

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14469

研究課題名(和文)細胞の力覚応答におけるSoloの活性化機構と機能解明

研究課題名(英文)Activation mechanisms and functions of Solo in mechanoresponses

研究代表者

水野 健作 (Mizuno, Kensaku)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70128396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：力学的刺激に対する細胞応答は生体の恒常性維持や組織形成において重要な役割を担っている。私達は最近、細胞の力覚応答に関与するRhoA活性化因子(RhoA-GEF)としてSoloを同定した。本研究では、Soloの力学的刺激依存的な活性化機構、および細胞機能を解明することを目的として研究を行った。その結果、Soloはケラチン8/18繊維と複数箇所では結合すること、張力刺激依存的なRhoAの活性化やストレスファイバーの形成・強化において、Soloとケラチン8/18繊維の結合が重要であることを明らかにした。さらに、Soloは、細胞の集団移動や管腔形成に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mechanical force-induced cytoskeletal reorganization is essential for cell and tissue remodeling and homeostasis. Solo (ARHGEF40) is a RhoA-targeting guanine nucleotide exchange factor (GEF) involved in cyclic stretch-induced endothelial cell reorientation. In this study, we showed that Solo binds to keratin-8/18 (K8/K18) intermediate filaments through multiple sites. Knockdown of Solo suppressed stress fiber formation and led to disorganized keratin networks, indicating that the Solo serves to precisely organize keratin networks as well as to promote stress fibers. Knockdown of Solo or K18 suppressed tensile force-induced RhoA activation and stress fiber reinforcement. These results suggest that Solo and K8/K18 filaments play crucial roles in tensile force-induced RhoA activation and consequent actin cytoskeletal reinforcement. We also provided evidence that Solo plays roles in collective cell migration and tubule formation.

研究分野：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

1. 研究開始当初の背景

細胞は多様な力学的刺激を受けており、これらの刺激に適切な応答をすることで生体の恒常性が維持されている。組織の形態形成過程においても、外環境の硬さや細胞集団内の力の負荷分布が細胞の運動、形態、極性や分化状態を制御することが明らかになりつつある。例えば、血管内皮細胞に対する血流によるずり応力や血管拍動による繰返し伸展刺激は、細胞の形態・配向を制御し、血管の恒常性維持に寄与している。また、原腸陥入時の中胚葉の収束伸長や上皮組織の形態形成は、液性因子の作用とともに外環境の硬さ、細胞間、細胞-基質間に発生する力によっても制御されている。このように力学的刺激に対する細胞応答(力覚応答)は組織の恒常性維持や形態形成に極めて重要であるが、力学的刺激を化学的シグナルに変換する機構については不明な点が多い。力覚応答にはアクチン骨格の再構築が必須であり、Rhoファミリーが中心的な役割を果たしている。しかし、力学的刺激によるRhoファミリーの活性化機構は全く不明である。私達は、最近、血管内皮細胞の繰返し伸展刺激による細胞配向の変化をモデル系として用いて、力覚応答に関与するRho-GEF(Rhoファミリー活性化因子)の網羅的探索を行い、11種類のRho-GEFを同定することに成功した。本研究では、これらの分子の中で、RhoAのGEFであり、ゼブラフィッシュ胚の収束伸長に関与することが示されているSoloに焦点を当てて、力学的刺激によるSoloの活性化機構と、細胞の力覚応答、集団移動、3次元組織構築におけるSoloの機能について、解析を行った。

2. 研究の目的

力学的刺激に対する細胞応答は生体の恒常性維持、胚発生、器官形成、組織再生において重要な役割を担っており、Rhoファミリー分子群によるアクチン骨格再構築はこれらの過程に必須である。細胞の力覚応答におけるRhoファミリーの活性制御は活性化因子であるRho-GEFに依存しているが、力覚応答におけるRho-GEFの活性化機構は全く不明である。本研究では、力覚応答に関与する

Rho-GEFとして私達が同定したSoloに焦点を当てて、Soloが力学的刺激によって活性化される分子機構について検討するとともに、力学的刺激による細胞骨格の再構築や、細胞の集団移動、3次元組織構築におけるSoloの機能を解明することを目的とした。本研究により、細胞の力覚応答の新たな分子機構を解明し、細胞の集団移動や3次元組織構築における力覚応答のシグナル伝達機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Solo とケラチン 8/18 繊維の結合と細胞の力覚応答における機能 :

① Solo 結合タンパク質のプロテオミクス解析 : Halo タグを付加した Solo を MCF-7 細胞に発現させ、細胞溶解液を Halo リガンドビーズと混合し、Halo-Solo と共沈降したタンパク質を SDS 電気泳動で分離し、トリプシンで消化後、質量分析により Solo 結合タンパク質を同定した。

② 引張刺激による RhoA の活性化の測定 : シート状に培養した MDCK 細胞にフィブロネクチンコートした磁気ビーズを付着させ、永久磁石で上方に引張刺激を与えた。磁力負荷後に細胞を回収し、Rhotekin の Rho-binding domain を用いたプルダウンアッセイにより、細胞内の活性型 RhoA-GTP 量の変化を測定した。Solo とケラチン 18 の機能は、siRNA のトランスフェクションによる発現抑制の効果を測定した。

③ 引張刺激によるストレスファイバー形成の測定 : フィブロネクチンでコートしたシリコーン膜上に YFP-Lifeact を発現させた MDCK 細胞を播種した。ガラス微細針でシリコーン膜を引っ張ることで、細胞に引張刺激を加えた。YFP-Lifeact でストレスファイバーを可視化し、引張刺激により形成・増強されたストレスファイバーの数の変化を測定した。

(2) 細胞の集団移動における Solo とケラチン繊維の機能 :

コラーゲンゲル上にガラスリングを置き、その中に MDCK 細胞をシート状の集団として培養した後、ガラスリングを除き、辺縁から

フィンガー様の形状で細胞が集団移動する時の速度をタイムラプス観察した。Solo とケラチン 18 の機能は、siRNA による発現抑制の効果を測定した。

(3) 管腔形成における Solo とケラチン繊維の機能：

管腔形成におけるSoloとケラチン繊維の機能を解明するために、MDCK細胞をHGF存在下、コラーゲンゲル内で4日間、三次元培養した。形成された管腔様構造の長軸/短軸比を測定した。Soloとケラチン18の機能は、siRNAによる発現抑制の効果を測定した。

4. 研究成果

(1) Solo とケラチン 8/18 繊維の結合と細胞の力覚応答における機能：

細胞の力覚応答における Solo の活性化機構と機能を解明するため、Solo の結合タンパク質のプロテオミクス解析を行い、上皮細胞における主要な中間径フィラメントであるケラチン 8/18 を同定した。Solo は少なくとも 3 箇所のケラチン結合領域をもつことを示した。次に、引張刺激による RhoA の活性化に対する Solo とケラチンの関与について検討した。シート状に培養した上皮細胞にフィブロネクチンをコートした磁気ビーズを付着させ、磁石によって細胞に張力を負荷すると、RhoA が活性化された。siRNA のトランスフェクションによって Solo やケラチン 18 の発現を抑制すると、張力負荷による RhoA の活性化が抑制された。以上の結果から、Solo とケラチン 18 は両者ともに張力負荷依存的な RhoA の活性化に関与することが示された。

また、細胞は張力を負荷されると、その方向にストレスファイバーを形成・増強させる。このような応答をリアルタイムで可視化解析するため、ガラスボトムディッシュに薄いシリコン膜を張り、フィブロネクチンでコーティングした上に細胞を接着させ、シリコン膜を針で引っぱって変形させることで細胞に引張刺激を負荷する系を構築した。蛍光タンパク質 YFP を付加した Lifeact でアクチンを可視化した上皮細胞に引張刺激を負荷したところ、Solo やケラチン 18 の発現抑

制によって、引張刺激で新生・増強されるストレスファイバーの数が減少することがわかった。以上の結果から、Solo とケラチン繊維は、引張刺激依存的な RhoA の活性化とストレスファイバーの形成・強化に関与することが明らかとなった。一部のケラチン結合領域を欠失した Solo では引張刺激依存的なストレスファイバーの形成・強化がみられないことから、引張刺激依存的なストレスファイバーの形成・強化には Solo とケラチン繊維の結合が重要であることが示唆された。

(2) 細胞の集団移動における Solo とケラチン繊維の機能：

細胞の集団移動は創傷治癒、器官形成などでみられる重要な現象である。集団移動において、細胞-基質間、細胞間における力の制御が重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、上皮細胞の集団移動における Solo の機能を解析した。イヌ腎上皮 MDCK 細胞において、siRNA を用いて Solo を発現抑制すると、単独細胞の移動速度には影響が見られなかったが、細胞集団の移動速度は有意に促進された。また、Solo の発現抑制によって、ケラチン繊維が減弱し、配向が乱れることを見出した。ケラチン 18 の発現を抑制すると、Solo の発現抑制と同様に、細胞の集団移動速度が上昇した。また、ROCK の阻害剤 Y27632 の効果を解析したところ、適度な濃度で添加すると、細胞の集団移動速度が上昇した。以上の結果から、Solo は RhoA-ROCK 経路の活性化を介してアクチオシンの活性化を促進し、細胞間の張力を増加することで、集団移動速度を抑制している可能性が示唆された。

(3) 管腔形成における Solo とケラチン繊維の機能：

管腔構造は様々な上皮組織にみられる構造であり、極性化した上皮細胞に囲まれた内腔を持つ。上皮管腔形成において、力覚応答の重要性が明らかになりつつある。本研究では、管腔形成におけるSoloの機能を解明するために、MDCK細胞のコラーゲンゲル内での三次元培養による管腔形成モデルを構築して

検討を行った。その結果、Soloやケラチン18の発現抑制によって管腔構造の長軸/短軸比が減少し、管腔における内腔の占める割合が有意に増加した。また、ミオシンII依存的な収縮力のマーカーである二重リン酸化ミオシン軽鎖 (ppMLC) の局在を観察したところ、Soloとケラチン18の発現抑制によって細胞頂端部 (内腔側) におけるppMLCの有意な低下が認められた。さらに、ミオシンIIの阻害剤の添加によって、同様に内腔の肥大が認められた。以上の結果から、SoloはRhoAを活性化し、アクトミオシンにより生み出される細胞間の収縮力を増加し、管腔の長い形状と内腔の形態の維持に関与していることが示された。

(4) 成果のまとめと展望

本研究では、様々なモデル系を用いて、細胞の力覚応答における Solo とケラチン繊維の機能を解析し、これらが、引張刺激による RhoA の活性化とストレスファイバーの形成・強化、細胞の集団移動速度の抑制、上皮細胞集団の管腔形成の制御に関与することを明らかにした。力学的刺激による Solo の活性化機構は未だ不明であるが、Solo が複数箇所ケラチン繊維と結合することから、力学的刺激によるケラチン繊維の構造変化によって、Solo が立体構造変化し、活性化する可能性や、他のタンパク質との結合が変化する可能性が考えられる。Solo の引張刺激依存的な構造変化や活性変化を測定する系を構築することが今後の課題である。また、集団移動や管腔形成における Solo の機能が明らかになったが、Solo 遺伝子改変マウスの表現型解析によって、個体レベルでの Solo の機能を解明することも今後の重要な課題である。細胞の力覚応答の破綻は多くの病気の原因となっていると考えられる。細胞の力覚応答機構の解明が進むことによって、これまで化学的シグナルだけでは説明できなかったさまざまな疾患について病因が解明されることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Ohashi, K., Fujiwara, S., and Mizuno, K., Roles of the cytoskeleton, cell adhesion, and Rho signaling in mechanosensing and mechanotransduction., *J. Biochem.*, 査読有, 161 巻, 2017, 245-254, doi:10.1093/jb/mvw082

② 藤原 佐知子, 大橋 一正, 水野 健作, メカノセンシングにおける細胞骨格, 細胞接着の機能, 生化学, 査読有, 88 巻, 2016, 443-451, doi:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880443

③ Fujiwara, S., Ohashi, K., Mashiko, T., Kondo, H., Mizuno, K., Interplay between Solo and keratin filaments is crucial for force-induced stress fiber reinforcement., *Mol. Biol. Cell*, 査読有, 27 巻, 2016, 954-966 doi: 10.1091/mbc.E15-06-0417

④ Katsuno, H., Toriyama, M., Hosokawa, Y., Mizuno, K., Ikeda, K., Sakumura, Y., Inagaki, N., Actin migration driven by directional assembly and disassembly of membrane-anchored actin filaments., *Cell Rep.*, 査読有, 12 巻, 2015, 648-60, doi:10.1016/j.celrep.2015.06.048

⑤ Abiko, H., Fujiwara, S., Ohashi, K., Hiattari, 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.*, 査読有, 128 巻, 2015, 1683-1695, doi: 10.1242/jcs.157503

[学会発表] (計 10 件)

① 大橋 一正, 西村 亮祐, 藤原 佐知子, 水野 健作, 力覚応答に関与する Rho-GEF, Solo の上皮細胞の管腔形成における機能解析, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016.11.30-12.2, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

② 水野 健作、藤原 佐知子、大橋 一正、動物細胞の力覚応答における細胞骨格の役割、第 39 回日本分子生物学会年会、2016. 11. 30-12. 2、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

③ 藤原 佐知子、大橋 一正、水野 健作、上皮細胞の力覚応答と細胞骨格制御に対する Rho-GEF Solo の機能、第 68 回日本細胞生物学会大会、2016. 6. 15-17、京都テルサ（京都府・京都市）

④ 西村 亮祐、大橋 一正、藤原 佐知子、水野 健作、メカノストレス応答に関する Rho-GEF, Solo の上皮管腔組織形成における役割、第 68 回日本細胞生物学会大会、2016. 6. 15-17、京都テルサ（京都府・京都市）

⑤ 西村亮祐、大橋一正、藤原佐知子、水野 健作、上皮管腔組織形成における Solo の機能解析、日本生化学会東北支部第 82 回例会、2016. 5. 21-22、弘前大学（青森県・弘前市）

⑥ 大橋一正、藤原佐知子、酒井高輝、安彦日和、近藤洋志、増子寿弥、水野健作、メカノストレス応答に寄与する RhoGEF, Solo の上皮細胞集団の秩序化における機能、2016 年生体運動合同班会議プログラム、2016. 1. 8-10、キャンパスプラザ京都（京都府・京都市）

⑦ 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）

⑧ Kensaku Mizuno、Dynamic reordering of actin cytoskeleton in mechanical force-induced cell responses、The 4th International Symposium on Dynamic Ordering and Functions、2015. 11. 22-23、九州大学西新プラザ（福岡県・福岡市）

⑨ 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）

⑩ 藤原佐知子、安彦日和、大橋一正、増子寿弥、水野健作、Rho-GEF Solo によるアクチン繊維と中間径フィラメントの制御とメカノセンシングにおける機能、日本生化学会東北支部第 81 回例会、2015. 5. 9、東北大学さくらホール（宮城県・仙台市）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno_lab/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 健作 (MIZUNO, Kensaku)

東北大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号：70128396