

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06625

研究課題名(和文)細胞間接着の形成と維持におけるI-BARタンパク質を介した細胞膜の制御機能の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of membrane regulation of cell-cell adhesion by I-BAR proteins

研究代表者

西村 珠子(Nishimura, Tamako)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：40415261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞間の細胞間接着形成における細胞膜の役割については、不明な点が多い。我々は、突出膜の形成を制御するI-BARタンパク質の、細胞間接着形成における役割を調べた。その結果、I-BARタンパク質は、上皮細胞の突出膜構造に加え、細胞間接着に分布した。I-BARタンパク質をノックアウトすると、密着結合における直線性の低下と、アクチン繊維の減少が認められた。さらに、I-BARタンパク質のノックアウトにより、上皮バリア機能の低下が認められた。従って、I-BARタンパク質は、細胞間接着の形成および維持に重要な役割を有する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで不明であった細胞間接着の形成における細胞膜の形態制御の重要性が明らかとなった。細胞間接着は、生物の形態形成時に重要であり、I-BARタンパク質のノックアウトマウスは胎生致死を示すとの報告があることから、形態形成における細胞間接着の制御にI-BARタンパク質が関与する可能性が示唆された。また、細胞間接着の形成不全は、がんの浸潤・転移と関連していることから、I-BARタンパク質の機能不全ががんの悪性化に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The role of cell membranes in cell-cell adhesion formation between epithelial cells is largely unknown. We investigated the role of the I-BAR proteins, which regulate the formation of protruding membranes, in intercellular adhesion formation. The I-BAR proteins were distributed not only in the protruding membrane structures of epithelial cells but also in the cell-cell adhesion. Knocking-out the I-BAR proteins resulted in decreased linearity in tight junctions and decreased actin filaments. Furthermore, knockout of the I-BAR proteins resulted in the impairment of epithelial barrier function. Therefore, it was suggested that the I-BAR proteins may have an important role in the formation and maintenance of the cell-cell adhesion.

研究分野：細胞生物学

キーワード：I-BARタンパク質 細胞間接着

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は、隣接する同種細胞との間に細胞間接着を形成することで、上皮細胞層として機能する。細胞間接着は、まず接着分子カドヘリンやネクチンの結合による隣接細胞同士の細胞間接着により開始される。その後、クローディンの結合による密着結合の形成、接着部位の細胞質側を裏打ちする F-アクチン骨格の形成を経て、次第に成熟した細胞間接着が形成される。細胞間接着の形成および維持における細胞間接着分子とその細胞内結合分子、および接着部 F-アクチン骨格の構造、機能、およびそれらの活性制御機構については、これまでの広範な研究により、非常に多くの知見が得られている。

それに対し、細胞間接着の形成における細胞膜の役割については、未だ不明な点が多い。細胞間接着分子は細胞膜貫通タンパク質である。従って細胞膜は、接着形成の際には突出膜を形成し、細胞膜同士を近づけることで接着分子間の結合を促し、接着後には接着構造の安定性をサポートする役割を担うと考えられる。しかしながら、細胞間接着の際に突出膜形成は観察されるものの、その形態を時空間的に制御し接着を促進する機序は明らかでない。

BAR ファミリータンパク質は三日月形の二量体を形成し、陽電荷を介して脂質膜に結合し、多量体を形成することで、膜の形態を制御する。BAR ファミリータンパク質のうち I-BAR タンパク質は、5 種類の分子が知られ、フィロポディア、ラメリポディア等の突出膜の形成を制御する。しかしながら、I-BAR タンパク質の細胞間接着形成における関与は明らかでない。

我々は予備的検討により、I-BAR タンパク質のひとつが上皮細胞で突出膜に分布し、E-カドヘリンを介した細胞間接着の形成を促進するとともに、接着形成後の細胞間接着にも分布し、E-カドヘリンや密着結合の機能を制御する現象を見出した。従って、I-BAR タンパク質による細胞膜の形態制御が、細胞間接着の形成および維持を制御する可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、I-BAR タンパク質が、細胞膜の突起構造を形成して細胞間接着の形成を制御すると共に、膜を安定化して接着の維持に関与する分子メカニズムを明らかにする。そして、細胞間接着形成における細胞膜の形態制御の重要性を解明する。

3. 研究の方法

(1) I-BAR タンパク質による細胞間接着の形成過程の制御

mVenus を I-BAR タンパク質の上流にノックインした Caco2 細胞株を、ガラスベースディッシュにまきこみ、培養した後、CO₂ チャンバー付き共焦点顕微鏡でライブ観察を行い、細胞間接着の形成時における I-BAR タンパク質の挙動を詳しく観察した。

野生型または I-BAR ノックアウト細胞の細胞膜を membrane-GFP や CellMask™ Plasma Membrane Stains で染色し、接着形成時の細胞膜の動態をライブ観察した。

(2) I-BAR タンパク質による細胞間接着の成熟・維持の制御

野生型または I-BAR タンパク質ノックアウト細胞をトランスウエルで 6 日間培養した後、経上皮電気抵抗を調べることで、上皮バリア機能への I-BAR タンパク質の関与を調べた。

CRISPR-Cas9 法で I-BAR タンパク質を複数ノックアウトした細胞を作製し、細胞間接着分子の分布変化や上皮バリア機能への影響を調べた。

I-BAR ノックアウト細胞に、I-BAR タンパク質の全長、膜結合変異体を発現し、ノックアウトのフェノタイプがレスキューされるかを調べた。

野生型または I-BAR タンパク質ノックアウト細胞に、蛍光ラベルした細胞間接着分子を発現し、FRAP を行うことで、細胞間接着分子の可動性に I-BAR タンパク質が関与するかを調べた。

mVenus を I-BAR タンパク質の上流にノックインした Caco2 細胞株を、GFP 抗体ビーズを用いて免疫沈降し、MS 解析を行うことで、相互作用分子の探索を行った。

HEK293 細胞に I-BAR タンパク質と密着結合タンパク質を共発現し、免疫沈降を行って、両者の相互作用を調べた。また、mVenus を I-BAR タンパク質の上流にノックインした Caco2 細胞株で mVenus-I-BAR タンパク質免疫沈降し、その密着結合分子が共沈降するかを調べた。さらに、I-BAR タンパク質とその分子との相互作用を AlphaFold 2 で解析し、相互作用に關与しうるアミノ酸残基を調べた。

4 . 研究成果

上皮細胞の細胞間接着の形成における細胞膜の役割については不明な点が多い。BAR ファミリータンパク質は、二量体で脂質膜に結合して、かつ多量体を形成することで、膜の形態を制御する。BAR タンパク質サブファミリーのひとつ I-BAR タンパク質は、突出膜の形成を制御するが、細胞間接着の形成・維持における I-BAR タンパク質の関与は明らかでない。

我々は、予備検討において、I-BAR タンパク質が突出膜に加え、細胞間接着に分布することを見出した。I-BAR タンパク質をノックアウトした Caco2 上皮細胞株を作製し、細胞間接着分子の分布を調べたところ、細胞間接着分子 E-カドヘリンの頂端面の分布が減少し、側底面の分布が diffuse になった。また、密着結合分子 ZO1 の分布の直線性が低下した。さらに、細胞間接着の頂端部に分布するアクチン繊維が、ノックアウト細胞で減少していた。そこで、I-BAR タンパク質が細胞膜の突起構造を形成し、細胞間接着の形成を制御する分子メカニズムを検討した。

まず、mVenus を I-BAR タンパク質の上流にノックインした Caco2 細胞株でライブイメージングを行ったところ、細胞間接着形成直前のラメリポディアに分布していた。また、membrane-RFP を野生型または I-BAR タンパク質ノックアウト細胞に発現して膜の動態を調べたところ、ノックアウト細胞で、膜の動きがより不安定な傾向が認められた。

I-BAR タンパク質は、細胞間接着において、密着結合のタンパク質とよく共局在していた。密着結合は、上皮細胞のバリア機能に關与する。そこで、経上皮電気抵抗の測定を行って上皮バリア機能を調べたところ、ノックアウト細胞では、上皮バリア機能が著しく低下していた。

そこで、I-BAR タンパク質ノックアウト細胞に、EGFP タグを付した I-BAR タンパク質を安定発現したレスキュー細胞を作製した。その結果、ノックアウトによる密着結合の漏れが、レスキュー発現により回復した。これに対し、膜に結合しない変異体を発現した細胞では、密着結合の漏れがレスキューされなかった。従って、I-BAR タンパク質は、膜の形態制御を介して、密着結合の形成に關与することが裏付けられた。

次に、I-BAR タンパク質をダブルノックアウトした Caco2 細胞を作製した。細胞間接着分子の分布を調べたところ、野生型およびシングルノックアウトと比較して、ダブルノックアウト細胞では、密着結合の直線性が更に低下し、頂端部細胞間接着のアクチン繊維も減少した。また、ダブルノックアウト細胞の細胞層では、野生型およびシングルノックアウトと比較して、上皮バリア機能が更に低下した。

さらに、蛍光ラベルした密着結合タンパク質 claudin7 を野生型、I-BAR タンパク質シングルノックアウト、ダブルノックアウト細胞に安定発現する Caco2 細胞を作製し、CLEM を行った。その結果、I-BAR タンパク質をノックアウトした細胞では、claudin7 の分布する密着結合が不完全と思われる箇所が認められ、かつ密着結合に沿ったアクチン繊維の分布が減少していた。

そこで、I-BAR タンパク質と種々の密着結合タンパク質との相互作用を調べたところ、密着結合タンパク質の一つが I-BAR タンパク質と共免疫沈降した。AlphaFold 2 による解析を行ったところ、両者の相互作用が裏付けられた。

以上の結果から、I-BAR タンパク質は、細胞膜の形態制御や密着結合タンパク質との相互作用を介し、細胞間接着の形成・維持に關与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Mitsuo Osuga, Tamako Nishimura, and Shiro Suetsugu	4. 巻 32
2. 論文標題 Development of a green reversibly photoswitchable variant of Eos fluorescent protein with fixation resistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 br7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E21-01-0044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hooi Ting Hu, Tamako Nishimura, and Shiro Suetsugu	4. 巻 2
2. 論文標題 The ultracentrifugal separation, characterization, and functional study of extracellular vesicles derived from the serum-free cell culture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100625	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kei Shigene, Yuta Hiasa, Yoshito Otake, Mazen Soufi, Suphamon Janewanthanakul, Tamako Nishimura, Yoshinobu Sato, and Shiro Suetsugu	4. 巻 9
2. 論文標題 Translation of cellular protein localization using convolutional networks	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 635231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.635231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tamako Nishimura*, Takuya Oyama*, Hooi Ting Hu*, Toshifumi Fujioka* et al. (*:equally contributed)	4. 巻 56
2. 論文標題 Filopodium-derived vesicles produced by MIM enhance the migration of recipient cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 842 ~ 859.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2021.02.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura T, Suetsugu S.	4. 巻 17
2. 論文標題 Super-resolution analysis of PACSIN2 and EHD2 at caveolae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0271003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0271003. eCollection 2022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 D' Angelo Gisela, Raposo Graca, Nishimura Tamako, Suetsugu Shiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Protrusion-derived vesicles: new subtype of EVs?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Reviews Molecular Cell Biology	6. 最初と最後の頁 81 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41580-022-00555-x	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 Mukherjee Apratim, Ron Jonathan Emanuel, Hu Hooi Ting, Nishimura Tamako, Hanawa Suetsugu Kyoko, Behkam Bahareh, Mimori Kiyosue Yuko, Gov Nir Shachna, Suetsugu Shiro, Nain Amrinder Singh	4. 巻 10
2. 論文標題 Actin Filaments Couple the Protrusive Tips to the Nucleus through the I BAR Domain Protein IRSp53 during the Migration of Cells on 1D Fibers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Advanced Science	6. 最初と最後の頁 2207368 ~ 2207368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/advs.202207368	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 西村 珠子、末次 志郎	4. 巻 94
2. 論文標題 フィロポディアから形成される新たな細胞外小胞の発見	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 585 ~ 589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940585	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20件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 ○古川 由莉、西村 珠子、末次 志郎
2. 発表標題 I-BARファミリータンパク質の細胞間接着形成における役割の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○西村珠子、大山 拓也、Hu Hooi Ting、藤岡 敏史、末次志郎
2. 発表標題 BARタンパク質MIMによる細胞膜からの細胞外小胞の形成
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○大菅 光雄、西村 珠子、末次 志郎
2. 発表標題 固定耐性を持つ緑色点滅蛍光タンパク質の開発とPALMへの応用
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○重根 桂、日朝 裕太、大竹 義人、Soufi Mazen、Janewanthanakul Suphamon、西村 珠子、佐藤 嘉伸、末次 志郎
2. 発表標題 機械学習を用いた細胞内タンパク質局在の推定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○藤岡 敏史、西村 珠子、末次 志郎
2. 発表標題 細胞外小胞によって誘導される細胞運動へのF-BARタンパク質CIP4の役割
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○Shiro Suetsugu, Takuya Oyama, Hooi Ting Hu, Toshifumi Fujioka, Tamako Nishimura
2. 発表標題 Extracellular vesicles by filopodia, Filopodium-Derived Vesicles, by the I-BAR domain proteins
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○西村珠子、末次志郎
2. 発表標題 BARタンパク質MIMを介した細胞膜に由来する細胞外小胞の形成機構とその生理機能
3. 学会等名 第8回日本細胞外小胞学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○西村珠子、大山拓也、Hooi Ting Hu、藤岡敏史、末次志郎
2. 発表標題 I-BAR タンパク質 MIM を介した細胞突起切断による細胞外小胞の形成とその生理機能
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○西村珠子、大山拓也、Hooi Ting Hu、藤岡敏史、末次志郎
2. 発表標題 BARタンパク質MIMによる細胞膜からの細胞外小胞の形成機構とその生理機能
3. 学会等名 第67回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○藤岡 敏史、西村 珠子、末次 志郎
2. 発表標題 F-BARタンパク質CIP4の細胞運動への関与
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村珠子、大山拓也、Hooi Ting Hu、○末次志郎
2. 発表標題 The extracellular vesicle formation by filopodial scission for cell migration
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村珠子、大山拓也、Hooi Ting Hu、○末次志郎
2. 発表標題 細胞膜突起の切断による小胞形成
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ○西村珠子、大山拓也、Hooi Ting Hu、末次志郎
2. 発表標題 I-BARタンパク質MIMによるマイクロベシクル形成機構とその生理作用
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ○Tamako Nishimura
2. 発表標題 Roles of I-BAR proteins in the extracellular vesicle formation and their functions
3. 学会等名 Workshop for Network Development of Young Researchers (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 ○Hooi Ting Hu, Tamako Nishimura, Shiro Suetsugu
2. 発表標題 The characterization and functional analysis of IRSp53-mediated secretion of the extracellular vesicles
3. 学会等名 ASCB/EMSO 2022 meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○西村珠子、古川由莉、末次志郎
2. 発表標題 I-BARタンパク質による上皮細胞の細胞間接着の制御
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○藤岡敏史、西村珠子、末次志郎
2. 発表標題 細胞外小胞に誘導される細胞運動におけるF-BARタンパク質CIP4の役割
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○前田胡桃、西村珠子、末次志郎
2. 発表標題 I-BARタンパク質ABBAの細胞外小胞形成における役割
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○西村珠子、藤岡敏史、末次志郎
2. 発表標題 細胞外小胞を介した細胞移動の促進におけるF-BARタンパク質CIP4の役割
3. 学会等名 第9回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村珠子、○末次志郎
2. 発表標題 Super-resolution analysis of PACSIN2 and EHD2 at caveolae
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞間の情報伝達に関わる細胞外微粒子の新たな形成機構を解明 https://bsw3.naist.jp/research/index.php?id=2256
人工知能（深層学習）により細胞内の特定たんぱく質の局在推定に成功 https://www.jst.go.jp/pr/announce/20210805/index.html
生体内を移動する細胞の基本的な振る舞いとらえた足場となる繊維状タンパク質を1本のナノファイバーで再現 https://bsw3.naist.jp/research/index.php?id=2655

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