

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21444

研究課題名(和文)アクチンフィラメントとカテニンの結合におけるラッチ機構の検証

研究課題名(英文)Verification of the force-dependent binding of an alpha-catenin to an actin filament

研究代表者

下澤 東吾(Shimozawa, Togo)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：00386608

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)：カテニンとアクチンフィラメントの張力依存的な結合の解明を主な目的としていたが、研究開始直後に他グループより詳細な報告がなされたため、もう一つの課題である細胞内のカテニンの2量体形成に焦点を絞った。細胞内の2量体形成の計測は蛍光2量体センサが必須だが、既存のGFP系センサは対象タンパク質の動態に影響を与えるため正しい動態の計測は困難だった。UnaGをベースにすることでこの欠点を克服したセンサを開発できると考えた。UnaGは基礎特性から未知なため、溶液中の分散特性やビリルビンとの結合速度などを解析し、holoUnaGは2つの蛍光状態をとることを発見した。

研究成果の概要(英文)：The application was planned to unravel the force dependency of binding property between alpha-catenin in cadherin-catenin complex (CCC) and actin filament (AF). However, just after the start of our research, other group published a report about identical interest. For that reason, we shifted main focus to the next interest of dynamic property of  $\alpha$ -catenin dimerization in cells. To this end, we aimed developing novel genetically encoded fluorescence dimerization sensor by utilizing UnaG, because conventional dimerization sensors are unsuitable for analyzing dynamic association/dissociation of proteins. As essential information for the developing dimerization sensor from UnaG, we determined the monomeric dispersion of apoUnaG and holoUnaG and the association/dissociation rate constant of UnaG and bilirubin. Furthermore, we discover that holoUnaG take distinct two fluorescent states defined by 23% and 92% quantum efficiency, and fluctuate between the two states.

研究分野：生物物理

キーワード：細胞間接着 アクチンフィラメント カテニン 蛍光タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

細胞間の接着は多細胞生物の生存に必須であり、なかでも接着結合(AJ)は同種細胞を認識する重要な接着である(図1)。AJは、細胞内でアクチンフィラメント(AF)に連結して細胞内外に力を伝えており、力学的刺激に対する細胞(集団)応答に重要な機能を果たす。AJの主な要素は、カドヘリン・カテニン・カテニン複合体(CCC)とAFであり、カテニンはN末端ドメインでカテニンと、C末端ドメインでAFと結合する、と考えられてきた。しかし、CCCおよびカテニンの細胞内機能の詳細は不明な点が多かった。

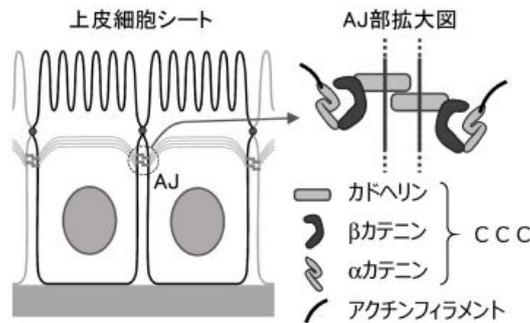


図1：接着結合(AJ)とその主要な構成要素

本研究は、このCCCおよびカテニンの細胞内機能の解明を目指したものであった。例えば、カテニンとAFとの結合は、力学状態により相反する結果が報告されていた。当初、これまでの報告を矛盾なく説明する、「ラッチ機構」モデルを1分子操作・計測により検証することを計画していた。しかし、研究開始直後に他グループから、ラッチ機構に関して存在の確認のみならず、張力依存性の定量解析も含んだ優れた報告がなされた。

そこで、もう一つの課題として申請していた「細胞内におけるカテニン2量体形成の検証」に焦点を絞ることとした。

## 2. 研究の目的

カテニンは、ホモ2量体を形成すること、この2量体には2本のAFを架橋する機能を持つことが試験管内実験により明らかになっている。しかしながら、2量体形成の結合・解離の測定定数や、CCC中においても2量体を形成するのか、など細胞内のカテニンの動態は不明である。これらの知見は、AJ形成のメカニズムの理解につながり生物学的に価値が高い。これらの理由から、「細胞内におけるカテニン2量体形成の検証」に主な研究目的とした。

## 3. 研究の方法

対象タンパク質の2量体形成を調べるためには、2量体形成依存的に蛍光シグナルを発する蛍光タンパク質を分割した蛍光2量体センサを用いて、このセンサを対象タンパク質の末端にラベルする手法が利用される。しかし、既存の蛍光2量体センサのうち、分割GFP型のセンサは2量体を形成すると解離できないため、対象タンパク質の自然な動態を変えてしまう欠点があった。これは、GFPは化学変化を伴う発色団形成という不可逆な過程を含むためである。

そこで、新たに近年発見された蛍光タンパク質UnaGをベースに2量体センサを開発することとした。UnaGは結合したピリルビン(BR)を発色団とし、発色団の形成時間が不要、かつUnaGとBRの結合・解離が可逆的であることが知られている。この特性を利用することで、従来の蛍光2量体センサの欠点を克服した対象タンパク質の動態への影響を抑えたセンサが実現できる可能性がある。しかしながら、UnaGは近年発見されたばかりで、2量体センサの開発には不可欠な溶液中での会合状態、蛍光強度の安定性、BRとの結合解離の速度定数、など基礎的な分子の特性が明らかではなかった。そこで、UnaGの溶液中の基礎特性から明らかにすることとした。

## 4. 研究成果

### [水溶液中でのUnaGの会合状態]

まず、BRが未結合のapoUnaGとBRが結合したholoUnaGの水溶液中(塩強度0mM)における多量体形成の有無を、超遠心分析の沈降速度法(AUC-SV)と沈降平衡法(AUC-SE)を用いて明らかにした。apoUnaGとholoUnaGを7.5 μMずつ含む等量混合溶液の沈降速度分布をAUC-SV法により解析した。apoUnaGとholoUnaGの両方を検出する波長280nmの吸収係数の遠心半径方向のプロファイルの時間変化を示す(図2上)。分析ソフトSEDFITを用いて連続的な沈降速度分布モデルでc(s)を解析すると、約1.8Sに単一のピークを持つ分布となった(図2下)。この結果は、apoUnaGとholoUnaGが同じ沈降係数(1.8S)を持つことを示している。同様に、BRを検出する波長500nmの吸収係数プロファイル、つまりholoUnaGの沈降係数も1.8Sに単一のピークを持つ分布となり、上記の結果を支持していた。1.8Sという沈降係数は、アミノ酸配列から計算した分子量(17kDa、His-tagを含む)を考慮すると、apoUnaGとholoUnaGがともに単量体で存在していることを示している。

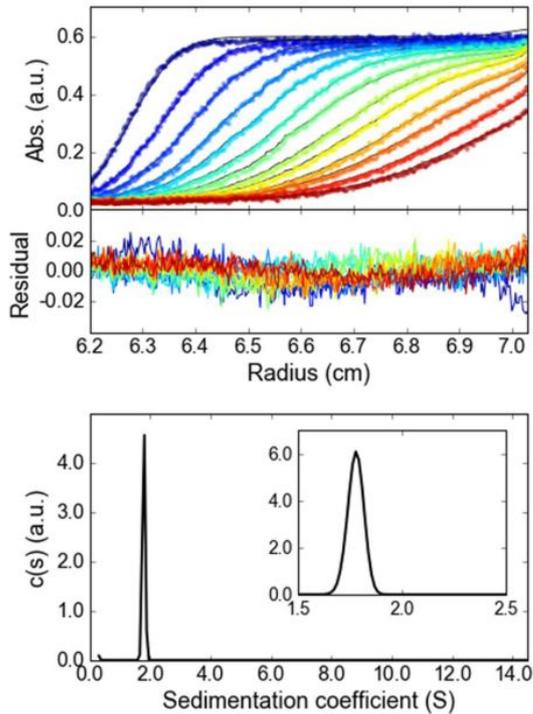


図2 UnaGの分析超遠心解析

つぎに、沈降平衡法 (AUC-SE 法) により、直接的に apoUnaG と holoUnaG の分子量を求めた。沈降平衡状態での吸収係数プロファイルについて、9.4  $\mu\text{M}$ 、5.6  $\mu\text{M}$ 、3.8  $\mu\text{M}$  の結果をグローバルフィッティングにより解析したところ、apoUnaG と holoUnaG の分子量は、それぞれ 20 kDa と 21 kDa となった。アミノ酸配列から計算した分子量 17 kDa と異なる理由は、実際には 4 次構造に依存する偏比容の値としてアミノ酸組成から求めた予想値を使用したためと考えられる。以上の結果より、apoUnaG と holoUnaG は、少なくとも今回実験した 9.8  $\mu\text{M}$  よりも低濃度では単量体であると考えられる。

### [holoUnaG の 2 つの蛍光状態]

次に、BR と apoUnaG の混合後の蛍光強度の時間変化を観察したところ、独立した 2 つの速度で蛍光強度が上昇していくことを見出した。過剰量の BR (最終濃度を固定) を時間 0 で apoUnaG 溶液に加えた後の蛍光強度 (FI) の時間推移は、BR 添加直後の迅速な上昇と、それに続く遅い上昇を示した (図 3 上)。速い上昇の強度 ( $FI_0$ ) は UnaG の濃度と比例関係にあったため、BR が apoUnaG に結合して holoUnaG を形成する過程に対応すると考えられた。一方、遅い蛍光上昇は、それぞれの  $FI_0$  で規格化すると、濃度に関わらずほぼ同じ単純な指数関数でフィットできた (図 3 下)。この結果は、遅い FI 上昇は BR の結合により生成した holoUnaG が、なんらかの 1 分子反応を起こし、それにより輝度が上昇していることを示唆している。

遅い FI 上昇について詳しく調べるために、上昇前後での吸収・CD スペクトルと励起・蛍光スペクトルを測定した。CD スペクトルと吸収スペクトル

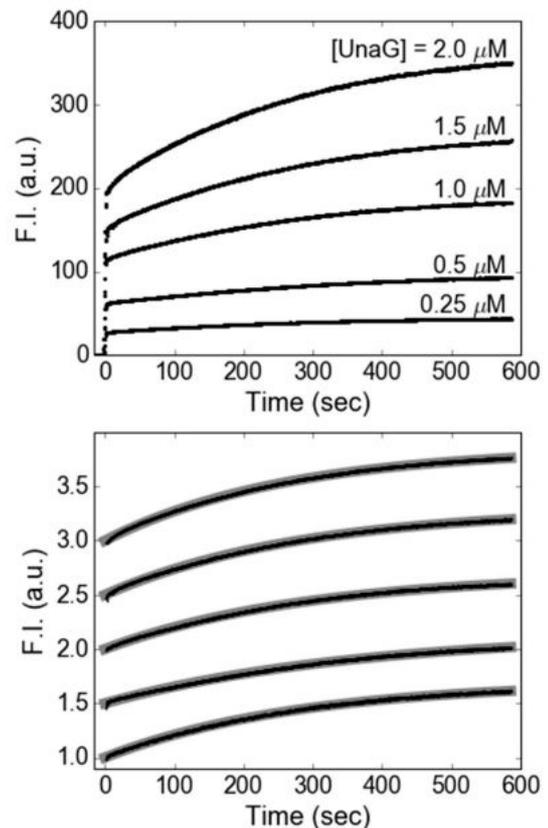


図3 UnaGとBRの結合による蛍光強度時間変化

は、遅い FI 上昇の前後で強度・形状が不変であった。溶液中の遊離 BR は CD 特性を持たないが、UnaG に結合すると特定の形状を取り CD が発現する。そのため、CD スペクトルの不変は、新たな BR と UnaG との結合が無いこと、さらには上述の 1 次反応では結合 BR のコンフォメーションは変化しないことを示している。励起・蛍光スペクトルは、遅い FI 上昇の前後で形状は変化せずに強度のみが変化した。これは、1 次反応では発色団の化学的変化はなく、周囲環境の変化により蛍光量子効率のみが変化したことを示唆している。これらの結果から、holoUnaG には蛍光輝度の異なる 2 つの状態 (以下、低輝度状態を holoUnaG<sub>1</sub> と高輝度状態を holoUnaG<sub>2</sub> と呼ぶ) が存在すること、遅い蛍光上昇は、この 2 状態間の遷移を示すものと考えられた。

次に、微小領域蛍光測定 (FIDA) を用いて、蛍光強度時間変化の定常状態において 2 状態の存在比と輝度比を解析した。表 1 に示すように、コントロールの有機蛍光色素は 1 成分であったのに対し、holoUnaG 溶液は 2 成分で良い一致を示し、輝度比 1 : 3.9、存在比 6 : 4 となった。蛍光強度時間変化の定常状態においても、holoUnaG<sub>1</sub> と holoUnaG<sub>2</sub> の両者が存在したことは、1 次反応は可逆的であり、最終的には 2 状態が混在する平衡状態に達することを示している。

Sample	q1 (kHz)	q2 (kHz)	C1 (%)	C2 (%)	$\chi^2$
Rhodamine-110	60.5±0.4	-	100	-	1.0
holoUnaG	11.5±2.1	44.9±1.3	60.3±1.6	39.7±1.6	1.5

表1 FIDAによる2つの蛍光状態の解析

図4に、本研究により明らかになった新たなUnaGとBRの結合・解離のモデルを図示する。我々が見出したモデルは、apoUnaGはBRと結合後にまず低輝度のholoUnaG<sub>1</sub>を形成するが、その後高輝度のholoUnaG<sub>2</sub>へと変化するが可逆な状態変化であるため、最終的に溶液は2状態が混在する平衡状態に達する。また、過去に報告されたUnaGの蛍光量子効率54%を2つの状態が混在した平衡状態での量子効率と考え、平衡状態でのholoUnaG<sub>1</sub>とholoUnaG<sub>2</sub>の存在比と輝度比からそれぞれの量子効率を求めると23%と92%となり、holoUnaG<sub>2</sub>は非常に高い量子効率状態であることが示唆された。

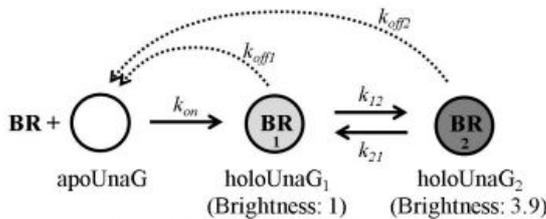


図4 UnaGとBRの結合と状態遷移図

### 【ビリルビンとの結合解離速度定数】

塩(NaCl)濃度0mMと150mMの2つの条件で求めたUnaGとBRの結合・解離の速度定数( $k_{on}$ と $k_{off}$ )およびholoUnaG<sub>1</sub>とholoUnaG<sub>2</sub>間の遷移の速度定数( $k_{12}$ と $k_{21}$ )を表2に示す。ここで、解離速度は野生型UnaGと同程度のBRとの親和性をもつ非蛍光性UnaG変異体を用いることで求めた。holoUnaG<sub>1</sub>とholoUnaG<sub>2</sub>からのそれぞれの解離速度は求められないが、少なくともUnaGとBRとの結合は可逆的であることが確認された。NaCl150mMにすると、 $k_{on}$ が遅くなり $k_{off}$ が速くなる。また $k_{12}$ と $k_{21}$ がともに大きくなることから、UnaGとBRの結合は、電荷の相互作用が大きく寄与していることが示唆された。

Contents	NaCl 0 mM	NaCl 150 mM
$k_{on}$	$7.05 \times 10^6 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}\text{)}$	$1.22 \times 10^6 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}\text{)}$
$k_{off}$	$2.16 \times 10^{-4} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$5.13 \times 10^{-4} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
$k$	$3.28 \times 10^{-3} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$6.60 \times 10^{-3} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
$k_{12} (*)$	$1.30 \times 10^{-3} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$2.47 \times 10^{-3} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
$k_{21} (*)$	$1.98 \times 10^{-3} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$4.13 \times 10^{-3} \text{ (s}^{-1}\text{)}$

表2 UnaGとBRの各種速度定数

### 【UnaGによる分割型蛍光2量体センサの検討】

UnaGの分割型の蛍光2量体センサを作製するために、最適な分割位置を探索した。構造情報からいくつかの位置にカルモジュリンを挿入した(25-26、71-72、82-83番目の残基間)蛍光能が維持できる挿入位置は分割しても蛍光能を保つ可能性が高い。その結果82-83番目のアミノ酸残基の間は、カルモジュリンを挿入しても蛍光能には影響を与えないことが解り、この位置で分割することで蛍光2量体センサを作製できることが示唆された。

### 【まとめ】

本研究で得られたUnaGとBRとの結合特性、蛍光特性の詳細な理解、2つの蛍光状態の発見と新しい状態遷移モデルの構築、加えてUnaGの分割可能位置に関する知見は、UnaGによる蛍光2量体センサの開発にとって重要な情報を与えるものである。本研究成果は、英文誌(Biophysical Journal)に投稿済みであり、今後のUnaGをベースとした動態解析に資する蛍光2量体センサの開発、これを用いた細胞内のカテニンの2量体形成の詳細解析および動態解析につながると考えられる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

(\*:equal contribution)

Ogino Y, Tanaka M, Shimozawa T, Asahi T. "LC-MS/MS and chiroptical spectroscopic analyses of multi-dimensional metabolic systems of chiral thalidomide and its derivatives." *Chirality* 29. 282-293. (2017)、査読有

\*Shimozawa T, \*Hirokawa E, \*Kobirumaki-Shimozawa F, Oyama K, Shintani SA, Terui T, Kushida Y, Tsukamoto S, Fujii T, Ishiwata S, Fukuda N. "In vivo cardiac nano-imaging: A new technology for high-precision analyses of sarcomere dynamics in the heart." *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 124. 31-40. (2017)、査読有

Tsukamoto S., Fujii T., Oyama K., Shintani SA., Shimozawa T., Kobirumaki-Shimozawa F., Ishiwata S., Fukuda N. "Simultaneous imaging of local calcium and single sarcomere length in rat neonatal cardiomyocytes using yellow Cameleon-Nano140." *J. Gen. Physiol.* 148. 341-355. (2016)、査読有

\*Kobirumaki-Shimozawa F., \*Oyama K., \*Shimozawa T., Mizuno A., Ohki T., Terui

T., Minamisawa S., Ishiwata S., Fukuda N. " Nano-imaging of the beating mouse heart *in vivo*: Importance of sarcomere dynamics, as opposed to sarcomere length per se, in the regulation of cardiac function. " *J. Gen. Physiol.* 147. 53-62. (2016)、査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

下島洋、下澤東吾、朝日透 「2 種類の蛍光強度を示す蛍光タンパク質 UnaG の蛍光特性の解析」 第 97 回日本化学会春季年会、2017 年 3 月、慶応義塾大学(神奈川県横浜市)

Yoh SHITASHIMA, Togo SHIMOZAWA, Toru ASAHI "Equilibrium of Two Fluorescence States in The UnaG-Bilirubin Complex" Biophysical Society 61st Annual Meeting, Feb, 2017, New Orleans(USA)

下島洋、下澤東吾、石田みやび、朝日透 「蛍光特性を用いたビリルビン依存型蛍光タンパク質 UnaG の自己二量化的解析」日本化学会第 96 春季年会、2016 年 3 月、同志社大学(京都府京都市)

Yoh SHITASHIMA, Togo SHIMOZAWA, Toru ASAHI "Chiroptical Properties of the Bilirubin Compounded with Fluorescent Protein UnaG in vitro" Pacificchem 2015, Dec, 2015, Honolulu(USA)

下島洋、下澤東吾、石田みやび、朝日透 「ビリルビンを発色団とする蛍光タンパク質 UnaG のキロオプティカル特性」 第 53 回日本生物物理学会年会、2015 年 9 月、金沢大学(石川県金沢市)

Yoh SHITASHIMA, Togo SHIMOZAWA, Miyabi Ishida, Toru ASAHI "Chiroptical Properties of Bilirubin-Dependent Fluorescent Protein UnaG" Symposium on Molecular Chirality 2015, 2015 年 6 月、早稲田大学(東京都新宿区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下澤 東吾 (SHIMOZAWA, Togo)  
早稲田大学・理工学術院・助教  
研究者番号：00386608

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：