

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19280

研究課題名(和文) RhoA活性化因子Soloのメカノセンシングの分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of mechanosensing of RhoA-GEF Solo

研究代表者

水野 健作 (MIZUNO, Kensaku)

東北大学・生命科学研究科・名誉教授

研究者番号：70128396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の力覚応答に関わるRhoA活性化因子(Rho-GEF)として同定したSoloの活性化機構と細胞機能を解明することを目的として研究を行い、以下の成果を得た。1) Soloはb4-インテグリンと結合しヘミデスモソームの形成に関与することを見出した。2) Soloとケラチン8/18は上皮管腔形成における長軸方向への伸長と集団移動に関与することを見出した。3) ケラチン線維との結合に関与するSoloのN末端領域のアミノ酸残基を同定し、ケラチン線維との結合がSoloの力覚応答機能に重要であることを解明した。4) BioID法を用いてSolo結合タンパク質としてCarmil-3とTalinを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞は、外界からの力学的刺激に反応して、形態、運動能、増殖・分化能を大きく変化させる。このような力学的刺激に対する細胞応答は、血管の恒常性、筋肉や骨の発達、幹細胞の運命決定、胚発生など、組織の形成や恒常性維持に重要な役割を果たしており、その応答不全は多くの疾患に関与している。本研究では、細胞の力覚応答に関与する分子であるSoloの活性化の分子機構に関する新しい知見を得た。また、管腔形成や集団移動におけるSoloの役割を解明した。これらの成果は、細胞の力覚応答の制御機構の解明と細胞の集団行動の分子機構の解明につながる成果であり、基礎生物学の進展だけでなく医学分野にも貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mechanical force-induced cytoskeletal reorganization is essential for tissue remodeling and homeostasis. Solo is a RhoA-targeting Rho-GEF that is required for mechanical force-induced cytoskeletal reorganization. In this project, we aimed to elucidate activation mechanisms and cellular functions of Solo and obtained several findings as follows: 1) Solo is involved in hemidesmosome formation by binding to b4-integrin. 2) Solo and keratin-8/18 are required for the formation of the elongated morphology of epithelial tubules and the collective migration of epithelial cells. 3) The four leucine residues in the N-terminal Solo domain of Solo is required for its keratin-binding ability and the keratin-binding ability of Solo is critical for its cellular function in mechanotransduction. 4) Using BioID techniques, we identified Carmil-3 and Talin as the Solo-binding proteins.

研究分野：生化学、細胞生物学

キーワード：細胞骨格 メカニカルストレス アクチン Rho Rho-GEF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は力学的刺激に応答して形態、運動能、増殖・分化能を変化させる。細胞の力覚応答は、血管の恒常性、筋肉や骨の発達、幹細胞の運命決定、胚発生など、組織の形成や恒常性維持に重要な役割を果たしており、その応答不全は多くの疾患に関与している。近年、細胞接着装置や細胞骨格を構成する蛋白質がメカノセンサー分子として力学的シグナルの受容・伝達に関与することが示唆されているが、力学的シグナルを化学的シグナル伝達経路の活性化に結びつける分子機構の多くは不明であり、今後解明すべき重要な課題である。細胞に張力刺激を与えると、細胞は細胞骨格を再編成し、ストレスファイバーや接着装置を形成・強化させる。このような細胞の力覚応答において Rho ファミリーの活性化が中心的役割を担っていると考えられるが、力学的刺激による Rho ファミリーの活性化機構は未だ不明である。私達は最近、血管内皮細胞の繰返し伸展刺激による細胞の配向変化を指標として、約 70 種ある Rho-GEF (Rho ファミリー活性化因子) の網羅的な発現抑制実験を行い、力覚応答に関わる 11 種類の Rho-GEF を同定した。同定した Rho-GEF の中で、RhoA の GEF であり、細胞間及び細胞-基質間接着部位に局在する Solo に注目して研究を進め、Solo が張力刺激依存的な RhoA の活性化とストレスファイバーの増強に重要な役割を担っていることを見出した。さらに、Solo 結合蛋白質としてケラチン-8/18 を同定し、張力刺激依存的な RhoA 活性化とストレスファイバー形成には Solo とケラチン繊維の結合が必須であることを見出した。Solo は複数の領域でケラチン繊維と結合し、結合領域を欠損した Solo 変異体では張力依存的な応答が失われることから、張力によるケラチン繊維の変形に伴って Solo の立体構造が変化し、その結果、Solo が活性化されるという機構の存在が推定された。

2. 研究の目的

上述の研究背景に基づいて、本研究では、Solo のメカノセンシング機構を解明するため、Solo の張力刺激依存的な活性化機構の解明と、多様な細胞力覚応答における Solo の機能の解明を目的に研究を行なった。Solo の活性化機構については、Solo がケラチン線維と結合することから、まずケラチン線維との結合に必要なアミノ酸残基を同定し、その変異体の機能解析からケラチンとの結合が Solo の力覚応答機能に重要であるかどうかを明らかにする。さらに、*in vitro* 分子引張実験により張力依存的な Solo の立体構造変化が GEF 活性の変化をもたらすのかを明らかにする。また、Solo の細胞機能については、力覚応答が重要な役割を果たしていると考えられる上皮管腔形成や腺房形成、細胞集団移動、細胞間及び細胞-基質間接着形成における Solo の役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヘミデスモソームの形成における Solo の機能：

Solo とケラチン-18 の発現抑制は siRNA のトランスフェクションにより行った。ヘミデスモソームの形成は b4-インテグリンの免疫蛍光染色により行った。腺房形成は、MCF10A 細胞の 3D Matrigel 中での培養により行った。wrinkle アッセイは、シリコーン基質上で YFP-Solo を発現した MCF10A 細胞を培養し、細胞の張力によって生じるシリコーン膜の wrinkle への YFP-Solo の局在を観察した。

(2) 上皮管腔形成における Solo の機能：

管腔形成は MDCK 細胞を硬い (2 mg/ml) コラーゲンゲルと HGF を含む軟らかい (0.1 mg/ml) コラーゲンゲルの界面で 4 日間培養し、観察した。管腔の形態は YFP-Lifeact を発現した MDCK 細胞について共焦点顕微鏡で得た YFP の蛍光画像から 3D 構築した。

(3) 細胞の集団移動における Solo の機能

細胞の集団移動は、MDCK 細胞をコラーゲンゲル上のガラスリング内に播種し、リングを外すことにより集団移動を開始させ、4 時間後からタイムラプス観察を行った。ケラチン-8 の局在は YFP-ケラチン-8 を発現する MDCK 細胞株を用いた。

(4) Solo のケラチン結合変異体の作成と細胞力覚応答における機能解析：

ケラチンとの結合に関わるアミノ酸残基を同定するため、Solo の N 末端 Solo ドメインと他のケラチン結合タンパク質 TRADD のケラチン結合ドメインのアミノ酸配列を比較し、相同な配列の中でヒトとゼブラフィッシュで保存されているアミノ酸から 2 つの LxxL モチーフに着目して置換するアミノ酸を選んだ。Solo の力覚応答機能は、細胞をシリコーン膜上に播種し、膜をガラス張りで引張ることで生じるストレスファイバーの増強活性を測定した。

(5) Solo の分子伸長による GEF 活性の変化の測定：

N 末端に Halo タグ、C 末端に GST タグを付けた Solo を Sf21 細胞に発現させ、グルタチオンセファロースで精製した。プラズマ処理後シランカップリングにより Halo リガンドとグルタチオンを結合したシリコーン膜に、精製した Halo-Solo-GST を添加し、シリコーン膜の伸展前後での RhoA-GEF 活性を測定した。GEF 活性は Halo-Solo-GST に RhoA と ³²P-GST を添加し、³²P-GTP を取り込んだ RhoA を PVDF 膜に吸着させ、定量した。FRET プローブは Solo の N 末端、C 末端や分子内部に CFP と YFP を付加した種々の発現プラスミドを作成し、細胞に導入した。

(6) BioID法を用いた Solo 結合タンパク質の同定：

Solo 及びその欠失変異体や GEF 不活性型変異体の N 末端および C 末端にビオチン化酵素 BirA を付加した融合タンパク質の発現プラスミドを作成し、恒常的発現細胞株を樹立した。ビオチンを添加後、細胞融解物をストレプトアビジンビーズにかけ、ビオチン化タンパク質を回収し、ゲル電気泳動で分離した。Solo 発現細胞に特異的に検出できるタンパク質について質量分析を行い、Solo 結合タンパク質を同定した。また、力学的刺激前後での細胞の融解物を用いた解析を行った。

(7) PLEKHG4B の細胞機能解析：

PLEKHG4B を A549 細胞及び MDCK 細胞に過剰発現させ、アクチン線維、E-カドヘリン b-カテニンの細胞染色を行なった。Rac1, Cdc42 の活性は、PAK1 の Rac/Cdc42 結合ドメインを用いた pull-down アッセイにより行なった。PLEKHG4B の細胞間接着に対する影響は、PLEKHG4B を siRNA を用いて発現抑制した時の A549 細胞及び MDCK 細胞をカルシウムスイッチアッセイにかけ、細胞間接着形成の様子はアクチン線維、b-カテニンの染色により解析した。

4. 研究成果

(1) ヘミデスモソームの形成における Solo の機能：

ヘミデスモソームは細胞-基質間接着部位に形成され、ケラチンをアンカーするタンパク質複合体であり、細胞の力覚応答にも重要な役割を担っていると考えられる。本研究では、Solo がヘミデスモソームの構成成分である b4-インテグリンの C 末端領域と結合することを見出した。Solo の発現抑制や ROCK 阻害剤 Y27632 によって、ケラチン線維の配向が変化し、ヘミデスモソームの形成が抑制された。ケラチン-18 の発現抑制によってもヘミデスモソームの形成が抑制された。以上の結果から、Solo は RhoA-ROCK 経路を介してケラチン線維の構築とヘミデスモソームの形成に関与することが示唆された。また、Solo の発現抑制は上皮細胞の腺房形成を阻害することを見出した。さらに、wrinkle 形成アッセイを用いて、Solo が細胞-基質間接着部位の牽引力の形成部位に集積することを見出した。(Fujiwara et al., PLoS One, 2018)

(2) 上皮管腔形成における Solo の機能：

細胞の力覚応答は、上皮細胞の管腔形成過程において重要な役割を果たしている。本研究では、MDCK 細胞をコラーゲンゲル内で 3D 培養し、管腔を形成させた時の Solo の機能を解析した。Solo の発現抑制によって、管腔の内腔面積、短軸/長軸比が増加し、ケラチン線維の配向が乱雑化することを見出した。ケラチン-18 の発現抑制によっても同様の結果が得られた。Solo またはケラチン-18 の発現抑制によって管腔表面における二重リン酸化ミオシンのレベルが低下した。以上の結果から、Solo はミオシンの活性化による収縮力の増加と、ケラチンの配向を制御することによって、上皮細胞の管腔形態形成における長軸方向への伸長に関与することが明らかになった。(Nishimura et al., Cell Struc. Funct., 2018)

(3) 細胞の集団移動における Solo の機能

細胞の集団移動における Solo の機能を解明するため、本研究では、MDCK 細胞をコラーゲンゲル上で培養し、Solo 発現抑制の効果を解析した。Solo の発現抑制は集団移動速度を速め、ケラチン線維の局在を変化させた。ケラチン-18 やプラコグロビンの発現抑制や Y-27632 処理でも Solo と同様に集団移動速度を速めた。以上の結果から、Solo はケラチン線維やプラコグロビンが関わるデスモソームの形成の促進及び RhoA-ROCK 経路の促進を介して、細胞の集団移動を負に制御していることが示唆された。(Isozaki et al., Mol. Biol. Cell, 2020)

(4) Solo のケラチン結合変異体の作成と細胞力覚応答における機能解析：

Solo は複数箇所でケラチン線維と結合することを私たちはすでに報告している。本研究では、Solo の N 末端領域 (Solo ドメイン) の複数のアミノ酸を置換することによって、ケラチンとの結合に関与するアミノ酸残基を同定した。L14R/L17R および L49R/L52R の置換によって Solo の N 末端断片のケラチン結合能が失われたが、全長の Solo のケラチン結合能は維持されていた。全長の Solo 変異体 (L14R/L17R あるいは L49R/L52R) は野生型 Solo の示す細胞-基質接着面への局在や、張力依存的なストレスファイバーの増強作用を示さないことから、Solo の N 末端 Solo ドメインにおけるケラチンとの相互作用は、Solo の細胞内局在および力覚応答機能において重要な役割を担っていることが示唆された。(Fujiwara et al., Genes Cells, 2019)

(5) Solo の分子伸長による GEF 活性の変化の測定：

Solo の分子伸長によって GEF 活性が変化するかを調べるための実験系を検討した。Solo の N 末端に Halo タグを、C 末端に GST タグを付けて、Sf21 細胞に発現させ、精製した。これをシリコン膜上に固相化し、シリコン膜の伸展後の Solo の GEF 活性を RhoA への ³²P-GTP の取り込みにより測定した。しかし、Solo の固相化の効率が悪く、また Solo を大量発現、精製することも困難であり、伸展による Solo の活性化は検出できなかった。また、Solo の構造変化を細胞内で検出するための FRET プローブを作成し、Y-27632 や Blebbistatin による張力の低下やミオシ

ソホスファターゼ阻害剤による張力増強の効果を測定したが、張力刺激依存的な Solo の構造変化は検出できなかった。

(6) BioID 法を用いた Solo 結合タンパク質の同定：

Solo の活性化機構や局在化機構を解明するため、BioID 法を用いて、Solo 結合タンパク質の探索を行った。本法は、直接結合するタンパク質だけでなく周辺に存在するタンパク質や一過的に結合するタンパク質も同定することができるため、力学的刺激の前後での結合タンパク質の解析などに有利な手法である。質量分析の結果、以前に同定しているケラチンのほか、Carmil-3, Talin, Filamin を Solo 結合タンパク質として同定した。現在、これらの分子が Solo の活性や局在に与える影響について解析を進めている。

(7) PLEKHG4B の細胞機能解析：

ヒトゲノム中に存在する約 70 種類の Rho-GEF の中で Solo ともっとも類似した構造をもつ PLEKHG4B について、細胞機能の解析を行った。その結果、PLEKHG4B は Rac1 と Cdc42 の活性化を介して、細胞間への突起伸長を促進することがわかった。また、PLEKHG4B の発現抑制によって、細胞間接着形成の速度が顕著に遅くなり、ジッパー様の細胞接着が形成されることが示された。以上の結果から、PLEKHG4B は細胞間接着の成熟過程に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujiwara, S., Matsui, T. S., Ohashi, K., Mizuno, K., and Deguchi, S.	4. 巻 24
2. 論文標題 Keratin-binding ability of the N-terminal Solo domain of Solo is critical for its function in cellular mechanotransduction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 390-402
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12682	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 -
1. 著者名 Isozaki, Y., Sakai, K., Kohiro, K., Kagoshima, K., Iwamura, Y., Sato, H., Rindner, D., Fujiwara, S., Yamashita, K., Mizuno, K., and Ohashi, K.	4. 巻 31
2. 論文標題 The Rho-guanine nucleotide exchange factor Solo decelerates collective cell migration by modulating the Rho-ROCK pathway and keratin networks.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol. Biol. Cell	6. 最初と最後の頁 741-752
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E19-07-0357	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 -
1. 著者名 Nishimura, R., Kato K., Fujiwara, S., Ohashi, K., and Mizuno, K.	4. 巻 43
2. 論文標題 Solo and keratin filaments regulate epithelial tubule morphology.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Struc. Funct.	6. 最初と最後の頁 95-105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.18010	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 -
1. 著者名 Fujiwara, S., Matsui, T. S., Ohashi, K., Deguchi, S., and Mizuno, K.	4. 巻 43
2. 論文標題 Solo, a RhoA-targeting guanine nucleotide exchange factor, is critical for hemidesmosome formation and acinar development in epithelial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0195124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0195124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 博紀、山下 和成、菅野 新一郎、水野 健作、大橋 一正
2. 発表標題 機械的力依存的なアクチン骨格制御に関する Rho-GEF, Solo の相互作用蛋白質の BioID 法による探索
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二宮 小牧、山下 和成、水野 健作、大橋 一正
2. 発表標題 Rho-GEF, PLEKHG4Bの細胞間接着形成における機能解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 博紀、山下 和成、菅野 新一郎、水野 健作、大橋 一正
2. 発表標題 機械刺激依存的なアクチン再構築に関するRho-GEF Soloの相互作用蛋白質の同定
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿子嶋 克彦、山下 和成、水野 健作、藤田 恭之、大橋 一正
2. 発表標題 メカノストレス応答に関するRho-GEF, Soloの細胞競合における機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原佐知子、松井翼、大橋一正、Thomas M. Magin、水野健作、出口真次
2. 発表標題 上皮細胞のメカノトランスダクションとヘミデスモソーム形成におけるRho-GEF Soloの役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 磯崎友亮、酒井高輝、藤原佐知子、水野健作、大橋一正
2. 発表標題 Solo (ARHGEF40) はケラチン8/18ネットワークの再構築に関与し細胞集団移動の速度を制御する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤博紀、山下和成、菅野新一郎、水野健作、大橋一正
2. 発表標題 力覚応答に関与するRhoGEF, Soloと相互作用する蛋白質のBioID法による網羅的探索
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 磯崎友亮、藤原佐知子、水野健作、大橋一正
2. 発表標題 RhoA-GEF Soloは上皮細胞の集団移動の速度を制御する
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 二宮小牧、水野健作、大橋一正
2. 発表標題 細胞間接着形成に關与するRho-GEF, PLEKHG4Bの機能解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Komaki Ninomiya, Kensaku Mizuno, Kazumasa Ohashi
2. 発表標題 Functional roles of Rho-GEF PLEKHG4B in the formation of adherens junctions
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院生命科学研究科 情報伝達分子解析分野 http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno_lab/
--

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
連携研究者	大橋 一正 (OHASHI Kazumasa) (10312539)	東北大学・生命科学研究科・教授 (11301)	