

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440085

研究課題名(和文)細胞膜の張力を介したアクチン重合制御機構の解明

研究課題名(英文)Role of plasma membrane tension in actin polymerization

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年の研究により、細胞運動時の先導端形成において、細胞膜の張力が阻害的なシグナルとして働き、アクチン重合を負に制御していることが明らかとなった。しかしながら、膜の張力を認識するタンパク質は不明であったため、この物理的なシグナルがどのようにアクチン重合活性を制御するのかは明らかではなかった。本研究により、膜変形活性を持つF-BARタンパク質であるFBP17が、細胞膜の張力センサーとして働き、先導端形成を制御していることが明らかとなった。細胞生物学的な手法により、細胞膜の張力はFBP17の膜変形活性を阻害することにより、アクチン重合活性を負に制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Tension applied to the plasma membrane (PM) is a global mechanical parameter that regulates actin polymerization. However, how membrane tension regulates actin assembly was unknown. This work showed that FBP17, a membrane-bending protein and an activator of WASP/N-WASP-dependent actin nucleation, is a PM tension-sensor involved in leading edge formation. Cell biological experiments showed that membrane tension inhibits membrane bending activity of FBP17 to negatively regulate actin polymerization.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞膜の張力 アクチン細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

細胞膜の張力は細胞膜の形状変化を伴う細胞運動、細胞分裂、発生等基本的な生命現象において不可欠である。実際に、細胞運動において、細胞膜の張力はアクチン重合の阻害的なシグナルとして働き、先導端 (leading edge) の極性形成に必須であることが明らかになっている。しかしながら、膜の張力を認識するタンパク質は不明なため、この物理的なシグナルがどのようにアクチン重合活性および先導端の形成を制御するのかは明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、近年申請者が同定した細胞膜とアクチン細胞骨格のインターフェイスとして働く F-BAR ドメインタンパク質である FBP17 に着目し、先導端形成時の極性を持ったアクチン重合における細胞膜の張力と FBP17 の重合の関連性を明らかにし、FBP17 が細胞膜の張力センサーであることを提唱するとともに、細胞膜の張力を介したアクチン重合の制御機構という新しい概念を導入することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) タイムラプスイメージングにより、先導端形成時の FBP17 の動態を詳細に解析する。次に細胞膜の張力を人工的に変化させた時の FBP17 の動態を解析した。細胞膜の張力を上げた時、極性は亢進するのか調べた。その際、アクチン重合活性も同様に調べた。
- (2) 細胞膜の張力依存的な先導端の形成が FBP17 依存的かどうか RNAi 法を用いて解析した。さらに、細胞膜の張力依存的な運動能の亢進が FBP17 を介しているか同様に解析した。RNAi 法とレスキュー実験を組み合わせ、先導端形成における極性を持ったアクチン重合と FBP17 のクラ

スター化の関連性を解析した。さらにこの FBP17 の局所的な重合が細胞膜の張力に依存するか全反射顕微鏡により経時的に解析した。

- (3) FBP17 の極性化が細胞膜の張力に制御されるメカニズムを解析した。(1)の実験により、FBP17 は細胞膜の退縮により重合し、アクチン重合による膜の伸展により細胞膜から外れることが分かった。以前の研究により、WASP ファミリータンパク質/Arp2/3 複合体を介したアクチン重合は、細胞膜を押し出すことで張力を発生させることが分かっていた。そこで、N-WASP および ARP2/3 阻害剤を用いてアクチン重合を抑えた時、FBP17 の重合活性が変化するか調べた。さらにミオシン阻害剤を用いて細胞膜の退縮を抑えた時も同様に解析した。

4. 研究成果

アフリカミドリザルの腎細胞である COS-1 細胞は自発的に先導端を数か所形成する。共焦点レーザー顕微鏡観察により、内在性の FBP17 はこれらの先導端にドット状に局在することが分かった。浸透圧を上げることにより細胞膜の張力を上げると、一か所の先導端が生き残ると同時に他の箇所のアクチン重合が消滅し、細胞の極性化は亢進した。FBP17 のドットも綺麗に先導端に極性化していた。逆に、高張液を加えることにより細胞膜の張力を下げると、FBP17 のドットは細胞全体にランダムに局在し、極性は崩壊した。それに伴いアクチン重合も細胞全体で無秩序に起こり、その多くは FBP17 のドットと一致していた。さらに詳細にこれらの過程を調べるために、ライブイメージングを行った。細胞膜の張力を上げると、細胞全体に局在していた FBP17 のドットが、一か所の先導端に極性化する様子が観察された。それに伴って、アクチン重合も活性化されていた。逆に細胞膜の

張力を下げると、FBP17 の極性化は瞬時に失われ、細胞全体にランダムに重合する様子が見られた。これらの結果から、細胞膜の張力が FBP17 の極性化に必須であることが分かった。

次に RNAi 法を用いた実験により、FBP17 は COS-1 細胞において、先導端の形成、及び運動に重要であることが明らかとなった。さらに、FBP17 は細胞膜の張力依存的な先導端の極性化の亢進にも重要な役割を果たしていることが分かった。レスキュー実験により、FBP17 の極性化と先導端の形成には、N-WASP/Arp2/3 複合体依存的なアクチン重合を活性化することが必須であることが示唆された。

次に FBP17 の極性化が膜の張力により制御されるメカニズムを解析した。タイムラプスイメージングにより、先導端では連続的かつ個々に独立した単位の細胞膜の伸長と退縮が起こっていることが分かった。この結果は、二次元環境の場合、細胞は先導端において、細胞膜の伸長と退縮を繰り返しながら、動いていることを示唆している。さらに FBP17 は重合と脱重合を繰り返しながら動的に先導端に極性化することが明らかとなった。さらにこのターンオーバーは先導端での伸長、退縮と同調していることが分かった。つまり、FBP17 は細胞膜が退縮する際に重合し、伸長に伴って脱重合していた。以前の研究により、WASP ファミリータンパク質/Arp2/3 複合体を介したアクチン重合は、細胞膜を押すことで張力を発生させることが分かっていた。FBP17 の重合はその活性化に重要であるので、FBP17 のアクチン重合活性とそれに伴う細胞膜張力のフィードバックループが FBP17 の極性化に必要であることが示唆された。それを確かめるために、N-WASP のインヒビターを用いて調べた結果、FBP17 は N-WASP の活性を阻害させると、瞬時に先端での極性を失い、細胞全体にランダムに重合することが分かっ

た。Arp2/3 複合体を阻害した場合においても、同様の結果が得られた。また FBP17 のターンオーバーも失われた。これらの結果は、細胞膜の張力を人工的に下げた場合の挙動と非致していた。さらに、N-WASP に結合できない変異体に関しては、先導端への極性化及びターンオーバーは見られなかった。よって、FBP17 によるアクチン重合を介した膜張力の上昇が、自身を膜から外すことに必要であると考えられた。

次に、上記の結果から細胞膜の退縮による一時的な膜張力の減少が FBP17 のリクルートメントに寄与している可能性が示唆された。この退縮にはミオシンの収縮力が必須であることが分かっており、実際にミオシンの活性を阻害すると、細胞膜の張力が上昇することが知られている。そこで、ミオシンを阻害した時、FBP17 の極性化を調べた。ミオシンの活性を阻害すると、FBP17 は先端から瞬時に脱重合することが分かった。さらに、この時、細胞膜の張力を人工的に下げると、FBP17 はランダムに細胞全体に重合した。これらの結果より、FBP17 は先導端での膜張力の変動を感知しながら、ダイナミックに極性化することが考えられた。

本研究課題から、FBP17 が細胞膜の張力センサーとして働き、細胞膜の張力にตอบสนองして細胞運動を制御するメカニズムの一端が明らかになった。さらに、BAR ドメインファミリーが普遍的な細胞膜の張力センサーとして働く可能性があることが示唆された。細胞膜の張力は、細胞運動のみならず、細胞膜の形状変化を伴う細胞分裂、神経突起の形成、上皮細胞の極性化、組織形成等、基本的な生命現象を理解するうえで不可欠である。もし BAR ドメインが普遍的な膜張力センサーとして働くのであれば、細胞膜の張力を介した生命現象を理解するうえで、大きな進展が期待される。

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 2件)

① Tsujita K., Takenawa T and Itoh T.
Feedback regulation between plasma membrane tension and membrane-bending proteins organizes cell polarity during leading edge formation.
Nat Cell Biol. 17. 749-758 (2015) DOI: 10.1038/ncb3162. 査読あり

Tsujita K., and Itoh T.

Phosphoinositides in the regulation of actin cortex and cell migration.
Biochim Biophys Acta. 1851. 824-831 (2014)
DOI: 10.1016/j.bbailip. 査読あり

[学会発表](計 7件)

① リン脂質結合タンパク質を介した細胞膜張力のシグナリング. 伊藤俊樹、辻田和也
第 88 回日本生化学会ワークショップ (2015 年 12 月 3 日 神戸 ポートピアホテル、兵庫県)

Feedback regulation between plasma membrane tension and membrane-bending proteins in cell migration

Kazuya Tsujita

The26th CDB Meeting (September 8, 2015, Riken CDB, Kobe, Hyogo)

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. 辻田和也、伊藤俊樹
第 67 回日本細胞生物学会シンポジウム(2015 年 07 月 2 日 タワーホール船橋、東京都)

F-BAR ドメインタンパク質による細胞運動の制御. 伊藤俊樹、辻田和也

第 87 回日本生化学会シンポジウム (2014 年 10 月 15 日 国立京都国際会館、京都府)

細胞質型チロシンキナーゼ Fer と生体膜との相互作用の解析. 伊藤俊樹、山本光、辻田和也

第 56 回脂質生化学会大会ワークショップ (2014 年 06 月 6 日 近畿大学、大阪府)

F-BAR タンパク質による細胞膜の張力を介した極性形成機構. 辻田和也、伊藤俊樹

第 56 回脂質生化学会大会ワークショップ (2014 年 06 月 6 日 近畿大学、大阪府)

Self-organization of FBP17 responds to membrane tension required for polarized actin polymerization.

辻田和也、伊藤俊樹

第 86 回日本生化学会シンポジウム (2013 年 09 月 12 日 パシフィコ横浜、神奈川県)

[図書](計 2件)

① 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. 辻田和也
臨床免疫・アレルギー科 科学評論社.
2016, 65, 174-179

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. 辻田和也
生体の科学. 2016, 67, 122-126

[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 (Tsujiita 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：