

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19248

研究課題名(和文)細胞に負荷される張力を可視化するテンションセンサープローブの開発

研究課題名(英文)Development of a tension sensor probe to Visualize the tensile force subjected to Cells

研究代表者

大橋 一正(Ohashi, Kazumasa)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：10312539

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究は、細胞に負荷される力を生細胞において可視化する汎用性の高いテンションセンサープローブの開発を目的とした。そのため、張力を受けて立体構造が変化し蛍光を失う蛍光蛋白質の張力センサーを作製すること試みた。蛍光蛋白質VenusのN末端とC末端にランダムな変異を導入した変異体ライブラリーを作製した。その変異体の中から、蛍光を保持しているが構造的に不安定な変異体を、熱安定性を指標に探索した。その結果、10万種類の変異体から5種類の温度感受性変異体を見出した。これらはテンションセンサーとして機能しなかったが、さらに変異体を探索することでテンションセンサープローブを作製できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、張力によって蛍光を失う不安定な蛍光蛋白質を作製し、簡便に細胞に負荷される力を可視化するテンションセンサー蛋白質の開発を目指した。そのため、力が負荷されることが予測されるGFPの部位をランダムに変化させ、その不安定さを温度に対する耐性で測定した。いくつか正常よりも低い温度で蛍光を失う変異体を見つけたことができたが、テンションセンサーとしては機能しなかった。しかし、変異の導入で蛍光蛋白質が不安定になることが明らかになり、今後、目的の蛍光蛋白質の変異体が得られる可能性が示唆された。このセンサーが完成すれば、細胞が力に対して応答する分子機構を解明する重要なツールとなると期待される。

研究成果の概要(英文):The aim of this study was to develop a convenient tension sensor probe to visualize the force applied to cells in real time. Therefore, we tried to develop a tension sensor of a fluorescent protein that changes its conformation under tension and loses its fluorescence. We prepared a library of mutants of Venus, a fluorescent protein, by randomly changing 6 residues of its N- and C-terminal α -sheet and searched for mutants that retain fluorescence activity but are conformationally unstable, with thermostability of fluorescence as an indicator. As a result, five thermosensitive mutants were found out of 100,000 mutants. Although these did not function as tension sensors, it was suggested that tension sensor probes could be created by further searching for mutants.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：テンションセンサープローブ メカノバイオロジー 力覚応答 GFP 細胞間接着

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体は、重力など外環境や生命活動から生じる多様な機械的刺激(メカノストレス)を常に受けており、個々の組織を構成する細胞は、各々の力学的環境に応じて細胞機能を調節している。このようなメカノストレスに対する細胞応答は力覚応答と呼ばれ、形態形成、組織の恒常性の維持など様々な生命活動に必要不可欠である。これはその分子機構の破綻が様々な疾患の原因や増悪因子として働くことを示唆している。そして力覚応答の機構を詳細に理解することは、力学的な環境制御による幹細胞の分化制御や、血管や骨を人工的に構築することを目指す組織工学の分野においても重要であると考えられる。しかし、細胞の力覚応答における力の種類や強さを感じ取る機構、細胞骨格の再構成を担う分子機構など、その詳細は未だ不明な部分が多く残されている。その要因の一つとして、細胞の置かれている力学的環境やその変化を計測するための手法がまだ十分ではないことが挙げられる。細胞に負荷される力負荷分布の変化を測定、可視化する技術としてこれまでに開発されているものの一つは Traction Force Microscopy がある。これは、培養基質として用いるゲル中にマイクロビーズを埋め、ビーズの動きからゲルの歪みを計測する解析手法である。比較的簡便で再現性が良い方法であるが、細胞が基質から受ける力を見るもので、細胞間や細胞内の詳細な変化を追うことは難しい。Fluorescence resonance energy transfer (FRET)は、ドナーとなる蛍光物質がアクセプターの蛍光物質のごく近傍にあると、ドナーの発色団からアクセプターの発色団へ励起エネルギーが電子の共鳴により直接移動し、アクセプターが発光する現象である。これを利用したテンションセンサープローブが開発されている。細胞内で張力が作用することが予想される蛋白質に2つの蛍光蛋白質を連結し、細胞内に負荷される力による FRET の変化を検出することで細胞内に負荷される張力の分布変化を可視化するものである。原理的には、細胞内の様々な部位でリアルタイムの力負荷の変化を検出できる方法であるが、FRET が起こる効率が低いことや、現時点では、波長特性の近い蛍光蛋白質を用いなければならないこと、細胞に作用する幅広い力のレンジに対応できないことなどから簡便に用いることができるプローブではない。これらのことから、通常の高倍率顕微鏡を用いて解析が可能で導入が容易であり、また、幅広い力のレンジに対応するプローブの開発が求められている。そのようなテンションセンサープローブが開発されれば、メカノバイオロジーの研究を越えて大きなブレークスルーを起こすツールになることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、細胞に負荷される力や細胞が発する力を生細胞において簡便に可視化する汎用性の高い方法を開発することを目的とする。そのために、張力を受けて立体構造が変化し蛍光を失う蛍光蛋白質の変異体を作製し、これを張力が負荷されることが知られている細胞間接着分子のカドヘリンに組み込み、細胞間の張力を可視化するテンションセンサープローブを開発する。さらに、幅広い力のレンジに対応したテンションセンサーとなる蛍光蛋白質の変異体の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 黄色蛍光蛋白質Venusの1番目と11番目のβシートのランダム変異体ライブラリーの作製

VenusのN末端側の1本目のβシートの前半部分である11~16残基とC末端側の11本目のβシートの後半部分である223~228残基をランダムな配列のライブラリーを作製するため、各々の部分を欠失したVenusのcDNA断片を作製し、これを鋳型とした。PCRにて変異体のcDNA断片を増幅する際に、プライマーとなる合成オリゴDNAにて、11~16残基又は223~228残基にあたる部分をランダムな配列で付加した。これらをプライマーとして、PCRにてVenus変異体のcDNA断片を増幅し

た。増幅したDNA断片は、大腸菌にてグルタチオン-s-トランスフェラーゼ (GST)蛋白質の融合蛋白質として発現するようにGST融合蛋白質発現用のPGEX6P-1プラスミドに組換えた。これを大腸菌に形質転換してVenus変異体のライブラリーとした。

(2) Venus変異体の温度感受性の検証方法

プラスミドライブラリーによってコロニー形成させた大腸菌を蛍光観察し、蛍光を保持したクローンをステンレス容器に作製した寒天培地に移植して培養した。このステンレス容器をホットプレートに乗せ、ホットプレートが10分間で室温から80℃になるようにプログラムして大腸菌コロニーを加熱した。コントロールとして変異の無いVenusを発現する大腸菌を同じ寒天培地で培養した。GFPに適した励起光をコロニーに照射し、GFPの蛍光フィルターを取り付けたデジタルカメラによってVenusの蛍光を撮影した。この条件で加熱開始から30秒毎のタイムラプス観察を行った。ホットプレートの温度変化は時間に比例していたため、経過時間によってコロニーの温度を推定して解析した。

(3) E-Cadherinをもとにした細胞間接着部位のテンションセンサープローブの作製と検証

温度感受性のVenus変異体をセンサーとする細胞間接着部位の張力センサープローブは、E-Cadherinをベースに作製した。マウスE-Cadherinの738番目と739番目の間にVenus変異体が挿入されるようにVenus変異体のcDNAを組換えた。さらに、C末端に付加するように赤色蛍光蛋白質mCherryのcDNA断片を組換えた。このDNA断片を動物細胞用の発現プラスミドに挿入した。作製したプラスミドは、35 mmガラスボトムディッシュに培養したイヌ腎上皮MDCK細胞にトランスフェクションして発現させた。プローブを発現した細胞を、蛍光倒立顕微鏡上のステージインキュベーターで培養条し、VenusとmCherryの蛍光をタイムラプス観察し、細胞間接着部位における相対輝度の変化を解析した。変異の無いVenusを比較対象とした。

(4) 任意に収縮可能なMDCK細胞の作製と細胞間接着部位への張力負荷実験方法の確立

FK506-binding protein (FKBP)に細胞膜局在化シグナルを付加した蛋白質と、FKBP12-rapamycin associated protein (FRB)に RhoA の GEF である LARG の活性型欠失変異体を融合した蛋白質を共に発現する MDCK 細胞 (収縮細胞) を作製した。さらに、その細胞を視認するため、赤色蛍光蛋白質である TagRFP にアクチン結合配列を付加した TagRFP-Lifeact を発現させた収縮細胞を樹立した。この収縮細胞と親株の MDCK 細胞を混合して 35 mm ガラスボトムディッシュに播種し、倒立顕微鏡のステージインキュベーターにて培養し、ラパマイシンを添加してタイムラプス観察を行った。

4. 研究成果

(1) 黄色蛍光蛋白質Venus変異体ライブラリーの作製

これまでに細胞間接着分子である E-Cadherin を用いて、FRETを原理としたテンションセンサープローブが開発されていることや、細胞間接着部位は輝度を定量しやすいという点から、本研究で開発するテンションセンサープローブも E-Cadherin を用いることにした。蛍光蛋白質は、輝度が高く、赤色蛍光蛋白質と同時に観察が可能なEYFPの改良型である Venus を用いることにした。作製する Venus 変異体は、E-

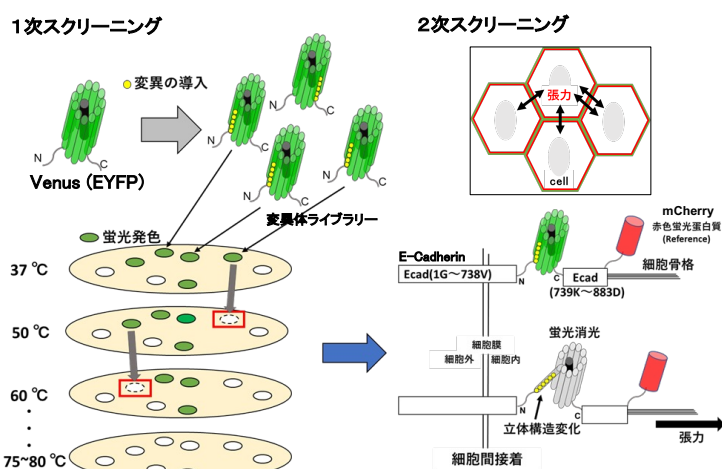


図1. テンションセンサープローブの開発の行程。Venus11G~16L変異体とVenus223F~228G変異体を大腸菌に発現させ、1次スクリーニングとして、蛍光発光の熱に対する安定性の低下したものを探索する。様々な温度の感受性変異体をE-Cadherinの細胞内ドメインに挿入し、また、C末端にmCherryを付加したものをMDCK細胞に発現させ、蛍光タイムラプス解析などでテンションセンサープローブとしての機能を検証する。

CadherinのC末端付近の細胞内領域の途中に挿入する設計にした(図1)。Venusは、11本のβシートが発光団を樽の中に取り囲むように取り囲むβバレル構造をしていることから、1本目または11本目のβシートに最も張力が負荷されると考えた(図1, 図2)。そのため、N末端側の1本目のβシートの前半部分である11~16番目、または、C末端側の11本目のβシートの後半部分である223~228番目をランダムな配列にした(図2)。以降、各々、N末端側の変異体をVenus11G~16L変異体、C末端側のVenus223F~228G変異体と表記する。この変異体は、計算上、各々20の60乗種類存在することから、テンションセンサーとして機能する可能性のあるものをハイスループットでスクリーニングする必要があった。そのため、テンションセンサーとして機能するものは構造として不安定であると予測し、大腸菌にてVenus変異体の熱安定性を指標に一次スクリーニングを行うことにした(図1)。グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)の融合蛋白質としてVenus変異体を発現するプラスミドライブラリーを作製し、このプラスミドライブラリーで大腸菌を形質転換させ、コロニーを作製させた。コロニーで発現したGST-Venus変異体を蛍光観察し、蛍光を持つものを選択した。多くのものは蛍光を失っており、蛍光を保持していても輝度は様々であった(図2)。また、蛍光を保持した変異体も変異部位の配列が変化していることを確認した。蛍光を保持する確率は、11G~16L変異体では約1.6%、223F~228G変異体では約0.7%であった。計算上、蛍光を保持する変異体は、11G~16L変異体で102万種類、223F~228G変異体で47万種類存在することが予測された。

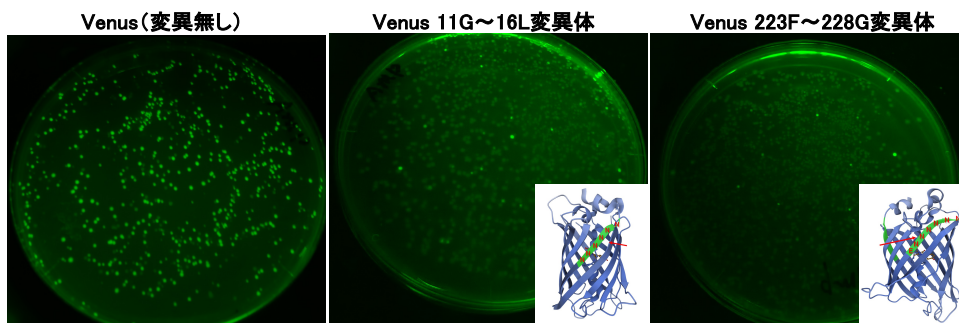


図2. 正常VenusとVenus11G~16L変異体とVenus223F~228G変異体が大腸菌に発現させたコロニーの蛍光像。Venusの立体構造と変異導入部位をVenus11G~16L変異体とVenus223F~228G変異体の右下に示す。明るい点は蛍光発光しているもので、暗いものは、Venusを発現していないものと同等のものである。

(2) Venusの温度感受性変異体のスクリーニング

図1のように、寒天培地にGST-Venus変異体を発現する大腸菌のコロニーを形成させ、蛍光を発するコロニーから大腸菌を採取し、ステンレス容器に作製した寒天培地で培養した。大腸菌が増殖し、Venusの蛍光が十分に観察できるようになってから、容器をホットプレートの上に置いて

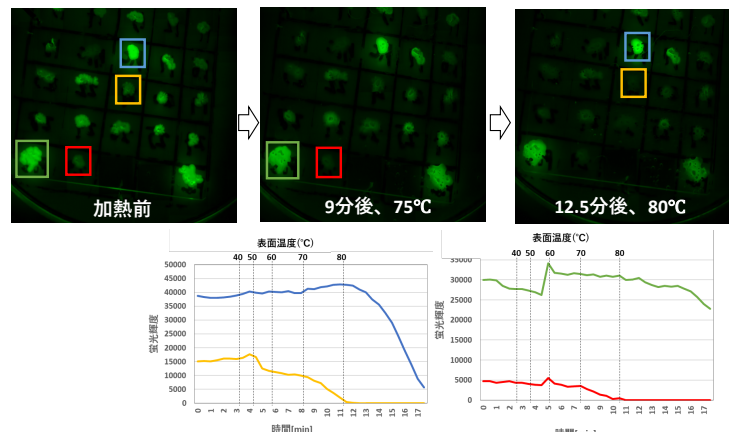


図3. Venus変異体の一次スクリーニング。蛍光を持つ変異体を移植して培養し、ホットプレート上で温度を上昇させた。加熱前と9分後(約75°C)、12分30秒後(約80°C)を示す。緑と青の四角は正常なVenusを発現する大腸菌のコントロール。それ以外のシグナルは変異体である。赤と黄色の四角内のVenus変異体は正常なVenusよりも低温で退色した。下グラフは、四角内の輝度の時間変化を示す。緑と青は正常Venusであり赤と黄色が変異体#1, #9 cloneを示す。ホットプレートの温度を上にした。

温度を上昇させた。その間、デジタルカメラによりVenusの蛍光発光を経時観察でモニターした。比較対象として変異の無いVenusを発現する大腸菌を同時に観察した(図3)。GST-Venusの蛍光は、80℃以上になってから蛍光退色が起こるため、温度の範囲は室温から80℃で行った。Venus11G~16L変異体とVenus223F~228G変異体を各々約5万種類スクリーニングした結果、蛍光を保持していたものは11G~16L変異体で800種、223F~228G変異体で365種であった。そして、GST-Venusより低温で蛍光を失う温度感受性Venusが11G~16L変異体では3種類(#1, #9, #21)、223F~228G変異体では2種類(#26, #29)発見した。それらについて、どの程度の温度で蛍光を失うかを詳細に検討した結果、全て70℃前後で退色する変異体であることが分かった(図3)。

(3) Venusの温度感受性変異体を用いた細胞間テンションセンサープローブの検証

得られた温度感受性変異体のVenusをE-Cadherinの細胞内ドメインに挿入し、C末端に赤色蛍光蛋白質mCherryを付加したテンションセンサープローブ候補を作製した(図1)。

これらをイヌ腎上皮MDCK細胞に発現させて解析を行った。

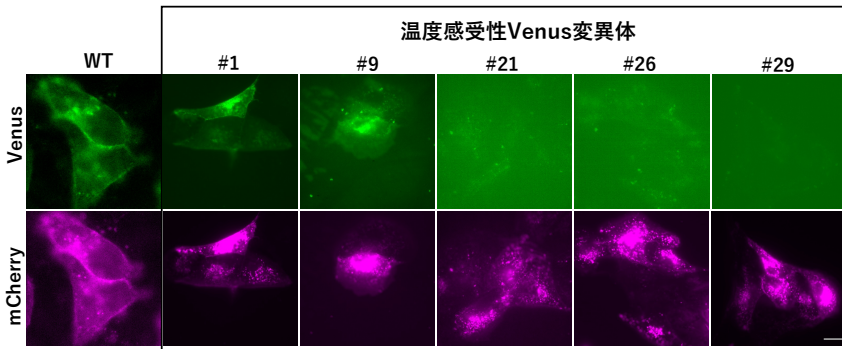


図4. テンションセンサープローブの2次スクリーニング。E-Cadherinの細胞内ドメインに温度感受性Venus変異体を挿入し、C末端にmCherryを付加した蛋白質をMDCK細胞に発現させ、VenusとmCherryの蛍光を生細胞にて観察した。#21, #26, #29は、Venusの蛍光を検出できなかった。スケールバー: 20 μm

その結果、#21, #26, #29はMDCK細胞に発現させた時点で蛍光発光しないことが明らかになった。#1, #9についても、Venusに比べて輝度が低いものであった(図4)。#1, #9のプローブ候補を発現しているMDCK細胞について蛍光タイムラプス観察を行ったところ、細胞間接着部位の形状は動的に変化したことから、部位によって張力が異なることが推測された。そのため、細胞間接着部位におけるVenus変異体の輝度とmCherryの相対輝度の変化を解析したがVenusのmCherryとの相対輝度に大きな変化は見られなかった。しかし、Venus変異体の輝度が非常に低いこと(図3)、温度感受性ではあるが、70℃でも安定なものであることから目的とするテンションセンサープローブとして使うことができないと判断した。Venus変異体のスクリーニングの結果から、βシート内の6残基を変異させても、蛍光発光を維持するものが1%程度残り、また、温度感受性の変異体も存在したことから、より輝度が高く、また、より低い温度で消光する変異体の存在が期待された。そのため、1次スクリーニングを更に大規模に行い、プローブとして機能する可能性が高いものを再度探索する方が良いと判断した。

(4) 細胞に張力を負荷する実験方法の確立

FKBP12-rapamycin associated protein (FRB)がラパマイシンを介してFK506-binding protein (FKBP)と結合する化学誘導二量体化法用い、RhoAのGEFであるLARGの活性型変異体を細胞膜直下でRhoAを活性化して収縮するMDCK細胞を作製していた。これを用いてテンションセンサープローブを発現するMDCK細胞の細胞間接着部位に張力を負荷する方法の確立を行った。しかし、再現精度が低く、定量的な解析が困難であったため条件検討を行った。その結果、収縮細胞を数個程度に少なくした場合、ラパマイシンの添加から20分程度で連続的に面積が約20%程度収縮することが明らかになった。これにより、テンションセンサープローブの検証を行う際に、細胞への張力負荷を行う方法が確立した。

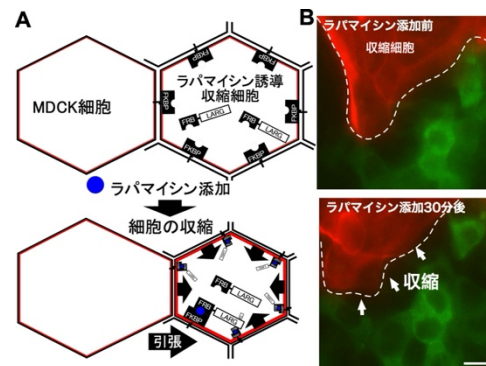


図5. 収縮細胞によるMDCK細胞の引張実験。A. 収縮細胞の作用機序の概要図。B. 収縮細胞(赤)がラパマイシンの添加後30分で点線の位置まで収縮した様子。YFPを発現するMDCK細胞(緑)は細胞間接着を維持し、引張されたと考えられる。スケールバー: 10 μm

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 大橋一正	4. 巻 57
2. 論文標題 力覚応答に関連する低分子量Gタンパク質Rhoファミリーの活性化因子RhoGEF	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本応用酵素協会誌	6. 最初と最後の頁 1-10
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10件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazumasa Ohashi, Aoi Kunitomi, Ukyo Kawasaki, Riku Maruta, Shuhei Chiba, Kensaku Mizuno
2. 発表標題 Functions and molecular mechanisms of Solo, a RhoGEF, in mechanical stress responses
3. 学会等名 International Symposium on Mechanobiology for Human Health: 8 years progress in The AMED-CREST/PRIME project on mechanobiology（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川崎右京, 丸田陸, 小松聖武, 水野健作, 大橋一正
2. 発表標題 力覚応答に関連するSoloの細胞間接着部位への局在にはプラコグロビンが必要である
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國富葵, 佐藤博紀, 東谷なほ子, 東谷篤志, 水野健作, 大橋一正
2. 発表標題 力覚応答に関連するRhoGEF, SoloとPDZ-RhoGEFの相互作用の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二宮小牧, 太田海, 大橋一正, 水野健作
2. 発表標題 Cdc42のGEFであるPLEKHG4Bはカルシウム流入依存的に細胞間接着に局在し、アクチン構築を促す
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村祥太郎, 鈴木充喜, 二宮小牧, 水野健作, 大橋一正
2. 発表標題 間葉系幹細胞の脂肪細胞分化に関するRhoGEFの網羅的探索
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國富葵, 佐藤博紀, 東谷なほ子, 東谷篤志, 水野健作, 大橋一正
2. 発表標題 メカノストレス応答に関する RhoGEF, SoIoのプロテオーム解析による結合タンパク質の同定と機能解析
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川崎右京, 小松聖武, 丸田陸, 水野健作, 大橋一正
2. 発表標題 力覚応答に関する RhoGEF, SoIoの細胞間接着部位への局在機構の解明
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大橋 一正、磯崎 友亮、小野 菜摘、小松 聖武、國富 葵、小廣 健太、鹿子嶋 克彦、水野 健作
2. 発表標題 細胞接着部位を介した力覚応答制御におけるRhoGEF, Solo の機能解析
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二宮 小牧、太田 海、水野 健作、大橋 一正
2. 発表標題 PLEKHG4B による細胞間接着形成過程のアクチン骨格再構築メカニズム
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國富 葵、佐藤 博紀、東谷 なほ子、東谷 篤志、水野 健作、大橋 一正
2. 発表標題 力覚応答機構に関するRhoGEF, Soloの相互作用タンパク質の同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/ts_oohashi/ 分子細胞生物分野 大橋研究室 https://konagata.wixsite.com/ohashi-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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------