備わり、これにより上皮組織は形や強度などを柔軟に変え、外部刺激から我々のからだを守っている。近年この能力の破綻が癌の悪性を促すことが指摘されており、その分子機構の解明が急がれる。本研究では上皮細胞が力を感じる際のセンサーとなる分子装置の個々の構成タンパク質がどのような量比で構成されるかを明らかにし、力を感じる過程でのそれらの量的変動も捉えることができた。この成果は上皮の力センサーの動作原理の解明という学術的意義が大きい、将来的には癌の病理の解明や新たな治療法の開発に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Epithelial cells are able to sense and respond to external forces. This ability is called as "mechanosensing", which allows epithelial tissues to flexibly change their shape and strength to protect our bodies from external stimuli. The molecular apparatus responsible for epithelial mechanosensation is a large protein complex including E-cadherin. However, it has remained unclear how the protein components that make up the complex cooperate to accomplish mechanosensing functions. In this study, by quantifying several proteins of the epithelial mechanosensing complex, we were able to uncover previously unknown quantitative changes of alpha-actinin and ZO-1 during the course of mechanical responses. This finding contributes to our understanding of the molecular mechanisms of epithelial mechanosensation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：メカノバイオロジー ゲノム編集 細胞間接着 CRISPR/Cas9 vinculin ノックイン catenin

### 1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は E-cadherin を中心とした接着性のタンパク質複合体(アドヘレンスジャンクション; AJ) によって隣接細胞と結合する。E-cadherin とアクチン細胞骨格を繋ぐ  $\alpha$ -catenin は、アクチン骨格にかかる力にตอบสนองして構造変化を起こし、AJ 局所のアクチン線維を安定化させるメカノセンシング機能を持つことが知られている。この発見が契機となり、AJ 複合体は百種を超えるタンパク質が巨大な複合体となり、メカノセンサーとして働くことが明らかになりつつある。研究の開始当初では既に多くの AJ 関連タンパク質(例: Vinculin,  $\alpha$ -actinin, Zyxin, Eplln など) が機械刺激によって AJ 局所における存在量を変化させることが報告されていた。しかし個々のタンパク質はそれぞれ異なる実験系で、別々の研究者によって報告されており、AJ メカノセンシング複合体が全体としてどのようにตอบสนองし、アウトプットを示すのか、というシステム全体としての理解が欠けていた。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究では機械刺激応答に関与する複数の AJ 構成タンパク質について、AJ 局所での存在量比を同一上皮細胞種 (Eph4 マウス乳腺上皮細胞株) で測定し、機械刺激応答の過程で個々のタンパク質がどのような量的変化を示すのかを明らかにすることを目的とした。これにより漸次的に進行すると予想されるメカノセンシングの素過程が明らかとなり、AJ 複合体の応答機構の理解への大きな一歩となることが期待された。

### 3. 研究の方法 (図 1)

#### (1) 蛍光タンパク質ノックインによる AJ メカノセンサーの化学量論的決定

タンパク質の分子数を計測するため、目的の内在性タンパク質全てを、蛍光タンパク質タグ付きのものに置き換えた細胞株を樹立する。いくつかの AJ メカノセンシング関連タンパク質についてそのような細胞株を樹立することで、AJ 局所における蛍光強度の比較からタンパク質の存在量比を算出することができる。蛍光タンパク質は目的とする遺伝子座にホモ接合でノックインする必要があるが、これには CRISPR/Cas9 法による高効率、かつ正確なノックイン法を利用することとした。

(2) AJ の定量的ライブイメージングによる機械刺激応答時のタンパク質の量的変化の解明

さらに上述の細胞株を使って AJ 局所でのタンパク質量の変化を生きた細胞で捉えることが可能である。隣り合う細胞同士の異なる AJ タンパク質が見分けられるよう、それぞれ異なる蛍光タンパク質(例: 緑色蛍光タンパク質 GFP と赤色蛍光タンパク質 RFP) でタグづけした細胞間の接着を見ることで、一方のタンパク質をレファレンスとして AJ メカノセンサーの構成タンパク質の相対的な変化量を時間を追って計測することができる。これにより機械刺激応答の過程で複数のタンパク質がどの順序で、どれくらいの量が変化するかを知ることができる。

### 4. 研究成果

#### (1) AJ メカノセンサー関連タンパク質の化学量論的計測とその信頼性

今回作製に成功した GFP ノックイン株 6 種類 (E-cadherin,  $\alpha$ -catenin, Vinculin,  $\alpha$ -actinin-4, ZO-1, ZO-2) について、定量が可能かどうかについて固定細胞を用いた検討を行った。Vinculin の蛍光強度の計測例を図 2 に示す。E-cadherin の免疫染色で斑点状の細胞間接着 (punctate AJ; pAJ) を検出し、個々の pAJ に含まれる GFP の蛍光強度を定量した。この GFP の蛍光強度を、当該タンパク質の免疫染色の蛍光強度と比較したところ、E-cadherin, Vinculin, ZO-1 について

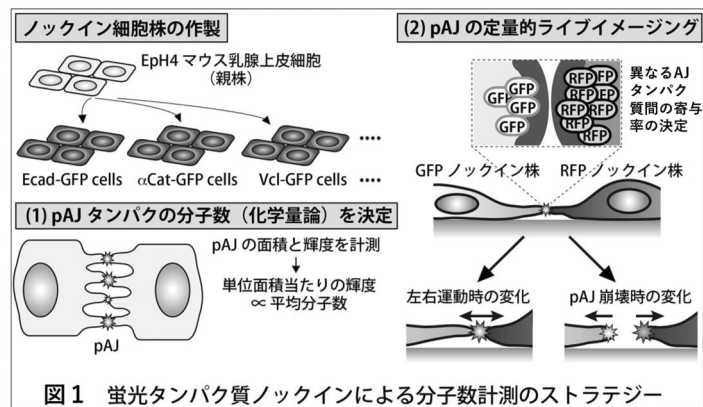


図 1 蛍光タンパク質ノックインによる分子数計測のストラテジー

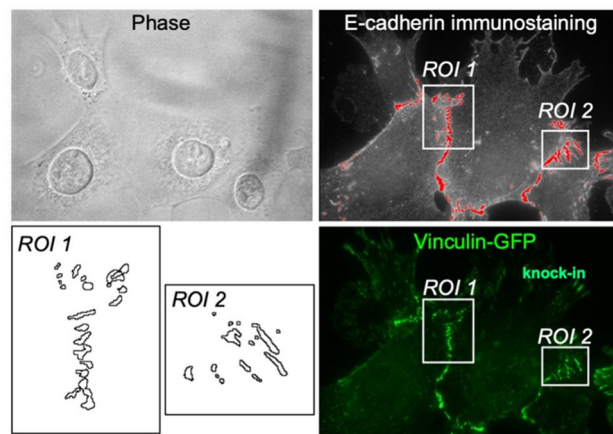


図 2 細胞間接着におけるタンパク質量の計測法 (E-cadherin の免疫染色により計測の興味領域 ROI を決定している)

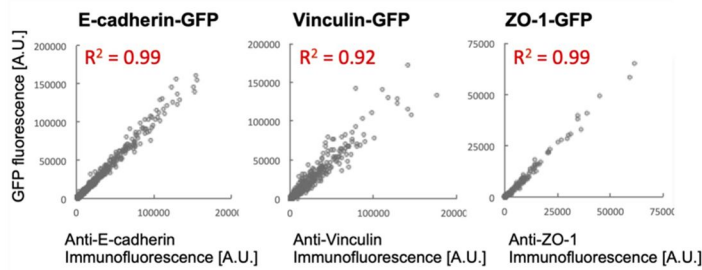


図3 GFPの蛍光強度と免疫染色蛍光強度の相関

概ね高い相関を示し、GFP 蛍光強度による定量が信頼できるものであることが確認された(図3)。

(2) AJ メカノセンサー関連タンパク質の化学量論の決定

まず固定細胞において、上述の6種類のタンパク質についてpAJでのGFP 蛍光強度を定量し、存在量の比較を行った(図4)。

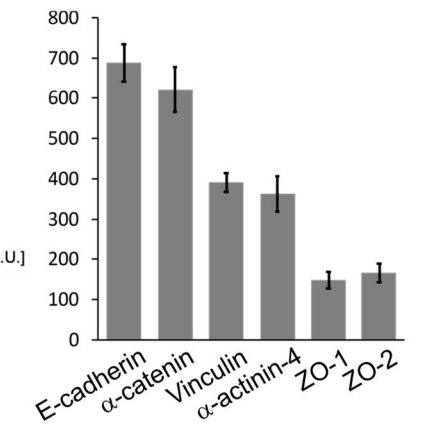


図4 斑状細胞間接着(pAJ)におけるタンパク質の存在量比(平均GFP蛍光密度)

E-cadherinの量を1とすると、 $\alpha$ -cateninは0.9程度となり、これらの分子が1:1の化学量論で結合する既知の事実と一致する。Vinculinや $\alpha$ -actinin-4は応力に応じてAJ複合体にリクルートされるアクチン結合タンパク質として知られ、その量比はそれぞれ0.6と0.56であった。即ち、今回の実験条件の下(細胞間接着形成時と考えられる)では多くのAJ複合体に応力がかかった状態であり、AJ複合体に強くアクチン線維が集積していることが示唆された。

(3) 機械刺激に応じた分子数の動的変化

次に、生細胞で分子数を比較し、AJ メカノセンサーの応答時の分子動態の解明を試みた。まずE-cadherinの遺伝子座にRFP遺伝子をホモ接合でノックインした細胞株を樹立し、分子数比較のためのレファレンスを得た。この細胞株と、目的のGFPタグタンパク質を発現する細胞株を混合培養し、GFPとRFPが隣り合って観察される領域で蛍光強度の追跡を行った。人為的に力学応答を誘導するため、ミオシン収縮の阻害剤であるプレビスタチンを観察開始時に加え、その後の変化を追跡した(図5)。

Vinculinはプレビスタチン処理後10分でAJでの存在量が大きく減じた(図5上段)。これは以前我々のグループが報告した挙動と一致する。興味深いことに、 $\alpha$ -actinin-4も同様にプレビスタチンに対して高い感受性を示した(図5中段)。これはAJメカノセンサーとアクチン線維の間の相互作用が、機械刺激に対して素早い応答を示すことを示唆している。また、ZO-1はこれまで機械刺激応答をする分子とは考えられていなかったが、今回の測定で約1時間後に存在量が大きく減少することが観察された。

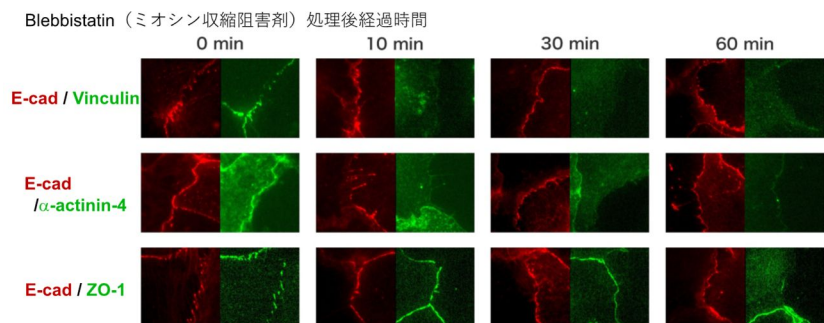


図5 AJメカノセンサーにおけるタンパク質の集積量の変化  
E-cadherin-RFP(各パネル左側)はAJの領域を示すレファレンスとして用いた。

また、ZO-1はこれまで機械刺激応答をする分子とは考えられていなかったが、今回の測定で約1時間後に存在量が大きく減少することが観察された。

(4) まとめ

今回の研究からAJメカノセンサーを構成するいくつかのタンパク質について、その存在量、および機械刺激応答時の量的変化を捉えることができ、当初の目的の幾らかは達成できたと考えている。特に $\alpha$ -actinin-4の素早い応答についてはこれまで報告がなく、その意義や、背景にある分子機構について更なる研究を行うことでAJメカノセンサーの新たな動作機序が解明されると期待している。研究開始当初の計画ではもっと多くのタンパク質について定量を行う計画であったが、技術的にホモ接合ノックインの難しい遺伝子もあり6遺伝子にとどまってしまったことは改善が必要な点である。また、生細胞を用いた動的変化では、計測領域が動くことが問題となって未だ適切な定量化が出来ていない。一つの解決策として興味領域の面積を広く取ることが考えられ、データの改善を行い研究成果をまとめる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aya Tentaku, Shusaku Kurisu, Kurumi Sejima, Toshiki Nagao, Akira Takahashi, and Shigenobu Yonemura	4. 巻 -
2. 論文標題 Proximal deposition of collagen IV by fibroblasts contributes to basement membrane formation by colon epithelial cells in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗栖修作, 米村重信
2. 発表標題 上皮細胞間接着のメカノセンシングにおけるアクチン結合タンパク質の量的変化
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗栖修作, 米村重信
2. 発表標題 上皮細胞間接着におけるアクチン結合タンパク質の存在比とその分布
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shusaku Kurisu, and Shigenobu Yonemura.
2. 発表標題 Determination of protein composition at epithelial cell-cell junctions by CRISPR/Cas9-mediated fluorescent protein knockin
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th
4. 発表年 2018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
---------	---------