

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19934

研究課題名(和文)細胞の力学応答極性に寄与する局所翻訳制御機構の立証

研究課題名(英文)Verification of local translational mechanism contributing to polarized cellular mechano-responses

研究代表者

坂元 尚哉(SAKAMOTO, NAOYA)

首都大学東京・システムデザイン研究科・准教授

研究者番号：20361115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、接着基質の繰り返し伸展刺激に対する極性を有した細胞形態変化において、細胞核の力学特性と局所的なタンパク質合成プロセスとの関係を検討した。細胞核内RNA合成分布および細胞内タンパク質産生分布と細胞核力学特性との明確な関係は得られなかったものの、細胞骨格の一つであるアクチンフィラメントと細胞核との結合が細胞の形態変化、また細胞核力学特性の経時的変化に対しても重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

力学環境に対する細胞応答は身体の生理機能維持や病理に深く関与することが知られている。細胞の力学環境への応答メカニズムにおいて、細胞外部の力学環境情報の細胞核への伝達および細胞核の変形が重要な役割を担うとして注目されている。力学特性は変形に極めて密接にかかわる物性であり、本研究結果は、アクチンフィラメントを介した細胞核への力学刺激伝達、さらに伝達された力学刺激によって細胞核自身の力学特性およびそれに伴う変形が経時的に変化することを意味しており、細胞応答メカニズムの解明に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study explored the role of the relationship between the nuclear mechanical properties and the local protein synthesis in the polarized morphological changes of cells induced by substrate cyclic stretching. We did not find any detectable interactions between the nuclear mechanical properties and the distributions of intranuclear RNA and intracellular protein syntheses. However, our results indicate that the bindings of actin filaments, one of the cytoskeletons, to the nucleus play important roles in the formation of polarized shapes of cells and the time course changes of intranuclear mechanical properties under cyclic stretching condition.

研究分野：メカノバイオロジー

キーワード：生物・生体工学 メカノバイオロジー 細胞バイオメカニクス 細胞骨格 細胞核

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の多くは力学刺激を感知して形態的・機能的応答（力学応答）を示す。力学応答は、発生過程における細胞分化・組織形成、生理機能の維持、さらに様々な病理にも重要な役割を担っており、そのメカニズム解明が求められている。力学応答プロセスにおいて、力学刺激の方向や大きさの感知および生化学的シグナルへの変換を行うメカノトランスダクション機構が根幹的役割を担うと考えられている。しかし、細胞核—細胞骨格結合を抑制した細胞に力学刺激を負荷すると、刺激方向の感知は維持されるものの、方向性（極性）を有した形態変化のみが低下する現象が報告されている[1]。従来のメカノトランスダクション機構だけではこの現象を説明できず、力学応答の統合的理解には、応答プロセスに対する力学刺激の影響を新たに見出す必要性を強く示唆している。

刺激を感知した細胞内では、生化学シグナルに応じた遺伝子発現変化に基づき、タンパク質合成（翻訳）が生じる。翻訳には細胞内全体で生じるものに加えて細胞内局所性も存在し、局所的な翻訳は細胞の極性を持った応答に関わることも知られており[2, 3]、この局所的な翻訳も細胞力学応答に寄与する可能性が考えられ、これを明らかにするためには細胞内局所の力学的状態と局所翻訳双方を組み合わせて評価する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では局所翻訳プロセスにおいて細胞内および細胞核内の力学的要因が影響を与えるという仮説を立て、細胞力学環境計測とタンパク質合成との関係を検証した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養およびタンパク質発現抑制

ヒト皮膚線維芽細胞および HeLa 細胞を実験に用いた導入試薬を用いて、線維芽細胞に対し siRNA を導入し、Nesprin-1 もしくは Nesprin-2 の発現抑制を行った。免疫蛍光染色により Nesprin の発現抑制を予め確認した。また、細胞骨格の一つアクチンフィラメントの影響を検討する際には、アクチンフィラメント重合阻害薬 Cytochalasin D で予め細胞を処理した。

(2) 細胞内力学環境計測

力学刺激に対する応答を検討するため、ストレッチチャンバ (Strex) に播種した細胞に対して 10%ひずみ、1Hz の単軸繰り返し伸展刺激を負荷した。

伸展に伴う細胞核内ひずみ分布計測の際には、ストレッチチャンバ内で予め Hoechst33342 で細胞核を蛍光標識した細胞に 10%ひずみを負荷し、負荷前後の細胞核蛍光画像を取得した (図 1)。MATLAB を用いた画像相関により細胞核変形前後の画像から相対変位を求め、相当ひずみを算出した。

局所力学特性を評価するため、ピペットプラーを用いて作製した先端外径約 1 マイクロメートルのガラスキャピラリーを顕微鏡ステージ上で細胞に刺入し、細胞核内部に微小蛍光ビーズを導入した。導入したビーズの連続画像を撮影し、その熱振動挙動から局所動的弾性特性を算出した。

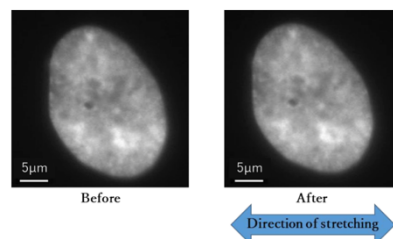


図 1 伸展前 (左) および伸展後 (右) の細胞核蛍光画像

(3) 細胞イメージング

細胞を 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定し、細胞核およびアクチンフィラメントを蛍光標識した。倒立型蛍光顕微鏡を用いて取得した蛍光画像から画像解析ソフト ImageJ (National Institutes of Health) を用いて細胞の形態評価を行った。

Click-iT RNA AlexaFluor 488 Imaging Kit および Protein Synthesis Assay Kit (ThermoFisher Scientific) を用いた蛍光標識によって一定時間内に新たに合成された RNA およびタンパク質の可視化をそれぞれ行った。ウリジンアナログである 5-ethynyl uridine (EU) を培養細胞の培養液に添加することで、新たに合成される RNA に EU を付与し、抗体により EU を検出することで RNA 合成量を検出した。またメチオニンアナログである L-ホモプロピルギルグリシンを細胞に取り込ませ、蛍光標識することで新たに合成されたタンパク質 (新生タンパク質) を検出した。

4. 研究成果

(1) 細胞核—アクチンフィラメント結合を抑制した細胞の形態変化

siRNA 処理により Nesprin-2 を発現抑制した線維芽細胞に繰り返し伸展刺激を負荷した結果、野生型群同様に負荷 1 時間で一旦収縮した形状を示した。その後負荷 24 時間で両群ともに、伸展刺激方向に対して直交方向への再配向を示した。しかし、野生型細胞群に比べ Nesprin-2 発現抑制細胞では形態変化時の細胞伸長の低下が観察された。本変化はこれまでに調べた Nesprin-1 を発現抑制した細胞と同じ変化であり、これらの結果から細胞核とアクチンフィラメント結合が繰り返し伸展刺激に対する極性を有した細胞形態に重要な役割を持つことが示唆された。

(2) 繰り返し伸展刺激による細胞核内ひずみの分布・極性変化

細胞核を予め蛍光染色した HeLa 細胞に対して繰り返し伸展刺激を 15 分間加えた後、さらに 15 分間静置培養した。刺激負荷前後および静置培養後の細胞に対して、接着基質伸展によって細胞核に生じる変形量を求め、ミーゼス相当ひずみを算出した。繰り返し伸展刺激負荷前は細胞核の辺縁部に比べ中心部で高いひずみが生じたが、伸展刺激負荷後辺縁部でのひずみに増加傾向が見られ、細胞核全体のひずみも増加した (図 2)。静置培養後は伸展刺激負荷前と同様のひずみ分布に回復した。細胞への力学的刺激負荷により細胞核全体のみならず局所ひずみ分布も経時的に変化することが明らかになった。また、アクチンフィラメント重合阻害処理により、繰り返し伸展刺激負荷による細胞全体および局所ひずみの変化が消失したことから、アクチンフィラメントが繰り返しの力学刺激による細胞核内ひずみ変化に重要な役割を有することが示唆された。一方で、細胞核内のひずみ分布と細胞核形状との関係を検討した結果、伸展刺激負荷前および後においてもひずみ分布に顕著な極性は見られなかった。

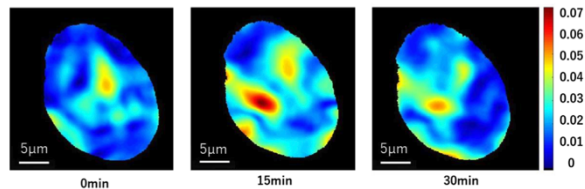


図 2 細胞核内相当ひずみ分布

(3) 細胞核内局所力学特性分布評価

HeLa 細胞核内部に、蛍光マイクロビーズをマイクロインジェクションによって導入した。細胞核内に導入されたビーズの変位は 100 nm 四方程度の領域内で生じた。ビーズの平均二乗変位から算出した貯蔵弾性率 $G'(\omega)$ 、損失弾性率 $G''(\omega)$ は $\omega = 1$ [1/s] においてそれぞれ $G' = 0.1 \sim 16$ Pa, $G'' = 0.1 \sim 6$ Pa の範囲の値であった。本研究ではさらに、導入した蛍光ビーズの細胞核内位置と細胞核内局所力学特性との関係性を評価した。蛍光ビーズの細胞核内位置を細胞核重心から細胞核辺縁部までの距離で規格化した結果、細胞核の中心部から辺縁部に向かに従い G' 、 G'' がそれぞれ増加する傾向が得られた。また、DNA 染色蛍光輝度を基に評価したビーズ周囲の DNA 凝集密度と力学特性との相関が得られた。しかし、細胞核および細胞の伸長方向と局所力学特性分布に明らかな関係は認められなかった。

(4) 合成 RNA およびタンパク質の合成量および局在性の変化

細胞内 RNA を蛍光標識することで、繰り返し伸展刺激を負荷した細胞内における RNA の局在性および合成量変化の評価を試みた。蛍光標識された RNA はほぼ細胞核内で観察され、細胞質内での局在は観察されなかった。細胞核内部で観察された RNA の蛍光輝度分布に核内位置との顕著な相関は見られなかった。繰り返し伸展刺激を負荷した細胞で経時的変化を調べた結果、刺激負荷 1 時間で、細胞核内の RNA 蛍光の減少傾向、2 4 時間の地には回復傾向がそれぞれ見られ、RNA 合成そのものに伸展刺激負荷の影響が示唆された。核膜タンパク質の一つである Nesprin-1 を発現抑制した細胞においても、伸展刺激負荷時に同様な RNA 合成の変化傾向が観察され、細胞骨格であるアクチンフィラメントを介した力学刺激伝達の影響は確認されなかった。

同様に、細胞内で新たに作成されたタンパク質 (新生タンパク質) を蛍光標識することで、繰り返し伸展刺激を負荷した細胞内におけるタンパク質産生局在性も評価した。蛍光標識された新生タンパク質はほぼ細胞内全体で観察され、細胞形態との顕著な相関は認められなかった。繰り返し伸展刺激を負荷し、伸展方向に対して垂直方向に配向した細胞においても同様に新生タンパク質の細胞内分布の局在性は見られなかった。

繰り返し伸展刺激による RNA 蛍光の減少傾向と、(2) で得られた細胞核ひずみ分布の変化には何らかの関係が存在することが考えられる。本研究において、細胞力学特性の極性とタンパク質産生との関係に明確な関係は認められなかったものの、細胞核の変形特性と RNA 合成との関係、さらにアクチンフィラメントを介した力学刺激伝達の関与は未だ明らかになっておらず、今後さらに調べる必要があると考えられる。

<引用文献>

- [1] Sakamoto et al, *Cell Mol Bioeng*, 2017
- [2] Wu, et al, *Nature*, 2005
- [3] Bseese and Ephrussi, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 N. Sakamoto, M. Ogawa, K. Sadamoto, M. Takeuchi, N. Kataoka
2. 発表標題 Mechanical conditions of nesprin-mediated nucleus-actin filament bindings affect polarized elongation of fibroblasts induced by cyclic stretching
3. 学会等名 8th World Congress of Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村 俊, 三好 洋美, 伊井 仁志, 坂元 尚哉
2. 発表標題 パーティクルトラッキング法による細胞核内局所力学特性の評価
3. 学会等名 日本機械学会第29回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 香嶋 謙志郎, 竹内 雅貴, 片岡 則之, 坂元 尚哉
2. 発表標題 繰り返し伸張刺激による繊維芽細胞核の弾性特性変化における核膜タンパク質の役割
3. 学会等名 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大山 侑樹, 中村匡徳, 木村直行, 坂元 尚哉
2. 発表標題 超高壁せん断応力による血管内皮細胞のMMPおよびeNOS産生の変化
3. 学会等名 日本機械学会2018年度年次大会
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 S. Tsukamoto, S., Kimura, N. Takesue, N. Sakamoto
2 . 発表標題 Condensation Level of Chromatin Affects Local Strain within the Nucleus under Mechanical Stimuli
3 . 学会等名 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 S. Ii, K. Ito, N. Takakusaki, N. Sakamoto
2 . 発表標題 Inverse Estimation of 3-D Traction Stress Field of Adhered Cell based on Optimal Control Technique using Image Intensities
3 . 学会等名 International Conference on Biomechanics and Medical Engineering (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 S. Tsukamoto, S. Kimura, N. Takesue, N. Sakamoto
2 . 発表標題 Heterogeneous strain distribution within the nucleus under substrate stretching is caused by chromatin condensation
3 . 学会等名 2019 BMES Annual Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 N. Sakamoto, K. Kashima, M. Takeuchi, N. Kataoka
2 . 発表標題 Roles of nuclear membrane proteins in cyclic stretch-induced changes of nuclear elasticity of fibroblasts
3 . 学会等名 2019 BMES Annual Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤佳祐, 伊井仁志, Daniel Conway, 坂元尚哉
2. 発表標題 接着基質力学特性の違いによって引き起こされる細胞内張力の変化
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Miyano, A. Suzuki, N. Sakamoto
2. 発表標題 Effects of the hyperosmolarity-induced cytoskeletal changes of tubule epithelial cells on renal fibrosis
3. 学会等名 TMU International Symposium: Multi-scale biomechanics, nano-to macro-scale (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Mechanobiology Laboratoryのホームページ http://www.comp.sd.tmu.ac.jp/mechanobio/index.html</p>
--

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