

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06638

研究課題名（和文）細胞膜直下におけるアクチン重合のネガティブフィードバック制御

研究課題名（英文）A feedback mechanism between the plasma membrane and the actin cytoskeleton underneath during cell migration

研究代表者

伊藤 俊樹 (Itoh, Toshiki)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・教授

研究者番号：30313092

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞運動において、細胞骨格は細胞膜を内側から押しながら伸展させることで駆動力を発揮する。効率的な細胞運動には、広がった細胞膜を退縮させる機能分子とのフィードバック制御が重要であるが、そのメカニズムは不明である。本研究では、細胞骨格を制御する活性を持ちながら、細胞膜にかかる張力を制御、感知するタンパク質群に着目し、細胞膜の伸展および退縮と細胞骨格をつなぐフィードバック制御機構の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞運動は個体発生や免疫機能などの生理的なプロセスにおいてだけでなく、がん悪性化などの重篤な病態に関わる重要な生命現象である。複雑な組織組織内を移動していくため、運動する細胞は自身の形態を柔軟に変化させ、その進路を効率的に選択する必要がある。本研究の成果は、このダイナミックな現象を支えるメカニズムの一端を明らかにするものであり、細胞運動に関わる生理、病理現象の理解への新たな理解と、これまでにない介入アプローチが期待される。

研究成果の概要（英文）：In cell migration, the cytoskeleton exerts a driving force by stretching the plasma membrane by pushing it from the inside. A feedback mechanism that regulates the retraction of the extended plasma membrane is vital for efficient cell movement, but its molecular detail is unknown. In this study, we focused on a group of proteins that control and sense the tension applied to the plasma membrane with the activity of regulating the actin cytoskeleton. Our results reveal a part of the feedback mechanism between the plasma membrane and the actin cytoskeleton underneath during cell migration.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞運動 細胞膜 細胞骨格 Rac F-BARドメイン 膜張力

1. 研究開始当初の背景

細胞膜直下のアクチン重合は、膜を細胞の外側に向かって押し広げることで、接着、運動、貪食など、細胞の多彩な動態を支えている。同時に、細胞膜は無秩序に「広がりすぎない」ようになっており、広がった膜は速やかに退縮して細胞体に回収される。このような膜の動きは細胞運動において特に重要である。例えば、細胞が進路を探索しながら運動する際、一度伸ばした膜を退縮させ、再び別の方向へ伸ばしていく。また、運動の後方において細胞膜を退縮させることで、細胞は前方に重心を移しながら進んでいく。細胞膜を伸展させるアクチン重合は、低分子量 G タンパク質 Rac によって制御されている。したがって、「広がった膜が退縮するメカニズム」は「伸ばした細胞膜の形状や張力を感知して Rac をオフにするフィードバック制御」と捉えることができる。

申請者は「膜の伸縮に伴う形状と張力の変化」を感知・認識する一群のタンパク質として、F-BAR ドメインファミリーを発見し (Itoh, Dev. Cell 2005)、細胞運動における役割を明らかにしてきた (Itoh, Sci. Signal. 2009; Tsujita, J. Cell Sci. 2013; Yamazaki, Mol. Biol. Cell 2013; Yamamoto, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018)。その中でも膜の凸面に結合し、Rac/Cdc42 依存的なアクチン重合を促す FBP17 について、「細胞膜張力の低下を感知してアクチン重合を活性化するメカニズム」を報告している (Tsujita, Nat. Cell Biol. 2015)。しかし逆反応である「膜の広がりに伴う張力の上昇を感知してアクチン重合を抑制するメカニズム」は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では F-BAR ドメインファミリーに属する「srGAP」に着目する。このタンパクは (FBP17 とは正反対に) 膜の凹面を認識する F-BAR ドメインと、Rac に対する GAP ドメインを持つ。申請者らの研究実績および予備実験から、srGAP1 の F-BAR ドメインは広がった細胞膜の先端部分に特異的に局在することが観察されている。細胞の運動先端の膜には高い張力がかかっているだけでなく、細胞質側の表面は高度な凹面構造を呈している。そこで本研究では「srGAP が伸ばした細胞膜の形状を感知して退縮させるメカニズムを明らかにすること」を目的とする。本研究の成果は、細胞運動における極性化メカニズムだけでなく、より広範な細胞の形態形成を支えるフィードバック制御機構の理解をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

ラット腎由来上皮 NRK 細胞を用いて、細胞運動能を付与する活性型 Ras (RasG12V) をドキシサイクリン依存的に発現する細胞を樹立した。この細胞にドキシサイクリンを添加すると、細胞集団内での高度な運動能が観察される。ドキシサイクリン添加条件と非添加条件の細胞から RNA を採取し、マイクロアレイ解析により全遺伝子発現変化を定量した。発現変動が認められた遺伝子から srGAP ファミリー遺伝子を抽出し、細胞運動能との相関を検討した。遺伝子変動は定量的逆転写 PCR 法によっても評価した。特異的な遺伝子ノックダウン実験は、Horizon 社の ON-TARGETplus siRNA SMARTpool を用いて行った。上皮細胞の運動能の評価は、トランスウェルを用いた細胞運動アッセイにより行った。細胞形態および各 srGAP 遺伝子産物の細胞内局在解析は、蛍光タンパク質の遺伝子導入とファロイジン染色および特異的抗体による免疫染色後の固定サンプルを、レーザー共焦点顕微鏡で観察することにより行った。

4. 研究成果

NRK 細胞に誘導的に活性化型 Ras を発現する過程における各 srGAP 遺伝子の発現パターンを調べた。マイクロアレイによる網羅的遺伝子変動の解析から、興味深いことに、各 srGAP 遺伝子がそれぞれに特徴的な発現変動を行うことが認められた。これらの結果は定量的 PCR によっても確認され、上皮細胞の癌化に伴う各 srGAP 分子の関与を強く示唆している。そこで、正常上皮細胞を用いた細胞運動アッセイにより、各 srGAP 分子種のノックダウンの影響を検討したところ、ある特定の srGAP 遺伝子のノックダウンが、細胞運動能に顕著な影響を及ぼすことが確認された。そこで、当該 srGAP 分子の詳細な解析を行うこととした。

GFP タグを付加した、当該 srGAP 分子の各コンストラクトを COS-7 細胞に発現し、細胞形態を観察したところ、Rac の抑制活性を担う RacGAP ドメイン依存的に、細胞体の極度な退縮が認められた。細胞形態への影響が大きかったため、当該 srGAP 分子の細胞内局在を観察する目的で、GAP 活性を失う変異体を用いて解析した。その結果、本タンパク質が細胞運動における後方の退縮膜側に選択的に局在することが明らかとなった (図 1)。反対に、Rac の下流でアクチン重合を促進する方向に働く F-BAR タンパク質である FBP17 は、運動する細胞の先端端側に顕著な局在

が認められた (図 1)。

次に、この局在機構における細胞膜張力の役割を明らかにするため、細胞膜張力のマスターレギュレーターであるイノシトールリン脂質に着目した。細胞膜の主要なイノシトールリン脂質である PIP2 に対する脱リン酸化酵素を誘導的に膜移行させ、顕微鏡観察下で膜張力を急速に減少させた。その結果、この srGAP 分子の F-BAR+FX ドメインを介した細胞膜への局在が減弱することが観察された (図 2)。このことは、当初予想されたような単なる膜の曲率だけではなく、細胞膜直下のアクチン細胞骨格構造を介した膜張力に依存した、当該 srGAP 分子の局在機構を示唆している。

次に、上記の解析で見出した当該 srGAP 分子種のノックダウン細胞を用いて、細胞膜張力との関連性を詳細に検討した。正常上皮細胞に特異的 siRNA プールをトランスフェクションすることで、ノックダウン細胞を作成し、細胞表面にポリスチレンビーズを付着させ、赤外線レーザー照射によりビーズを引っ張る光ピンセット法により、細胞膜にかかる張力を測定した。その結果、当該 srGAP 分子のノックダウン細胞はコントロール細胞に比べて膜張力が大きく変化していることが明らかになった。以上の結果は、当該 srGAP 分子が細胞膜張力の調節に必須の役割を担っていることを示唆している。

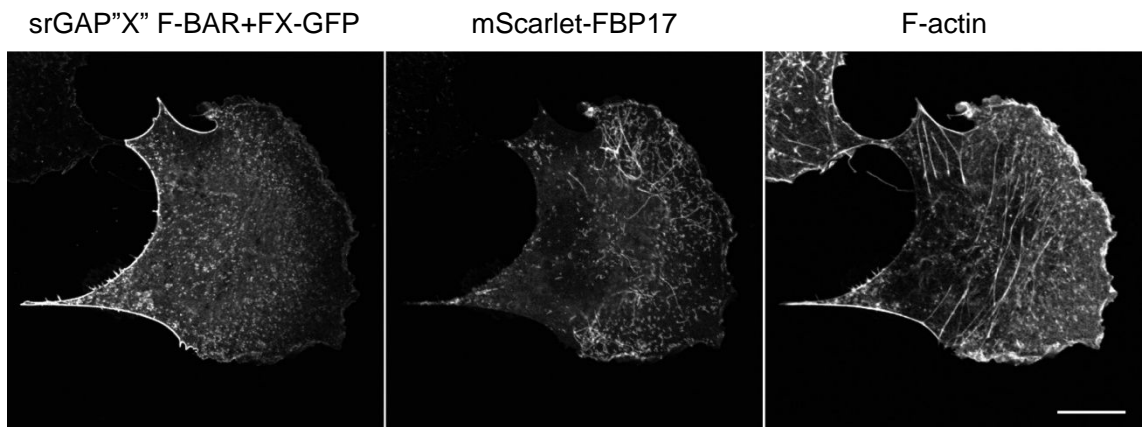


図 1 F-BAR ドメインタンパク質の細胞内局在。運動する COS-7 細胞における、当該 srGAP 分子 (srGAP " X " と表記) の F-BAR+FX 領域、FBP17、および F-actin を、それぞれに付加した蛍光タンパク質および蛍光標識ファロイジンにて可視化した。

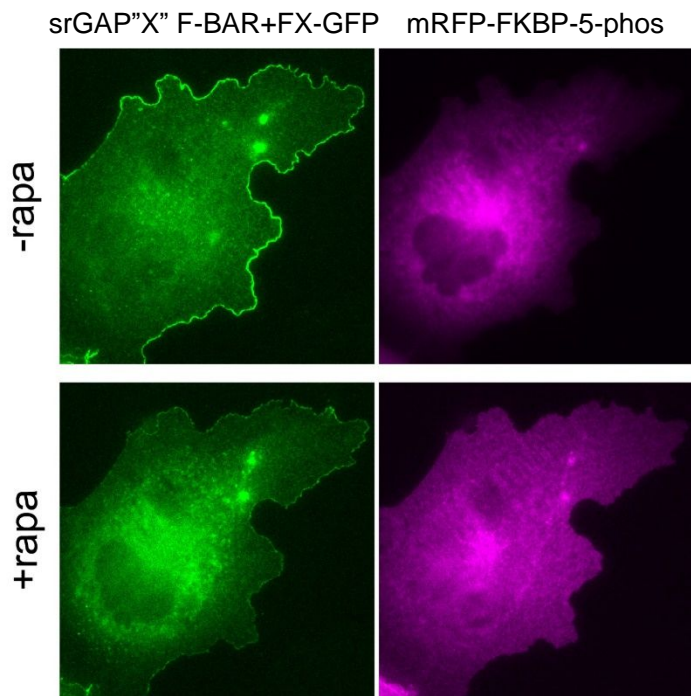


図 2 当該 srGAP 分子の細胞内局在の PIP2 依存性。COS-7 細胞に当該 srGAP 分子 (srGAP " X " と表記) の F-BAR+FX 領域と PIP2 脱リン酸化酵素 (FKBP タグ) および細胞膜移行シグナルを付加した FRB を共発現し、ラパマイシン (rapa) 添加後の挙動を蛍光顕微鏡で可視化した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jebri Imen, Tsujita Kazuya, Fujita Yasuyuki, Itoh Toshiki	4. 巻 543
2. 論文標題 Non-cell-autonomous migration of RasV12-transformed cells towards the basal side of surrounding normal cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 15~22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.01.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yan Lu, Tsujita Kazuya, Fujita Yasuyuki, Itoh Toshiki	4. 巻 1
2. 論文標題 PTEN is required for the migration and invasion of Ras transformed MDCK cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hasegawa Junya, Jebri Imen, Yamamoto Hikaru, Tsujita Kazuya, Tokuda Emi, Shibata Hideki, Maki Masatoshi, Itoh Toshiki	4. 巻 132
2. 論文標題 SH3YL1 cooperates with ESCRT-I in the sorting and degradation of the EGF receptor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.229179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masuda Toshihiro, Baba Kentarou, Nomura Takeshi, Tsujita Kazuya, Murayama Tomo, Itoh Toshiki, Takatani-Nakase Tomoka, Sokabe Masahiro, Inagaki Naoyuki, Futaki Shiroh	4. 巻 2
2. 論文標題 An influenza-derived membrane tension-modulating peptide regulates cell movement and morphology via actin remodeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0486-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsujita Kazuya, Satow Reiko, Asada Shinobu, Nakamura Yoshikazu, Arnes Luis, Sako Keisuke, Fujita Yasuyuki, Fukami Kiyoko, Itoh Toshiki	4. 巻 12
2. 論文標題 Homeostatic membrane tension constrains cancer cell dissemination by counteracting BAR protein assembly	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26156-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kamasaki Tomoko, Miyazaki Yumi, Ishikawa Susumu, Hoshiba Kazuya, Kuromiya Keisuke, Tanimura Nobuyuki, Mori Yusuke, Tsutsumi Motosuke, Nemoto Tomomi, Uehara Ryota, Suetsugu Shiro, Itoh Toshiki, Fujita Yasuyuki	4. 巻 24
2. 論文標題 FBP17-mediated finger-like membrane protrusions in cell competition between normal and RasV12-transformed cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102994 - 102994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102994	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Motegi Toshinori, Takiguchi Kingo, Tanaka-Takiguchi Yohko, Itoh Toshiki, Tero Ryugo	4. 巻 11
2. 論文標題 Physical Properties and Reactivity of Microdomains in Phosphatidylinositol-Containing Supported Lipid Bilayer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 339 - 339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/membranes11050339	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岡本聖香, 林大輝, 足立直子, Varnavas Mouchlis, 上田修司, 山之上稔, Edward Dennis, 伊藤俊樹, 斎藤 尚亮, 白井康仁
2. 発表標題 Vitamin E induces palmitoylation of 67kDa laminin receptor by direct binding .
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 閻 露、伊藤俊樹
2. 発表標題 The Dynamic Changes in PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3 are Required for the Elimination of RasG12V Transformed Cells by Cell Competition
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤俊樹、山本 光、ジェブライメン
2. 発表標題 リン脂質結合タンパク質SH3YL1の機能解析
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻田和也、伊藤俊樹
2. 発表標題 メカノバイオロジー研究の新展開 "力"による生命現象制御の理解深化に向けて
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神戸大学バイオシグナル総合研究センター 伊藤研究室 http://www.research.kobe-u.ac.jp/brce-itoh/papers.html
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------