

細胞内力学伝達により引き起こされる細胞核遺伝子発現メカニズムの解明

坂元尚哉*

Study on gene expression mechanism regulated by intracellular force transmission to nucleus

Naoya Sakamoto*

In this study, the author investigated responses of nesprin knocked-down endothelial cells (ECs) subjected to uniaxial stretch to understand the role of nucleus-actin filaments bindings via nesprins in force transmission to the nucleus. Wild-type ECs reoriented perpendicular to the stretching direction, whereas such morphological changes were not observed in the nesprin knockdown cells. In nesprin-1 knockdown ECs subjected to stretching, horizontal strain of nuclei increased compared to that in wild-type cells. This suggests that nesprin-1 knockdown releases the nucleus from tension of actin filaments bound to the nucleus, thereby increasing allowance for deformation before stretching and the nucleus was compressed by actin cortical layer under stretching condition. These results indicate that actin filaments bound to the nucleus via nesprins cause sustainable force transmission to the nucleus.

1. はじめに

細胞核は Nuclear envelope spectrin repeat protein (Nesprin), Sad1p-UNC84 (SUN), Lamin により構成される Linker of nucleus and cytoskeleton (LINC) 複合体を介して細胞骨格と結合することが示唆されている。LINC 複合体のうち、細胞骨格に直接結合する Nesprin には Nesprin-1 から-4 の 4 種類が存在し、特に Nesprin-1/2 は細胞骨格のうちアクチンフィラメントに結合することが報告されている⁽¹⁾。

アクチンフィラメントは細胞形態の維持・変化に重要な役割を担い、LINC 複合体を介して細胞外からの力学刺激を細胞核に直接伝達すると考えられている。これまでに、LINC 複合体に異常が生じると、様々な遺伝性疾患や細胞の遺伝子発現変化、機能・形態の異常を引き起こす事が報告され^(2, 3)、これらの異常はアクチンフィラメントおよび LINC 複合体を介した細胞核への力学伝達が抑制されることに起因すると考えられている⁽⁴⁾。しかしながら、LINC 複合体を介した細胞核-細胞骨格結合に着目した力学的な観点からの研究は行われておらず、LINC 複合体を介した細胞核-細胞骨格結合が細胞核への力学伝達を担う役割について詳細は明らかにされていない。

本研究では RNA 干渉法により Nesprin 発現を抑制した細胞を用いて、細胞核への力学伝達が力学刺激に対する形態応答に果たす役割を検討した。また力学刺激負荷時の細胞核の変形を評価し、Nesprin を介した細胞核へ力学伝達メカニズムを検討した。

2. 実験方法

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (継代 4-7 代目) を実験に用いた。細胞培養液には抗生物質、10ng/ml ヒト塩基性繊維芽細胞増殖因子 (Austral Biologicals), ウシ胎児血清 (Sigma Aldrich) を含む Medium 199 (Invitrogen) 用いた。Nesprin-1 もしくは Nesprin-2 に対する siRNA (Dermacon) を導入することにより、Nesprin 発現を特異的に抑制した。Nesprin の発現抑制および他の核膜タンパク質発現に変化が無いことを免疫蛍光染色法により予め確認した。

ファイブロネクチンコーティングを予め施したストレッチチャンバ (Strex) に Nesprin 発現抑制した細胞を播種し、繰り返し伸展刺激負荷装置を用いて伸展率 10%, 周波数 0.5Hz で伸展刺激を 18 時間負荷した。その後、アクチンフィラメントを Alexa Fluor 546 phalloidin, 細胞核を DAPI, 細胞間接着タンパク質である VE-cadherin を蛍光染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞の蛍光画像を取得した。得られた画像から画像解析ソフト ImageJ を用いて細胞の輪郭を抽出し、伸展刺激負荷方向を 0° とし 90° までの範囲で細胞の配向角を算出した。60° から 90° の配向角を示した細胞を配向した細胞と定義した。

2013年3月31日 受理

*豊田理研スカラー

(川崎医療福祉大学医療技術学部臨床工学科)

細胞核への力学伝達指標として伸展刺激負荷に伴う細胞核変形を評価した。ストレッチチャンバ内で培養した生細胞内の細胞核を Hoechst33342 で蛍光標識した後、共焦点レーザー顕微鏡ステージに設置した伸展刺激負荷装置を用いてストレッチチャンバに20%の伸展を負荷した。負荷前後で取得した細胞核中心付近の横断面画像から細胞核の高さおよび水平方向の幅の変化を算出した。

3. 結果および考察

伸展刺激を負荷する前の静置培養状態において、siRNA で処理した細胞と無処理の細胞 (Wild type, WT 細胞) との間に形態に差は見られなかった。WT 細胞では細胞核を取り囲むようなアクチンフィラメント構造が観察されたが、Nesprin を発現抑制した細胞では細胞核周囲のアクチンフィラメントが減少した。

伸展刺激負荷後、WT 細胞は伸展方向に対して垂直方向への配向を示し、細胞内においても垂直方向へ太いアクチンフィラ

メント構造の形成が見られた (図 1)。一方、Nesprin-1 または Nesprin-2 の発現を抑制した細胞では伸展刺激負荷前に比べ細胞形態およびアクチンフィラメント構造に変化は見られなかった。配向角を調べた結果、60%以上の WT 細胞が伸展刺激に対して配向性を示したが、Nesprin 発現抑制細胞では伸展刺激負荷による配向角変化が見られなかった。この結果は Nesprin を介したアクチンフィラメントから細胞核への力学伝達が内皮細胞の形態応答に必要であることを示す。

Nesprin-1 を発現抑制した細胞および WT 細胞の細胞核横断面画像を図 2 に示す。静置培養状態において Nesprin-1 発現抑制細胞の細胞核の幅は WT 細胞に比べ減少していた。細胞核高さには変化が見られなかった。Nesprin-1 を発現抑制した細胞では、WT 細胞に比べ伸展負荷時の水平方向ひずみが有意に増加した。一方、伸展負荷により細胞核には圧縮変形を生じる傾向がみられたが、WT 細胞および Nesprin 発現抑制細胞間での差は見られなかった。

Nesprin 発現抑制した細胞では細胞核周囲のアクチンフィラメント減少が見られた。これにより Nesprin 発現抑制により細胞核とアクチンフィラメント結合の減少が示唆される。また細胞核-アクチンフィラメント結合減少により、アクチンフィラメントが発生する水平方向の張力から細胞核が解放されたため、静置培養状態において WT 細胞に比べ Nesprin-1 発現を抑制した細胞の細胞核幅が減少したと考えられる。伸展刺激を負荷した場合、また細胞核は細胞核を裏打ちするアクチン皮層からの圧縮力を受けて変形し、アクチン皮層は Nesprin 発現抑制による影響を受けないと考えられることから、Nesprin 発現抑制細胞において WT 細胞と同様な変形が生じたと示唆される。しかし、伸展刺激負荷前において水平方向の幅が減少していたことから Nesprin 発現抑制細胞ではひずみ量が WT に比べ増加したと考えられる。これらのことから、Nesprin を含む LINC 複合体を介した細胞核への力学伝達は恒常的に生じ、細胞に力学刺激が作用した際の細胞核変形挙動に影響を与えると言える。細胞核の変形は内部に含まれるクロマチン構造変化を引き起こし遺伝子発現に影響を及ぼすことが指摘されており⁽⁴⁾、本研究において観察された力学刺激に対する細胞の形態応答に深く関与していると考えられる。

4. おわりに

本研究では細胞核とアクチンフィラメントを結合する LINC 複合体の一つ Nesprin の発現を抑制することで血管内皮細胞の繰り返し伸展刺激に対する形態応答が抑制され、伸展刺激時における細胞核変形挙動が変化することを示した。アクチンフィラメントを介した細胞核への力学伝達は細胞核形状に影響を与え、遺伝子発現を変化させる可能性が示唆された。

REFERENCES

- (1) Mellad J, et al, Nesprins LINC the nucleus and cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* (2011), 23, pp 47-54.
- (2) Mejet A and Misteli, LINC complexes in health and disease. *Nucleus* (2010), 1, pp 40-52.
- (3) Chancellor TJ, et al, Actomyosin tension exerted on the nucleus through nesprin-1 connections influences endothelial cell adhesion, migration, and cyclic strain-induced reorientation. *Biophys J* (2010), 99, pp 115-123.
- (4) Wang N. et. al., Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2009), 10, pp 75-82.

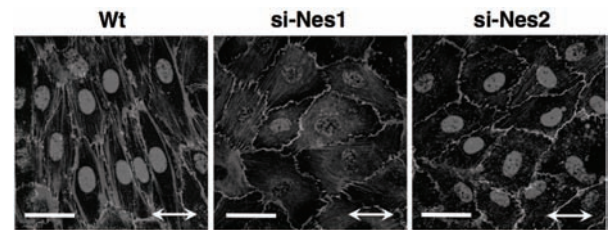


図 1 繰り返し伸展刺激を負荷した内皮細胞の蛍光画像 (18 時間負荷後。Wt, WT 細胞; si-Nes1, Nesprin-1 発現抑制細胞; si-Nes2, Nesprin-2 発現抑制細胞。バーは 30 μ m, 矢印は伸展方向を示す。)

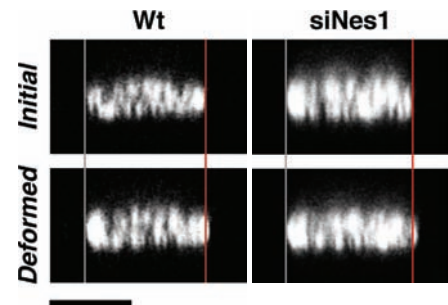


図 2 伸展負荷した内皮細胞の細胞核横断面蛍光画像 (20%伸展。Wt, WT 細胞; si-Nes1, Nesprin-1 発現抑制細胞。バーは 10 μ m。)