

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370051

研究課題名(和文) 力学的刺激による Rhoファミリーの活性化とアクチン骨格制御機構

研究課題名(英文) Mechanisms of mechanical force-induced Rho family activation and actin cytoskeletal reorganization

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) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：Rhoファミリーは力学的刺激によるアクチン骨格再編成を制御するが、力学的刺激によるRhoファミリーの活性化機構は不明である。本研究では、shRNAライブラリーを用いて、力覚応答に関与するRhoファミリー活性化因子(Rho-GEF)を探索し、血管内皮細胞の繰返し伸展刺激による細胞再配向に関わる11種のRho-GEFを同定した。この中で、Soloはカドヘリン依存的な細胞間接着からの力学刺激によるRhoAの活性化と細胞配向に主に寄与することが明らかになった。また、細胞外基質の硬さ依存的な形質転換に関わるRho-GEFとして同定したFarp1が細胞接着、増殖、形態形成の促進に関与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Rho family GTPases are crucial for mechanical force-induced actin cytoskeletal reorganization; however, the mechanism underlying force-induced activation of Rho family GTPases is unknown. A screen of short-hairpin RNAs targeting 63 Rho-guanine nucleotide exchange factors (Rho-GEFs) revealed that at least 11 Rho-GEFs are involved in cyclic-stretch-induced reorientation of vascular endothelial cells. Among 11 Rho-GEFs, Solo is involved in cell-cell-adhesion- and cadherin-mediated mechanical force-induced RhoA activation and reorientation of endothelial cells. We also identified at least 5 Rho-GEFs that are involved in extracellular matrix (ECM) stiffness-induced transformation of MCF-10A human breast epithelial cells cultured in 3D ECM conditions. Among them, Farp1 binds to integrins and plays a critical role in cell adhesion, proliferation, and morphogenesis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞・組織 細胞骨格 Rho メカニカルストレス アクチン

1. 研究開始当初の背景

胚発生、器官形成、血管形成、組織再生などの組織構築過程において、力学的刺激に対する細胞応答は重要な役割を果たしており、その応答不全は器官形成不全、循環器疾患、癌転移能の亢進等多くの疾患と密接に関与している。細胞は外界からの力学的刺激にตอบสนองして、その形態、極性、接着性、運動能、増殖能を変化させる。例えば、血管内皮細胞は拍動による繰返し伸展刺激や血流によるずり応力を受けており、これらにตอบสนองしてアクチン骨格の再編成が起こり、細胞の配向性、運動性、増殖能の変化が誘導される。また、上皮細胞は通常の3次元培養下では内腔をもつ嚢胞(シスト)や管腔等の秩序化された組織を形成するが、細胞外基質の硬さの増加にตอบสนองして極性・接着性の低下と運動能・増殖能の上昇が誘導され、脱組織化、脱秩序化した細胞コロニーの形成や上皮-間葉転換がもたらされる。これらの例に見られるように、力学的刺激による細胞応答は組織の形成・維持において重要な役割を担っているが、化学シグナルの受容・伝達機構の理解の進展に比較して、物理的な力シグナルの受容・伝達機構については不明の点が多く残されており、今後解明すべき重要な課題である。

2. 研究の目的

細胞は力学的刺激にตอบสนองして、形態、極性、接着性、運動能、増殖能を大きく変化させるが、力学的シグナルを受容し化学シグナルに変換するメカノトランスダクションの分子機構の多くは不明である。Rhoファミリーは、アクチン骨格の再編成を誘導し、力学的刺激依存性の細胞応答を制御する中心的役割を担っていると考えられるが、力学的刺激がいかにして受容され、Rhoファミリーの活性化へと変換・伝達されるのか、その機構は不明である。本研究では、血管内皮細胞の繰返し伸展刺激による細胞とストレスファイバー

の再配向(図1)、3次元培養下における上皮細胞の細胞外基質の硬さの増加によるシスト形成の脱組織化(図2)を力学的刺激応答のモデル系として用い、力学的刺激依存性のRhoファミリーの活性化に関わるRho-GEFを同定し、力学的刺激の受容・伝達の分子機構を解明するとともに、力学的刺激によるアクチン骨格再編成の制御機構を解明することを目的とする。

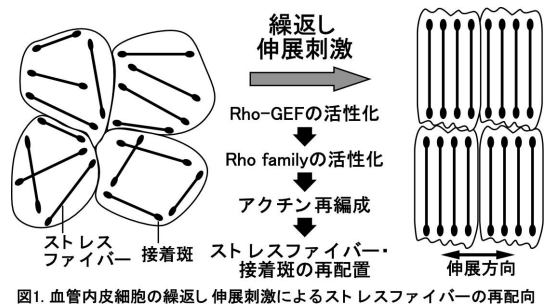


図1. 血管内皮細胞の繰返し伸展刺激によるストレスファイバーの再配向

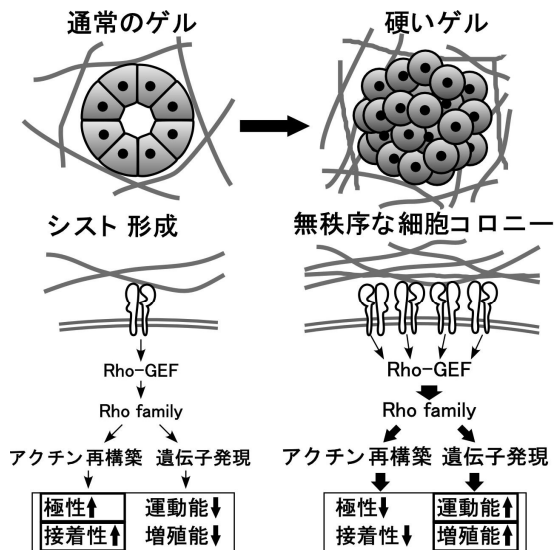


図2. 3次元培養下における上皮細胞の細胞外基質の硬さ依存性のシスト形成の脱組織化

3. 研究の方法

本研究では、力学的刺激依存性のRho-GEF及びRhoファミリーの活性化機構、及びアクチン骨格再編成の時空間的制御機構を解明するため、2つの力刺激依存性の細胞応答のモデル系、(1)血管内皮細胞の繰返し伸展刺激による細胞とストレスファイバーの再配向(図1)、(2)上皮細胞のシスト形成における細胞外基質の硬さ依存性の脱組織化(図2)、

を用いて解析した。2つのモデル系において、Rho-GEF の shRNA ライブラリーを用いて網羅的な発現抑制解析を行い、力刺激応答に関わる Rho-GEF を同定した。同定した Rho-GEF の標的となる Rho ファミリーの同定、力学的刺激依存的な Rho-GEF の活性、局在、結合蛋白質、アクチン骨格動態を解析し、力学的刺激依存的な Rho-GEF 及び Rho ファミリーの活性化の分子機構を解明した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 血管内皮細胞の繰り返し伸展刺激依存的な再配向に関わる Rho-GEF の同定と機能：

血管内皮細胞は血圧、血流、心拍動によるメカニカルストレスに曝されており、これらの力学的刺激に適切に応答することによって血管機能の動的秩序が維持されている。血管内皮細胞に繰り返し伸展刺激を与えると、Rho ファミリーの活性化を介して、細胞の長軸とアクチンストレスファイバーが伸展方向と垂直に配向する(図1)。本研究では、Rho ファミリーの活性化因子である GTP-GDP 交換因子(Rho-GEF) 63種類に対する shRNA ライブラリーをスクリーニングし、繰り返し伸展刺激依存的な血管内皮細胞とストレスファイバーの配向に関与する 11 種類の Rho-GEF の同定に成功した。得られた 11 種類の Rho-GEF の中で、RhoA/RhoC の GEF として働き、ゼブラフィッシュの発生において原腸陥入に関与することが報告されている Solo に注目して、さらに研究を進めた。繰り返し伸展刺激によって細胞が配向する過程において、細胞間接着、又は、細胞-基質間接着のどちらのシグナルによって Solo が関与するかを検討した結果、Solo は、カドヘリンに依存した細胞間接着からのシグナルによる細胞の配向に主に寄与することが明らかになった。さらに、カドヘリンの細胞外ドメインをコートした磁気ビーズを細胞に接着させ、磁気によって細胞に張力を負荷して RhoA を活性化させ

たところ、Solo の発現抑制は RhoA の活性化を抑制することが明らかとなった。これらの結果から、Solo は、繰り返し伸展刺激による血管内皮細胞の配向において、カドヘリン依存的な細胞間接着からの機械的シグナルによる RhoA の活性化を介して細胞の配向に寄与することが明らかとなった。本研究の成果は、力学的刺激による Rho ファミリーの活性化とアクチン骨格再編成の新たな分子機構を明らかにしたものである。

##### (2) 細胞外基質の硬さ依存的な脱組織化に関わる Rho-GEF の同定と機能解析：

上皮細胞は通常の 3 次元培養下では内腔をもつ球状のシスト構造を形成するが、硬い細胞外基質の条件で培養すると極性・接着性の低下と運動能・増殖能の亢進により脱組織化が起こり、無秩序な細胞コロニーとなる(図2)。Rho-GEF の shRNA ライブラリーを用いて各 Rho-GEF の発現抑制を行い、ヒト乳腺上皮由来 MCF-10A 細胞の硬さ依存的な脱組織化に関わる Rho-GEF を探索し、5 種類の Rho-GEF (CDEP/Farp1, Db1, Duet, WGEF,  $\beta$ -Pix)を同定した。Farp1 については、インテグリンと結合することを見出し、dorsal stress fiber の形成や細胞の接着、増殖能、運動能の亢進に関与することを明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Abiko, H., Fujiwara, S., Ohashi, K., Hiataru, 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、in press, 2015、doi: 10.1242/jcs.157503

Takahashi, K., Kanno, S., and Mizuno, K., Activation of cytosolic Slingshot-1 phosphatase by gelsolin-generated soluble

actin filaments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有、454 巻、2014、471-477、doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.108.

Homma, Y., Kanno, S., Sasaki, K., Nishita, M., Yasui, A., Asano, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Insulin receptor substrate-4 binds to Slingshot-1 phosphatase and promotes cofilin dephosphorylation., *J Biol Chem.*, 査読有、289 巻、2014、26302-26313、doi:10.1074/jbc.M114.565945.

Ohashi, K., Sampei, K., Nakagawa, M., Uchiumi, N., Amanuma, T., Aiba, S., Oikawa, M., and Mizuno, K., Damnacanthol, an effective inhibitor of LIM-kinase, inhibits cell migration and invasion., *Mol. Biol. Cell*, 査読有、25 巻、2014、828-840、doi:10.1091/mbc.E13-09-0540.

Mizuno, K., Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation., *Cell. Signal.*, 査読有、25 巻、457-469、2013、doi:10.1016/j.cellsig.2012.11.001.

Higashida, C., Kiuchi, T., Akiba, Y., Mizuno, H., Maruoka, M., Narumiya, S., Mizuno, K., and Watanabe, N., F- and G-actin homeostasis regulates mechanosensitive actin nucleation by formins., *Nat. Cell Biol.*, 査読有、15 巻、395-405、2013、doi:10.1038/ncb2693.

Hayashi, A., Hiattari, R., Tsuji, T., Ohashi, K., and Mizuno, K., p63RhoGEF-mediated formation of a single polarized lamellipodium is required for chemotactic migration of breast carcinoma cells., *FEBS Lett.*, 査読有、587 巻、698-705、2013、doi:10.1016/j.febslet.2013.01.043.

Shoji, K., Ohashi, K., Sampei, K., Oikawa, M., Mizuno, K., Cytochalasin D acts as an inhibitor of the actin-cofilin

interaction., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有、424 巻、52-57、2012、doi:10.1016/j.bbrc.2012.06.063.

〔学会発表〕(計 15 件)

Mashiko, T., Fujiwara, S., Kondo, H., Abiko, H., Sato, M., Ohashi, K., Mizuno, K., Identification and functional analysis of Rho-GEFs involved in cyclic stretch-induced cell orientation of vascular endothelial cells, 第 37 回日本分子生物学会、2014.11.25-27、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Takahashi, K., Kanno, S., Mizuno, K., Cofilin-phosphatase Slingshot-1 is bound to and activated by gelsolin-generated soluble actin filaments、The 11th International Conference on Protein Phosphatase、2014.11.12-14、東北大学(宮城県・仙台市)

高橋 克宣、菅野 新一郎、大橋 一正、水野 健作、ゲルゾリンはアクチンオリゴマーによるスリングショットの活性化を介してコフィリンの脱リン酸化を亢進する、第 87 回日本生化学大会、2014.10.15-18、国立京都国際会館(京都府・京都市)

梶 紀子、萱場 敦子、高橋 将太、大橋 一正、水野 健作、Farp1 はインテグリンを介した細胞接着に関与する、第 6 回日本細胞生物学会、2014.6.11-13、奈良県新公会堂(奈良県・奈良市)

Fujiwara, S., Mashiko, T., Kondo, H., Abiko, H., Sato, M., Ohashi, K., Mizuno, K., Identification and characterization of Solo as a Rho-GEF involved in mechanosensing, International Symposium on Mechanobiology、2014.5.20-23、岡山大学(岡山県・岡山市)

藤原 佐知子、増子 寿弥、近藤 洋志、安彦 日和、佐藤 正明、大橋 一正、水野 健作、細胞の力覚応答に関わる Rho-GEF として同

定した Solo の機能解析、第 36 回日本分子生物学会、2013.12.3-6、神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）

高橋 将太、大橋 一正、北谷 佳那恵、直塚 萌、佐藤 圭一、阿部 彰子、萱場 敦子、梶 紀子、水野 健作、細胞外基質の硬さ依存的な乳腺上皮細胞の形質転換における Farp1 の機能、第 36 回日本分子生物学会、2013.12.3-6、神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）

水野 健作、安彦 日和、藤原 佐知子、梶 紀子、大橋 一正、細胞の力覚応答に關与する Rho-GEF の同定と機能、第 86 回日本生化学会大会、2013.9.11-13、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

大橋 一正、林 文、日當 竜一、辻 拓史、水野 健作、乳がん組織の極性移動には p63RhoGEF によるラメリポディア形成の極性化が必要である、第 65 回日本細胞生物学会大会、2013.6.19-21、ウインク愛知（愛知県・名古屋市）

Kaji, N., Takahashi, S., Kayaba, A., Ohashi, K., and Mizuno, K., Farp1 is involved in ECM stiffness-induced transformation of mammary epithelial cells.、第 65 回日本細胞生物学会大会、2013.6.19-21、ウインク愛知（愛知県・名古屋市）

藤原 佐知子、近藤 洋志、増子 寿弥、安彦 日和、大橋 一正、水野 健作、メカノセンシングに關与する Rho-GEF として同定した SOLO の機能解析、日本生化学会東北支部第 79 回例会、2013.5.11、東北大学（宮城県・仙台市）

Ohashi, K., Abiko, H., Kondo, H., Fujiwara, S., Mashiko, K., Sakamoto, N., Sato, M., and Mizuno, K., Identification of Rho-GEFs involved in mechano-biological responses of vascular endothelial cells, International

Symposium on Biomedical Engineering Interface、2013.3.14-15、東北大学（宮城県・仙台市）

Kondo, H., Ohashi, K., Abiko, H., Hiatari, R., Sakamoto, N., Sato, M., Mizuno, K. Identification of Rho-GEFs involved in cyclic stretch-induced mechanosensing of vascular endothelial cells.、第 35 回日本分子生物学会、2012.12.11-14、福岡コンベンションセンター（福岡県・福岡市）

高橋 将太、大橋 一正、北谷 佳那恵、直塚 萌、佐藤 圭一、阿部 彰子、萱場 敦子、梶 紀子、水野 健作、DbI ファミリー Rho-GEF である CDEP は乳腺上皮細胞の細胞外マトリックスの硬さ依存的な形質転換に關与する、第 35 回日本分子生物学会、2012.12.11-14、福岡コンベンションセンター（福岡県・福岡市）

Kondo, H., Ohashi, K., Abiko, H., Hiatari, R., Sakamoto, N., Sato, M., Mizuno, K., Identification of Rho-GEFs involved in mechanosensing of vascular endothelial cells.、第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会、2012.5.28-31、神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno\\_lab/](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