

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14725

研究課題名(和文)細胞膜の張力を可視化するプローブの開発

研究課題名(英文)Development of molecular fluorescent probes for plasma membrane tension

研究代表者

辻田 和也(Tsujita, Kazuya)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・講師

研究者番号：10457054

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):細胞膜の力学的性質である膜張力は、細胞運動や細胞分裂等の動的な細胞機能を理解するうえで必須な要素である。しかしながら、細胞膜の張力を可視化するプローブが存在しないため、細胞膜の張力がどのように、時空間的にこれらの生命現象を制御しているのか全く明らかではない。本研究により、FBP17のBARドメインが細胞膜張力の減少を感知するプローブとして最も適していることを明らかにした。ライブイメージングにより、このプローブは細胞膜張力のfluctuationを伴う伸展や退縮に依存して、ダイナミックに局在することが分かり、細胞膜張力の時空間的な勾配を直接可視化することに成功した。

研究成果の概要(英文):Tension in the plasma membrane plays an important roles in mechanical cellular functions, such as cell migration and division. however, it is unclear how plasma membrane tension regulates these processes in space and time. In this study, we identified membrane bending BAR domain of FBP17 as the probe for plasma membrane tension. Using the GFP-fusion probe combined with live imaging, we found that this probe dynamically localized to the plasma membrane by sensing the fluctuation of membrane tension during cell migration. Thus, this probe allows us to visualize a gradient of membrane tension in mechanical cellular processes.

研究分野：細胞生物学

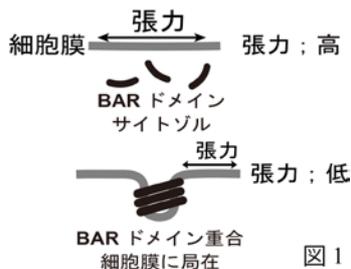
キーワード：細胞膜の張力 BARタンパク質

1. 研究開始当初の背景

細胞膜の張力は細胞膜の形状変形を伴う細胞運動、細胞分裂、発生等基本的な生命現象において必須な要素であり、近年注目を集めている。実際に、細胞運動、細胞分裂、上皮細胞の極性形成において細胞膜の張力が重要な役割を果たしていることが分かっている。また光ピンセットを用いた解析により、細胞運動や上皮細胞の極性形成の際、細胞膜の張力に勾配があることが明らかになってきた。例えば、上皮細胞では、頂端部側の細胞膜の張力が基部側よりも高いことが分かっている。これらの研究により、細胞膜の張力そのものがシグナルとして働き、これら細胞膜の変形を伴う細胞機能を制御していると考えられている (Houk A et al, *Cell*. 2012, Gauthier NC et al, *Trends Cell Biol*. 2012)。しかしながら、細胞膜の張力を特異的に認識するプローブが存在しないため、実際に細胞膜張力の時空間的な勾配を可視化することは不可能であった。またこのことにより、細胞膜の張力というシグナルが、どのように生化学的反応と時空間的にリンクするのか全く不明であり、細胞膜の張力を可視化するプローブの開発が急務であった。

2. 研究の目的

本研究では、膜張力依存的な膜変形活性を有する BAR ドメインファミリーに着目して、細胞膜の張力を減少を可視化するプローブを開発することを目的とする (図 1)。さらにその応用例として、細胞運動及び上皮細胞の極性形成時の細胞膜張力の勾配を実際に可視化することを目指す。



3. 研究の方法

(1) プローブの候補となる BAR, F-BAR ドメインのクローニング

候補となる BAR ドメインファミリーは、生体膜変形を有し、in vivo において、細胞膜を内側に引っ張って曲げる活性を持つものである。申請自身の研究及び文献から、BAR ドメインよりも F-BAR ドメインのほうが重合活性及び細胞膜変形活性が高く、プローブとして適しているが、凝集体を作りやすいという欠点があった。そこで、BAR ドメインと比較解析するために、8種類の BAR ドメイン群をクローニングした。細胞内においてリアルタイムで解析するために GFP 及び mCherry タグ付きのコンストラクトを作製した。

(2) BAR ドメインファミリーをプローブとして適するように改変

上記のように F-BAR ドメインは凝集体を作りやすい。これを克服するため、F-BAR ドメインの重合活性に関係するアミノ酸に変異を入れた変異体を作製する。FBP17 及び CIP4 の F-BAR ドメインに関しては、申請者らの研究によりその立体構造及び自己重合のメカニズムが既に明らかになっており (Shimada et al, *Cell* 2007)、重合に関与するアミノ酸が分かっている。そこで、これらのアミノ酸に変異を入れた変異体を作製し、細胞に発現させて、膜変形能を維持しかつ凝集体を作らない変異体を作製した。また F-BAR ドメインは面全体で酸性リン脂質に結合するので、脂質特異性はないが、酸性リン脂質に対する親和性が高い。そこで酸性リン脂質への親和性を下げた場合、膜張力への依存性が増すかどうか調べるために、脂質結合に関与するアミノ酸にも変異を入れた変異体も作製した。BAR ドメインに関しては、Amphiphysin の BAR ドメインはその N 末端に、膜の曲率を認識する両親媒性ヘリックスをもっているため、これを無くして、膜張力のみに対応する変異体

を作製した。

(3) 細胞伸展装置を用いて、細胞膜の張力に応答して、細胞膜にリクルートする BAR ドメインファミリーの同定

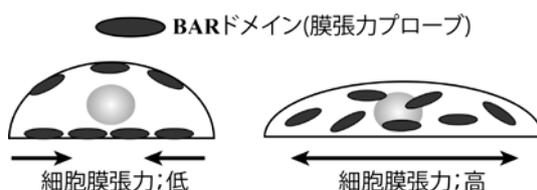
前年度に同定したプローブの候補となる BAR ドメインファミリーが、細胞膜の張力の変動に応じて重合して細胞膜にリクルートするか明らかにした。細胞膜の張力を操作するために細胞伸展装置を用いた。この原理は、シリコンゴムで作製したディッシュに細胞をまき、ディッシュを機械的に変形させることで細胞の張力を変化させる。つまりゴム製のディッシュを伸ばしたり縮めたりすることで細胞を伸び縮みさせ、細胞膜の張力を直接操作することができる。この装置を用いて、細胞膜の張力を操作したときの BAR ドメインの動きを解析した。コントロールとして、膜の張力を認識しないリン脂質結合タンパク質を用いて、細胞膜張力の変動に応答しないことを確認した。実際に細胞を縮めて細胞膜の張力を下げた時、細胞膜にリクルートして、かつ細胞を伸ばして張力を上げた時、細胞膜から綺麗に外れる BAR ドメインを同定して、細胞膜の張力特異的なプローブの候補した。

(4) 同定した細胞膜張力プローブが細胞膜張力の勾配を認識しているか、細胞運動を例として、ライブイメージングにより解析した。細胞運動に関しては、運動先端側の細胞膜張力は変動しており、細胞後方の膜張力より優位に低いことが示唆されている。そこで、実際に同定したプローブが、細胞先端側に特異的に濃縮しているかどうか調べた。さらに、プローブが細胞膜の張力を特異的に認識して先端に局在しているか確認するため、細胞伸展装置を用いて、細胞運動時の細胞膜の張力を人工的に下げた時、プローブの先端への極性が崩壊して、細胞膜全体に局在化するかどうか調べた。逆に、細胞膜の張力を人工

的に上げた時、プローブが細胞先端から外れるかどうか明らかにした。

4. 研究成果

細胞伸展装置及び浸透圧の変化を用いた解析により、FBP17 の BAR ドメインが細胞膜張力の減少を感知するプローブとして最も適していることを明らかにした。



コンフォーカルレーザー顕微鏡を用いたライブイメージングにより、細胞膜張力のプローブは、細胞運動の際に、移動先端における細胞膜の退縮に伴い重合し、逆に細胞膜の伸展により、脱重合することを明らかにした。この移動先端における膜の退縮・伸展により、細胞膜の張力は変動することが知られており、膜張力プローブにより、細胞膜の張力の変動を直接可視化することに成功した。この膜張力プローブを用いることにより、細胞膜の張力とアクチン重合のような生化学的反応との時空間的な相関性を直接イメージングで解析可能になると考えられる。さらに、このプローブをゼブラフィッシュの胚等に導入して、in vivo イメージングを行うことにより、生体における細胞膜張力の可視化が可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

辻田和也.

生体膜変形タンパク質による細胞膜の張力を介したアクチン重合制御機構

生化学 4, 508-514 (2017) 査読無

[学会発表] (計 3 件)

① 辻田和也、伊藤俊樹
細胞膜張力の恒常性制御機構、ConBio2017
ワークショップ 2017

② Kazuya Tsujita
Role of plasma membrane tension in cell
migration and invasion、第 55 回生物物理
学会シンポジウム 2017

③ 辻田和也、伊藤俊樹
細胞運動時の極性形成における細胞膜の張
力と膜変形タンパク質のフィードバック調
節機構、第 89 回日本生化学学会フォーラム
2016

[図書] (計 2 件)

① 辻田和也
膜変形タンパク質による細胞膜の張力を介
した細胞運動の制御
生体の科学 67, P122-126 (2016)

② 辻田和也
細胞運動を制御する細胞膜の張力を介した
メカノトランスダクション
臨床免疫・アレルギー科. 65, 174-179 (2016)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻田 和也 (Kazuya Tsujita)
神戸大学バイオシグナル総合研究センタ
ー・講師
研究者番号：10457054

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()