

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14692

研究課題名(和文)光操作による膜形状変化と膜上シグナリング誘導の解析

研究課題名(英文)Analysis of membrane deformation and signaling using optogenetic approach

研究代表者

島田 奈央(Shimada, Nao)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：90596850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞において膜の変形は主に膜直下で細胞骨格タンパク質の再編成が行われ続けることによるが、これを司るシグナル因子もまた細胞膜上に存在している。このように膜はシグナル伝達を行う場を提供する役割をもつが、膜の変形がシグナル伝達にあたる作用は明らかになっていない。本申請ではアメーバ様運動を行う細胞を模倣した構成的実験で、リン脂質膜の変形を操作する系の確立を目指した。膜に結合、変形させる機能をもつことが期待されるBARドメインタンパク質の機能を同定、改変し、光操作によって細胞骨格非存在下で膜を変形させる実験系の確立を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リボソームや油層中の水滴といった細胞と模した構成的研究は盛んに行われている。しかし実際の細胞膜はこれらとは異なり複雑な貫入や突出がある。本研究は貫入と突出を時空間的に操作する実験系の確立はできなかったが、BARドメインタンパク質の有無により膜の形状を内部より変えられることを示した。これを再構成実験に応用することで、脂質膜上で行われる生体反応をより細胞に近い状態で再現しうることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In living cells, membrane deformation caused by actomyosin reorganization regulated by signal molecules lie on them. In this process, the membrane serves as reaction field for signal molecules to organize cytoskeletal proteins. However, it remains unclear how the membrane deformation affects those signaling on plasma membrane. In this work, we try to establish the optogenetic approach for manipulation of membrane deformation spatiotemporally using modified BAR-domain proteins in reconstitution system without cytoskeletal proteins.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リン脂質膜-タンパク質相互作用 BARドメインタンパク質 細胞性粘菌 膜変形 再構成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜の変形をともなう生命現象には、エンドサイトーシスやファゴサイトーシスなど数百ナノメートルサイズのものから、細胞運動にみられるような仮足形成など仮数マイクロメートルにわたる変形があげられる。これらはその時間的・空間的大きさの違いから関連のない現象に見えるが、これらの調節は共通したタンパク質によって行われる。例としてアクチン・ミオシンの他その調節因子である Arp2/3 や WAVE 複合体、これと細胞内膜を繋ぐ Bin-amphiphysin-Rvs (BAR) スーパーファミリータンパク質が挙げられる[1]。BAR スーパーファミリータンパク質は N 末端に特徴的な F-BAR, N-BAR I-BAR ドメインをもち、それぞれ脂質膜の曲率の正負を感知し選択的に結合することが報告されている [2][3]。これは初めはリポソームを用いた構成的な実験で証明されたが、例えば数百ナノメートルの突起をもった基盤上に細胞を置いた場合に形質膜の変形部に BAR ドメインタンパク質の蓄積が誘導されることから、細胞が外場から与えられる凹凸を感じ取るセンサーのような機能をもつと考えられる[4]。また興味深いことに同じ基盤上でエンドソーム形成因子であるクラスリンについても BAR タンパク質とは独立して膜への蓄積が誘導されたがエンドサイトーシスは誘起しなかった[4]。これは BAR ドメインの局在だけでなく、それをエンドソーム形成または仮足形成につなげるためのシグナル増幅ないし抑制機構があることを示唆する。しかしながらこれまで膜変形が BAR タンパク質を介して細胞骨格関連因子局在を誘起する報告は多数知られているが、膜変形により膜上のシグナル伝達因子を活性化、不活性化が促進される報告は未だない。

### 2. 研究の目的

細胞膜の変形をともなう生命現象である、エンドサイトーシスやファゴサイトーシス、細胞運動の際の仮足形成においては、膜直下でアクチン・ミオシンや調節因子である Arp2/3 や WAVE 複合体、BAR ファミリータンパク質などの再編成が絶えず行われている。一方、これらの再編成の調節を司るシグナル因子も細胞膜上に存在しているが、膜の変形がシグナル伝達に与える作用はほとんど明らかになっていない。そこで本研究は構成的アプローチにより、改変 BAR タンパク質を光操作することで脂質膜を変形させる系を確立する。これと精製した低分子量 G タンパク質 Ras やフォスファチジルイノシトールシグナリング因子などのシグナル因子を組み合わせ、活性化量・生成物の比較を行うことで、膜の変形がシグナル伝達を増幅・抑制する機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) 光誘導性 BAR ドメインタンパク質を設計・構築・精製し、青色光によりリポソーム膜の変形を誘起する実験系を確立する。
- (2) (1) を確立したのち、光誘導性 BAR ドメインタンパク質を封入したリポソームに対し、細胞でみられる膜上のシグナル伝達反応である Ras の活性経路やイノシトールリン脂質経路を構成し、膜の変形に依存した局在変化や、酵素反応の促進や阻害が起こるか明らかにする。

### 4. 研究成果

- (1) 細胞性粘菌 BAR ドメインタンパク質の RFP タグ発現コンストラクトの構築および、タンパク質精製を行った。細胞性粘菌の BAR ドメインタンパク質である SLP (Syndapin-like protein)、NLP (Nwk/Bzz1p-like protein) について、可視化のための RFP タグ、精製のための GST タグを付加したコンストラクトを構築し大腸菌で発現させ精製を行った。同様に SLP、NLP の BAR ドメインのみ(NLP-BAR, SLP-BAR)、または BAR ドメインを欠失させたもの(NLP $\Delta$ BAR)についても精製を行った(図 1)。

#### (2) 精製 SLP, NLP のリン脂質相互作用と機能解析

フォスファチジルコリン、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール(4,5)-ビスリン酸で構成されたリポソーム外へ精製 NLP, SLP タンパク質を与え、共焦点顕微鏡で観察を行った結果、脂質膜上で RFP 蛍光が観察された。同様に NLP-BAR, SLP-BAR も脂質膜上への局在が観察されたが、BAR ドメインもない(NLP $\Delta$ BAR)は脂質膜上への局在が観察されなかった。このことからこのリン脂質膜への局在は BAR ドメインを介していることが示された。これらの脂質をデカンに溶解しこの油相中で精製タンパク質を含む水滴を形成させると、リポソームの場合と同様に油相と水相の界面(脂質一枚膜)上で RFP 蛍光が観察された(図 2A)。PI(4,5)P<sub>2</sub> を含まない脂質を用いると脂質膜上の蛍光輝度が低下したことから、この結合にはリン脂質の構成成分に依存していることも示された。

油相に形成した、NLP-BAR, SLP-BAR を含む水滴はしばしば形状の歪みが観察された(図 2B)。これは今回精製した BAR ドメインタンパク質は脂質変形能をもつことを示しており、BAR ドメインが膜変形のツールとして使用しうることが示された。

( 3 ) 光誘導性 BAR ドメインの構築と粘菌細胞内発現

( 2 ) より *in vitro* の実験系で BAR ドメインが膜変形能を持つことが示された。F-BAR の脂質膜への相互作用には二量体および多量体形成が必要であるという点に着目し [5]、暗条件下では二量体形成が阻害され、青色光を照射により多量体形成が促進、膜局在量を時空間的に操作できるようなコンストラクトを設計した。光誘導性タグとしてオーツ麦の改変 LOV ドメインを用いた [6]。これを粘菌細胞において発現させたところ、暗条件下でも形質膜局在を示し、また ( 4 ) で記述するようないくつかの表現型が観察された。暗条件下で形質膜局在をしない BAR ドメインの改変を試みたが、いずれのコンストラクトも光刺激なしの条件下で形質膜への局在が観察された。結果として、BAR ドメインの形質膜局在を光操作しうるコンストラクトは構築できなかった。

( 4 ) 細胞における局在解析

SLP, NLP の BAR ドメインが *in vitro* 同様に細胞内で機能を持つか調べるため、SLP-BAR, NLP-BAR の RFP タグを粘菌細胞で発現させ増殖期、発生期の細胞内局在を観察した。NLP-BAR は増殖期発生期ともに核と形質膜に局在を示した。一方、SLP-BAR は形質膜と核近傍に局在していた(図 3A)。SLP, NLP 全長はともに、先行研究と同様にその BAR ドメイン単独のものほど明確な形質膜局在を示さなかった[7]。また NLP $\Delta$ BAR は細胞質に局在していた。増殖期の細胞の基質接着面にみられるアクチン波と呼ばれる構造には全長 SLP の局在は観察されないが、SLP-BAR はその前端に線状に局在した(図 3B)。SLP-BAR を発現させた細胞は増殖が遅くしばしば多核の細胞となり BAR ドメインだけで機能をもちうることを示唆された(図 3C)。また、集合期の SLP 全長は SLP-BAR と異なり前後に連なる後ろ側の細胞の前端に線状に局在が観察された(図 3D)ことから、この局在については BAR ドメイン非依存であると考えられた。

本申請期間においては結果として、光遺伝学手法を用いて脂質膜変形を時空間的に操作する実験系は確立できなかったが、BAR ドメインタンパク質の有無により膜の形状変化を誘導することは実現できた。この機能はこれまでショウジョウバエの Nwk タンパク質の BAR ドメインで報告があり、F-BAR ドメインタンパク質に保存されている機能であると考えられる[8]。これを従来の再構成実験と組み合わせることで、脂質膜上で行われる生体反応をより本来の細胞に近い形で再現できることが期待される。

【文献】 [1] Itoh and Takenawa 2009, Progress in Lipid Research 48, 298-305 [2] Takenawa and Suetsugu 2007 Mol. Cell Biol. 8, 37-48 [3] Takano et al., 2008 The EMBO Journal (2008) 27, 2817-2828 [4] Saarikangas et al., Curr. Biol. 19, 95-107 [5] Galic et al., 2012 Nature Cell Biol. 14, 874-881 [6] Daumke et al., Cell 156, 882-892 [7] Guntas et al., PNAS, 2015, 112-117 [8] Lee et al., Biochimica et Biophysica Acta 1793 (2009) 1199-1209 [9] Kelley et al., Cell Reports (2015) 13, 2597-2609

【図】

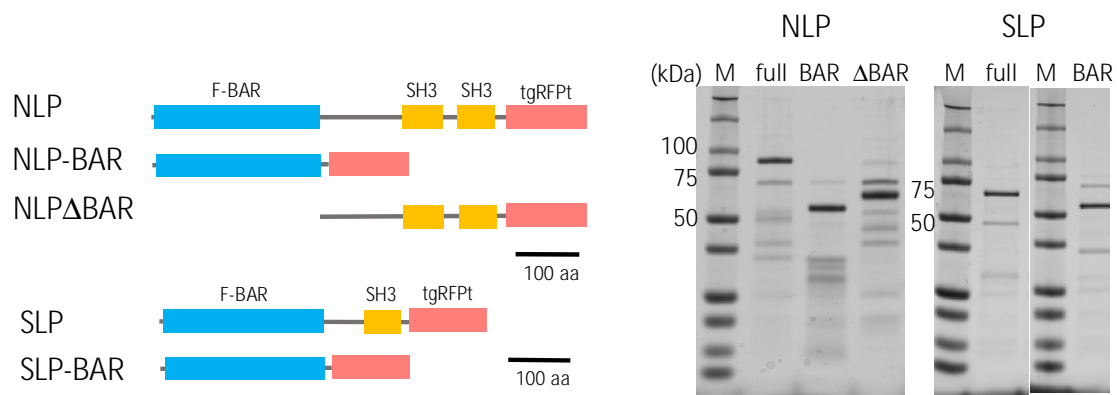


図1 BARドメインタンパク質の精製  
NLP, SLP のドメイン構造(左)と精製タンパク質のSDS-PAGE(右)

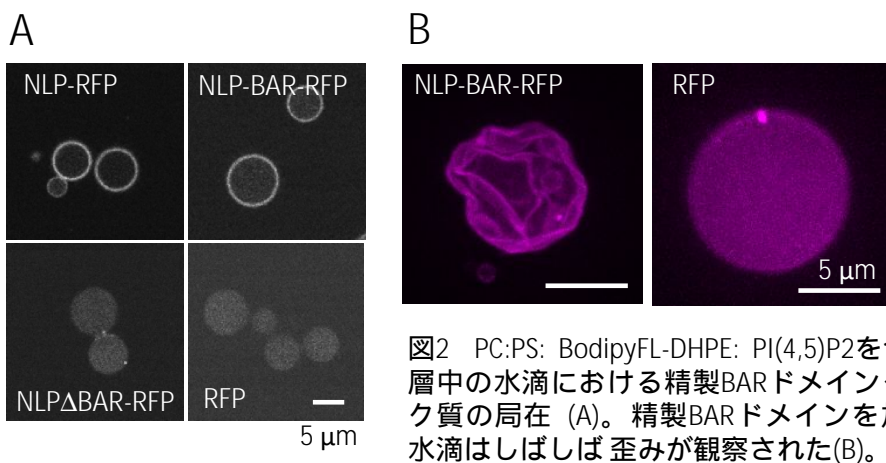


図2 PC:PS: BodipyFL-DHPE: PI(4,5)P2を含む油層中の水滴における精製BARドメインタンパク質の局在 (A)。精製BARドメインを加えた水滴はしばしば歪みが観察された(B)。

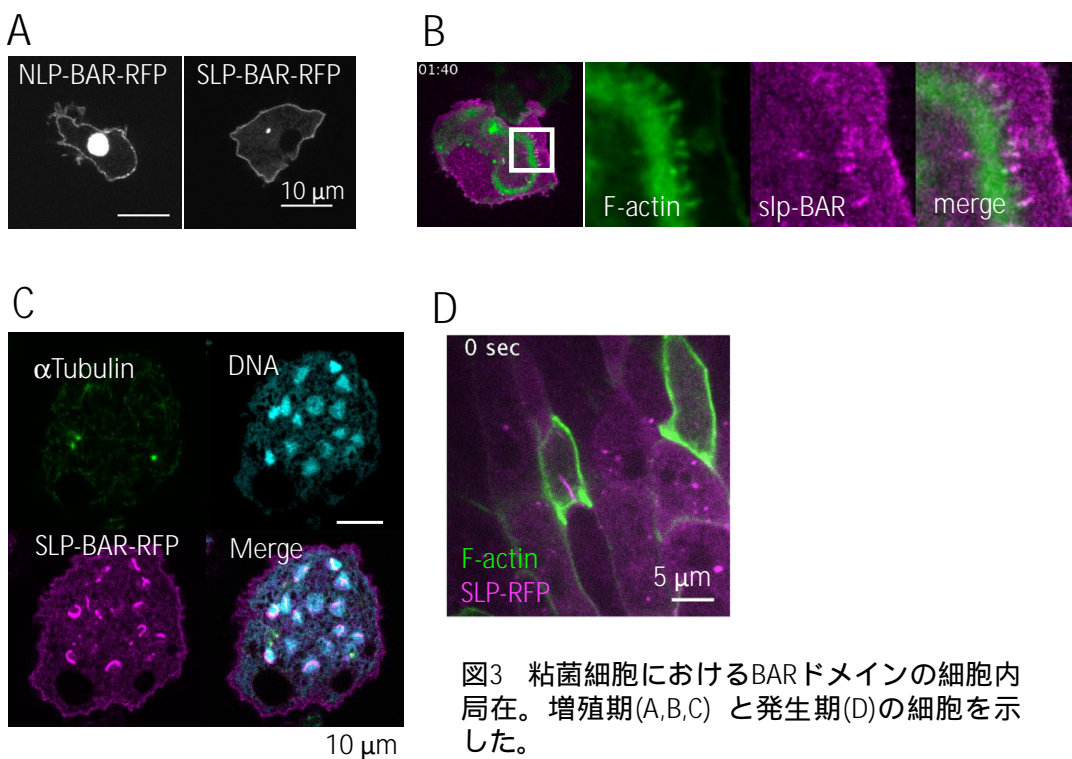


図3 粘菌細胞におけるBARドメインの細胞内局在。増殖期(A,B,C) と発生期(D)の細胞を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----