

令和 4 年 6 月 1 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：19K06541

研究課題名(和文)膜張力センサータンパク質による細胞膜張力の恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of Cell Membrane Tension Homeostasis by Membrane Tension Sensor Proteins

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・准教授

研究者番号：10457054

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)：本研究は、細胞膜の曲率を誘導・感知するBARタンパク質に着目し、上皮細胞の細胞膜張力が恒常的に高く維持される分子機構の解明を目的とした。光ピンセットとRNAi法を組み合わせた解析により、細胞膜張力の維持に必要なBARタンパク質Xを同定した。Racに対するGAPドメインを持つXは、細胞膜張力の低下を感知して、膜にリクルートし、Racを不活性化し、その結果、競合相手のRhoAの活性化を介して、細胞膜張力を正に制御することが示唆された。これらの結果から、細胞膜張力とBARタンパク質Xによるフィードバック制御機構が、細胞膜張力の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、BARタンパク質が細胞膜張力を制御する仕組みを解明し、細胞膜張力の恒常性維持機構という上皮細胞のintegrityを保つ新しいコンセプトを提示することができた。細胞膜張力の制御・維持機構はよく分かっておらず、本研究結果は、細胞膜の変形を伴う細胞運動、エンドサイトーシス、細胞分裂、極性形成等の動的な生命現象の理解に大きく貢献するものと期待される。また、BARタンパク質Yは浸潤・転移に関わるがん遺伝子としても知られており、Yはがん治療における有望な標的分子となる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study focused on BAR proteins that induce and sense membrane curvature to elucidate the molecular mechanisms by which plasma membrane tension homeostasis is maintained in epithelial cells. Using a combination of optical tweezers and gene knockdown experiments, we identified a BAR protein X that is required for homeostasis of plasma membrane tension. We found that, X, which has a GAP domain for Rac, recruit to the membrane by sensing decreased membrane tension, where it inactive Rac, which in turn activates its competitor, RhoA. This RhoA activation seems to lead to increased membrane tension by increasing membrane-cortex attachment. These results suggest that a feedback regulation between plasma membrane tension and BAR protein X plays an important role in tensional homeostasis of the plasma membrane.

研究分野：細胞生物学、生物物理学、腫瘍生物学

キーワード：細胞膜の張力 BARタンパク質 光ピンセット

1. 研究開始当初の背景

細胞膜の張力という膜の物理的性質は、細胞膜の変形を伴う細胞運動、エンドサイトーシス、細胞分裂、極性形成等の動的な生命現象を本質的に制御していると考えられ、近年注目されている(Diz-Munoz, Nat Phys. 2018)。実際に、細胞運動やエンドサイトーシスにおいて、細胞膜の張力が物理刺激として働き、これらの動的な細胞機能を制御していることが示されている(Mueller, Cell 2017; Houk, Cell 2012; Boulant, Nat Cell Biol 2011)。申請者らは膜変形活性をもつ BAR ドメインが膜張力センサー(low-membrane tension sensor)として働くことを明らかにし、BAR タンパク質が膜張力の減少を感知して重合・活性化し、この物理的な力の変動をアクチン重合という生化学的な反応に変換する仕組みを世界で初めて解明した(Tsujita, Nat Cell Biol 2015)。これは、「細胞膜の張力依存的なシグナル伝達機構」という新しい概念を提案するものであり、細胞膜の変形を伴う生命現象の理解に重要なステップとなった。細胞膜張力の変化が、物理刺激として働くためには、それは厳密に制御されなければならない。しかし、最も基本的かつ重要な問題である細胞膜の張力自体を制御する仕組みはよく分かっていない。細胞が膜張力を制御するためには、この物理的な力の変動を直接感知する必要があり、我々は膜張力センサー(BAR タンパク質)が、この基本的な問題を解く鍵になると考えた。

我々の先行研究により、上皮細胞の細胞膜張力は、運動能の高いがん細胞と比較して有意に高いことが分かった。重要なことに、細胞膜張力を強制的に下げる操作により、上皮細胞が間葉系運動形態に変換し、運動・浸潤能を獲得することを見出した。さらに、上皮細胞は、細胞膜とアクチン皮層を繋ぐリンカータンパク質である ERM ファミリータンパク質による membrane-cortex attachment (MCA) を介して、細胞膜張力の恒常性を維持していることを明らかにした。これと一致して、ERM タンパク質の上流に位置する RhoA の活性がこの MCA に必須であることを示した。これらの知見は、上皮細胞は MCA を介した細胞膜の張力を高く保つシステム(active な制御機構)を備えていることを明確に示唆していた。興味深いことに、多くの BAR タンパク質が Rho ファミリータンパク質の活性を制御する RhoGAP、GEF ドメインを持つことから、BAR タンパク質の活性依存的に細胞膜張力が制御される可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膜張力センサーとして働く BAR タンパク質に着目し、上皮細胞が細胞膜張力の恒常性を維持する分子メカニズムを解明することを目指した。具体的には

細胞膜張力の恒常性維持に必須な BAR タンパク質を同定する。

システムの恒常性を保つ基本原理は「負のフィードバック制御機構」である。そこで、上記で同定した BAR タンパク質が細胞膜張力の減少を感知した後、Rho ファミリータンパク質の活性を制御する分子機構を解明し、細胞膜張力の恒常性を維持する動作原理を明らかにする。

3. 研究の方法

予備データから、RhoA の活性化が細胞膜張力の上昇に寄与することを見出している。RhoA と Rac はお互い拮抗しており、Rac の活性が上がると、RhoA は不活性化することが知られている。そこで、Rac に対する RhoGAP ドメインや基質がまだ不明な RhoGEF ドメインをもつ BAR タンパク質に着目した。これらのドメインを持つ 10 種の BAR タンパク質に対し、RNAi 法によりノックダウンを行い、細胞膜張力の測定により、細胞膜張力を制御する(すなわち、ノックダウンにより、細胞膜張力が減少する)BAR タンパク質の同定を試みた。細胞膜張力の測定法として、光ピンセットを用いた。これを用いて、マイクロビーズを細胞膜に結合させ、細胞膜を引っ張り、形成されたテザーにかかる力から、細胞膜の張力(数十 pN[ピコニュートン]オーダーの力)を測定した。同定した BAR タンパク質のノックダウンにより、上皮細胞の浸潤能が亢進するかを、マトリゲル invasion チャンバーを用いて解析した。RHO GAP 酵素活性を無くした BAR タンパク質の機能不全変異体および BAR ドメインを欠損させた変異体を作製し、GFP 融合タンパク質として細胞膜張力が低いがん細胞に発現させ、細胞膜局在および細胞形態への影響を解析した。

4. 研究成果

1. 細胞膜張力を制御する BAR タンパク質の同定

上皮細胞の細胞膜張力を制御する BAR タンパク質の同定を試みた。我々の先行研究により、MCA を介した細胞膜張力を強制的に下げると、上皮細胞である MCF10A 細胞の運動性が亢進することが分かっているため、これを指標に一次スクリーニングを試みた。10 種の BAR タンパク質に対し、RNAi を行い、transwell を用いて運動性を解析した結果、BAR タンパク質 X をノックダウンすると、上皮細胞の運動性が顕著に亢進することを見出した。そこで、光ピンセットを用いて解析した結果、X のノックダウンにより、細胞膜張力がコントロールと比較して、

有意に減少することが分かった。X は Rac に対する RHOGAP ドメインを持っており、Rac の活性を抑制することで、細胞膜張力を正に制御することが考えられた。実際に、MCF10A 細胞において、Rac をノックダウンすると、細胞膜張力が上昇することを確認した。

2. BAR タンパク質 X のノックダウンにより、上皮細胞が浸潤能を獲得する

マトリゲル invasion チャンバーを用いて、浸潤能を解析した結果、X のノックダウンにより、MCF10A 細胞の浸潤能が劇的に亢進することを明らかにした。実際に、X のノックダウンにより、細胞膜上の ERM シグナルが減少しており、これに伴って、MCF10A 細胞の上皮形態が間葉系運動形態に変換していた。これらの結果から、BAR タンパク質 X は上皮細胞の細胞膜張力を高く維持することにより、上皮の integrity を保つ役割を持つことが示唆された。これと一致して、X はがん抑制因子として働くことが、近年示唆されている。

3. X による細胞膜張力の恒常性維持機構の解明

X を細胞膜張力が低い浸潤性がん細胞である MDA-MB-231 細胞に発現させた結果、X は細胞質に分布し、細胞膜全体に ERM のシグナルが増強され、細胞形態が運動性形態から非運動性の丸い細胞形態に変化することが分かった。X の BAR ドメインを欠損させた変異体も同様に細胞質に局在したが、細胞形態への影響は全く見られなかった。興味深いことに、Rac に対する RHO GAP 活性を無くした変異体は細胞膜にきれいに局在し、細胞形態の変化は観察されなかった。これらの結果から、細胞膜張力と BAR タンパク質 X によるフィードバック制御機構が、細胞膜張力の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yan Lu, Tsujita Kazuya, Fujita Yasuyuki, Itoh Toshiki	4. 巻 -
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 -
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 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 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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 辻田和也、伊藤俊樹
2. 発表標題 膜曲率誘導タンパク質による細胞膜張力の制御機構
3. 学会等名 日本細胞生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻田和也、伊藤俊樹
2. 発表標題 膜曲率誘導タンパク質による細胞膜張力の恒常性維持機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻田和也、伊藤俊樹
2. 発表標題 細胞膜張力と膜変形タンパク質によるがん細胞運動・浸潤の制御
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻田和也、伊藤俊樹
2. 発表標題 がん細胞運動のメカノバイオロジー
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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