

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870302

研究課題名(和文) 難溶性アクチン結合タンパク質カプリースによる細胞骨格制御機構の解明

研究課題名(英文) Functional regulation of cytoskeletal organization by a highly insoluble actin bundling protein Caprice

研究代表者

桑田 昌宏 (Kumeta, Masahiro)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：00582181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々が見出した新規のアクチン繊維架橋タンパク質「カプリース」は、1) 生化学的に高度に難溶性で、2) ノックダウンや過剰発現で細胞の形態を大幅に変化させ、3) 特定の細胞種にしか発現していない、という特徴的な性質を持つ。本研究で我々は、高濃度のカプリースタンパク質が溶液中でゲル化することを示し、ゾル-ゲルという相転移を起こすことによってアクチン骨格に特殊な性質を与えている可能性を見出した。更に、カプリースの発現様式の詳細な解析やノックダウンによる細胞形態や細胞接着における影響を解析し、このタンパク質が細胞骨格の制御において重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The novel actin-bundling protein Caprice is characteristic in its 1) highly insoluble nature, 2) drastic effect on cellular morphology by over expression or knockdown, and 3) cell type-specific expression. We demonstrated that high concentration of Caprice protein in solution make it into a hydrogel, thus this protein is expected to confer specific property on the actin filament by undergoing sol-to-gel phase transition. Detailed analyses focusing on its transcriptional control and knock-down effect on cellular activities such as morphological regulation and adhesion properties revealed important roles of Caprice in organizing cytoskeletal dynamics.

研究分野：生化学、細胞生物学、分子生物学

キーワード：細胞骨格 生化学 細胞生物学 アクチン

1. 研究開始当初の背景

細胞内には様々な特徴をもつ分子が高濃度で存在し機能している。これらの分子機能の研究は、単離・精製や調製などが容易な「可溶性タンパク質」に偏りがちであり、生化学的に取り扱いが難しい「難溶性タンパク質」には手つかずのものも多い。

我々は過去に、この難溶性タンパク質のみを対象として質量分析器を用いた網羅的解析を行い、多くの新規タンパク質を発見し報告してきた。中でも、アクチン骨格に共局在する新規タンパク質(遺伝子座 C19orf21)に着目し、このタンパク質をカプリース(Caprice)と名付けて、本研究計画でその機能解析を進めた。

2. 研究の目的

本研究では、カプリースによる細胞骨格制御機構の解明を目的とし、以下の研究を推進した。

- (1) カプリースの分子機能を制御するメカニズムの解明
- (2) カプリースが形成する難溶性アクチン高次構造の解析
- (3) カプリースによる細胞機能制御機構の解明
- (4) カプリースの細胞種特異的な遺伝子発現制御メカニズムの解明

3. 研究の方法

(1) カプリースにはいくつかのリン酸化修飾が予測される。リン酸化依存的なアクチン骨格との関連を明らかにするとともに、これらのサイトに点変異を導入した変異体の動態を調べることで、リン酸化依存的な分子機能調節の可能性を追究した。

(2) これまでのカプリース断片を用いた実験から、このタンパク質はアクチン繊維を架橋する活性をもつことが分かっている。この分子活性を更に詳細に調べるため、高度に難溶性であるカプリース全長タンパク質を、変性剤の存在下で可溶化し精製する調製法に取り組んだ。また得られたタンパク質を用いて、どのような生化学特質を持つか、さまざまな角度からその分子特性の解明に取り組んだ。

(3) カプリースの分子機能を細胞レベルで明らかにするため、遺伝子ノックダウンによる影響を解析した。細胞形態や細胞接着を指標とした定量評価を行うとともに、ノックダウンの影響を遺伝子導入により相補できるかどうかの検討を行った。

(4) これまでのところカプリースの発現は特定の細胞のみに限られることを示唆する結果を得ている。様々な細胞・組織でその発現パターンがどのようなものであるかを明らかにするとともに、その調節が遺伝子発現のどの段階で行われているかを、プロモーターアッセイなどを用いて追究した。

4. 研究成果

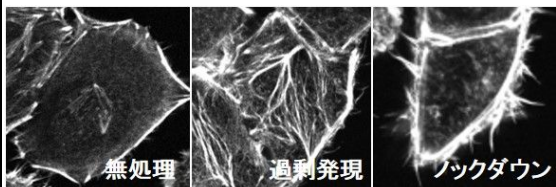
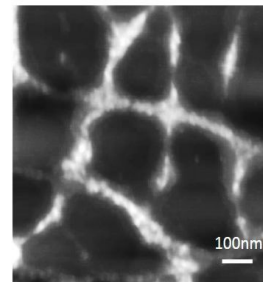
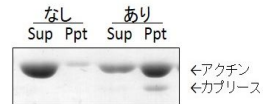
(1) カプリース断片は細胞懸濁液からアクチンを結合して共沈する。細胞をキナーゼ阻害剤であるスタウロsporinで処理すると、共沈の量が有意に増加することから、カプリースとアクチンの結合はリン酸化によって負に制御されていることが明らかになった。点変異体の解析では、これまでのところこのメカニズムに参与するリン酸化サイトは特定されていないが、予測されるヘリックス近傍がアクチン結合に重要なことは明らかにしており、今後リン酸化依存的なアクチン架橋機構が明らかになることが期待される。

(2) カプリースのC末端側半分の領域は、アクチン繊維を束ねる活性がある(右図上、カプリース存在下では束ねられ重くなったアクチン繊維が沈殿画分 Ppt に検出される)。この束ねられた構造体を原子間力顕微鏡で観察したところ、直角に近い角度でアクチン繊維を束ねていることが明らかになった(右図下)。定量的な生化学実験により、カプリースとアクチン繊維の結合比率は分子数にして1:12程度であることも明らかになった。

また、難溶性である全長分子を変性剤の存在下で精製する方法の確立に取り組んだ。ヒスチジンタグ(HisX6)を融合した全長分子を昆虫細胞で発現し、高濃度の尿素の存在下で可溶化して、ニッケルビーズにより精製の後、透析により段階的に尿素を取り除いたところ、目的の全長分子が精製された。この分子を凍結乾燥により濃縮し、1 μ M程度の濃度で生理的な塩濃度の条件に置いたところ、相分離しドロップレットを形成した。

これらの結果は、カプリース分子が細胞内でアクチン繊維を高度に組織化して相分離した構造体を構成することを示唆し、細胞内のアクチン動態制御に新たな観点から説明を与える興味深いものである。

(3) カプリースのノックダウンを行うため、siRNAを用いてその分子合成を抑制した。遺伝子のコード領域内に設計したsiRNAを用いると48時間で95%程度、コード領域の外側(非翻訳領域UTR)に設計したsiRNAでも同時間で90%程度の高い抑制効率を示した。

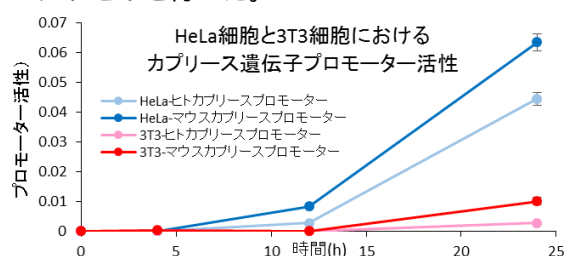


HeLa細胞において、カプリースをノックダウンもしくは過剰発現したところ、アクチン骨格の構造に大きな影響がみられた(上図)。

過剰発現の場合はアクチン繊維の大規模な架橋によるストレスファイバーの形成が誘導され、ロックダウンでは細胞外縁に糸状仮足(フィロポディア)状の毛羽立った突起が形成された。このことは、カプリースの異常によりアクチン繊維が大規模に再構築され、細胞形態に影響を与えたことを示す。

カプリースのロックダウンによって、細胞接着が有意に抑制されることも見出した。トリプシン処理により HeLa 細胞を培養基盤から剥離し、定着を経時観察したところ、カプリースのロックダウンではその定着率は顕著に低下する上に、生存率も低下することが明らかとなった。ロックダウンは細胞接着因子ヴィンキュリンの接着斑へのターゲットも阻害することから、接着斑を介してアクチン骨格を安定化させる過程に重要な役割を果たしていることが示された。

(4) 細胞種特異的なカプリース遺伝子の発現調節機構を明らかにするため、プロモーターアッセイを行った。



ヒトとマウスのカプリース遺伝子上流をクローニングし、HeLa 細胞(カプリースを発現している)および3T3 細胞(カプリースを発現しない)を用いてデュアルルシフェラーゼアッセイによる定量評価を行ったところ、HeLa 細胞では有意な活性がみられたが、3T3 細胞ではその活性は有意に低いことが明らかになった(上図、青: HeLa 細胞、赤: 3T3 細胞)。このことから、細胞種特異的なカプリースの発現は、プロモーター依存的な転写レベルでの制御がなされていることが明らかになった。

上記の結果から、機能未知であった難溶性アクチン架橋タンパク質カプリースに対し、遺伝子レベル・分子レベル・細胞レベルでそのはたらきに迫り、多くの新規な知見が得られた。中でも、分子解析から明らかになった濃度依存的に自発的に相転移を起こす性質は、アクチン骨格制御における新たな概念を提示するものであり、研究申請当初の目的は十分に達せられたと言える。これらの成果は多数の論文や学会で報告し、評価を得ている。本研究の成果を元に、今後更に研究を進めることで、この分子を基点としてどのように適時適切な細胞骨格制御がなされているのか、特に細胞内の高分子クラウディング環境がどのように細胞骨格の制御に利用されているか、新たな概念が得られることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Zhang Y, Yoshida A, Sakai N, Uekusa Y, Kumeta M, Yoshimura SH. "In vivo dynamics of the cortical actin network revealed by fast-scanning atomic force microscopy." *Microscopy*, 査読あり, 2017, 20:1-11. doi: 10.1093/jmicro/dfx015.

Gilmore JL, Yoshida A, Takahashi H, Deguchi K, Kobori T, Louvet E, Kumeta M, Yoshimura SH, Takeyasu K. "Analyses of nuclear proteins and nucleic acid structures using atomic force microscopy." *Methods Mol Biol.*, 査読あり, 2015, 1262:119-53. doi: 10.1007/978-1-4939-2253-6_8.

Yoshida A, Sakai N, Uekusa Y, Deguchi K, Gilmore JL, Kumeta M, Ito S, Takeyasu K. "Probing in vivo dynamics of mitochondria and cortical actin networks using high-speed atomic force/fluorescence microscopy." *Genes to Cells*, 査読あり, 2015, 20(2):85-94. doi: 10.1111/gtc.12204.

Wada K, Sato M, Araki N, Kumeta M, Hirai Y, Takeyasu K, Furukawa K, Horigome T. "Dynamics of WD-repeat containing proteins in SSU processome components." *Biochem Cell Biol.*, 査読あり, 2014 92(3):191-9. doi: 10.1139/bcb-2014-0007

Kumeta M, Gilmore JL, Umeshima H, Ishikawa M, Kitajiri S, Horigome T, Kengaku M, Takeyasu K. "Caprice/MISP is a novel F-actin bundling protein critical for actin-based cytoskeletal reorganizations." *Genes Cells*, 査読あり, 2014, 19(4):338-49. doi: 10.1111/gtc.12131

〔学会発表〕(計 10 件)

Yoshida A, Sakai N, Uekusa Y, Zhang Y, Kumeta M, Ito S, Yoshimura SH. "Nano-scale live cell imaging of cell cortex by fast-scanning atomic force microscope.", The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2016年11月30日, 横浜・神奈川県

Yoshida A, Sakai N, Uekusa Y, Kumeta M, Ito S, Yoshimura SH. "non-invasive imaging of membrane dynamics accompanied with endocytosis in living cells by atomic force microscopy.", The 60th Annual Meeting of Biophysical Society, 2016年2月27日, Los Angeles (USA)

吉田藍子、酒井信明、植草良嗣、桑田昌宏、伊東修一、吉村成弘 "生細胞における皮質アクチンネットワークの動的分子イメージング" 第3回「分子ロボティクス」若手の会, 2016年2月22日, 京都・京都府

Yoshida A, Sakai N, Uekusa Y, Kumeta M, Ito S, Yoshimura SH. "Probing in vivo dynamics of membrane/cortical actin networks using high-speed atomic force/fluorescence microscopy.", The 38th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2015年12月2日, 神戸・兵庫県

Yoshida A, Deguchi K, Ito S, Kumeta M, Yoshimura SH. "Non-invasive imaging of F-actin dynamics in living cells by atomic force microscopy.", The 59th Annual Meeting of Biophysical Society, 2015年2月10日, Baltimore (USA)

Takeyasu K, Yoshida A, Sakai N, Uekusa Y, Deguchi K, Gilmore JL, Kumeta M, Ito S. "Probing in vivo dynamics of mitochondria and cortical actin networks using high-speed atomic force/fluorescence microscopy.", The 2014 American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2014年12月9日, Philadelphia (USA)

Yoshida A, Deguchi K, Kumeta M, Yoshimura SH. "Three-dimensional organization and dynamics of cortical actin networks in living cells revealed with high-speed atomic/fluorescence microscopy.", The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2014年11月27日, 横浜・神奈川県

Yoshida A, Ito S, Deguchi K, Gilmore J, Kumeta M, Takeyasu K. "Probing in vivo dynamics of mitochondria and cortical actin networks using high-speed atomic force/fluorescence microscopy.", The 13th NTU-KU-UT Joint Mini-Symposium, 2014年9月26日, 筑波・茨城県

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑田 昌宏 (Kumeta Masahiro)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：00582181

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし