

(報告様式4)

【課題管理番号】 16gm5810015h0001

平成 29年 5月 25日

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 革新的先端研究開発支援事業  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名 : (日本語) アクチン骨格再構築に関連するメカノセンサー蛋白質の同定とその機能解明  
(英語) Identification and functional analysis of mechanosensor proteins involved in actin cytoskeleton remodeling

研究開発担当者 (日本語) 東北大学 大学院生命科学研究科 准教授 大橋一正  
所属 役職 氏名 : (英語) Tohoku University, Graduate School of Life Sciences, Associate Professor,  
Kazumasa Ohashi

実施期間 : 平成28年10月 1日 ~ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語)  
開発課題名 : (英語)

研究開発分担者 (日本語)  
所属 役職 氏名 : (英語)

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### 1. 細胞に対する力負荷刺激実験方法の確立

細胞に対する力負荷の応答として細胞内のシグナル分子の活性変化を RhoA の活性を指標に解析する方法としてこれまで確立しているものがあるが、アクチン骨格の構造変化、Rho ファミリー蛋白質の活性変化は大きくないため、より簡便に力の負荷とその応答を解析する実験方法が求められた。そのため、細胞を付着させる基質の硬さをシリコンで調節することを試みた。まずは、柔らかいシリコンゲルに細胞付着させ細胞動態を観察し、基質の硬さ依存的なアクチン骨格の再構築とメカノシグナルの生化学的解析を行う方法の検討を行った。その結果、細胞応答の再現性を良くするためには基質の硬さとともに細胞の接着を促進させるシリコン膜表面に対するプラズマ処理をより正確にコントロールする必要があることが示唆された。また、シリコン膜上に付着させた細胞にシリコンを伸長させて負荷する張力刺激についても、シリコン膜へのプラズマ処理による細胞外マトリックス分子の結合の効率が重要であることが明らかとなった。

### 2. 力覚応答に関与する RhoGEF の分類と選択

これまでの研究により力覚応答に関与する Rho-GEF を 16 種類同定しているが、今後のプロテオミクス解析を行う上でその中から対象とする分子を選択する必要がある。最初に力覚応答に直接関与する可能性を考え、力覚応答との関与が他のグループからも報告されている GEF-H1, Larg, p190RhoGEF について検討を進めるとともに、Solo と類似したファミリー蛋白質である PLEKHG4B について検討を開始した。これらについて、ビオチン化酵素を用いた BioID 法による相互作用蛋白質の検出の特性を利用し、力の負荷の有無による相互作用蛋白質の変化を検出することにした。そのため、BioID 法に用いるプローブ分子の作製に着手した。

### 3. 力覚応答に関与する Rho-GEF の Biotin 化酵素を用いた相互作用蛋白質の探索

力覚応答に関与する Rho-GEF として同定した Solo について先行して解析を進めており、Solo の活性制御や局在を規定する分子の探索のために Solo と細胞内で相互作用する分子の探索を開始した。Solo と相互作用する蛋白質を新たに探索するため、Solo 蛋白質、Solo 断片変異体に改変した大腸菌由来のビオチン化酵素 BirA と GFP を付加したプローブ発現プラスミドを作製し、乳癌由来 MCF7 細胞に恒常的に発現させた細胞株を樹立した。ビオチン化の条件検討を行い、Solo 特異的にビオチン化される分子や Solo の GEF 活性に依存して相互作用する分子を同定することに成功した。現在、これらを質量分析できる量を回収するための検討を進めている。

### 4. 生細胞における細胞間、細胞-基質間にかかる機械的力の可視化技術の確立

細胞に作用する力(張力)を可視化するテンションセンサープローブとして、まず、細胞間接着部位における張力を可視化するプローブの作製に取りかかった。E-カドヘリンをベースとして細胞外ドメインの細胞膜貫通ドメイン近くに YFP (Venus) を挿入し、細胞内ドメインの C 末端に赤色蛍光蛋白質 mcherry を挿入したプローブの基本骨格を作製した。これをベースとして、Venus の部位に円順列変異体 Venus を置換したプローブを作製した。これらの中で、円順列変異体 Venus の蛍光を細胞間接着部位で検出できるものをいくつか作製することができた。これらのプローブを検証するため、ROCK の阻害剤を添加し細胞間に作用する張力を変化させる方法を検討中である。これらの開発と共に、YFP を付加したミオシン S1 断片の発現細胞、YFP-Solo の発現細胞を樹立し、Cell contraction assay により、細胞-基質間、細胞間に作用する張力変化の測定の検討を開始した。

### **1. Establishment of methods of detecting force-induced cell responses**

We have analyzed the mechanical force-induced cell responses by measuring the change in the activity of a signaling molecule RhoA. However, because the change in RhoA activity was faint, more simple and sensitive method to detect force-induced cell responses must be established. We first investigated the effects of the stiffness of the substrate, to which cells were attached, and the conditions of plasma treatment on force-induced changes in cell dynamics and established the proper method to analyze the force-induced changes in actin cytoskeleton and activity of signaling molecules. In order to improve the reproducibility, it was necessary to precisely control the stiffness of the silicone gum substrate and the conditions of plasma treatment of the silicone surface to facilitate cell adhesion. It was also important to increase the binding efficiency of extracellular matrix proteins to the silicone membrane for detecting the tensile force-induced cell responses.

### **2. Selection of Rho-GEFs for further analysis**

We have identified 16 Rho-GEFs involved in mechanoresponse. To focus our study on several Rho-GEFs, we selected GEF-H1, LARG and p190RhoGEF from these 16 Rho-GEFs, because they were reported to participate in mechanoresponses by other groups and appeared to be directly involved in mechanoresponse. We also selected PLEKHG4B, a homologue of Solo, which we have extensively studied. We planned to identify the interacting proteins of these Rho-GEFs by BioID method, using *E. coli*-derived biotin ligase, and started to construct the plasmids coding for the probes for BioID proteomics analysis. We plan to examine the role of the interacting proteins in mechanoresponse by measuring the changes in the interactions in the presence or absence of force application.

### **3. Proteomics analysis of Solo-binding proteins using BioID**

We are searching for the Solo-binding proteins, which regulate activity and localization of Solo. To search for Solo-binding proteins, we used a BioID method, which uses a mutant of *E. coli*-derived biotinylation enzyme BirA (BirA\*). We constructed expression plasmids coding for BirA\* fused to GFP-tagged Solo WT, and its mutants, a GEF activity-defective mutant (Solo LE) and deletion mutants, and established MCF7 cells constantly expressing these probes. We investigated the conditions for biotinylation and succeeded to identify the proteins that are biotinylated specifically by BirA\*-GFP-Solo. It was also found that Solo interacts with several proteins, depending on the GEF activity. Currently, we are recovering these proteins for mass spectrometric analysis.

### **4. Establishment of new techniques to visualize mechanical forces in living cells**

To develop tension sensor probes that visualize the tensile force in living cells, we first constructed probe proteins for visualizing the tensile force at cell-cell adhesion sites. YFP (Venus) was inserted into the extracellular domain (near the transmembrane domain) of E-cadherin, and a red fluorescent protein mCherry was fused to the C-terminal of the intracellular domain. Venus was inserted as circular permutation Venus mutants. Several constructs exhibited YFP fluorescence of the circular permutation Venus mutants at the cell-cell adhesion site. To examine whether these probes are useful for detecting tensile force, we are testing the effect of ROCK inhibitor on YFP fluorescence at cell-cell adhesion sites. In addition to these probes, we also examined whether YFP-tagged myosin S1 fragment or YFP-tagged Solo can be used to detect mechanical force in cells, using MDCK cells constitutively expressing these constructs. We started to examine whether these probes work as tension sensors using the cell contraction assay.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 3件）

1. Fujiwara S., Ohashi K., Mashiko T., Kondo H., Mizuno K. Interplay between Solo and keratin filaments is crucial for force-induced stress fiber reinforcement. *Molecular Biology of the Cell*. 2016, 27, 954-66.
2. Morita R., Kihara M., Nakatsu Y., Nomoto Y., Ogawa M., Ohashi K., Mizuno K., Tachikawa T., Ishimoto Y., Morishita Y., Tsuji T. Coordination of cellular dynamics contributes to tooth epithelium deformations. 2016, 11, PLoS One. 11, e0161336.
3. Ohashi K., Fujiwara S., Mizuno K. Roles of the cytoskeleton, cell adhesion, and Rho signaling in mechanosensing and mechanotransduction. 2016, *J. Biochemistry*. 161, 245-54.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 西村亮祐, 大橋一正, 藤原佐知子, 水野 健作, 日本生化学会東北支部第82回例会・シンポジウム, 2016/5/21, 国内.
2. 西村亮祐, 大橋一正, 藤原佐知子, 水野 健作, 第68回日本細胞生物学会大会, 2016/6/15, 国内.
3. 藤原 佐知子, 大橋一正, 水野 健作, 第68回日本細胞生物学会大会, 2016/6/16, 国内.
4. Ohashi, K, 5th Japanese-German University Presidents' Conference (HeKKSaGOn German-Japanese University Network), 2016/9/29, ドイツ.
5. 大橋一正, 西村 亮祐, 藤原 佐知子, 水野 健作, 第39回日本分子生物学会年会, 2016/11/30, 国内.
6. 水野 健作, 藤原 佐知子, 大橋一正, 第39回日本分子生物学会年会, 2016/12/2, 国内.
7. 西村 亮祐, 大橋一正, 藤原 佐知子, 水野 健作, 2017年生体運動研究合同班会議プログラム, 2017/1/7, 国内.
8. Mizuno K., Fujiwara S., Ohashi K., 新学術領域研究「動的秩序と機能」第5回国際シンポジウム, 2017/1/22, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし