

課題番号 61

細胞骨格をセンサーとするメカノストレス応答機構の解明

[1] 組織

代表者：大橋 一正

(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)

水野 健作 (東北大学大学院生命科学研究科)

安元 研一 (東北大学大学院生命科学研究科)

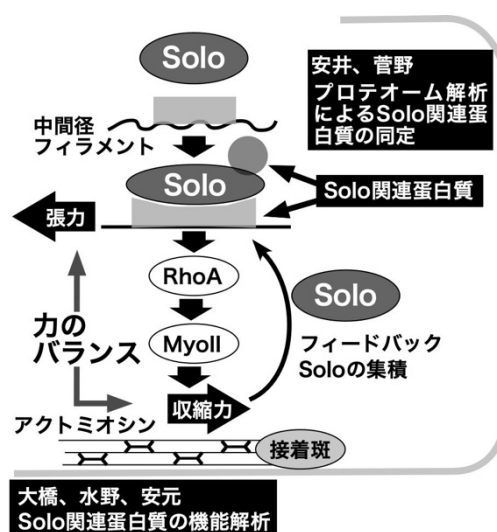
研究費：物件費 15万円

[2] 研究経過

細胞が受ける外環境からの機械的な力(メカノストレス)は、細胞運動、細胞形態、代謝、分化・増殖、細胞死といった様々な細胞応答を引き起こすことが知られており、骨や循環器などの強いメカノストレスを受ける器官、組織において古くから研究されてきた。また、組織形態形成や組織の恒常性の維持においても関与することは明らかであり、その破綻は骨や循環器の疾患だけでなく、がんの悪性化など多岐にわたると考えられる。しかし、細胞に負荷されるメカノストレスを細胞がどのように細胞内の化学的なシグナルに変換して応答しているのか、その分子機構はほとんど明らかになっていない。

私たちは、メカノストレスによって再構築されるアクチン骨格の細胞内シグナル伝達機構に注目し、血管内皮細胞の繰り返し伸展刺激による配向と整列をモデルに低分子量G蛋白質Rhoファミリーの活性化因子RhoGEFを探索し、関与する11種類のRhoGEFを同定することに成功した。その中の一つであるSoloについて、細胞のメカノストレス応答における機能、作用機構の解析を進め、Soloが、引張刺激に対するRhoAの活性化や中間径フィラメントであるケラチン8/18繊維の正常なネットワーク形成に必要であり、細胞集団の秩序化に関与することを見出してきた。Solo蛋白質は、細胞に負荷された張力に対して、ケラチン8/18繊維との結合を介して抵抗する収縮力を発生させ、バランスする機能を持つことが推測された(図)。これらの知見から、Soloとその関連分子が、細胞集団の秩序化

に働く細胞内シグナル伝達経路に深く関与することが示唆された。しかし、Soloを活性化するメカノストレス応答の分子機構は不明である。これらの背景から、本共同研究では、Soloとその関連分子のメカノストレス応答の細胞内シグナル伝達経路とメカノセンサー蛋白質を探索し、同定することを目的として研究を行った。



本研究の概要
細胞への張力負荷によるSolo蛋白質の活性化機構、細胞機能のモデルと大橋グループと安井グループの役割分担

以下、研究活動状況の概要を記す。

研究活動状況

本共同研究を開始するにあたり、安井フェロー、菅野講師と3月に打ち合わせを行い、Solo蛋白質の細胞内局在とGEF活性を制御する結合蛋白質の探索をプロテオーム解析により行うことを計画した。大橋、水野教授、安元准教授のグループは、Solo及び関連蛋白質のBioIDプローブを発現するヒト乳癌MCF7細胞を樹立し、Solo関連蛋白質の回収を行い、安井フェロー、菅野講師のグループが、回収した蛋白質を質量分析によって同定することにした。

コロナ禍のため、研究の遂行を一時停止したが、東北大学の行動指針BCPレベルが2になった段階で再開した。計画通り、大橋のグループがサンプルを作製し、安井グループが質量分析を行い、いくつかの候補蛋白質を同定した。これを受け、大橋グループが、それら候補蛋白質についてSoloに対する機能解析を進めた。

感染防止のため、実験は各グループごとに行い、サンプルの受け渡し時に2回目の打ち合わせを行った。初回の打ち合わせ、データ交換はオンラインにて行った。

研究概要

Solo関連蛋白質のプロテオーム解析を行うにあたり、Solo蛋白質は機械的な力の作用で活性化されるため、生細胞内でのみ相互作用する蛋白質に重要なものがあると想定した。そのため生細胞内で蛋白質間の相互作用を検出することが可能なビオチン化酵素を用いたBioID法を選択した。BioID法では、変異を加えた大腸菌由来のビオチン化酵素BirAがごく近傍の蛋白質のリジン残基を非特異的にビオチン化することを利用する。この活性を利用し、Soloに変異型BirAを付加して細胞に発現させ、培地にビオチンを添加することでSoloに相互作用する蛋白質をビオチン化ラベルする。細胞は、ヒト由来で安定した細胞のヒト乳がん細胞であるMCF7細胞を用いた。BioID法によってビオチン化された蛋白質はストレプトアビジン担体によって回収し、SDS-PAGEにて分離した(大橋グループ)。蛋白質を分離したアクリルアミドゲルを解析し、Solo特異的にビオチン化された蛋白質を質量分析を用いて同定した(安井グループ)。同定された蛋白質のcDNAをクローニングし、蛍光蛋白質を付加した蛋白質として発現させ、Soloとの局在の相関、Soloの機能に対する効果を検討した。さらに、それらの発現抑制による効果を解析し、Soloとの関係を解析した(大橋グループ)。以上の行程で研究を遂行した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

大橋グループは、Soloの全長と各ドメインを欠失した変異体にビオチン化酵素BirAを付加した発現プラスミドを作製し、これらを恒常的に発現するMCF7細胞株を樹立した。BirAのみを発現させた細胞をネガティブコントロールとし、生細胞内でBirA依存的なビオチン化反応を12時間以上誘導して細胞を溶解し、ビオチン化された蛋白質をストレプトアビジン担体で回収した。これをSDS-PAGEによって分離した結果、BirAのみのコントロールに対してSolo存在時にビオチン化された蛋白質が多数検出された。安井、菅野グループが、その中からSolo特異的にビオチン化されている可能性が高いものを選定して質量分析を行った。その結果、これまでに明らかになっていたSolo結合蛋白質であるケラチン8/18繊維と共に、接着斑蛋白質のTalin2、アクチン骨格の制御因子であるCARMIL3、Filamin Aを同定した。大橋グループはこの結果を受

け、Talin2、Filamin A、CARMIL3について各cDNAを入手し、蛍光蛋白質の融合蛋白質としてMCF7細胞に発現させ、Soloとの共局在と細胞内における相互作用を確認した。その結果、Talin2とFilamin AについてSoloとの関与は見出せなかったが、CARMIL3はSoloの細胞基底部の特徴的な局在と一致した。また、共沈実験により、SoloとCARMIL3が細胞内で直接、又は、間接的に結合していることが明らかになった。これらの結果から、Soloと細胞基底部において共局在する蛋白質を初めて発見することに成功した。これまでに、Soloが集積する基底部の領域は細胞が収縮力を発生している部位であることが明らかになっているが、細胞-基質間接着部位のFocal AdhesionやHemidesmosomeのマーカー蛋白質と局在が一致せず、未だ未知の細胞内構造である。今回の発見は、この細胞内構造のメカノストレス応答における意義を解明する糸口になると考えられる。大橋グループは、さらに、CARMIL3とSoloの細胞機能の相関について、RNA干渉による発現抑制実験を行って検討を行った。まず、Soloの基底部への集積に対してCARMIL3の発現抑制の効果を検討したが影響は見られず、CARMIL3の局在はSoloに依存していることが明らかになった。さらに、Soloの発現抑制は、Keratin8/18繊維ネットワークの形成を乱すこと、イヌ腎上皮MDCK細胞の集団移動に対して、移動速度を加速することをこれまでに見出していた。これらを指標に、CARMIL3の発現抑制の影響を検討したが有意な変化は検出されなかった。現時点ではCARMIL3のSoloに対する機能は不明である。しかし、本研究によって、今まで未知であったSoloの関連蛋白質を同定することができた。今後、安井グループによるSoloの各ドメイン特異的な相互作用蛋白質の同定をさらに進めることにした。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により、既知なものを含め細胞骨格構造に関与する複数のSoloの相互作用蛋白質を同定することができた。メカノストレス応答における力のセンサー蛋白質やセンサー機構については、同定されている分子がわずかなため、未だ分子機構はブラックボックスである。Soloを手がかりに関連分子を明らかにしていくことで、その一端が明らかになると考えられる。本研究は、メカノバイオロジー研究の重要なピースを提示し、その発展に貢献することが期待される。

[4] 成果資料

該当なし