

60. 細胞の力覚応答における Solo-RhoA 系の機能

水野 健作

東北大学 大学院生命科学研究科 分子生命科学専攻
遺伝子システム学講座 情報伝達分子解析分野

Key words : メカノバイオロジー, アクチン細胞骨格, Rho ファミリー, ケラチンフィラメント, 細胞集団移動

緒言

細胞は外界からの力学的刺激に応答して、その形態、極性、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、これらに応答して細胞の配向性、運動性、増殖能を変化させる。また、形態形成においては、液性因子の作用とともに、外環境の硬さや、細胞間、細胞-基質間に発生する力による制御も重要な役割を果たしている。このように細胞の力覚応答は組織の形成や恒常性維持において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、癌の悪性化など多くの疾患と密接に関連している。しかし、細胞の力覚応答の分子機構については未だ不明な点が多い。

細胞の力覚応答にはアクチン骨格の再構築が関与しており、Rho ファミリーが中心的な役割を果たしている。また、細胞間や細胞-基質間接着部位に局在するタンパク質はメカノセンサー分子として力覚応答に関与している。しかし、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。私達は最近、血管内皮細胞の繰返し伸展刺激による細胞配向の変化をモデル系として、力覚応答に関わる 11 種類の Rho-GEF の同定に成功した。同定した Rho-GEF の中で、RhoA の GEF であり、ゼブラフィッシュ胚の収束伸長に関与することが示されている Solo に注目して研究を進め、Solo が中間径フィラメントであるケラチン 8/18 と結合することを見出した。本研究では、細胞の力覚応答の分子機構を解明するため、張力刺激による RhoA の活性化やストレスファイバーの形成・強化における Solo とケラチン繊維の機能を解析した。また、細胞の集団移動や 3 次元培養下の管腔形成において、細胞間、細胞-基質間の力覚応答の重要性が示唆されていることから、これらの過程における Solo の機能を解析した。

方法および結果

1. 細胞の力覚応答における Solo とケラチン 8/18 繊維の機能^{1,2)}

細胞の力覚応答における Solo の活性化機構と機能を解明するため、Solo の結合タンパク質のプロテオミクス解析を行い、上皮細胞における主要な中間径フィラメントであるケラチン 8/18 を同定した。Solo は少なくとも 3 箇所のケラチン結合領域をもつことを示した。次に、引張刺激による RhoA の活性化に対する Solo とケラチンの関与について検討した。シート状に培養した上皮細胞にフィブロネクチンをコートした磁気ビーズを付着させ、磁石によって細胞に張力を負荷すると、RhoA が活性化された。siRNA のトランスフェクションによって Solo やケラチン 18 の発現を抑制すると、張力負荷による RhoA の活性化が抑制された (図 1)。以上の結果から、Solo とケラチン 18 は両者ともに張力負荷依存的な RhoA の活性化に関与することが示された。

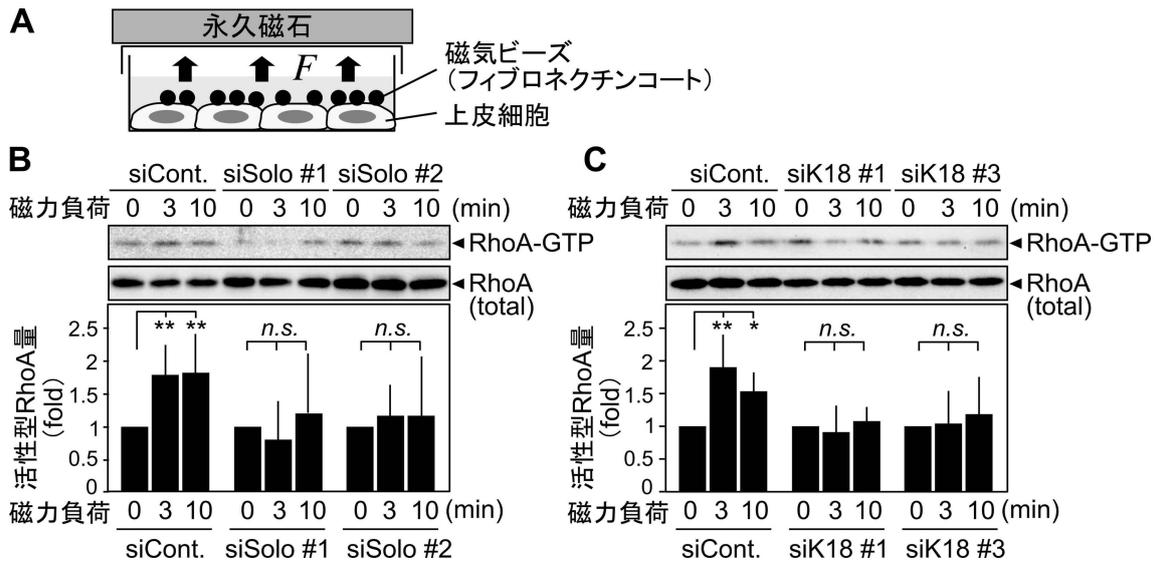


図1. 引張刺激によるRhoAの活性化におけるSoloとケラチンの機能

(A) 引張刺激の負荷実験系。シート状に培養した上皮細胞にフィブロネクチンコートした磁気ビーズを付着させ、永久磁石で上方に引張刺激を与える。(B、C) 記載した時間の磁力負荷後に細胞を回収し、RhotekinのRho-binding domainを用いたプルダウンにより、細胞内の活性型RhoA-GTP量の変化を比較した。コントロール細胞では引張刺激により活性型RhoA量が有意に増加したが、siRNAによるSoloの発現抑制や(B、siSolo)、ケラチン18の発現抑制(C、siK18)によってこの応答は抑制された。活性型RhoAの相対値は3回の実験の平均値±SDを示し、統計処理はone-way ANOVAとDunnnett's testによった。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; n.s., not significant.

また、細胞は張力を負荷されると、その方向にストレスファイバーを形成・増強させる。このような応答をリアルタイムで可視化解析するため、ガラスボトムディッシュに薄いシリコン膜を張り、フィブロネクチンでコーティングした上に細胞を接着させ、シリコン膜を針で引っぱって変形させることで細胞に引張刺激を負荷する系を構築した(図2)。蛍光タンパク質YFPを付加したLifeactでアクチンを可視化した上皮細胞に引張刺激を負荷したところ、Soloやケラチン18の発現抑制によって、引張刺激で新生・増強されるストレスファイバーの数が減少することがわかった。以上の結果から、Soloとケラチン繊維は、引張刺激依存的なRhoAの活性化とストレスファイバーの形成・強化に関与することが明らかとなった(図2)。ケラチン結合領域の一部を欠失したSoloでは引張刺激依存的なストレスファイバーの形成・強化がみられないことから、引張刺激依存的なストレスファイバーの形成・強化にはSoloとケラチン繊維の結合が重要であることが示唆された。

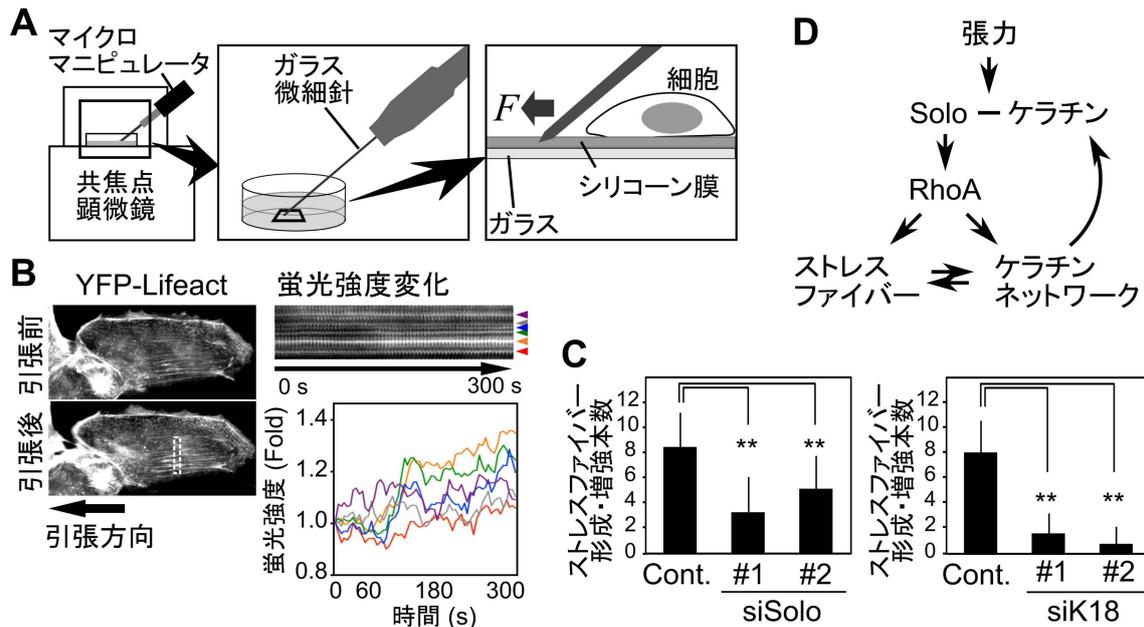


図 2. 引張刺激によるストレスファイバー形成における Solo とケラチンの機能

(A) 引張刺激によるストレスファイバー形成の実験系。ガラス微細針でシリコン膜を引っ張ることで、細胞に引張刺激を加える。(B) YFP-Lifeact でアクチンを可視化した MDCK 細胞の引張刺激に対する応答。右は点線枠内のキモグラフと蛍光強度変化。引張刺激によるストレスファイバーの増強が認められる。(C) 引張刺激により形成・増強されたストレスファイバーの数。Solo の発現抑制 (siSolo) やケラチン 18 の発現抑制 (siK18) により、この応答は抑制された。データは 1 回の実験あたり 16–21 個の細胞での形成・強化されたストレスファイバーの本数の平均値 \pm SD を示し、統計処理は one-way ANOVA と Dunnett's test によった。**, $p < 0.01$ 。(D) 張力刺激によるストレスファイバーとケラチンネットワークの形成における Solo とケラチン繊維の機能のモデル。Solo とケラチンの相互作用は、張力による RhoA の活性化とストレスファイバーとケラチン繊維の形成において重要な役割を果たしており、ケラチン繊維は Solo の活性化にも関与する。

2. 細胞の集団移動における Solo とケラチン繊維の機能

細胞の集団移動は創傷治癒、器官形成などでみられる重要な現象である。集団移動において、細胞-基質間、細胞間における力の制御が重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、上皮細胞の集団移動における Solo の機能を解析した。イヌ腎上皮 MDCK 細胞において、siRNA を用いて Solo を発現抑制すると、単独細胞の移動速度には影響が見られなかったが、細胞集団の移動速度は有意に促進された。また、Solo の発現抑制によって、ケラチン繊維が減弱し、配向が乱れることを見出した。ケラチン 18 の発現を抑制すると、Solo の発現抑制と同様に、細胞の集団移動速度が上昇した。また、ROCK の阻害剤 Y27632 の効果を解析したところ、適度な濃度で添加すると、細胞の集団移動速度が上昇した。以上の結果から、Solo は RhoA-ROCK 経路の活性化を介してアクチンミオシンの活性化を促進し、細胞間の張力を増加することで、集団移動速度を抑制している可能性が示唆された。

3. 管腔形成における Solo とケラチン繊維の機能

管腔構造は様々な上皮組織にみられる構造であり、極性化した上皮細胞に囲まれた内腔を持つ。上皮管腔形成において、力覚応答の重要性が明らかになりつつある。本研究では、管腔形成における Solo の機能を解明するために、MDCK 細胞のコラーゲンゲル内での三次元培養による管腔形成モデルを構築して検討を行った。その結果、Solo やケラチン 18 の発現抑制によって管腔構造の長軸/短軸比が減少し、管腔における内腔の占める割合が有意に増加した。また、ミオシン依存的な収縮力のマーカーである二重リン酸化ミオシン軽鎖 (ppMLC) の局在を観察したところ、Solo、ケ

ラチン 18 の発現抑制によって細胞頂端部（内腔側）における ppMLC の有意な低下が認められた。さらに、ミオシン II の阻害剤の添加によって、管腔構造の長軸／短軸比の減少と内腔の肥大が認められた。以上の結果から、Solo は RhoA を活性化し、アクトミオシンにより生み出される細胞間の収縮力を増加し、管腔の長い形状と内腔の形態の維持に関与していることが示された。

考 察

本研究では、様々なモデル系を用いて、細胞の力覚応答における Solo とケラチン繊維の機能を解析し、これらが、引張刺激による RhoA の活性化とストレスファイバーの形成・強化、細胞の集団移動速度の抑制、上皮細胞集団の管腔形成の制御に関与することを明らかにした。力学的刺激による Solo の活性化機構は未だ不明であるが、Solo が複数箇所でケラチン繊維と結合することから、力学的刺激によるケラチン繊維の構造変化によって、Solo が立体構造変化し、活性化する可能性や、他のタンパク質との結合が変化する可能性が考えられる。Solo の引張刺激依存的な構造変化や活性化を測定する系を構築することが今後の課題である。また、力学的刺激の前後での Solo 結合タンパク質の変化を解析することも重要な課題である。また、集団移動や管腔形成における Solo の機能が明らかになったが、Solo 遺伝子改変マウスの表現型解析によって、個体レベルでの Solo の機能を解明することも今後の重要な課題である。細胞の力覚応答の破綻は多くの病気の原因となっていると予想される。細胞の力覚応答機構の解明が進むことによって、これまで化学的シグナルだけでは説明できなかった現象について新たな知見が生まれ、さまざまな疾患の病因解明に役立つことが期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東北大学大学院生命科学研究科の藤原佐知子、大橋一正である。

文 献

- 1) Fujiwara S, Ohashi K, Mashiko T, Kondo H, Mizuno K. Interplay between Solo and keratin filaments is critical for mechanical force-induced RhoA activation and stress fiber reinforcement. *Mol Biol Cell*. 2016;27(6):954-66. PubMed PMID: 26823019. doi: 10.1091/mbc.E15-06-0417.
- 2) Ohashi K, Fujiwara S, Mizuno K. Roles of the cytoskeleton, cell adhesion and rho signaling in mechanosensing and mechanotransduction. *J Biochem*. 2017;161(3):245-54. PubMed PMID: 28082721. doi: 10.1093/jb/mvw082.