

令和元年5月18日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15118

研究課題名(和文) Rho-GEF Soloを介する上皮細胞のメカノセンシング機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of cellular mechanosensing through Rho-GEF Solo

研究代表者

藤原 佐知子 (Fujiwara, Sachiko)

大阪大学・基礎工学研究科・特別研究員(PD)

研究者番号：40771879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：力学的環境に対する細胞や組織の応答(メカノセンシング)の重要性が、様々な生理機能で注目されている。本研究では細胞内Rhoファミリーシグナル伝達経路に着目し、Rhoファミリー活性化因子の一つであるSoloが機械的力の受容と伝達にどのように関与するのかに重点を置き研究を推進した。その結果、Soloと細胞骨格のケラチン中間径フィラメントの結合の分子機構を明らかにし、さらに力の発生とメカノセンシングにおけるSoloの重要性を示した。本研究結果は、細胞のメカノセンシングについて、Rhoファミリーとケラチン中間径フィラメントを介する経路の分子メカニズムと生理的役割を新規に解明したものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体を形成、維持する過程において、力学的環境に対する細胞や組織の応答(メカノセンシング)は必須の役割を果たしている。本研究では細胞内Rhoファミリーシグナル伝達経路と細胞骨格のケラチン中間径フィラメントに着目し、メカノセンシングの新たな分子機構と生理的役割を解明した。本研究結果は、メカノセンシングの破綻により引き起こされる疾患のメカニズムを理解するための新規な基礎的知見を得たものである。

研究成果の概要(英文)：Cells sense and respond to their mechanical environment (mechanosensing), which can regulate the various physiological functions of the cells and the tissues. This study focused on the cell signaling pathway of Rho family GTPases and analyzed the involvement of Solo, a Rho family GTPases exchange factor, in mechanosensing. We elucidate the molecular mechanisms of the interaction of Solo and keratin intermediate filaments and showed their importance in mechanosensing and in the force generation in cells. This study revealed a novel mechanism and the physiological roles of cellular mechanosensing.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Rhoファミリー活性化因子 メカノセンシング 細胞骨格 中間径フィラメント 細胞-基質間接着 細胞収縮力

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体を形成、維持する過程において、力学的環境に対する細胞や組織の応答（メカノセンシング）は必須の役割を果たしている。力学的シグナルは細胞の様々な部位で受容され、細胞内の化学的シグナルに変換された後、細胞骨格の再構築をはじめとする様々な応答を引き起こす。細胞が力学的シグナルを感知する分子機構は、近年注目され、機械感受性チャネルの発見など多くの研究がなされてきた¹。しかし力の受容から細胞骨格再構築に至る分子機構は、未発見のメカノセンサー蛋白質やシグナル伝達経路がまだ多く残されている。

ケラチン中間径フィラメントは細胞の力学的な耐性に寄与し、メカノセンシングにおいても重要性が示唆されている²。一方アクチン骨格は、細胞の運動や形態変化を司ると同時に、ミオシンと共に力を発生させる細胞骨格であり、メカノセンシングにおいてもその制御が必須である。Rhoファミリーはアクチン骨格の再構築において中心的な役割を担っており、繰返し伸展刺激依存的なヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）の再配向にも関与する。私は2015年度まで所属していた東北大で、繰返し伸展刺激依存的なHUVECの再配向に必要なRho-GEFの同定を目的として、約70種あるRho-GEFのshRNAライブラリーを作製し、網羅的な発現抑制スクリーニングを行った。その結果RhoA-GEFであるSolo（ARHGEF40）が繰返し伸展刺激依存的なHUVECの垂直方向への再配向に関与することを見出した³。加えて、Soloがケラチンに対して複数の結合領域を保有することや、Soloおよびケラチンが力負荷で誘導されるRhoAの活性化やストレスファイバー形成に必要なことを解明した。細胞のメカノセンシングにおける中間径フィラメント、アクチン骨格、Rho-GEFの関与を同時に測定し、Soloがメカノセンシングに関与するRho-GEFであることを証明した⁴。これらの研究により、メカノセンシングのための新たなシグナル伝達経路の解明に繋がる知見を得た。

細胞は細胞骨格を再構築し、力学的環境に適応する。従って細胞のメカノセンシングを理解するためには、アクチン骨格と中間径フィラメントの再構築を統御するRhoシグナルを中心とした分子機構の解明が必要である。私はこれまでの研究で、力刺激に応答した細胞骨格再構築にはフィードバック制御が存在すること、その制御にSoloが必要であることを示し、Soloがまさに鍵分子である可能性が高いと考えた。力の受容の分子機構を解明することは、その破綻による疾患のメカニズムの解明にも寄与する重要な研究であると考え、本研究課題の提案に至った。

2. 研究の目的

力学的環境に対する細胞や組織の応答（メカノセンシング）が、生体組織の形成や機能維持など様々な生理機能に重要であることが報告されている。私はRhoファミリー活性化因子（Rho-GEF）の一つであるSoloが、ケラチン中間径フィラメントと相互作用し、機械刺激で誘発される細胞応答に寄与することをこれまでに見出している。この知見を元に、本研究は機械的力の受容と伝達にRho-GEF Soloがどのように関与するのか、その分子機構を蛋白レベルおよび細胞レベルで明らかにし、メカノセンシングの新たな制御機構や役割を世界に先駆けて解明することを目的とした。そのために、特に以下の2点を具体的な解明点と設定し研究を推進した。

- 1) 生化学的手法によるSoloを介するメカノセンシングの分子機構の解明
- 2) 上皮細胞におけるメカノセンシングの分子機構と機能解析

3. 研究の方法

3-1. 生化学的手法によるSoloを介するメカノセンシングの分子機構の解明

3-1-1. 新規Solo結合タンパク質の同定

Soloとメカノセンシングとの関係についてより深く理解するためには、Solo結合タンパク質の解析が不可欠である。私はこれまでにSolo結合タンパク質としてケラチン中間径フィラメントを報告しているが³、それ以外は未解明である。そこでSoloが強く局在する部位である細胞の接着部位に局在するタンパク質に着目し、それらのタンパク質とSoloとの結合を生化学的手法で解析することにより、新たなSolo結合タンパク質を見出す。同定したSolo結合タンパク質の発現プラスミドを作製、さらに種々の欠失変異体も作製し、Soloとの結合を詳細に解析することで互いの結合部位を同定する。

3-1-2. Soloのケラチン結合能喪失変異体の作製

Soloとケラチンを介したメカノセンシングを証明するために、ケラチンとの結合能を喪失したSoloのアミノ酸点変異体を作製する。ただし、これまでにケラチンとの結合のコンセンサス配列の報告は無いため、既報のケラチン結合タンパク質の結合ドメインを参考に、Soloのアミノ酸配列を解析する。候補に挙げたアミノ酸については、YFPタグ付きのSoloに変異を入れ、実際にケラチンとの結合能に変化があるかや、局在や活性に影響があるかを解析する。

3-2. 上皮細胞におけるメカノセンシングの分子機構と機能解析

3-2-1. シリコーン基板を利用した細胞収縮力評価

細胞が発する力を所属する研究室が独自開発したシリコーン法（細胞内外の力をシリコーン基板表面に発生するシワにより可視化する技術）で可視化解析する。Soloの局在と力の発生部位

に関連があるか、また Solo の野生型とケラチン結合能を喪失した変異体の細胞収縮力に差があるかを評価する。

3-2-2. 上皮細胞の接着や腺房形成における Solo の機能評価

乳腺上皮由来 MCF10A 細胞は、細胞外基質上で二次元培養すると細胞-基質間接着部位にヘミデスモソームと呼ばれる接着複合体を形成する。ヘミデスモソームは細胞内のケラチン線維を接着部位に繋ぎ止める役割をする。また MCF10A 細胞は細胞外基質のゲル内で三次元培養すると、ゲル内で細胞集団となり極性化して内腔を持つ腺房を形成する。細胞の接着や腺房形成の過程では様々な力の作用が考えられることから、これらの事象における Solo やケラチン、また Rho-ROCK シグナル伝達経路の役割を検証する。Rho-ROCK 経路については ROCK 阻害剤の処理、Solo と関連分子についてはそれらの分子の発現抑制や過剰発現、ケラチンネットワークについてはケラチンの発現抑制によるネットワークの攪乱を行い、ヘミデスモソーム形成や腺房形成過程に生じる影響を解析する。

4. 研究成果

4-1. Solo の新規結合タンパク質の同定

私は2016年度までに、Solo が細胞間および細胞-基質間接着部位に強く局在すること、また Solo の発現抑制がこれら細胞接着部位におけるケラチン繊維の繋ぎとめを減弱させることを見出ししていた^{2,3}。ケラチン繊維は細胞間接着ではデスモソーム、細胞-基質間ではヘミデスモソームと呼ばれる接着複合体により細胞膜に繋ぎとめられている。そこで Solo がデスモソームやヘミデスモソームを構成するタンパク質と結合する可能性を考え、Solo とそれらのタンパク質の結合を生化学的手法で検証した。その結果、アドヘレンスジャンクション構成タンパク質、デスモソーム構成タンパク質、ヘミデスモソーム構成タンパク質 (β4 インテグリン) を Solo 結合タンパク質候補として新たに見出すことに成功した。さらに Solo と β4 インテグリンの結合について、両者の欠失変異体を用いてより詳細に解析し、両者の結合部位を明らかにした。

4-2. 上皮細胞の接着と腺房形成に対する Solo の関与

Solo が細胞-基質間接着部位におけるケラチンを攪乱することおよび Solo とヘミデスモソーム構成タンパク質が結合すること (研究成果 4-1) を鑑みて、Solo がヘミデスモソーム形成に関与する可能性を検証した。MCF10A 細胞をマトリゲルをコートしたカバーガラス上で培養し、血清飢餓でヘミデスモソーム形成を誘導し観察に用いた。その結果 Solo の発現抑制、ケラチンの発現抑制、ROCK 阻害剤による Rho-ROCK 経路の阻害はいずれもヘミデスモソーム形成を著しく低下させることが分かった。

4-3. 細胞-基質間接着部位での張力発生に対する Solo の関与

細胞には常に周囲の力学的環境に応じた張力がかかり、それに見合う収縮力が細胞に発生している。収縮力の時空間的に適切な発生は力学的環境への適応に必須であり、正常な細胞機能に不可欠である。Solo が上皮細胞の細胞-基質間接着部位におけるケラチン線維の正常なネットワーク構築およびヘミデスモソーム形成に必要であることから (研究成果 4-2)、Solo の局在と細胞-基質間接着部位に発生する力の部位をシリコン法 (研究方法 3-2-1) で可視化解析を試みた。MCF10A 細胞をマトリゲルをコートしたシリコン基板上で培養し YFP-Solo を過剰発現させ、YFP-Solo の蛍光シグナルとシリコン基板上に形成されたシワとの位置関係をライブイメージングで詳細に検証した結果、力の発生部位と Solo の局在に相関があることを明らかにした。

4-4. Solo とケラチン中間径フィラメントの結合部位の探索

メカノセンシングにおける Solo とケラチンの相互作用の意義を解明するために、ケラチンとの結合能を欠く Solo の変異体の作製を試みた。Solo のアミノ酸配列のデータベース解析を行い、種間で特に保存された N 末の Solo ドメインに着目してアミノ酸をピックアップした。分子生物学的手法を用いてそれらの Solo 変異体の発現遺伝子を作製し、Solo 変異体の細胞内でのケラチン結合能を生化学的手法で検証した結果、Solo N 末ドメインのケラチン結合能に重要なアミノ酸として、複数箇所のロイシンを見出した (図 1)。

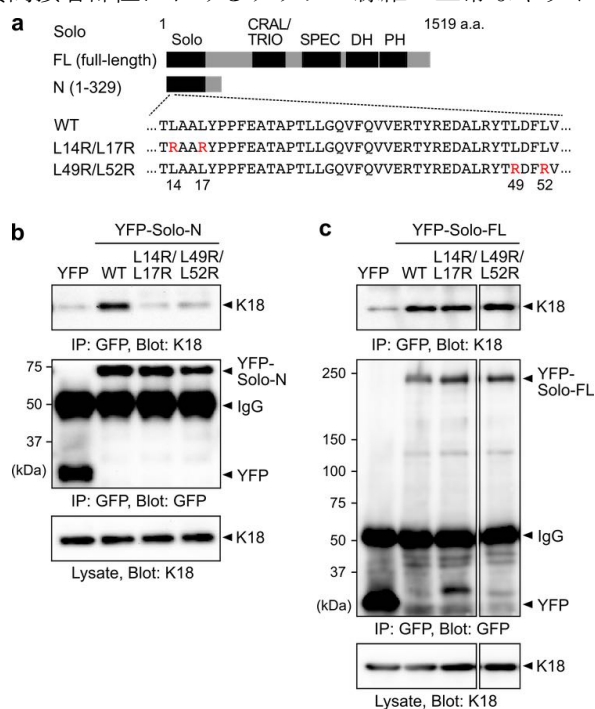


図 1 Solo のケラチン結合能に重要なアミノ酸の同定
a. N 末の保存領域 Solo ドメイン内の連続したロイシン配列 LxxL (L14, L17 もしくは L49, L52)。 b, c. 免疫沈降法による Solo 変異体のケラチン結合能評価。L14R/L17R, L49R/L52R 変異は Solo 全長のケラチン結合能には影響しないが (b)、Solo N 末ドメインのケラチン結合能を欠損させた (c)。

4-5. Solo とケラチン中間径フィラメントの結合の意義

ケラチン結合能を一部欠く Solo の変異体 (研究成果 4-4) の解析を行った。細胞に発現させた際の Solo の局在および細胞骨格の変化を蛍光顕微鏡観察および画像解析により詳細に解析したところ、Solo 野生型で見られるケラチン線維との部分的な共局在が見られず (図 2)、またアクチン骨格の増強能も失っていることが分かった。また Solo 変異体発現細胞では細胞が発する力が低下し、力刺激で誘導されるアクチン骨格の増強も起こらないことを見出した。

本研究により Solo の N 末ドメインのケラチン結合能が Solo の細胞-基質接着面付近への局在と収縮力の発生および細胞骨格再構築に重要であることを解明し (4-4, 4-5)、メカノセンシングの新たな分子機構が明らかとなった。

さらに細胞機能における Solo の役割として、Solo がケラチンに加えて細胞-基質間接着の構成タンパク質と結合すること (4-1)、細胞-基質間接着部位で細胞の収縮力発生部位に局在すること (4-3)、また細胞-基質間接着形成や腺房形成に必要であること (4-2) を新規に解明した。

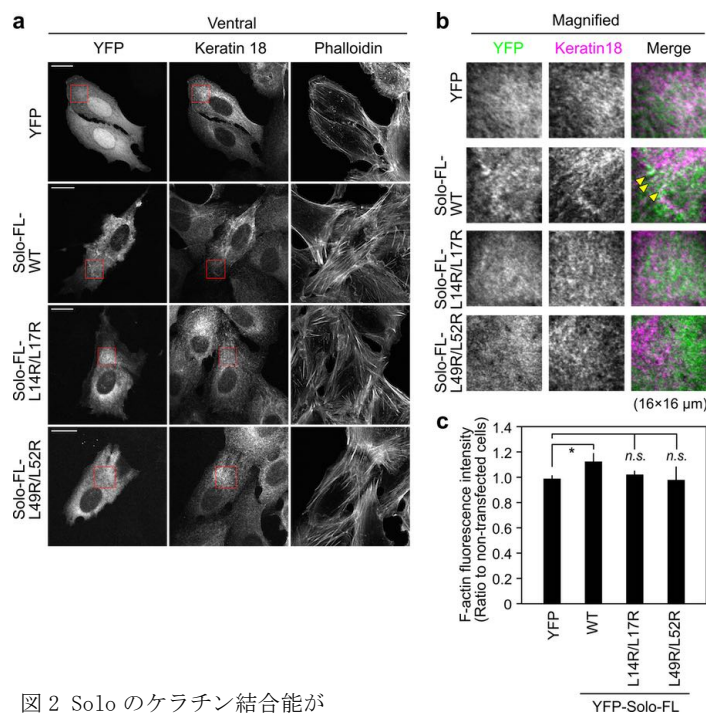


図 2 Solo のケラチン結合能が Solo の局在に及ぼす影響

a. YFP タグを付加した Solo の野生型および変異体の細胞内における局在とケラチンおよびアクチン繊維構造を共焦点顕微鏡により観察した。b. a の赤枠の拡大図。Solo 野生型はケラチン線維との共局在が見られるが (黄矢頭)、Solo 変異体では見られなかった。c. アクチン線維の蛍光強度。Solo 野生型の共発現はアクチン構造を強化させたが、Solo 変異体では見られなかった。

<引用文献>

1. 曾我部正博, 細胞工学, 31, 978-987, 2012
2. Toivola et al., Curr. Opin. Cell Biol. 32C, 73-81, 2015
3. Abiko and Fujiwara et al., J Cell Sci. 128, 1683-1695, 2015
4. Fujiwara et al., Mol Biol Cell. 27, 954-966, 2016

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Sachiko Fujiwara, Tsubasa S. Matsui, Kazumasa Ohashi, Kensaku Mizuno, Shinji Deguchi. Keratin-binding ability of the N-terminal Solo domain of Solo is critical for its function in cellular mechanotransduction. Genes to Cells, 査読有, 2019, 24(5), 390-402
DOI: 10.1111/gtc.12682
- ② Sachiko Fujiwara, Tsubasa S. Matsui, Kazumasa Ohashi, Shinji Deguchi, Kensaku Mizuno. Solo, a RhoA-targeting guanine nucleotide exchange factor, is critical for hemidesmosome formation and acinar development in epithelial cells. PLoS ONE, 査読有, 2018, 13(4): e0195124.
DOI: 10.1371/journal.pone.0195124
- ③ Ryosuke Nishimura, Kagayaki Kato, Sachiko Fujiwara, Kazumasa Ohashi, Kensaku Mizuno. Solo and Keratin Filaments Regulate Epithelial Tubule Morphology. Cell Structure and Function, 査読有, 2018, 43(1), 95-105.
DOI: 10.1247/csf.18010
- ④ Sachiko Fujiwara, Kensaku Mizuno
Role of Intermediate Filaments in Cell Locomotion. eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 査読無, 2017, 1-9
DOI: 10.1002/9780470015902.a0026365

[学会発表] (計 11 件)

- ① Sachiko Fujiwara, Hiyori Abiko, Tsubasa S. Matsui, Kazumasa Ohashi, Kensaku Mizuno, Shinji Deguchi. Rho-signaling plays crucial roles for cellular mechanotransduction and regulates actin and intermediate filament. 2018 World Congress of Biomechanics (国際学会), 2018 年
- ② Sachiko Fujiwara, Tsubasa S. Matsui, Kazumasa Ohashi, Kensaku Mizuno, Shinji Deguchi, Hemidesmosomal cell-substrate adhesion and aciner morphogenesis of epithelial cells are organized by Rho-signaling through mechanotransduction. 2018 World Congress of Biomechanics (国際学会), 2018 年
- ③ Sachiko Fujiwara, Tsubasa S. Matsui, Kazumasa Ohashi, Thomas M. Magin, Kensaku Mizuno, Shinji Deguchi, Rho-signaling organizes hemidesmosomal cell-substrate adhesion and acinar morphogenesis of epithelial cells through controlling mechanotransduction. DGZ 2018 (International Meeting of the German Society for Cell Biology) (国際学会), 2018 年
- ④ 磯崎友亮、藤原佐知子、水野健作、大橋一正. RhoA-GEF の Solo は上皮細胞集団移動の速度を制御する. 第 91 回日本生化学会大会, 2018 年
- ⑤ 磯崎友亮、酒井高輝、藤原佐知子、水野健作、大橋一正. 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. 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年
- ⑥ 藤原佐知子、松井翼、大橋一正、Thomas Magin、水野健作、出口真次. Physiological roles of Rho-GEF Solo in mechanotransduction and hemidesmosomal cell-substrate adhesion in epithelial cells. 第 91 回日本生化学会大会, 2018 年
- ⑦ 藤原佐知子、松井翼、大橋一正、Thomas Magin、水野健作、出口真次. 細胞収縮力の発生と上皮腺房形成における細胞内 Rho シグナルの制御機構と生理機能. 日本機械学会 第 31 回バイオエンジニアリング講演会, 2018 年
- ⑧ 磯崎友亮、藤原佐知子、水野健作、大橋一正. 力覚応答に関与する RhoGEF, Solo の上皮細胞の集団移動における機能解析. 第 83 回日本生化学会東北支部例会, 2017 年
- ⑨ 藤原佐知子、勝野真美、大橋一正、水野健作. 上皮細胞の細胞-基質間接着と腺房形成における Rho-GEF Solo の機能. 第 69 回日本細胞生物学会大会, 2017 年
- ⑩ 西村亮祐、加藤輝、藤原佐知子、大橋一正、水野健作. Solo はミオシン II を介して上皮管腔の形態を制御する. 第 69 回日本細胞生物学会大会, 2017 年
- ⑪ 藤原佐知子、松井翼、出口真次、水野健作. Rho-GEF Solo は細胞-基質間接着における力覚応答に関与し上皮腺房形成を制御する. 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会, 2017 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

大阪大学大学院 基礎工学研究科 出口研究室ホームページ

<http://mbm.me.es.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

- (1) 研究分担者: なし
- (2) 研究協力者: なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。