

課題番号 78

## 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)

分担者：水野 健作  
(東北大学大学院生命科学研究科)

分担者：安元 研一  
(東北大学大学院生命科学研究科)

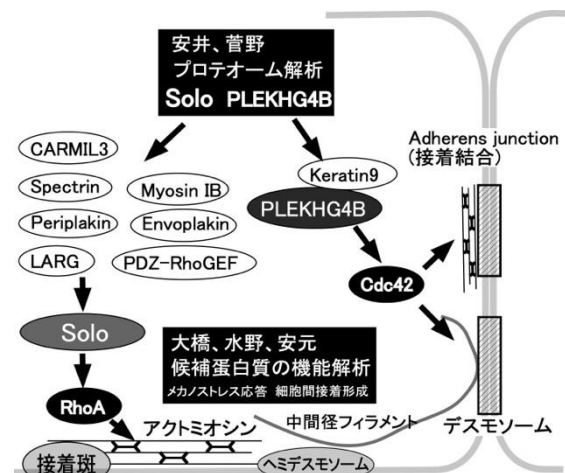
研究費：物件費 20万円

### [2] 研究経過

上皮細胞は内側と外側の極性を持った層構造の細胞集団を形成し、その層構造が管腔を形成して肺や腎臓、分泌腺といった上皮組織を形成している。このような秩序ある細胞形態の制御には、様々な機構が存在するが、その重要な要素の一つは、細胞と細胞間接着の強度と力の発生の制御である。組織において、個々の細胞が細胞間接着部位に負荷される力を感知し、発生する力とその部位の強度を適切に制御することは必須であり、それらは主にアクチン細胞骨格と中間径フィラメントを介した細胞間接着部位の構造によって制御されていると考えられる。しかし、その分子機構は未だ不明な点が多く残されている。

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GDP-GTP交換因子(RhoGEF)に注目し、細胞への機械刺激(メカノストレス)に対する応答に関与するRhoGEFとしてSolo(別名：RAGHEG40)を同定した。Soloは、細胞への張力負荷によるRhoAの活性化に寄与し、また、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明らかにした。さらに、上皮細胞の集団移動時の速度を減速する働きがあることを明らかにしてきた。これと同時に、SoloとRhoGEFの中でサブファミリーを構成し、類似した構造を持つPLEKHG4Bについても機能解析を進め、PLEKHG4Bが、上皮細胞の細胞間接着構造であるAdherens Junctionの形成過程を制御することを明らかにした。これらの経緯から、本

共同研究は、SoloとPLEKHG4Bによるアクチン細胞骨格と中間径フィラメントの再構築制御の分子機構を解明し、メカノストレス応答におけるそれらの機能を解明することを目的に研究を開始した。これまでの研究によって、SoloとPLEKHG4Bのプロテオーム解析が進められ、いくつかの結合蛋白質の候補を見出した。これまでに、Soloについては、アクチン骨格の制御因子であるCARMIL3とRhoAのGEFとして働くLARGについて検討を行い、どちらもSoloとの結合と共局在することを見出した。LARGについては、SoloがLARGのGEF活性の活性化に必要であることが示唆された。しかし、細胞における機能的な相関を見出すに至らなかった。また、PLEKHG4Bについてもプロテオーム解析を行い、中間径フィラメントの一つであるケラチン9との関与を見出した。本年度は、さらにSoloに対するプロテオーム解析を行い、Soloを介するメカノストレス応答の細胞内シグナル伝達経路を探索するとともに、PLEKHG4Bと中間径フィラメントとの関係を解明することを目的に研究を行った。



#### 本研究の概要図

安井グループは、SoloとPLEKHG4Bに対するプロテオーム解析を行う。  
大橋グループは、同定されたアクチン骨格と中間径フィラメントの制御タンパク質や細胞間、細胞基質間接着、膜骨格に関するタンパク質について、SoloとPLEKHG4Bに対する機能を解析する。

以下、研究活動状況の概要を記す。

#### 研究活動状況

本年度は、安井フェロー、菅野講師と3月に打ち合わせを行い、安井グループは、SoloとPLEKHG4Bについてプロテオーム解析を再度行い、相互作用蛋白質の網羅的探索を継続することにした。大橋グループは、これまでに安井グループが同定したSoloとPLEKHG4B

の相互作用蛋白質と、新たに見出されるものについてさらに機能解析を進めることにした。また、4月から大橋研に着任した千葉秀平助教が参加した。各グループで実験を進め、9月と3月に得られたデータについてデスカッションを行い本研究の総括をした。

#### 研究概要

昨年度までに、安井グループがPLEKHG4Bに対するプロテオーム解析をマウスの心臓の抽出物を材料として行い、筋肉型ミオシンIIとケラチン9を同定した。大橋グループは、ケラチン9に注目し、他の中間径フィラメントとともに、PLEKHG4Bによる細胞内ネットワーク形成に対する機能を探索した。また、Soloに対するプロテオーム解析から得られた蛋白質の解析を進めるとともに、新たに見出されたPDZ-RhoGEFがSoloと複合体を形成し、共局在することを見出した。これを受け、SoloとPDZ-RhoGEFとの相互作用の細胞における機能を検討した。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

大橋グループは、PLEKHG4Bの細胞内の中間径フィラメント構造に対する機能を解析するために、PLEKHG4Bの発現抑制と過剰発現させたイヌ腎上皮MDCK細胞のケラチン8/18繊維ネットワークとビメンチンのネットワーク構造を解析した。しかし、これらの構造に対して、PLEKHG4Bの発現抑制と過剰発現は認識できる変化を引き起こさなかった。次に、安井グループがPLEKHG4Bの相互作用蛋白質の候補として見出したケラチン9のcDNAクローニングを開始した。しかし、cDNAの配列が特殊なためか、クローニングに難航した。そのため、cDNAクローンを購入して発現プラスミドを作製しようとしたがcDNAを増幅することが出来なかった。これを打開するため、cDNAを全合成して発現プラスミドを作製することにしたが、やはり、発現プラスミドの作製に難航している。一方、ケラチン9は皮膚の肥厚化などに関与することから、PLEKHG4Bが機械的な力による細胞間接着部位の形成に関与することが示唆された。そのため、機械刺激による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇によるPLEKHG4Bの働きを解析した。その結果、機械刺激依存的なCa<sup>2+</sup>チャネルの阻害剤によってPLEKHG4Bの働きが阻害されることが明らかになった。PLEKHG4Bが細胞間接着部位に作用する張力に反応してAdherens Junctionの形成を促進することが示唆された。

安井グループと大橋グループは、再度Soloに対するBioID法を用いたプロテオーム解析を行い、複数のSolo結合蛋白質の候補を同定した。関与する可能性が高いものからcDNAを入手してGFP融合蛋白質として発現させ、Soloとの結合と局在の相関を解析した。膜骨格

を構成するスペクトリン、ミオシンIB、また、中間径フィラメントの結合蛋白質であるEnvoplakinとPeriplakinを検討したが、Soloの機能との相関は見出されなかった。これに対し、RhoGEFであるPDZ-RhoGEFが新たに候補として見出されたため検討した。その結果、PDZ-RhoGEFは、Soloの局在に依存してSoloと強く共局在することを見出した。また、Soloによるアクチン重合はPDZ-RhoGEFによって増強され、逆にPDZ-RhoGEF発現抑制によって阻害された。更に、PDZ-RhoGEFとSoloの各々の過剰発現による細胞内のRhoAの活性化には、内在性の他方が必要であり、両RhoGEFが共役して働くことを見出した。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本研究によって、SoloとPLEKHG4Bの細胞内における結合蛋白質の網羅的探索を行った結果、中間径フィラメントとアクチン骨格に関する蛋白質が多く候補として見出され、細胞内での結合や局在に対する働きを見出した。ケラチン繊維の遺伝子変異は、皮膚水疱症に代表される組織の脆弱性に起因する疾患の原因となることが知られており、SoloとPLEKHG4Bを介したメカノストレス応答と細胞間接着形成に関する新たな疾患発症の作用機序の発見が推測される。また、これまで、アクチン骨格の再構築に中間径フィラメントのネットワークのダイナミクスが制御されていることは知られていたが、その分子機構は多くの部分が不明であった。本研究を基盤に、アクチン骨格に依存した中間径フィラメントの種々の構造とその細胞機能の同定が期待され、細胞の力学的環境への応答から組織の強度を制御する分子機構の発見につながることを期待される。

### [4] 成果資料

- 川崎 右京, 他4名, 力覚応答に関与するRhoGEF, Soloの細胞間接着部位への局在機構の解明, 第74回日本細胞生物学会大会, 東京, 2022. 6. 28
- 國富 葵, 他5名, メカノストレス応答に関与するRhoGEF, Soloのプロテオーム解析による結合蛋白質の同定と機能解析, 第74回日本細胞生物学会大会, 東京, 2022. 6. 29
- 二宮 小牧, 他3名, Cdc42のGEFであるPLEKHG4Bはカルシウム流入依存的に細胞間接着に局在し, アクチン構築を促す, 第45回日本分子生物学会年会, 幕張, 2022. 12. 1
- 國富 葵, 他5名, 力覚応答に関与するRhoGEF, SoloとPDZ-RhoGEFの相互作用の解析, 第45回日本分子生物学会年会, 幕張, 2022. 12. 1
- 川崎 右京, 他4名, 力覚応答に関与するSoloの細胞間接着部位への局在にはプラコグロビンが必要である, 第45回日本分子生物学会年会, 幕張, 2022. 12. 1