

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770228
 研究課題名（和文） アクチンカップ形成におけるEFC/F-BARタンパク質であるFBP17の役割
 研究課題名（英文） Role of FBP17, an EFC/F-BAR protein, in phagocytic cup formation
 研究代表 辻田 和也 (Tsujiita Kazuya)
 神戸大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：10457054

研究成果の概要（和文）：

本研究によりFBP17による生体膜のチューブ構造依存的なアクチン重合活性化機構をin vitro再構成実験により明らかにすることができた。in vivoにおいてはFBP17がファゴサイトーシスの際F-BARドメインを介してアクチンカップ形成部位に集積し、その形成に重要であることが明らかとなった。さらにRNAi法とそのレスキュー実験によりFBP17はF-BARドメイン依存的に細胞膜直下で重合し、その重合がアクチンカップ形成に重要であることが分かった。これらの結果からFBP17が誘導する細胞膜の陥入構造がアクチン重合の足場として機能していることを示唆された。

研究成果の概要（英文）：

By performing in vitro analysis, we directly showed the mechanism by which FBP17 regulates actin polymerization on the membrane tubules. Physiologically, it was found that FBP17 is recruited to phagocytic cup via its F-BAR domain and that this accumulation is critical for phagocytic cup formation. Furthermore, RNAi and its rescue experiments revealed that the assembly of FBP17 at the plasma membrane is dependent on its F-BAR domain, promoting actin polymerization at phagocytic cup membrane. These data suggest that invaginated membrane caused by FBP17 may function as a scaffold for actin polymerization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3500000	1050000	4550000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：F-BAR ドメイン、アクチン重合

1. 研究開始当初の背景

ファゴサイトーシス（食作用）は、細菌やアポトーシスした死細胞等巨大な構造体を飲み込む機能であり、免疫や発生等に必須であ

る。例えば、ファゴサイトーシスの異常は自己免疫性疾患や重度の細菌感染の原因となることが分かっており、この制御機構を解明することは極めて重要である。ファゴサイト

ーシスの際、アクチンカップ (Actin cup/Phagocytic cup) が形成するためには、細胞膜直下において局所的でかつロウバストなアクチン重合が起こることが必須であるが、その分子機構の多くは不明である。

ここで、これらの構造を形成するマシナリーは細胞膜とアクチン細胞骨格を繋ぐインターフェイスタンパク質であると考えられる。

2. 研究の目的

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である EFC/F-BAR タンパク質の中でも FBP17 に着目し、アクチンカップ形成時における細胞膜動態とアクチン重合の協調的な制御機構を明らかにし、細胞膜の曲率、つまりチューブ膜構造によるシグナルの場という三次元的な要素を導入してアクチン重合の制御機構を統合的に理解することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) アクチンカップ形成時における FBP17 と WASP の挙動をタイムラプス顕微鏡で観察
FBP17 がアクチンカップ形成時に WASP を細胞膜にリクルートするか調べた。まず GFP-FBP17 と tagRFP-WASP をマクロファージに共発現し、ファゴサイトーシスを誘導させ、それらがアクチンカップ形成部位にリクルートされてくる時間をタイムラプス顕微鏡で観察した。また FBP17 の WASP に結合できない変異体を作製し細胞に発現させ、アクチンカップ形成におけるドミナントネガティブ効果があるか検討した。さらに WASP の局在が FBP17 依存的であることを直接的に示すために、内在性の FBP17 を RNAi 法でノックダウンし、WASP の細胞膜への局在を観察した。

(2) FBP17 によるチューブ膜構造依存的な

アクチン重合の試験管内再構成実験

試験管内でアクチン重合の再構成を可視化する際、バックグラウンドシグナルを低く抑えるために全反射顕微鏡を用いて観察した。ここで、人工リボソームの影響を解析するためにリボソームをガラス面に直接コートする必要がある。その方法としてガラスをストレプトアビジンで予めコートし、ビオチン標識した巨大リボソームを調製し、その結合を利用してコートさせる方法を用いた。同時にリボソームを Alexa488 で標識し、可視化させておく。次にこの系にローダミン標識した G-アクチン、Arp2/3 複合体、WASP、FBP17 を加えアクチン重合活性を経時的に観察した。次に、脂質に結合できるがフィラメント形成ができない変異体 (この変異体はチューブ膜構造を引き起こさない) や WASP に結合できない変異体を作製し、同様の実験を行い、野生型と比較検討した。

(3) アクチンカップ形成時における FBP17 の細胞膜変形活性 (チューブ形成活性) とアクチン重合活性の協調性の意義を *in vivo* で解析

細胞膜変形とアクチン重合の協調的な重要性を *in vivo* で示すために、内在性の FBP17 を RNAi 法でノックダウンし、その野生型及び各種変異体を発現させる機能回復 (レスキュー) 実験を行った。まず、細胞膜には局在できるが細胞膜を変形することができない変異体を用いて、レスキュー実験を行い、このアクチンカップ形成に必要な局所的なアクチン重合には FBP17 が単に WASP と結合して細胞膜へリクルートするだけではなく、膜変形活性が重要であるか調べた。また WASP に結合できない変異体を、FBP17 をノックダウンした細胞に発現させて、アクチンカップ形成能を野生型と比較し検討した。

4. 研究成果

本研究により FBP17 による生体膜のチューブ構造依存的なアクチン重合活性化機構を *in vitro* 再構成実験により明らかにすることができ、初めて細胞膜の曲率、つまりチューブ膜構造によるシグナルの場という三次元的なアクチン重合制御機構を明らかにすることができたと考えられる。これはリポソームとアクチンを可視化し FBP17 が誘導するチューブ膜に局限してアクチン重合が活性化するという非常に画期的なものである。*in vivo* においては FBP17 がファゴサイトーシスの際 F-BAR ドメインを介してアクチンカップ形成部位に集積し、その形成に重要であることが明らかとなった。さらに RNAi 法とそのレスキュー実験により FBP17 は F-BAR ドメイン依存的に細胞膜直下で重合し、その重合がアクチンカップ形成に重要であることが分かった。これらの結果は FBP17 が誘導する細胞膜の陥入構造がアクチン重合の足場として機能していることを示唆し、ファゴサイトーシスのメカニズムの一端のみならず、新しいアクチン重合制御機構を明らかにすることができ、非常に重要であると考えられる。またファゴサイトーシスは病原体や死細胞の除去に必須であり、本研究結果は医学的にも貢献すると考えられる。

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 5 件)

1. Tsujita K, Kondo A, Kurisu S, Hasegawa J, Itoh T, Takenawa T.
Antagonistic regulation of F-BAR protein assemblies controls actin polymerization during podosome

formation.

Journal of Cell Science. 掲載確定

2. Tanaka-Takiguchi Y, Itoh T, Tsujita K, Yamada S, Yanagisawa M, Fujiwara K, Yamamoto A, Ichikawa M, Takiguchi K
Physicochemical analysis from real-time imaging of liposome tubulation reveals the characteristics of individual F-BAR domain proteins.
Langmuir. 29, 328-336 (2013)
 3. Hasegawa J, Tsujita K, Takenawa T, Itoh T.
ARAP1 regulates the ring size of circular dorsal ruffles through Arf1 and Arf5.
Molecular Biology of The Cell. 23, 2481-2489 (2012)
 4. Uezu A, Umeda K, Tsujita K, Suetsugu S, Takenawa T, Nakanishi H.
Characterization of the EFC/F-BAR domain protein, FCHO2.
Genes to Cell. 8, 868-878 (2011)
 5. Hasegawa J, Tokuda E, Tenno T, Tsujita K, Sawai H, Hiroaki H, Takenawa T, Itoh T.
SH3YL1 regulates dorsal ruffle formation by a novel phosphoinositide-binding domain.
Journal of Cell Biology. 193, 901-916 (2011)
- [学会発表] (計 2 件)
1. 第 63 回日本細胞生物学会大会
辻田 和也(口頭発表)
Regulation of membrane mediated actin

assembly by EFC/F-BAR proteins.

2011年6月29日, 北海道大学

2. 第84回日本生化学会大会

辻田 和也(口頭発表)

Antagonistic regulation of F-BAR
domain assembly on membrane.

2011年9月23日, 国立京都国際会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻田 和也 (Tsujita Kazuya)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 10457054