

課題番号 51

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)

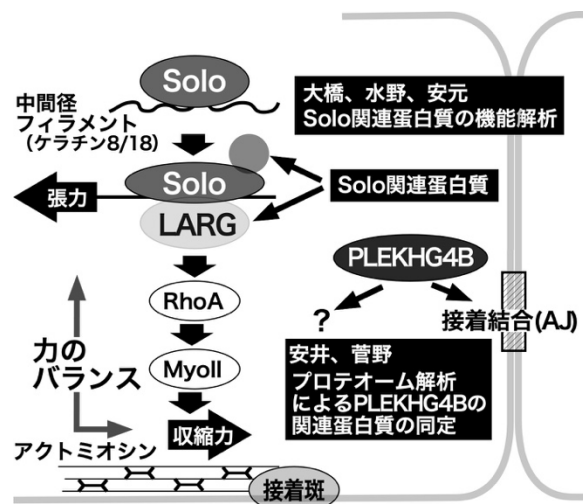
研究費：物件費 20万円

[2] 研究経過

私たちの体は様々な機械的な力（メカノストレス）が作用しており、それらのメカノストレスに対し個々の細胞は、構成する組織の特性に合わせて適切に応答している。このようなメカノストレス応答は、形態形成、創傷治癒、代謝制御、機能発現、恒常性の維持などの様々な生理機能に必須である。また、その破綻は様々な疾患に関与することが示唆されるが、メカノストレス応答の分子機構は不明な点が多く残されている。特に、細胞骨格などの細胞の構造に依存した応答については、多様な蛋白質がメカノストレスの感知に関与すると考えられるが、まだわずかな種類の分子の関与しか明らかにされていない。

私たちは、アクチン骨格の特定の構造形成の分子スイッチとして働く低分子量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)の中から、メカノストレス応答に関与するものを探索し複数のを同定した。これまで、その1つであるSolo蛋白質に注目して解析を進め、Soloは、引張刺激に対するRhoAの活性化に必要であること、中間径フィラメントであるケラチン8/18繊維に結合し、その正常なネットワーク形成に必要であることを明らかにしてきた。また、上皮細胞集団の秩序化に関与することを見出してきた。Soloは、細胞-基質間、細胞間接着における張力負荷に対して、アクチン骨格とケラチン繊維ネットワークの再構築を協調させ、細胞内の力学的環境の制御に寄与することが推測された。さらに、RhoGEF蛋白質群の中でSoloと同じドメイン構成を持つサブファミリー蛋白質のPLEKHG4Bについて

も研究を進め、PLEKHG4Bは、Soloとは異なるRho蛋白質を活性化して細胞間接着形成に関与することを明らかにしてきた。これまで、本共同研究は、メカノストレス応答におけるSoloの機能解析のため、網羅的なプロテオーム解析によるSolo結合蛋白質を探索し、いくつかの候補分子を発見した。本年度は、見出した蛋白質のSoloに対する機能解析を進めるとともに、PLEKHG4Bのプロテオーム解析による結合蛋白質の探索を行い、PLEKHG4Bを介した細胞機能を担う蛋白質の探索を目的に研究を行った。



本研究の概要図
 安井グループが同定したSolo関連蛋白質の機能解析を大橋グループが進め、新たに、Soloファミリー蛋白質PLEKHG4Bのプロテオーム解析による関連蛋白質の網羅的探索を安井グループが行う。

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、安井グループは、PLEKHG4Bについてプロテオーム解析を行いその相互作用蛋白質の網羅的探索に着手するとことにした。大橋グループは、昨年度に安井グループが同定したSoloの相互作用蛋白質の候補について、まだ解析を行っていない候補分子について機能解析を進めることにした。各グループで実験を進め、8月と12月に得られたデータについてディスカッションを行い、新たなSoloのプロテオーム解析の手法とPLEKHG4Bの相互作用蛋白質について解析する候補を決定した。コロナ禍のため、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

昨年度までに、安井グループがビオチン化酵素を用いたBioID法により、Soloの相互作用蛋白質の候補を複数同定しており、大橋グループは、それらの解析を進めてきた。今年度は、まだ検討していない蛋白質としてSoloと同じRhoGEFであり、張力負荷によって活性化するRhoAのGEFであるLARGについて解析を進めた。LARGを蛍光蛋白質と融合させて細胞に発現させ、Soloとの局在の相関を解析すると共に、LARGの活性化に対するSoloの機能と下流の標的分子であるRhoAの活性化に対する相互の働きを生化学的に解析した。安井グループは、新たにPLEKHG4Bについてのプロテオーム解析を行うため、今回は、リコンビナント蛋白質として精製したPLEKHG4Bを用いて、組織抽出物から精製を行った。特に、SoloとPLEKHG4Bに共通する特徴的なN末端のSoloドメインに注目し、大腸菌の発現系によりSoloドメインをグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合蛋白質として大量精製して固相化し、マウスの心臓の抽出物より結合蛋白質を精製した。それらを質量分析によって解析し、新たなPLEKHG4Bの結合蛋白質の候補を同定した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

大橋グループは、LARGのcDNAを入手し、蛍光蛋白質を付加して発現する発現ベクターを作成した。これらを用い、これまで主に用いて来たイヌ腎上皮MDCK細胞に異なる色の蛍光蛋白質を付加したSoloと共に発現させ、局在の相関を解析した。Soloは、MDCK細胞等の多くの培養細胞で細胞基底部にドット状に集積する特徴的な局在を示すことが明らかになっている。LARGは、単独の発現では細胞膜に均一に局在したが、Soloと共発現させると局在を変化させ、基底部のSoloの集積する部位に集積することが明らかになった。また、LARGがSoloと共に集積する部位の近傍では、Soloが単独で集積するときよりも有意にアクチン繊維の重合が促進されることが明らかになった。また、Soloの過剰発現により、細胞基底部のSolo集積箇所ではアクチン繊維の重合が促進されるが、同時に、LARGを発現抑制するとそのアクチン重合が有意に抑制されることが明らかになった。これらの結果から、Soloは、LARGの局在について上流因子として機能する可能性が示唆された。次に、SoloのLARGの活性化状態に対する働きを解析した。活性化したLARGは、RhoAのGTP結合能を失ったG17A変異体と結合することが知られており、RhoA G17A変異体によって活性型LARGのみを共沈降させることが可能である。この方法を用いて、MDCK細胞におけるLARGの活性化に対するSoloの発現抑制の効果を解

析した。その結果、Soloの発現抑制はLARGの活性を有意に低下させることが明らかになった。これらの結果から、Soloは、LARGの上流因子として細胞に負荷される張力に依存したRhoAの活性化に寄与することが強く示唆された。

安井、菅野グループは、PLEKHG4BのN末端SoloドメインとSoloドメインよりC末端側のCRAL/Trioドメインを含む領域のGST融合蛋白質を用い、マウスの心臓の抽出物からそれらに結合する蛋白質を検出した。多種の蛋白質が検出され、そのいくつかを質量分析によって同定した。その結果、PLEKHG4BのN末端Soloドメインに結合する蛋白質として、中間径フィラメントであるケラチン9と筋肉型ミオシンIIが同定された。ケラチン9は皮膚の肥厚化などに関与することが知られている中間径フィラメントである。また、筋肉型ミオシンIIは、筋肉の収縮力の発生を行う主要なモーター蛋白質である。これまでPLEKHG4Bは、上皮細胞の細胞間接着の形成過程におけるアクチン骨格の再構築に関与することが明らかになってきたが、中間径フィラメントとの関係は見出されていなかった。この発見とSoloとの類似性から、PLEKHG4Bは、メカノストレスに対するアクチン骨格の再構築と中間径フィラメントの再構築を介して細胞間接着の形成に関与することが示唆された。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究を進め、Soloの機能に関与する蛋白質を見出すことに成功した。予想した細胞骨格などの細胞内の構造に関連する分子ではなかったが、Soloと同じ働きをもつRhoGEFであった。近年、RhoGEFやRhoファミリーの不活性化因子であるRhoGAPが、細胞内シグナル伝達経路においてカスケードや相反するカウンターパートを組んで機能することが明らかにされつつある。メカノストレスに対する応答は、力の強さや速さに応じた応答が必要であるため、このようなRho蛋白質の上流因子の多段階の活性制御が存在すると考えられる。本研究は、RhoGEFの組み合わせによるアクチン骨格再構築の高次な制御機構の発見につながることを期待される。また、PLEKHG4Bのプロテオーム解析により、ケラチン9と筋肉型ミオシンIIが同定されたことから、PLEKHG4Bは、強い力が負荷される組織において機能し、組織の恒常性維持に働いていることが推測される。

[4] 成果資料

1.大橋 一正, 他6名, 細胞接着部位を介した力覚応答制御におけるRhoGEF, Soloの機能解析, 第73回日本細胞生物学会大会, オンライン開催, 2021.6.29-7.2