

24 上皮細胞集団の力学的秩序を制御する分子機構の解明	大橋 一正
------------------------------------	--------------

【目的】 細胞は、多様な機械的な力を受けており、これを感知して応答する（力覚応答）を行うことが知られている。細胞内アクチン骨格は、細胞の形態と運動を制御する主要な細胞骨格であり、力覚応答においても力の発生や形態の制御に重要な機能を担っていると考えられるが、その分子機構は未だ多くの部分が不明である。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 Rho GDP-GTP 交換因子 (RhoGEF) に注目して探索し、細胞の力覚応答に関与する Solo を同定した。さらに、Solo は、中間径フィラメントであるケラチン 8/18 繊維と結合して機能することを見出し、上皮細胞の集団移動や管腔形成に関与することを明らかにしてきた。本研究は、Solo と相互作用する蛋白質を網羅的に探索するとともに、細胞への力負荷実験方法を確立し、細胞に負荷される力を感知し、Solo を介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行う分子機構とその生理的意義を解明することを目的に行った。

【方法】 1. Solo の結合蛋白質の網羅的探索：Solo に関与する蛋白質の網羅的探索は、生細胞における近位依存性ビオチン標識法により関心蛋白質の相互作用蛋白質を同定する BioID 法と質量分析を組み合わせたプロテオーム解析によって行った。見出された蛋白質の中で Solo と機能的関与が見出された PDZ-RhoGEF について、イヌ腎上皮 MDCK 細胞をモデルにアクチン骨格の再構築に対する Solo と PDZ-RhoGEF の相互作用の働きを解析した。2. 細胞への張力負荷実験方法：細胞を簡単に引っ張るために、MDCK 細胞を用い、化学誘導二量体化法を用いて任意の時に収縮させることができる MDCK 細胞（収縮細胞）を作製した。この収縮細胞を用いて蛍光蛋白質 YFP を融合した Solo (YFP-Solo) を発現する MDCK 細胞が収縮細胞によって引張られる様子を蛍光顕微鏡によって観察した。

【結果】 1. Solo の結合蛋白質の網羅的探索：BioID 法を用いた Solo の相互作用蛋白質のプロテオーム解析より、これまでに見出されていたケラチン 8/18 に加え、アクチン骨格と中間径フィラメントとの結合蛋白質や細胞膜骨格の構成蛋白質、Solo と同じ RhoGEF である PDZ-RhoGEF が同定された。2. Solo 結合蛋白質としての PDZ-RhoGEF の機能解析：PDZ-RhoGEF について、Solo に対する機能を解析した結果、PDZ-RhoGEF は、Solo が集積する細胞基底部に集積し、その部位での Solo によるアクチン重合を促進した。これらの結果から、Solo と PDZ-RhoGEF は、カスケードを形成して力覚応答に働いていることが強く示唆された。3. 細胞間接着部位への力負荷依存的な Solo の局在化機構の解析：YFP-Solo を発現する MDCK 細胞を収縮細胞によって引張った結果、引張開始から 30 分以降に細胞間接着部位へ YFP-Solo が集積する様子が観察された。この結果から、Solo は、細胞間接着部位の張力によって局在が制御され、ケラチン繊維ネットワークを再構築して、細胞間接着部位の強度の調節を担っている可能性が考えられた。

Solo を介したアクチン骨格と中間径フィラメントの共役による細胞の力学的環境の制御

