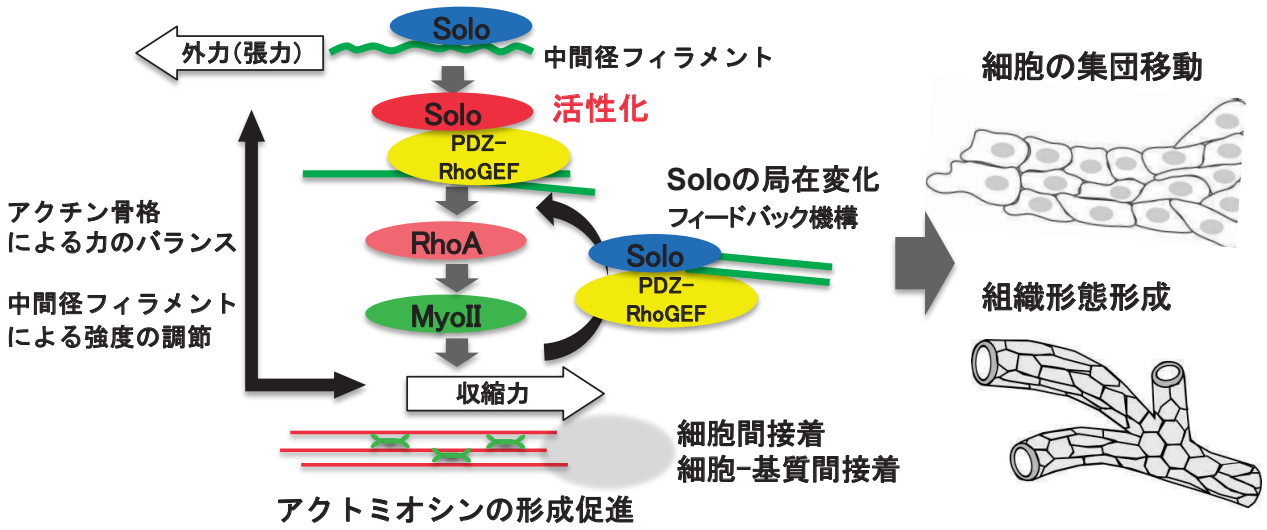
24　上皮細胞集団の力学的秩序を制御する分子機構の解明	大橋　一正

【目的】細胞は、多様な機械的な力を受けており、これを感知して応答する（力覚応答）を行うことが知られている。細胞内アクチン骨格は、細胞の形態と運動を制御する主要な細胞骨格であり、力覚応答においても力の発生や形態の制御に重要な機能を担っていると考えられるが、その分子機構は未だ多くの部分が不明である。私たちは、アクチン骨格の再構築を制御する低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーの活性化因子である Rho GDP-GTP 交換因子（RhoGEF）に注目して探索し、細胞の力覚応答に関与する Solo を同定した。さらに、Solo は、中間径フィラメントであるケラチン 8/18 繊維と結合して機能することを見出し、上皮細胞の集団移動や管腔形成に関与することを明らかにしてきた。本研究は、Solo と相互作用する蛋白質を網羅的に探索するとともに、細胞への力負荷実験方法を確立し、細胞に負荷される力を感知し、Solo を介してアクチン骨格とケラチン繊維ネットワークの再構築を行う分子機構とその生理的意義を解明することを目的に行った。

【方法】1. Solo の結合蛋白質の網羅的探索：Solo に関与する蛋白質の網羅的探索は、生細胞における近位依存性ビオチン標識法により関心蛋白質の相互作用蛋白質を同定する BioID 法と質量分析を組み合わせたプロテオーム解析によって行った。見出された蛋白質の中で Solo と機能的関与が見出された PDZ-RhoGEF について、イヌ腎上皮 MDCK 細胞をモデルにアクチン骨格の再構築に対する Solo と PDZ-RhoGEF の相互作用の働きを解析した。2. 細胞への張力負荷実験方法：細胞を簡便に引っ張るために、MDCK 細胞を用い、化学誘導二量体化法を用いて任意の時に収縮させることができる MDCK 細胞（収縮細胞）を作製した。この収縮細胞を用いて蛍光蛋白質 YFP を融合した Solo（YFP-Solo）を発現する MDCK 細胞が収縮細胞によって引張される様子を蛍光顕微鏡によって観察した。

【結果】1. Solo の結合蛋白質の網羅的探索：BioID 法を用いた Solo の相互作用蛋白質のプロテオーム解析より、これまでに見出されていたケラチン 8/18 に加え、アクチン骨格と中間径フィラメントとの結合蛋白質や細胞膜骨格の構成蛋白質、Solo と同じ RhoGEF である PDZ-RhoGEF が同定された。2. Solo 結合蛋白質としての PDZ-RhoGEF の機能解析：PDZ-RhoGEF について、Solo に対する機能を解析した結果、PDZ-RhoGEF は、Solo が集積する細胞基底部に集積し、その部位での Solo によるアクチン重合を促進した。これらの結果から、Solo と PDZ-RhoGEF は、カスケードを形成して力覚応答に働いていることが強く示唆された。3. 細胞間接着部位への力負荷依存的な Solo の局在化機構の解析：YFP-Solo を発現する MDCK 細胞を収縮細胞によって引張した結果、引張開始から 30 分以降に細胞間接着部位へ YFP-Solo が集積する様子が観察された。この結果から、Solo は、細胞間接着部位の張力によって局在が制御され、ケラチン繊維ネットワークを再構築して、細胞間接着部位の強度の調節を担っている可能性が考えられた。

Solo を介したアクチン骨格と中間径フィラメントの共役による細胞の力学的環境の制御



24. 上皮細胞集団の力学的秩序を制御する分子機構の解明

大橋　一正

東北大学 大学院生命科学研究科 分子化学生物学専攻

Key words：アクチン骨格，力覚応答，中間径フィラメント，RhoGEF，シグナル伝達

緒　言

細胞が機械的な力を感知して応答する力覚応答は、多細胞生物の細胞社会を成立させるために必須である。そのために細胞は、細胞に作用する力と細胞が発する力、それらと細胞の強度をバランスして制御する分子機構をもつと考えられる。細胞内アクチン骨格は、細胞の運動と形態を制御する最も基本的な細胞骨格であり、力覚応答においても力の発生や形態の制御に重要な機能を担っている。さらに、他の細胞骨格である微小管や中間径フィラメントと相互に連携して細胞の力の発生と強度のバランスを制御していると考えられるが、その分子機構は未だ多くの部分が不明である。アクチン骨格の再構築において、低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーの蛋白質群は下流エフェクターとともに特異的なアクチン骨格構造を形成するスイッチ蛋白質である。その活性は、多様化した分子種をもつ活性化因子（Rho グアニンヌクレオチド交換因子：RhoGEF）によって時空間的に制御されている。私たちは、この RhoGEF 分子群に注目し、細胞の力覚応答に関与する RhoGEF として Solo を同定した［1］。さらに、Solo は、細胞への引張刺激により RhoA を活性化すること、ストレスファイバーの増強に必要であること、Solo が細胞の収縮力発生部位に集積することを明らかにしてきた［2，3］。また、Solo が中間径フィラメントであるケラチン 8/18 繊維に結合することを発見し、Solo とケラチン繊維の結合が Solo を介する力覚応答に必要であることを明らかにした［3，4］。Solo は、RhoGEF として中間径フィラメントに結合して力覚応答に寄与する初めての分子であった。さらに、細胞における Solo の機能を解析し、Solo は、上皮細胞集団の集団移動や管腔形成に関与することを明らかにした［5，6］。これらの知見から、Solo は、細胞に負荷される力を感知するセンサー機構からのシグナルで活性化し、アクチン骨格の再構築を介して中間径フィラメントの構造を変化させ、力学的な環境に適応する働きを担うことが示唆された。そのため、本研究は、Solo と相互作用する蛋白質を網羅的に探索するとともに、細胞への力負荷実験方法を確立し、細胞に負荷される力を感知してアクチン骨格とケラチン繊維ネットワークの再構築を行う分子機構とその生理的意義を解明することを目的に行った。その結果、細胞への張力負荷で Solo が細胞間接着部位へ集積すること、そして、同じ RhoGEF である PDZ-RhoGEF が Solo の下流で機能することを明らかにした。

方法および結果

1. Solo の結合蛋白質の網羅的探索

Solo を介したアクチン骨格と中間径フィラメントの再構築に関与するシグナル分子を同定するために、生細胞内での近位依存性なビオチン化により相互作用蛋白質を標識する BioID 法を用いて、Solo の相互作用蛋白質のプロテオーム解析を行った。ヒト大腸癌由来の DLD1 細胞を用い、改良型のビオチン化酵素である TurboID を付加した Solo（TurboID-Solo）を恒常的に発現させた DLD1 細胞を樹立した。同時に、TurboID による非特異的なビオチン化のバックグラウンドを排除するために、TurboID のみを発現する細胞を樹立した。それらの細胞を培養し、培地にビオチンを添加することで TurboID-Solo と TurboID の近傍の蛋白質を細胞内でビオチン化した。これらのビオチン化された蛋白質をストレプトアビジン担体によって回収し、SDS-アクリルアミドゲルで分離した。蛋白質は、銀染色によって検出した。TurboID-Solo に特異的にビオチン化された蛋白質をゲルより回収し、質量分析によってその蛋白質を同

定した。その結果、これまでに見出されていたケラチン 8/18 に加え、アクチン骨格と中間径フィラメントとの結合蛋白質や細胞膜骨格の構成蛋白質、Solo と同じ RhoGEF である PDZ-RhoGEF が同定された（表 1）。

表 1. BioID 法によって検出された Solo の相互作用蛋白質の候補

分類	アクチン骨格	中間径フィラメント	膜骨格	細胞間接着	細胞−基質間接着
蛋白質名	β−アクチン	エンボプラキン	スペクトリン	アファディン	タリン1
	エズリン	ケラチン8	バンド4.1	α−カテニン	
	フィラミン1	ケラチン18	ミオシンIa	デスモグレイン	
	ミオシンVI	ペリプラキン	ミオシンIb	DLG1	
	CARMIL3		ミオシンIc	ZO1/2	
	LARG				
	PDZ−RhoGEF				

それらの中から、アクチン骨格と中間径フィラメントに結合する CARMIL3、細胞膜の裏打ちを構成するスペクトリン、ミオシン I、また、中間径フィラメントを細胞膜へアンカーするペリプラキンとエンボプラキン、そして PDZ-RhoGEF について cDNA を入手し、Solo と共発現させて局在の相関を解析した。その結果、PDZ-RhoGEF が Solo と共局在することが明らかになった（図 1a）。しかし、それ以外は Solo と共局在するものは見出されなかった。また、これらの蛋白質を、Solo の特徴的な局在が観察できるイヌ腎上皮 MDCK 細胞において発現抑制し、Solo の局在に対する影響を解析した結果、Solo の局在には影響しなかった。

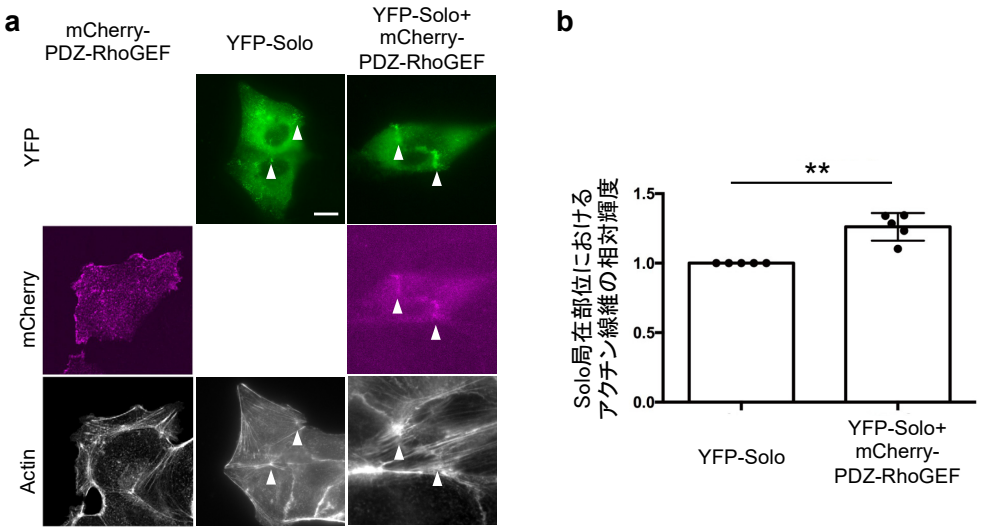


図 1. PDZ-RhoGEF は Solo の局在部位に集積してアクチン重合を促進する

a） mCherry-PDZ-RhoGEF と YFP-Solo を MDCK 細胞に各々単独、又は、共発現させ、細胞を固定してアクチン線維を蛍光染色し、各々の局在とアクチン骨格に対する影響を解析した。図中の矢じりは Solo の局在部位を示す。スケールバー：10 μm。

b） YFP-Solo、又は、YFP-Solo と mCherry-PDZ-RhoGEF を共発現させた細胞において、Solo の局在部位を抽出し、その部位におけるアクチン線維の相対量を蛍光輝度によって測定した。** $P<0.001$（ANOVA）。

2. Solo 結合蛋白質としての PDZ-RhoGEF の機能解析

赤色蛍光蛋白質 mCherry を付加した PDZ-RhoGEF（mCherry-PDZ-RhoGEF）と黄色蛍光蛋白質 YFP を付加した Solo（YFP-Solo）を各々MDCK 細胞に発現させると、PDZ-RhoGEF は細胞膜と細胞辺縁に局在し、YFP-Solo は細胞基底面に集積する特徴的な局在を示し、各々局在部位のアクチン重合を促進した。これらを共発現させると、

PDZ-RhoGEF は単独発現とは異なり、Solo が集積する細胞基底部に集積した。また、その共局在した部位は、Solo 単独で発現させた場合よりも有意にアクチンが強く重合していることが明らかになった（図 1）。これに対し、YFP-Solo の発現に対して内在性の PDZ-RhoGEF を発現抑制した場合は、Solo の集積部位におけるアクチンの重合が有意に抑制された（図 2）。また、mCherry-PDZ-RhoGEF の発現に対して内在性の Solo を発現抑制した場合も、PDZ-RhoGEF によって誘導されるアクチン重合を有意に低下させた（図 3）。

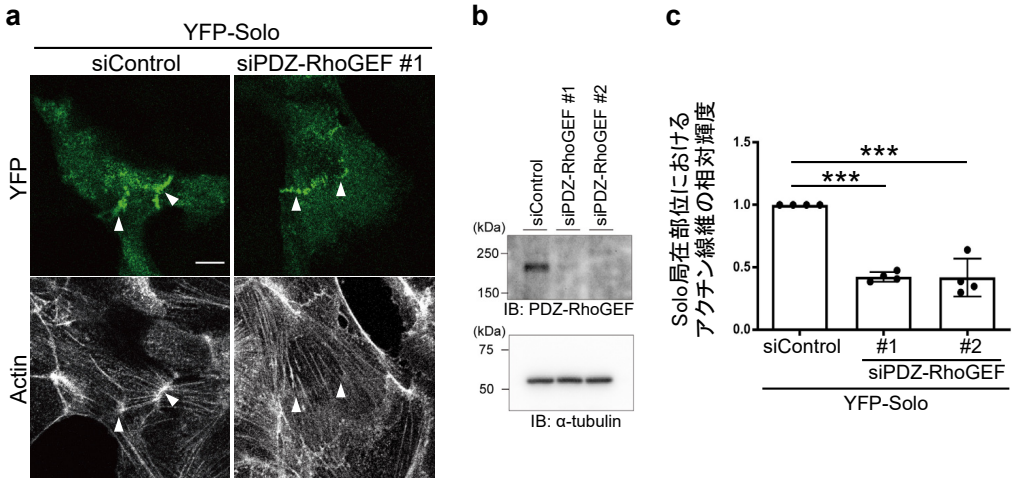


図 2. Solo の発現によるアクチンの重合は PDZ-RhoGEF の発現抑制によって抑制される

a） MDCK 細胞に YFP-Solo を発現させると共に Control siRNA、又は、PDZ-RhoGEF に対する siRNA（#1、#2 の 2 種類）を導入し、Solo の局在部位におけるアクチン重合に対する影響を解析した。図中の矢じりは Solo の局在部位を示す。スケールバー：10 μm。

b） 各々の siRNA による PDZ-RhoGEF の発現抑制の効果を、特異抗体を用いて確認した。

c） 各々の条件の細胞において、Solo の局在部位を抽出し、その部位のアクチン線維の相対量を測定した。*** P＜0.0005（ANOVA followed by Dunnett's test）。

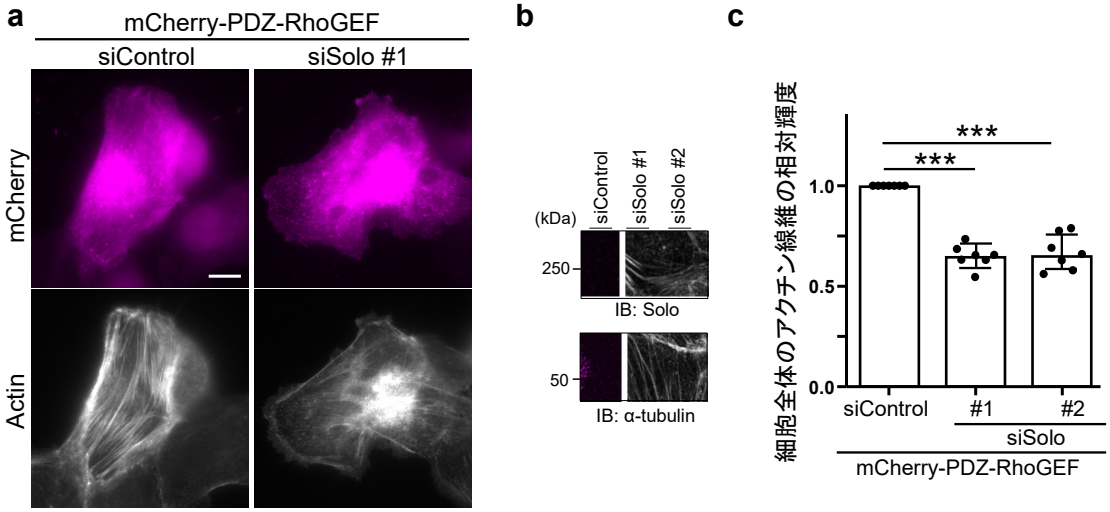


図 3. PDZ-RhoGEF の発現によるアクチンの重合は Solo の発現抑制によって抑制される

a） MDCK 細胞に mCherry-PDZ-RhoGEF を発現させると共に Control siRNA、又は、Solo に対する siRNA（#1、#2 の 2 種類）を導入し、細胞内のアクチン重合に対する影響を解析した。スケールバー：10 μm。

b） 各々の siRNA による Solo の発現抑制の効果を、特異抗体を用いて確認した。

c） 細胞全体のアクチン線維の相対量を蛍光輝度より測定した。*** P＜0.0005（ANOVA followed by Dunnett's test）。

3. 細胞間接着部位への力負荷依存的な Solo の局在化機構の解析

FK506-binding protein（FKBP）と FKBP12-rapamycin associated protein（FRB）がラパマイシンを介して結合することを原理とした化学誘導二量体化法を用い、MDCK 細胞において、RhoA の活性化因子である LARG の RhoA 活性化ドメイン（DH ドメイン）をラパマイシン添加によって細胞膜へ局在変化する細胞株（収縮細胞）を樹立した。この細胞は、ラパマイシンの添加によって細胞膜直下で RhoA が活性化し、アクトミオシンの形成促進によって数分後から収縮する細胞となった（図 4a、b）。この収縮細胞と親株である MDCK 細胞を混合して細胞層になるように培養し、ラパマイシンの添加によって収縮細胞周辺の MDCK 細胞を引張する実験方法を作製した。定量的な解析を行うために、収縮細胞の収縮率、収縮の時間変化を検討した結果、ラパマイシン添加後、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。この実験方法を用いて、YFP-Solo を恒常的に発現する MDCK 細胞を引張した結果、Solo が、ラパマイシンの添加から 30 分以降に細胞間接着部位へ集積する様子が観察された（図 4b）。

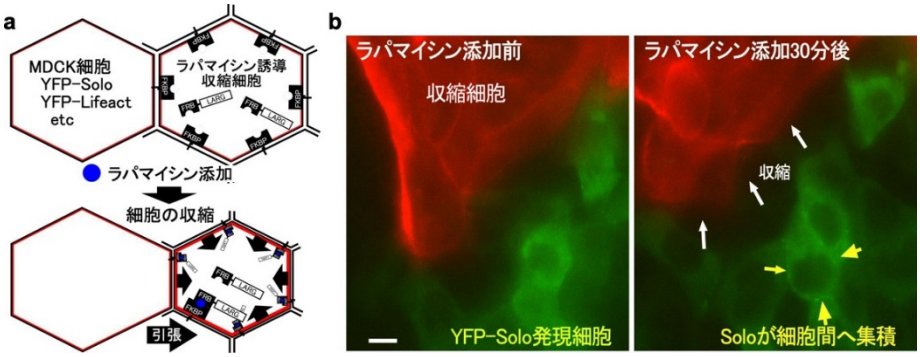


図 4. 細胞への張力の負荷に応じて Solo は細胞間接着部位に局在する

a） ラパマイシンを用いた化学誘導二量体化法によって人為的に収縮させることができる MDCK 細胞（収縮細胞）の収縮する作用機序のモデル。

b） YFP-Solo を恒常的に発現する MDCK 細胞（緑）を mCherry-Lifeact（アクチン線維のマーカー）を発現させた収縮細胞（赤）と共培養し、ラパマイシンを添加して収縮細胞を収縮させて経時観察を行った。添加前（左）と添加後 30 分（右）の細胞の蛍光像を示す。図中の白矢印は収縮細胞の収縮した領域を示し、黄色の矢印は細胞間接着部位に集積した YFP-Solo を示す。スケールバー：10 μm。

4. Solo のケラチン 8/18 繊維ネットワークに対する機能解析

Solo の細胞間接着部位への張力負荷依存的な局在化の機能を解析するため、細胞間接着部位におけるケラチン 8/18 ネットワークの構造に対する Solo の発現抑制の影響を解析した。その結果、細胞間接着部位付近に見られるケラチン 8/18 繊維束の集合が減少する傾向がみられた（図 5）。

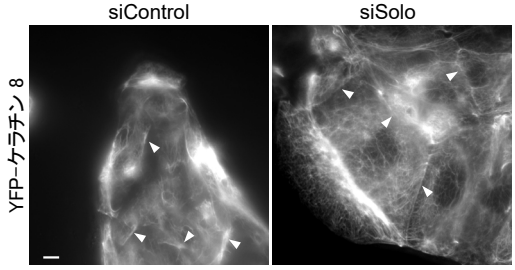


図 5. Solo の発現抑制は細胞間接着部位付近のケラチン 8/18 線維の集積を抑制する

YFP-ケラチン 8 を恒常的に発現する MDCK 細胞において Solo の発現抑制を行い、ケラチン 8/18 線維ネットワークに対する影響を観察した。コントロールの細胞（左）の矢じりは、細胞間接着部位付近でケラチン 8/18 線維が集積している部位を示す。Solo の発現抑制細胞（右）内の矢じりは、コントロールの細胞に相応する細胞間接着部位を示す。スケールバー：10 μm。

考　察

Solo に対するプロテオーム解析を、BioID 法を用いて行った結果、これまで見出していたケラチン 8/18 繊維に加え、細胞膜の裏打ち蛋白質やアクチン骨格、中間径フィラメントに関連する蛋白質が同定された。しかし、PDZ-RhoGEF を除いて、それらの発現抑制は Solo の局在や働きに対する影響が見られなかった。未だに Solo の細胞基底部、細胞間接着部位への局在に関与する蛋白質は見出されておらず、細胞膜ドメインである脂質ラフトなどが関与している可能性が考えられた。また、PDZ-RhoGEF は、同じ RhoA の GEF であるが、Solo に局在が制御されていることが明らかになった。また、Solo は、収縮力の発生部位や張力が負荷された細胞間接着部位へ局在することが明らかになった。Solo と PDZ-RhoGEF は、シグナル経路においてカスケードを形成し、Solo が PDZ-RhoGEF の局在と活性を制御し、収縮力を発生させる場所と強さを制御している可能性が強く示唆された。また、Solo の細胞間接着部位への局在変化は、張力の負荷から 30 分以上後で起こることが分かった。これは、Solo の局在化が張力による何らかの蛋白質の構造変化によるものではなく、力の負荷によって引き起こされた細胞内構造変化に依存していると考えられた。Solo は、アクチン骨格に依存してケラチン繊維を集積させ、外力に応じた組織の強度を維持する働きを持つことが推測された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学大学院生命科学研究科分子遺伝生理分野の東谷篤志教授、東谷なほ子博士、東北大学大学院生命科学研究科の水野健作名誉教授、千葉秀平助教である。共同研究者の皆様のご助力とご助言に深く感謝申し上げます。また、上原記念生命科学財団より本助成を賜りましたこと、深く感謝申し上げます。

文　献

1) Abiko H, Fujiwara S, Ohashi K, Hiatari R, Mashiko T, Sakamoto N, Sato M, Mizuno K. Rho guanine nucleotide exchange factors involved in cyclic-stretch-induced reorientation of vascular endothelial cells. J Cell Sci. 2015 May 1;128(9):1683-95. Epub 2015 Mar 20. PMID: 25795300 DOI: 10.1242/jcs.157503

2) Fujiwara S, Ohashi K, Mashiko T, Kondo H, Mizuno K. Interplay between Solo and keratin filaments is crucial for mechanical force-induced stress fiber reinforcement. Mol Biol Cell. 2016 Mar 15;27(6):954-66. PMID: 26823019 DOI: 10.1091/mbc.E15-06-0417

3) Fujiwara S, Matsui TS, Ohashi K, Deguchi S, Mizuno K. Solo, a RhoA-targeting guanine nucleotide exchange factor, is critical for hemidesmosome formation and acinar development in epithelial cells. PLoS One. 2018 Apr 19;13(4):e0195124. eCollection 2018. PMID: 29672603 DOI: 10.1371/journal.pone.0195124

4) Fujiwara S, Matsui TS, Ohashi K, Mizuno K, Deguchi S. Keratin-binding ability of the N-terminal Solo domain of Solo is critical for its function in cellular mechanotransduction. Genes Cells. 2019 May;24(5):390-402. Epub 2019 Apr 21. PMID: 30929300 DOI: 10.1111/gtc.12682

5) Nishimura R, Kato K, Fujiwara S, Ohashi K, Mizuno K. Solo and Keratin Filaments Regulate Epithelial Tubule Morphology. Cell Struct Funct. 2018 Jun 2;43(1):95-105. Epub 2018 Apr 28. PMID: 29709890 DOI: 10.1247/csf.18010

6) Isozaki Y, Sakai K, Kohiro K, Kagoshima K, Iwamura Y, Sato H, Rindner D, Fujiwara S, Yamashita K, Mizuno K, Ohashi K. The Rho-guanine nucleotide exchange factor Solo decelerates collective cell migration by modulating the Rho-ROCK pathway and keratin networks. Mol Biol Cell. 2020 Apr 1;31(8):741-752. Epub 2020 Feb 12. PMID: 32049581 DOI: 10.1091/mbc.E19-07-0357