

## 20. 浸潤性の細胞膜構造と細胞膜にかかる張力による細胞融合メカニズムの解明

神戸大学バイオシグナル総合研究センター 教授 伊藤 俊樹

### 概要

細胞融合は筋分化や受精、ウイルス感染など、多様な生命現象において重要な役割を担うが、その詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。本研究では、破骨細胞をモデルとして、細胞膜の張力と形状が細胞融合に与える影響を明らかにすることを目的とした。光ピンセットによる膜張力測定により、RANKL 刺激による破骨細胞融合において細胞膜張力が低下することが分かった。反対に、人工的に膜張力を上昇させた細胞では、RANKL 刺激下においても細胞融合が有意に抑制された。この結果は、細胞膜張力の低下が細胞融合の前提条件となることを示唆している。さらに、14 種類の BAR タンパク質の網羅的ノックダウンにより、FBP17 や IRTKS などが融合過程に必須であることが明らかになった。これらの BAR タンパク質は破骨細胞の分化には影響を与えない一方、浸潤性膜構造 (invadosome) の形成に必須であった。すなわち、細胞膜張力の低下がこれらの BAR タンパク質の変形活性を惹起し、invadosome の形成と細胞膜どうしの融合を引き起こすメカニズムが示唆される。本研究の成果は、細胞融合の分子メカニズムの理解だけでなく、新たな細胞融合技術の開発や、ウイルス感染症治療法の発展に寄与することが期待される。

### 背景および目的

細胞どうしが融合する現象 (細胞融合) は、筋分化、骨代謝、受精、胎盤形成、ウイルス感染など、多様な生理的・病的プロセスに関与する。また、人為的な細胞融合技術は、モノクローナル抗体産生細胞 (ハイブリドーマ) の作出など幅広い領域で利用されているが、細胞融合の詳細な分子メカニズムはほとんど分かっていない。興味深いことに、破骨細胞の融合面において「浸潤性の入り組んだ細胞膜構造」が発見されている (Oikawa et al., J. Cell Biol. 2012)。一方で私たちは、浸潤性膜構造の形成に関与する「膜変形タンパク質」を一貫して研究し、「細胞膜の変形」と「細胞膜にかかる張力」の拮抗作用を明らかにしてきた (Dev. Cell 2005, J. Cell Biol. 2008, J. Cell Biol. 2011, Nat. Cell Biol. 2015)。細胞膜張力が悪性がん細胞の浸潤性運動に対抗する「がん抑制因子」であることも報告している (Nat. Commun. 2021)。このような背景から、細胞膜どうしの融合に関与する浸潤性膜構造もまた、膜張力により制御されると考えた。そこで本研究は、細胞膜の形状と張力を制御、感知する分子による、細胞融合メカニズムの解明を目的とした。細胞融合現象は長年研究されてきたが、向かい合った細胞膜どうしが融合するメカニズムは未だに不明である。COVID-19 の重症肺炎では肺胞上皮細胞が融合する現象が知られている。細胞融合の最も重要な謎を解くことが出来れば、ウイルス感染症への治療法開発に与える波及効果が期待される。応用面でも、新しい細胞融合技術の創出につながるなど、本研究の意義は非常に大きい。

### 方法

本研究では、破骨細胞分化における細胞融合をモデルとして、細胞膜の形状と張力による細胞融合制御の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。具体的には、以下の研究を行った。

- ①細胞膜張力の測定と人為的な操作により、細胞膜張力と細胞融合の関係を明らかにする。
- ②細胞融合に必須な細胞膜張力センサー分子を同定する。
- ③細胞融合における浸潤性膜構造の動態を明らかにし、向かい合った二つの細胞膜を単一の膜に融合するメカニズムを明らかにする。

#### ①膜張力の測定と操作による細胞膜張力と細胞融合の相関解析

1-1) マウス単球マクロファージ RAW264.7 細胞を RANKL 刺激すると、72 時間から 96 時間の間に細胞融合が進行する。当研究室が保有する光ピンセット顕微鏡を用いて RANKL 刺激後の各時間における細胞膜張力を計測し、これを検証する。

1-2) 我々が独自に設計した membrane-targeted active ezrin (MA-ezrin) を発現する細胞集団（全ての細胞で膜張力が高い）で、RANKL による細胞融合が抑制されるか検証する。野生型細胞と MA-ezrin 発現細胞と混合し、膜張力の高い細胞と正常細胞の間で融合が起こるか観察する。

#### ②細胞融合に必須な細胞膜張力センサー分子の同定

2-1) 我々は RAW264.7 細胞の浸潤斑に局在する F-BAR タンパク質として、FBP17 と PSTPIP2 を同定し報告した (J. Cell Sci. 2013)。両者は浸潤性膜構造の形成と分解を競合的に調節しており、細胞融合面の形状と動態の制御に関わる可能性がある。蛍光タンパク質タグ発現と免疫染色により、RANKL 刺激後の細胞融合における両タンパク質の動態を観察するとともに、ロックダウンによる細胞融合への影響を調べる。

2-2) 我々が保有するマイクロアレイデータにより、破骨細胞分化に伴って発現変動する F-BAR タンパク質を抽出し、そのロックダウンや過剰発現により関与を検証する。また、標識タグ発現や免疫染色により、融合における内在性タンパク質の局在を明らかにする。

2-3) 我々は、F-BAR を含む BAR スーパーファミリーの網羅的ロックダウン系を保有している。BAR タンパク質に対する網羅的アプローチにより、細胞膜融合の責任因子を探索する。

#### ③細胞融合における浸潤性膜構造と細胞融合メカニズムの解明

3-1) 細胞融合に関わる浸潤性膜構造 (invadosome) の形成効率と細胞膜張力の関係を明らかにする。

3-2) 計画②で同定した、細胞融合に関与する BAR ドメインタンパク質のロックダウンによる、invadosome の形成効率への影響を検証する。

3-3) これらの BAR ドメインタンパク質の invadosome 形成および細胞融合における動態を明らかにする。

## 結果および考察

破骨細胞の融合における細胞膜張力の役割を調べるため、RANKL 処理により破骨細胞への分化が誘導されたマウスマクロファージ RAW 264.7 の挙動を観察した。RANKL 処理後、融合に至った細胞の面積 (area) および真円度 (circularity) は、他の細胞 (非融合、RANKL 未処理) よりいずれも高い数値を示した。アクチン染色により、非融合・RANKL 未処理細胞が filopodia 優位であるのに対して、融合に至る RANKL 処理細胞では、伸展・扁平化した膜構造にアクチンドットが豊富に存在する invadosome が観察された。細胞融合と細胞形態の扁平化との有意な相関関係は、細胞融合のプロセスに細胞膜張力の減少が関与することを示唆している。そこで、光ピンセット顕微鏡を用いて、RANKL 処理単核細胞の膜張力を評価したところ、RANKL 処理細胞は未処理細胞に比べて有意に低い細胞膜張力を示すことが明らかになった。細胞融合において細胞膜張力の低下が前提条件であるなら、膜張力の上昇は反対に融合を阻害すると考えられる。この仮説を検証するため、細胞膜張力を上昇させる人工遺伝子コンストラクト (membrane-targeted active ezrin [MA-ezrin] および signal-inert MCA linker [iMC linker]) の高発現細胞を作製した。これらの発現細胞は、RANKL の存在下でも親細胞株と比較して有意に高い細胞膜張力を示すとともに、細胞融合が有意に抑制されることが分かった。これらの人工遺伝子ツールの発現は、破骨細胞形成のマスター転写因子である NFATc1 の誘導および核内移行を阻害せず、破骨細胞分化の特異的マーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 活性も認められた。このことから、これらの破骨細胞株の融合能低下が分化抑制に起因するものではないことが示された。

これまでの研究により、非対称な機械的張力が筋芽細胞の融合や酵母の配偶子融合において重要な役割を果たすことが示されている。破骨細胞融合が2つの細胞間の非対称な細胞膜張力によって促進するかどうかを確かめるため、MA-ezrin または iMC linker を発現する細胞株と、それらの親株との共培養実験を行った。混合細胞の融合指数は、親細胞のみの場合よりも有意に低かった。これは、破骨細胞融合においては細胞膜張力の非対称性ではなく、両細胞における細胞膜張力の減少が重要であることを示している。

次に、RANKL による破骨細胞分化において、膜張力減少の下流で細胞融合を促進するエフェクタータンパク質の同定を試みた。RAW 264.7 細胞で発現している 14 種類の BAR タンパク質を選択し、その減少が細胞融合に及ぼす影響を調べた。その結果、TOCA ファミリー (Fnbp1/FBP17、Fnbp11/TOCA-1、Trip10/CIP4)、Baiap2/IRSp53、Baiap211/IRTKS などの一部の BAR タンパク質のノックダウンにより、細胞融合効率が顕著に減少することが分かった。この減少は、破骨細胞融合の主要な制御因子である DC-STAMP のノックダウンで観察された減少と同等であった。Baiap211 および Fnbp1 のノックダウンでは、融合指数が減少したが、TRAP 活性は影響を受けなかった。このことは、TOCA ファミリー (Fnbp1、Fnbp11、Trip10)、Baiap2、Baiap211 などの BAR タンパク質が、破骨細胞の分化に影響を与えることなく、細胞融合に関与することを示唆している。次に、invadosome 形成と細胞膜張力の関係を調べたところ、親細胞における invadosome の数は、RANKL 処理後に増加する一方、MA-ezrin および iMC linker 細胞では有意に抑制された。重要なことに、Baiap211/IRTKS または Fnbp1/FBP17 のノックダウンにより、RANKL 依存的な invadosome 形成の増加は抑制された。これらの結果は、RANKL 処理による細胞膜張力の低下が、Baiap211/IRTKS および Fnbp1/FBP17 を含む BAR タンパク質を介して浸潤性膜構造である invadosome の形成を促進し、細胞融合に至ることを示唆している。

## 謝辞

本研究助成により、高速共焦点顕微鏡の導入が可能となり、細胞融合現象の高精細観察と迅速な細胞融合指数の算出を達成することが出来ました。本研究課題を採択いただいた三菱財団と審査員の方々に深く感謝いたします。

(完)

## 発表論文

- 1) Wan, Y., Nemoto, YL., Oikawa, T., Takano, K., Fujiwara, TK., Tsujita, K., Itoh, T., 2025. Mechanical control of osteoclast fusion by membrane-cortex attachment and BAR proteins *Journal of Cell Biology*, in revision

## 引用文献

- 1) Oikawa, T., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Uehara, S., Udagawa, N., Saya, H., Matsuo, K., 2012. Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell-cell fusion. *Journal of Cell Biology* 197, 553–568. <https://doi.org/10.1083/jcb.201111116>
- 2) Itoh, T., Erdmann, K.S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., De Camilli, P., 2005. Dynamin and the Actin Cytoskeleton Cooperatively Regulate Plasma Membrane Invagination by BAR and F-BAR Proteins. *Developmental Cell* 9, 791–804. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.11.005>
- 3) Oikawa, T., Itoh, T., Takenawa, T., 2008. Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *Journal of Cell Biology* 182, 157–169. <https://doi.org/10.1083/jcb.200801042>
- 4) Hasegawa, J., Tokuda, E., Tenno, T., Tsujita, K., Sawai, H., Hiroaki, H., Takenawa, T., Itoh, T., 2011. SH3YL1 regulates dorsal ruffle formation by a novel phosphoinositide-binding domain. *Journal of Cell Biology* 193, 901–916. <https://doi.org/10.1083/jcb.201012161>

- 5) Tsujita, K., Takenawa, T., Itoh, T., 2015. Feedback regulation between plasma membrane tension and membrane-bending proteins organizes cell polarity during leading edge formation. *Nature Cell Biology* 17, 749–758. <https://doi.org/10.1038/ncb3162>
- 6) Tsujita, K., Satow, R., Asada, S., Nakamura, Y., Arnes, L., Sako, K., Fujita, Y., Fukami, K., Itoh, T., 2021. Homeostatic membrane tension constrains cancer cell dissemination by counteracting BAR protein assembly. *Nature Communications* 12, 5930. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26156-4>
- 7) Tsujita, K., Kondo, A., Kurisu, S., Hasegawa, J., Itoh, T., Takenawa, T., 2013. Antagonistic regulation of F-BAR protein assemblies controls actin polymerization during podosome formation. *Journal of Cell Science* 126, 2267–78. <https://doi.org/10.1242/jcs.122515>