

143. F-BAR タンパク質による細胞膜の張力認識機構

辻田 和也

Key words : 細胞膜の張力, F-BAR タンパク質

神戸大学 自然科学系先端融合研究環
バイオシグナル研究センター
情報クロストーク・生体制御統合研究
分野

緒言

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を理解するうえで不可欠である。近年, 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, その極性形成に必須であることが報告された¹⁾。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を制御するのかは明らかでない。膜の張力を認識するためには, 膜を引っ張って張力を感知する必要があると考えられ, 膜変形活性を持つタンパク質が張力センサーとして働くことが予想される。我々は膜変形活性を持つ F-BAR ドメインを同定し, その膜変形活性がアクチン重合に重要であることを明らかにしてきた²⁾。本研究では 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を見出したので報告する。

方法および結果

1. FBP17 の極性化は細胞膜の張力によって制御される

COS-1 細胞において, GFP-FBP17 の動きをライブイメージングを用いて解析した。興味深いことに, 低張液を加えて細胞膜の張力を上げると, FBP17 の先導端への極性化は非常に増大することが分かった (図 1A)。これに対応して, 弱い先導端は阻害され, それに応じて FBP17 も膜から外れていることが分かった (図 1A, 黄色の矢頭)。逆に, 高張液を加えて細胞膜の張力を下げた時, FBP17 の極性化は瞬時に崩壊し, 全体的に重合することがわかった (図 1B)。

細胞膜の張力は浸透圧だけでなく, イノシトールリン脂質である PIP2 の代謝によって制御されることが知られている。PIP2 の増加は膜張力を上げることが分かっているため, PIP2 の量を増やしてやると, FBP17 は先導端に極性化することが分かった (図 1C)。逆にその脱リン酸化酵素を膜にリクルートさせ, PIP2 の量を減らすと, FBP17 の極性化は瞬時に崩壊した (図 1D)。これらの結果により, 膜変形タンパク質である FBP17 は, 膜の張力に応じて極性化することが明らかとなった。

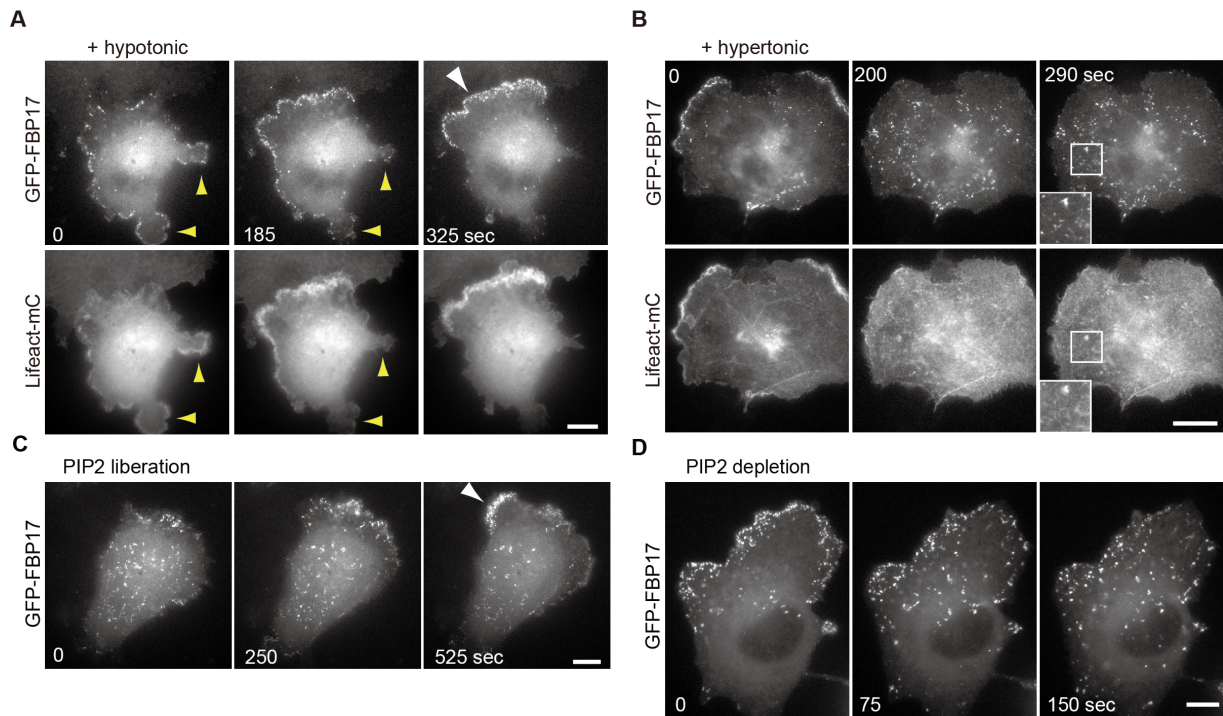


図1. 細胞膜の張力はFBP17の極性化に必須である.

A) GFP-FBP17とLifeact-mCherry (F-actinのマーカ)を発現させたCOS-1細胞に低張液を加えた時のタイムラプスイメージ. B) GFP-FBP17とLifeact-mCherryを発現させたCOS-1細胞に高張液を加えた時のタイムラプスイメージ. C) GFP-FBP17を発現させたCOS-1細胞においてPIP2の量を増やした時のタイムラプスイメージ. D) GFP-FBP17を発現させたCOS-1細胞においてPIP2の量を減らした時のタイムラプスイメージ. All Scale bars: 10 μ m.

2. FBP17の膜変形活性は膜張力により制御される

FBP17の膜変形活性が直接膜張力に依存するかどうか *in vitro*で解析した. GFPタグを付加したりコンビナントFBP17を精製し, 人口リポソームと混ぜて, コンフォーカルレーザー顕微鏡で観察した. その結果, 高張液を加えてリポソーム膜の張力を下げると, FBP17の膜変形活性が顕著に増加することが明らかとなった(図2A, B). この結果はFBP17の膜変形活性及び重合活性は, 膜の張力により直接制御されることを示唆していると考えられる.

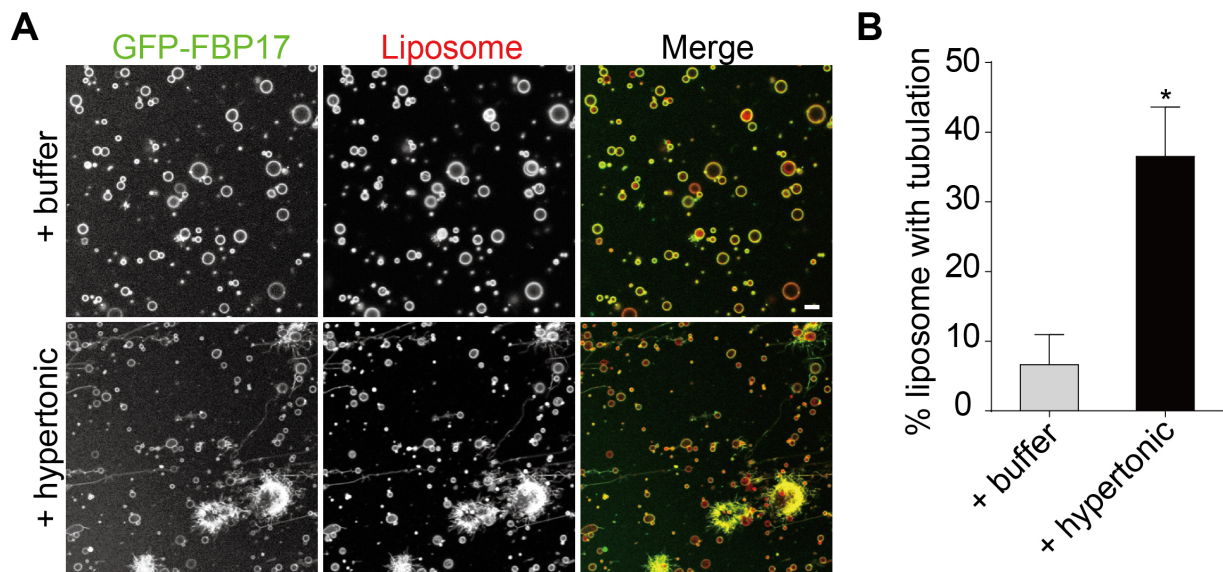


図2. FBP17の膜変形活性は膜張力により制御される。

A) 精製した GFP-FBP17 と人口リボソームを反応させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(上) コントロールとして buffer を加えたもの。(下) 高張液を加えたもの。Scale bar: 5 μ m. B) A の結果を定量化した平均値グラフ。Error bar: SD. *P < 0.01. student's t-test.

3. FBP17の重合と細胞膜の張力とのフィードバック制御機構が、先端端の極性形成に重要である

次に FBP17 が先端端に極性化するメカニズムを調べた。ライブイメージングにより、FBP17 は細胞膜が伸展する際、膜から外れ、リトラクションすると膜に重合することが分かった (図 3A)。つまり FBP17 は膜張力の変動を感知してダイナミックに重合と脱重合を繰り返しながら先端端に極性化していることが予想された (図 3A)。FBP17 は N-WASP/Arp2/3 複合体依存的なアクチン重合を活性化し、このアクチン重合は膜を押すことで張力を発生させる。よって FBP17 の重合と細胞膜の張力のフィードバック制御が極性化に重要ではないかと考えられた。実際に N-WASP の阻害剤である Wiskostatin を細胞に加えると FBP17 の先端端への極性化は瞬時に失われ、全体的に重合することが分かった (図 3B)。Arp2/3 複合体の阻害剤である CK-666 を加えた時も同様の結果が得られた (図 3C)。これらの結果から FBP17-N-WASP 複合体によるアクチン重合が膜張力を生み出し、それが FBP17 のターンオーバーに必須であることが考えられた。

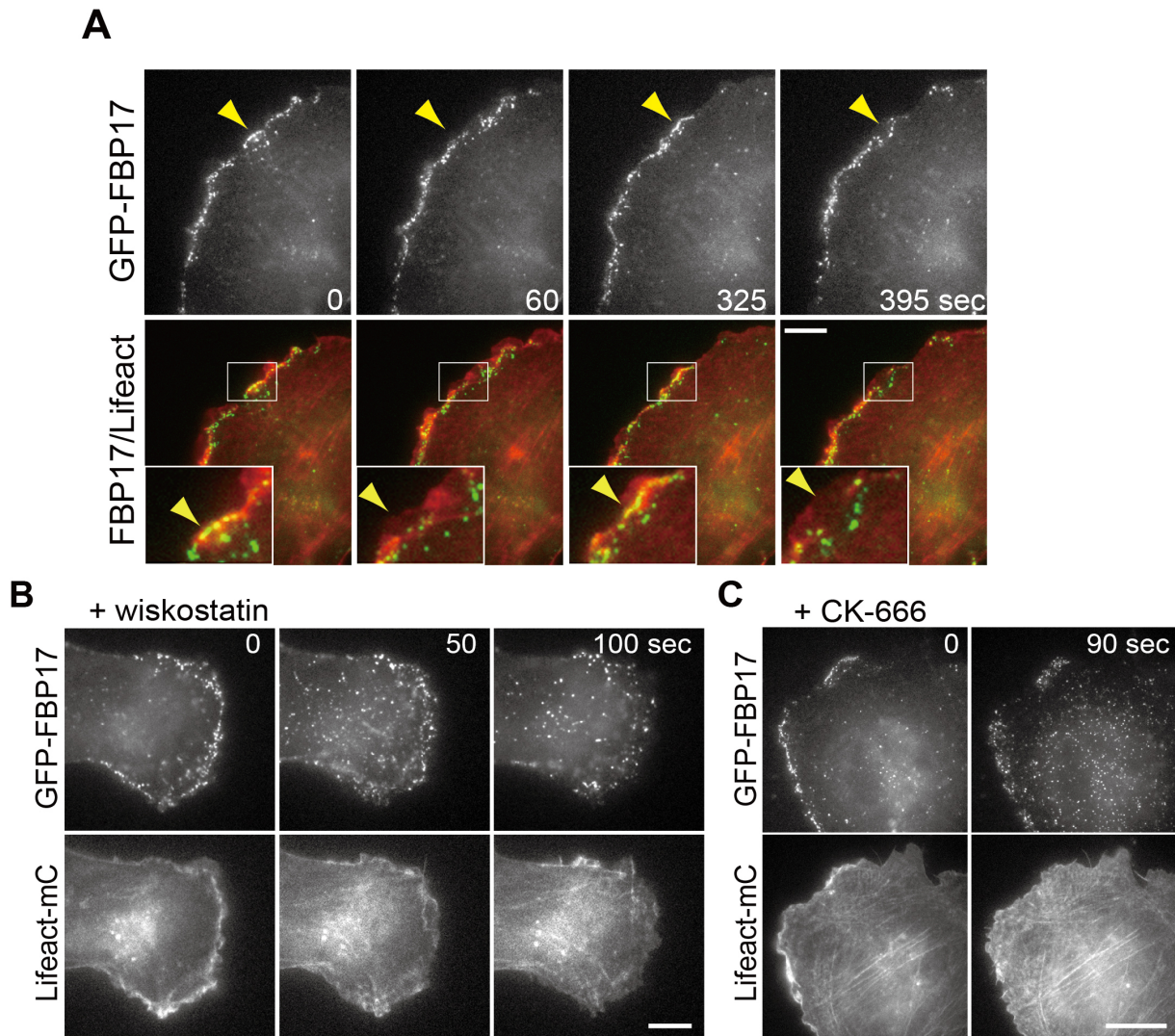


図3. FBP17の重合と細胞膜の張力のフィードバック制御が極性化に必須である。

A) GFP-FBP17とmCherry-Lifeactを発現させたCOS-1細胞の先端端におけるタイムラプスイメージ。B) GFP-FBP17とmCherry-Lifeactを発現させたCOS-1細胞にWiskostatin ($5\mu\text{M}$)を加えた時のタイムラプスイメージ。C) GFP-FBP17とmCherry-Lifeactを発現させたCOS-1細胞にCK-666 ($150\mu\text{M}$)を加えた時のタイムラプスイメージ。All Scale bars: $10\mu\text{m}$ 。

考 察

本研究結果から、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、先端端の形成に重要であることが明らかとなった。細胞膜の張力は細胞運動だけでなく、細胞分裂、上皮細胞の極性形成、膜輸送に重要である。膜変形活性をもつF-BAR、BARタンパク質はこれらの機能に関わっていることが知られており、細胞膜の張力を介したこれらの機能の新たな制御機構が明らかになることが期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、神戸大学バイオシグナル研究センター生体膜機能分野の伊藤俊樹博士である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Diz-Munoz, A., Fletcher, D. A. & Weiner, O. D. : Use the force: membrane tension as an organizer of cell shape and motility. *Trends Cell Biol.*, **23** : 47-53, 2013.
- 2) Tsujita, K., Suetsugu, S., Sasaki, N., Furutani, M., Oikawa, T. & Takenawa, T. : Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J. Cell Biol.*, **172** : 269-279, 2006.