

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：10103

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14704

研究課題名(和文) タンパク質の拡散運動が細胞内構造体により抑制されることで創生する機能に関する研究

研究課題名(英文) Study on functions generated by suppressing diffusive motion of proteins by interaction with intracellular structures

研究代表者

徳楽 清孝 (Tokuraku, Kiyotaka)

室蘭工業大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00332106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体内と同様にタンパク質分子の拡散運動が空間的に制限される条件下でお互いにどのように相互作用し、機能発現するのか解析した。F-アクチンに対して高い親和性を持つMAP2やMAP4はF-アクチン共存下で微小管重合促進活性が亢進されたが、F-アクチンに対する親和性が低いtauの微小管重合促進活性は亢進されなかった。また、アミロイドの凝集を量子ドットを用いてリアルタイムイメージングした結果、培養細胞共存下で凝集が促進される様子が観察された。以上の結果は、F-アクチンや細胞膜との相互作用によるタンパク質分子の拡散運動の抑制がタンパク質の機能発現に大きく影響することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed how proteins interact with each other and express their functions under conditions where the diffusive motion of protein molecules is spatially restricted as in vivo. Microtubule assembly-promoting activity of MAP2 and MAP4 with high affinity for F-actin was enhanced in the presence of F-actin, but tau with low affinity for F-actin was not. Besides, when aggregation of amyloid was real-time imaged using quantum dots, it was observed that aggregation was promoted in the presence of cultured cells. These results suggested that suppression of diffusion of protein molecules by interaction with F-actin and cell membrane greatly affects expression of the protein functions.

研究分野：生物物理学

キーワード：タンパク質 拡散運動 自己集合 細胞骨格 微小管 アクチン 細胞膜 アミロイド

1. 研究開始当初の背景

微小管や F-アクチンなどの細胞骨格は様々な結合タンパク質と相互作用することで、細胞分裂、細胞運動、細胞形態形成などの重要な細胞機能の発現に寄与している。我々はこれまで微小管や F-アクチンと相互作用する様々な結合タンパク質の機能について研究してきた。その中で、微小管結合タンパク質 (MAPs) の一種である MAP4 が微小管に沿って一次元拡散運動する可能性を明らかにした (未発表)。その後、同様の一次元拡散運動が MAP4 のスーパーファミリーである tau で報告され (Hinrichs *et al.*, 2012)、MAPs は微小管と単に結合し解離するのでは無く、微小管に沿って拡散運動することが証明された。一方で、我々は MAP4 が微小管に対する親和性と同程度の高い親和性で F-アクチンと相互作用することを報告した (Matsushima *et al.*, 2012)。そこで、細胞内と同様に微小管 (またはチューブリン) や F-アクチン (または G-アクチン) の共存下で MAP4 がどのように振る舞うか様々な条件下で調べた。その結果、予備的データではあるが、重合の臨界濃度以下の MAP4 とチューブリン濃度条件でも、F-アクチン共存下で微小管が重合することが明らかになった (未発表)。このことは、F-アクチンの共存が MAP4 の微小管重合促進活性を亢進させたことを意味する。我々はこの現象を説明するため、次の仮説を考えた。

溶液中 (細胞質中) の MAP4 の三次元拡散運動は F-アクチンと結合することでフィラメントに沿った一次元拡散運動に抑制される。この MAP4 と結合したチューブリンが一次元拡散運動することでお互いに衝突しやすくなり、溶液中では重合しないような臨界濃度以下でも微小管が形成される。実際に、超解像顕微鏡による生細胞の観察により、細胞内で F-アクチンに沿って微小管が形成される様子も観察されており (未発表)、細胞内でこのような現象が起きている可能性は高い。

2. 研究の目的

細胞内には細胞骨格の繊維構造や細胞小器官の膜構造が網の目のように張り巡らされている。多くのタンパク質はこれら細胞内構造体と相互作用することで、その拡散が空間的に抑制されている。従来、タンパク質の機能解析は精製したタンパク質を用い、このような細胞内構造体の影響を考慮しない中で実施されてきた。本研究では、細胞内と同様に拡散運動が空間的に制限される条件下でタンパク質の振る舞いを解析し、細胞内構造体が共存するからこそ発現されるタンパク質機能について解明することとした。

3. 研究の方法

(1) 三次元拡散運動が一次元拡散運動に抑

制されることで創生される機能の解析

細胞骨格タンパク質が協働することで機能する神経細胞突起形成の分子機構を F-アクチンや微小管上での「微小管結合タンパク質 (MAPs) やモータータンパク質の拡散運動」を手がかりに解析した。具体的には、F-アクチンをプラス電荷を持つ脂質膜を介してガラス基板上に固定化し、フローチャンバー中でモータータンパク質や、MAPs がどのように相互作用するか、蛍光顕微鏡下で、継時的に観察した。また、MAPs (本研究では、MAP2、tau、MAP4 の 3 種のアイソフォームを用いた) については、F-アクチンと相互作用した MAPs によるチューブリン重合促進の様子を顕微鏡で直接観察し、MAPs 間でその違いを比較した。さらに、MAPs を発現させた培養細胞を蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡で観察し、MAPs、微小管、F-アクチンの細胞突起中での局在を詳細に観察した。

(2) 三次元拡散運動が二次元拡散運動に抑制されることで創生される機能の解析

我々は、最近量子ドットで蛍光標識したアミロイド β を蛍光プローブとして、アミロイド β の凝集を蛍光顕微鏡下でリアルタイムイメージングする手法を開発した⁽¹⁾。本研究では細胞 (PC12 細胞) を培養中、培地に添加したアミロイド β が細胞膜表面上でどのように凝集するか蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡を用いてリアルタイムイメージングした。

4. 研究成果

(1) 三次元拡散運動が一次元拡散運動に抑制されることで創生される機能の解析

F-アクチンをガラス基盤上に固定化し、アクチン結合タンパク質として知られるミオシン (モータードメインを含むヘビーメロミオシンと GFP を融合させた HMM-GFP を利用)、およびコフィリン (コフィリンと mCherry を融合させた mCherry-cofilin) が結合していく様子を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、これらのアクチン結合タンパク質がクラスター状に結合していく様子を継時的に観察することに成功した。また、クラスターが F-アクチン上を広がっていく様子を解析したところ、一方向に向かってクラスターが成長することが多いことが明らかになった。HMM については、HMM がクラスターに向かって F-アクチン上を移動していく様子が観察された。以上の成果は、雑誌論文 (①、③)、および学会 (⑦、⑪) で発表した。

F-アクチンをフローチャンバーのガラス基盤上に脂質膜を介して固定化し、MAPs およびチューブリンを様々な濃度で添加後、微小管が重合していく様子を蛍光顕微鏡下でリアルタイムイメージングした。その結果、

MAP2 と MAP4 存在下では、F-アクチンに沿って微小管が形成していく様子が観察された。その際、MAP2 の方がより F-アクチンに沿う傾向がみられた。一方で、tau についてはF-アクチンに沿って微小管が伸長する様子は観察されなかった。興味深いことに、重合の臨界濃度以下のチューブリンを添加した場合にも、MAP2 と MAP4 共存下ではF-アクチンに沿って微小管が形成される様子が観察されたが、tau 存在下では微小管は形成されなかった (図1)。tau はMAP2 やMAP4 と比較して、F-アクチンに対する親和性が著しく低かったことから、この結果は、MAP2 や tau、およびそれらと結合したチューブリンの三次元拡散運動が共存する F-アクチンと相互作用により次元拡散抑制され、その結果としてチューブリン同士が衝突しやすくなり、見かけ上 MAPs のチューブリン重合促進活性が亢進したためだと考えた。

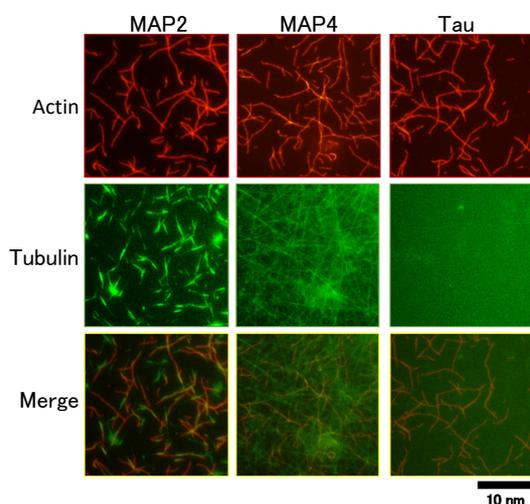


図1 固定化したF-アクチン共存下でのMAP2、MAP4、tau による微小管重合促進活性の評価 F-アクチン共存下でMAP2 (左) とMAP4 (中) を加えたサンプルはアクチンに沿った微小管が観察されるが、Tau を加えたサンプル (右) では微小管が観察されなかった。

培養細胞に MAP2 と tau を過剰発現させると、MAP2 を発現させた場合のみ細胞突起が形成されることが報告されている⁽²⁾。そこで、本研究では MAP4 を過剰発現させた細胞を観察したところ、MAP2 の結果と同様に細胞突起が形成されること、またその突起中では F-アクチンに沿って微小管が形成されている様子が観察された。この結果は、*in vitro*において観察された F-アクチン共存下における MAP2 や MAP4 の微小管重合促進活性の亢進の結果、突起形成が促進、また形成した突起が安定化されたものと推測された。以上の成果については、学会 (①、③、④、⑤、⑥、⑧、⑨、⑩) で発表し、現在、論文投稿の準備中である。

(2) 三次元拡散運動が二次元拡散運動に抑制されることで創生される機能の解析

アミロイドβをモデル神経細胞としてよく用いられている PC12 細胞に添加すると、培地中で凝集体が形成され、その毒性によって細胞が死滅するが、この毒性発現のメカニズムについてはよくわかっていない。そこで、最近報告した、量子ドットナノプローブを用いたアミロイドβ凝集体形成過程のリアルタイムイメージング法を用い⁽¹⁾、細胞培養中下、アミロイドβがどのように凝集していくのか蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡で詳細に観察した。その結果、細胞辺縁部の細胞膜上でアミロイドβの凝集が促進されることが明らかになった (図2)。この結果は、溶液中でのアミロイドβの三次元拡散運動が、アミロイドβが細胞膜にトラップされ二次元拡散運動に抑制されることでお互いに衝突しやすくなり、凝集が促進されたものと考えられた。以上の成果については、学会 (②) で発表し、現在、論文投稿のための追加データの取得中である。

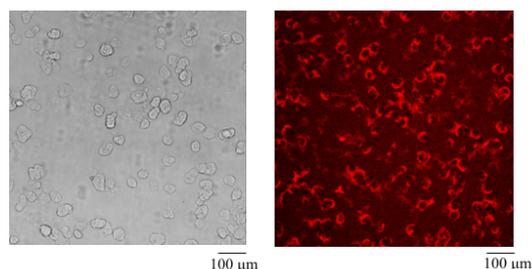


図2 培養細胞表面上でのアミロイドβ凝集のリアルタイムイメージング アミロイドβおよび QDA β を培地に添加し、24 時間後の明視や画像 (左) と蛍光画像 (右)。

<引用文献>

- (1) Tokuraku *et al.*, PLOS ONE 4, 2009
- (2) Roger *et al.*, Curr Biol 14, 2004

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Hirakawa, R., Nishikawa, Y., Uyeda, T. Q. P., Tokuraku, K. "Unidirectional growth of heavy meromyosin (HMM) clusters along actin filaments revealed by real-time fluorescence microscopy" Cytoskeleton 74, 482-489 (2017).
- ② Taguchi, R., Hatayama, K., Takahashi, T., Hayashi, T., Sato, Y., Sato, D., Ohta, K., Nakano, H., Seki, C., Endo, Y., Tokuraku, K., Uwai, K. "Structure-activity relations of rosmarinic acid derivatives for the amyloid β

aggregation inhibition and antioxidant properties” Eur. J. Med. Chem.138, 1066-1075 (2017).

- ③ Ngo, K.X., Umeki, N., Kijima, S.T., Kodera, N., Ueno, H., Furutani-Umezumi, N., Nakajima, J., Noguchi, T.Q.P., Nagasaki, A., Tokuraku, K., Uyeda, T.Q.P. “Allosteric regulation by cooperative conformational changes of actin filaments drives mutually exclusive binding with cofilin and myosin” Scientific Reports 6, Article number 35449 (2016).

[学会発表] (計 1 1 件)

- ① Tamura, M., Matsui, K., Siga, M., Kabir, A.R., Kakugo, A., Kotani, S., Tokuraku, K. “Analysis of the mechanical properties of MAPs-bound microtubules using fluorescence microscope and mechanical chamber” Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research 2018 (Muroran), Mar. 2018.
- ② 山下涼太、徳楽清孝 “細胞表面におけるアミロイドβの凝集は細胞運動によって促進される” 2018 年生体運動研究合同班会議 (東京) 2018 年 1 月
- ③ 田村水季、松井一史、志賀美由貴、Kabir Arif Md. Rashedul、角五彰、小谷享、徳楽清孝 “微小管の物理的特性に与える MAPs の影響” 第 55 回日本生物物理学会年会 (熊本) 2017 年 9 月
- ④ 松井一史、田村水季、志賀美由貴、橋友理香、小谷享、徳楽清孝 “Protein with tau-like repeats (PTL-1) と細胞骨格線維の相互作用” 第 55 回日本生物物理学会年会 (熊本) 2017 年 9 月
- ⑤ Matsui, K., Shiga, M., Hashi, Y., Kotani, S., Tokuraku, K. “A comparison of interaction properties of mammalian Microtubule-associated- proteins (MAPs) and protein with tau-like repeats (PTL-1) for cytoskeletal filaments” Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research 2017 (Muroran), Mar. 2017.
- ⑥ 志賀美由貴、松井一史、齋藤翔馬、橋友理香、小谷享、徳楽清孝 “微小管結合蛋白質が関与した F-アクチン-微小管相互作用による細胞突起形成機構” 生体運動研究合同班会議 (神戸) 2017 年 1 月
- ⑦ 平川利佳、上野寛朗、古寺哲幸、上田太郎、

徳楽清孝 “蛍光顕微鏡および高速 AFM によるミオシンと F-アクチン間の協同的結合の経時的観察” 第 54 回日本生物物理学会年会 (つくば) 2016 年 11 月

- ⑧ 松井一史、志賀美由貴、橋友理香、小谷享、徳楽清孝 “線虫由来 PTL-1 (protein with tau-like repeats) による微小管重合促進と F-アクチンの結合活性” 日本動物学会第 87 回年会 (沖縄) 2016 年 11 月
- ⑨ 志賀美由貴、松井一史、小谷享、徳楽清孝 “微小管結合蛋白質によるアクチンと微小管のクロスリンクとアクチンに沿った微小管の形成” 日本動物学会第 87 回年会 (沖縄) 2016 年 11 月
- ⑩ Shiga, M., Matsui, K., Kotani, S., Tokuraku, K. “Regulation of actin filaments-microtubule interaction by microtubule-associated proteins” The 7th Forum on Studies of Environmental and Public Health Issues in the Asian mega-Cities (EPAM 2016) (Muroran), Sep., 2016.
- ⑪ Hirakawa, R., Ueno, H., Kodera, N., Uyeda, Q.P.T., Tokuraku, K. “Real-time observation of cooperative binding between actin-binding proteins and F-actin” The 7th Forum on Studies of Environmental and Public Health Issues in the Asian mega-Cities (EPAM 2016) (Muroran), Sep., 2016.

[その他]

ホームページ等

http://www3.muroran-it.ac.jp/tokuraku/tokuraku/Top_Page.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳楽清孝 (TOKURAKU, Kiyotaka)

室蘭工業大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：00332106