

## メカニカルストレスによる細胞の増殖・分化の制御機構

### [1] 組織

代表者:水野 健作

(東北大学大学院生命科学研究科)

対応者:安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

分担者:菅野新一郎

(東北大学加齢医学研究所)

大橋 一正

(東北大学大学院生命科学研究科)

永井友朗

(東北大学大学院生命科学研究科)

研究費: 物件費 45 万円

### [2] 研究経過

力学的刺激(メカニカルストレス)は細胞の増殖・分化能を制御する重要な因子であり、生体の恒常性維持や器官形成において必須の役割を担っている。以前の研究から、力学的刺激によって細胞内アクチン骨格の動態が変化すること、細胞内アクチンの重合・脱重合の状態によって細胞の増殖・分化能が制御されていることが知られてきたが、その分子機構の多くは未解明である。私達は、アクチン脱重合因子コフィリンをリン酸化(不活性化)するLIMキナーゼと、脱リン酸化(活性化)するホスファターゼSlingshotを同定した。また、最近、メカニカルストレスによるストレスファイバーの再構築に関わるRho-GEFとしてSoloの同定にも成功した。本研究では、力学的刺激によるアクチン骨格の再構築制御や細胞増殖・分化能の変化におけるこれらの分子の機能を解明すること、また、アクチンを強制的に重合あるいは脱重合させた場合の細胞増殖能、一次繊毛形成能、転写調節因子YAPの細胞内局在を解析し、アクチン重合・脱重合による細胞増殖、一次繊毛形成の分子機構を解明することを目的として研究を行った。本研究によって、力学的刺激依存的なアクチン骨格再編成による細胞の増殖・分化の制御機構を解明し、生体の恒常性維持機構ならびにその破綻に

よる癌、生活習慣病、繊毛病などの病因を解明することを目的とした。

細胞は、一般に、低密度、硬い基質、血清存在下で培養すると増殖するが、高密度、軟らかい基質、血清飢餓の条件では増殖能が低下する。前者の条件では、細胞に張力がかかり、アクチン重合、ストレスファイバー形成が促進され、転写調節因子YAPは核内に移行する。一方、後者の条件では、細胞-基質間接着は弱くなり、張力の減少、アクチンの脱重合、YAPの細胞質への繫留が認められる。これらの分子機構を解明するため、以下の研究を行った。

(1)メカニカルストレスによるアクチン骨格の制御機構: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やストレスファイバーの配向に関与するRho-GEFとしてSoloを同定した。本研究では、Solo結合タンパク質としてケラチン8/18を同定し、Soloとケラチンの結合がメカニカルストレス依存的なRhoAの活性化とストレスファイバーの形成・増強に重要な役割を果たしていることを明らかにした

(図1)。また、アクチン脱重合因子であるコフィリンの活性化酵素であるSlingshotの分子内にPH様ドメインの存在を明らかにし、このドメインがSlingshotのアクチン繊維への結合とアクチン繊維による活性化に関与することを明らかにした。

(2)アクチン重合・脱重合による細胞増殖制御機構:低密度、血清存在下の増殖しやすい条件で培養した細胞に対して、アクチンを強制的に重合・脱重合させた場合の、YAPの細胞内局在や一次繊毛形成能を測定し、細胞増殖、一次繊毛形成に対するアクチン重合・脱重合の関与を解析した。その結果、アクチン重合阻害剤でも、重合促進剤処理でも、YAPの核外移行が促進され、一次繊毛形成が促進されることが明らかになった。

上記の研究過程で、研究代表者、研究分担者、対応者は、プロテオミクス解析や2次構造予測解析について、度々、面談及びメールにて研究打ち合わせを行った。

### [3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

(1) メカニカルストレスによるアクチン骨格の制御機構：

低分子量G蛋白質 Rhoファミリーはアクチン骨格の再構築に必須のシグナル分子であり、Rho グアニンヌクレオチド交換因子 (Rho-GEF) により活性化される。しかしながら、機械的刺激による Rho シグナルの活性制御機構は不明である。血管内皮細胞は血管の伸縮を模した繰返し伸展刺激を受けると、アクチン骨格の再構築が誘導され、細胞とストレスファイバーの再配向が引き起こされる。繰返し伸展刺激による細胞配向に必要な Rho-GEF の探索を目的として、63 種類の Rho-GEF shRNA をスクリーニングした結果、11 種類の Rho-GEF が繰返し伸展刺激依存的な細胞配向に関与することを見出した。本研究ではその中の Solo に着目して、その機能を解析し、Solo が上皮細胞の主要な中間径フィラメントであるケラチン 8/18 繊維と複数箇所て結合することを明らかにした。Solo を過剰発現させると、太いストレスファイバーと太いケラチン繊維が形成された。一方、Solo の発現抑制はストレスファイバーの消失とケラチン繊維の不規則な分布を引き起こした。力覚応答における Solo およびケラチン繊維の役割を解明するために、引張刺激依存的なストレスファイバーの形成・増強をリアルタイムで可視化できる引張力負荷試験系を構築した。Solo あるいはケラチン 18 の発現抑制は、引張刺激依存的なストレスファイバー形成を抑制した。また、Solo の不活性型変異体や各種欠失変異体の発現も引張刺激依存的なストレスファイバー形成を抑制した。さらに、Solo あるいはケラチン 18 の発現抑制は、力負荷刺激依存的な RhoA の活性化を抑制した。これらの結果から、Solo とケラチン繊維の相互作用は、機械的刺激依存的な RhoA の活性化とストレスファイバーの形成・増強に重要な役割をもつこと明らかとなった (図 1)。

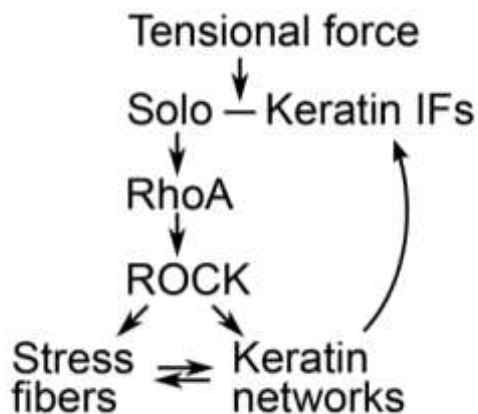


図 1. メカニカルストレスによる RhoA の活性化とストレスファイバー形成における Solo とケラチンの機能のモデル

(2) Slingshot の活性化機構：

アクチン脱重合因子コフィリンの脱リン酸化 (活性化) 酵素である Slingshot の 2 次構造予測解析によって、分子内に Pleckstrin homology (PH) 様ドメインの存在を見出した。Slingshot はこのドメインを介してアクチン繊維と結合し、アクチン繊維による Slingshot の活性化にはこのドメインが必須であることを明らかにした。

(3) アクチン重合・脱重合による細胞増殖制御機構：

動物細胞を低密度、血清存在下で培養すると増殖するが、アクチン重合阻害剤 Latrunculin によって強制的にアクチンを脱重合すると、細胞増殖を促進する転写制御因子である YAP が核外移行し、増殖が抑制され、一次繊毛形成が促進される。アクチン脱重合因子コフィリンの不活性化酵素である LIM キナーゼを発現抑制しても同様の結果が得られる。一方、アクチン重合促進剤である Jasplakinolide で細胞を処理すると、意外なことに、重合阻害剤と同様に、YAP の核外移行と一次繊毛形成が促進されることを見出した。この時、細胞は球状化し、細胞-基質間接着が減弱していることが観察された。以上の結果から、アクチンの重合・脱重合の状態だけでなく、細胞-基質間接着も YAP の細胞質-核局在、細胞増殖の制御、一次繊毛形成に重要であることが示された。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究により、メカニカルストレスによるアクチン骨格再構築に Solo が重要な役割をもつことが明らかになった。力学的刺激依存的な Solo の活性化の分子機構とその生理的意義を解明していくことが今後の重要な課題である。また、メカニカルストレスによるアクチン骨格の重合・脱重合制御は、細胞の増殖・分化の制御やがん化、繊毛形成においても重要な役割を担っていることが推定されているが、その分子機構はほとんど不明である。本研究の成果を基盤として、メカニカルストレス、アクチン骨格動態、細胞増殖・分化をつなぐ新たなシグナル経路が解明されることは、癌、繊毛病などの発症機構について新たな知見を提供できるものと期待される。

[4] 成果資料

学会発表

(1) 岡部悠香、高橋克宣、永井友朗、菅野新一郎、水野健作：Slingshot-1 分子内の PH 様ドメインの同定とその F-アクチン結合における機能、BMB2015、神戸、2015. 12. 1-4 (論文投稿中)

(2) 永井友朗、高橋健悟、向山祥帆、水野健作：Jasplakinolide による細胞の球状化は一次繊毛形成を誘導する、BMB2015、神戸、2015. 12. 1-4