

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06652

研究課題名(和文)メカノセンシングに必要なRho-GEF、Soloによる特異なアクチン骨格制御機構

研究課題名(英文)The actin-regulatory manner of Solo, a Rho-GEF involved in mechanosensing.

研究代表者

山下 和成 (Yamashita, Kazunari)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70589481

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)：細胞は物理刺激により多様な制御を受けることがわかってきている。Soloは細胞の力覚応答に関わるアクチン制御タンパク質(RhoA-GEF)であることが示唆されている。Soloは細胞膜上に特徴的な顆粒状の局在をするのだが、この顆粒が何で形成されているのかを解明することを研究目的とした。BioIDという方法を用いてSoloの近傍にある分子を同定することを試み、いくつかのタンパク質を同定した。その中の一つに、モータータンパクであるミオシンファミリー蛋白質の一つを同定することができた。今後、これら候補分子の中で、Soloと共局在する分子を探索していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、物理刺激(メカニカルストレス)によって細胞内にシグナル伝達が惹起されることが明らかになっており、力覚応答(メカノセンシング)機構の解明は細胞の応答を知る上で重要な課題になっている。アクチン細胞骨格の一種であるストレスファイバーは、細胞の形態変化に働くと共に、細胞外基質の硬さ認識に必須な構造であることがわかっている。Soloはストレスファイバー形成を促進することがわかっているが、その機能発揮機構はいまだに謎が多い。本研究はSoloの細胞膜上での挙動を知ることで、ストレスファイバー形成の時空間的制御機構の解明に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Recent studies revealed that various cellular processes are regulated by mechanical stress. Solo is a RhoA-GEF, which regulates actin cytoskeleton. It is also suggested that Solo is involved in mechanosensing. Solo localized to the plasma membrane as small puncta. In this study, we analyzed the components of the puncta. Using BioID, the proteins that localized adjacent to Solo was identified. These contains interesting proteins such as myosin-family proteins, which are involved in actin contraction and vesicle transport. Future study needs to reveal if these factors localize with Solo.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Solo RhoA-GEF メカノセンシング メカノバイオロジー アクチン骨格制御

1. 研究開始当初の背景

細胞の挙動を司るシグナル伝達は、液性因子などのシグナル伝達物質が惹起すると考えられてきたが、近年、物理的刺激(メカニカルストレス)によってもシグナル伝達が惹起されて細胞が制御されることが明らかにされており、力覚応答(メカノセンシング)機構の解明が求められている。アクチンが作る骨格であるストレスファイバーは、その収縮力によって細胞の形態変形に働くと共に、細胞外基質の硬さを認識して細胞の増殖・分化を制御する、メカノセンシングの中核を担う構造体である。ストレスファイバーはほとんどの細胞生物学の教科書にて解説される構造であるが、その形成過程や機能発揮にはいまだに謎が多い。アクチンの収縮には、「RhoA-GEF による RhoA の活性化」「ROCK の活性化」「ミオシン軽鎖のリン酸化」の経路が必要である。ストレスファイバーの両端は接着斑(Focal Adhesion)によって細胞外基質に繋ぎとめられており、接着斑には GEF-H1 という RhoA-GEF が局在することがわかっている(Huang IH, et.al. J Cell Science, 2014)。しかし、ストレスファイバー中腹部の収縮機構はいまだ不明である。

以下に示す実験結果により、Solo という因子が、上述のストレスファイバー中腹部での RhoA 活性化に働く GEF (Guanine nucleotide exchange factor) の有力な候補であると考えている。シリコン膜上で培養した血管内皮細胞に継続的に伸展刺激を与えると、伸展方向に対して直交するようにストレスファイバーが整列する。このメカノストレスに応答してストレスファイバーが整列する現象に必要な Rho-GEF として、RNAi スクリーニングによって Solo が同定された。Pull down assay により Solo は RhoA の GEF であることがわかり、また、Solo の強制発現により細胞内でのストレスファイバー形成が促進されることがわかった(Abiko H, et.al. J Cell Science, 2015)。

2. 研究の目的

Solo は細胞膜上に顆粒状の局在を示す。顆粒のサイズを考慮すると、Solo は細胞膜上にある何かしらのマイクロドメインのような構造に集積していることが示唆される。この、Solo 集積マイクロドメイン(仮称)が集中している領域では、ストレスファイバーが過剰に発達していることがわかった。このマイクロドメインは接着斑とも一致せず、F-Actin 繊維の位置とも完全には一致しない、未知の細胞内構造であることが示唆された。Solo 集積マイクロドメインは何かしらのシグナル(機械的刺激を含む)に応じて形成され、ストレスファイバーの中腹部付近に活性型 RhoA を提供する領域を作り出す新規細胞内構造である可能性がある。Solo 集積マイクロドメインは何で構成され、何に規定されて局在するのか? その性状を明らかにすることを本研究の主たる目的とした。

3. 研究の方法

非特異的ビオチン化酵素 BirA を Solo と融合して細胞に発現させ、Solo の近傍約 20nm の範囲にある分子をビオチン化によってラベルし、これら分子をストレプトアビジンビーズで精製する BioID という方法を用いて Solo の周辺に存在する分子を同定することを試みた。2018 年に発表された BirA の高活性変異体である TurboID を導入し、また、ストレプトアビジンの代わりにタマジンを用いてビオチン溶出を可能にすることでビオチン化タンパク精製の純度を高める工夫をした。

また、Flag や SBP などのタグを付けた Solo を培養細胞に安定発現させて、これを免疫沈降等で精製し、精製物を SDS-PAGE や LC で分離して質量分析を行うことで、Solo 結合タンパクを同定することも試みる。

4. 研究成果

(1) TurboID 融合 Solo 発現細胞の樹立

非特異的ビオチン化酵素 BirA を Solo と融合して細胞に安定発現させ、Solo の近傍にある分子をビオチン化によってラベルし、これら分子をストレプトアビジンビーズで精製する BioID 法を用いて Solo 集積マイクロドメインの構成因子を同定することを試みた。今回は、BirA の高活性変異体である TurboID を用い、puromycin 耐性遺伝子を持った V5-TurboID-Solo 発現ベクターを構築し、ヒト大腸癌細胞である DLD-1 細胞に安定発現させた。タンパク質の発現は V5 抗体によるウェスタンブロットや免疫蛍光染色で確認した。

(2) BioID による Solo 近傍局在タンパク質候補の同定

上述のように樹立した細胞にビオチンを加えて培養し、その細胞から Lysate を調整し、タマビジンビーズを用いることでビオチン化されたタンパク質を精製した。精製したタンパク質は SDS-page で展開し、質量分析に対応した銀染色法によってタンパク質によるバンドを可視化した。ネガティブコントロールとして通常の DLD-1 細胞や Solo が無い V5-TurboID のみを発現させた DLD-1 細胞を用意していたが、これらからの精製タンパク質を泳動したレーンにはバンドが無く、V5-TurboID-Solo を発現した DLD-1 由来の精製タンパク質を泳動したレーンに特異的に表れたバンドに関してはバンドを切り出し、脱染色、Trypsin 消化し、MALDI-TOF 質量分析によって解析した。質量分析の結果、いくつかのタンパク質が同定されたが、その中でもモータータンパク質であるミオシンファミリー蛋白質の一つを同定することができた。ミオシンファミリー分子は小胞輸送やアクチンの収縮と関係することが多いので着目した。Flag-tag を付加した Solo と、Halo-tag を付加したこのミオシン分子の発現ベクターをそれぞれ作成し、これらを MDCK 細胞に共発現させて蛍光抗体染色を行った。このミオシン分子は細胞膜に局在したが、Solo の顆粒状構造との共局在は認められなかった。今後は BioID で同定された他の因子や、Solo と相互作用する候補因子の Solo との共局在を調べていく予定である。

(3) Solo に結合するタンパク質の探索

Solo と物理的に相互作用する (結合する) タンパク質を同定することで、Solo が局在する細胞膜上ドメインの性質を解明することができるかもしれない。このために、Flag-SBP-Solo を発現するプラスミドベクターを作成した。SBP は streptavidin binding protein であり、ストレプトアビジンビーズにより精製することができる。Flag-tag も抗 Flag 抗体で精製して Flag peptide で溶出可能なので、Flag-SBP はタンデム精製タグとして用いることができ、高純度のタンパク質精製が可能になる。Flag-SBP-Solo を安定発現させた MDCK 細胞を樹立した。今後は質量分析により、Solo 結合タンパク質を同定する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Isozaki Yusuke, Sakai Kouki, Kohiro Kenta, Kagoshima Katsuhiko, Iwamura Yuma, Sato Hironori, Rindner Daniel, Fujiwara Sachiko, Yamashita Kazunari, Mizuno Kensaku, Ohashi Kazumasa	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 Molecular Biology of the 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 Ninomiya Komaki, Ohta Kai, Yamashita Kazunari, Mizuno Kensaku, Ohashi Kazumasa	4. 巻 134
2. 論文標題 PLEKHG4B enables actin cytoskeletal remodeling during epithelial cell-cell junction formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs249078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.249078	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 山下 和成, 磯崎 友亮, 鹿子嶋 克彦, 國富 葵, 大橋 一正	4. 巻 51(13)
2. 論文標題 細胞の力覚応答におけるRho-GEFの機能	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 687 ~ 690
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 無
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 二宮 小牧, 太田 海, 山下 和成, 水野 健作, 大橋 一正
2. 発表標題 上皮細胞のアクチン骨格制御と細胞間接着形成におけるRho-GEF, PLEKHG4Bの機能
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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与する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

〔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