

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22092

研究課題名(和文) 中間径フィラメント捕縛による転写制御の定量的解析

研究課題名(英文) Quantitative analysis of transcription factor captured by intermediate filament

研究代表者

中村 史(Nakamura, Chikashi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・連携研究室付

研究者番号：40357661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：中間径フィラメント(IF)は、細胞質で様々なタンパク質と結合し、機能調節を行うことが近年報告されている。我々は、IFが転写に関連する因子を捕縛する足場として機能し、核移行を妨げることで遺伝子発現を制御すると推察している。本研究では、細胞内のIF捕縛分子を検出する手法を開発し、IFによる転写制御機構を解明することを目的とした。転写関連タンパク質PHB2がIFであるビメンチンに結合することに注目し研究を起こった結果、抗PHB2抗体を修飾したナノニードルと原子間力顕微鏡を用いることで、生細胞内でビメンチン繊維に捕縛されたPHB2を力学的に検出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した技術により、さまざまな細胞骨格に結合するタンパク質を力学的に検出可能であると考えられ、非標識の生きた細胞に対してこれを適用することで、転写関連因子の捕縛・放出のダイナミックな細胞内の変化を解析する手法になる。これにより、細胞骨格タンパク質が支配する細胞機能調節機構を明らかにできると期待される。

研究成果の概要(英文)：Intermediate filaments (IFs) have recently been reported to bind to various proteins in the cytoplasm and regulate their function. We hypothesize that IFs act as scaffolds that trap transcription-related factors and regulate gene expression by preventing nuclear translocation. In this study, we developed a method to detect IF-trapped molecules in living cells and to elucidate the mechanism of transcriptional regulation by IFs. We used antibody-modified nanoneedles and atomic force microscopy to target the transcription-related protein PHB2, which is trapped by IF vimentin, and to mechanistically detect IF-binding molecules in living cells.

研究分野：ナノ細胞工学

キーワード：中間径フィラメント AFM ナノニードル 転写制御

1. 研究開始当初の背景

中間径フィラメント (IF) は細胞骨格として細胞に剛性を与えるのみならず、様々なタンパク質と結合することによって細胞機能を調節する役割を持つことが近年明らかになりつつある。がん進展に重要なヘッジホッグ経路のリプレッサーである Gli3 がネスチン繊維に捕縛されることで腫瘍化が進行することなどの例が報告されている¹。組織や発生段階によって異なる IF が発現するため、IF は細胞種判定のマーカーとして用いられるが、その IF が細胞種を決定する上流の因子である可能性がある。IF は特定の転写因子やヒストン修飾酵素を核外でトラップし、遺伝子の発現を促進・抑制することで、細胞機能を規定する (図 1)。このような IF の転写因子捕縛機能を調査するためには、細胞内のタンパク質相互作用を解析する技術が必要だが、近接ライゲーションアッセイ・蛍光相関分光法などの従来法では、膜透過処理を必要とする、あるいは標識分子を使用することから、生細胞内における本来の相互作用を解析できない可能性がある。

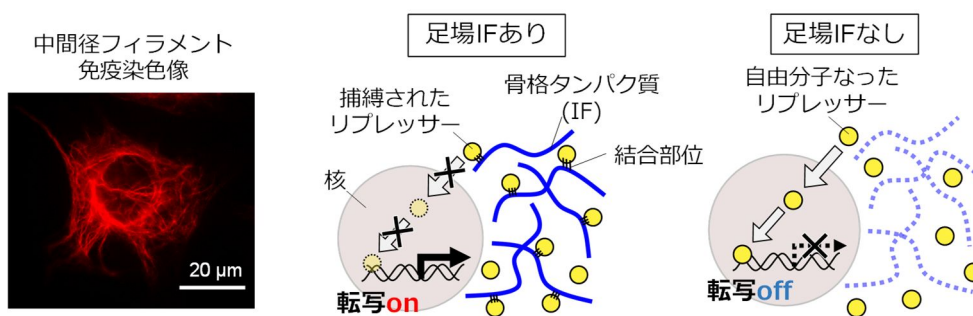


図1 中間径フィラメント(IF)による転写制御機構

我々はこれまでに、原子間力顕微鏡 (AFM) の探針を直径約 200 nm の針状に加工したナノニードルに抗体を修飾し、細胞内に挿入することで標的となる骨格タンパク質を力学的に検出する手法を開発してきた²。この手法で、標的となる骨格タンパク質を半定量的に検出できることを示してきた。この技術を応用し、IF に結合する転写関連タンパク質を力学的に検出することが出来ると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、抗体修飾ナノニードルと AFM を用いて、間葉系の細胞で発現する IF であるビメンチンに捕縛される転写関連因子を標的とし、同因子とビメンチンの相互作用を生細胞内で力学的に検出する技術開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ビメンチン結合転写関連因子の探索

ビメンチン結合タンパク質の探索には、BAC-トランスジェニック Hela 細胞を用いた共免疫沈降と質量分析により、タンパク質の相互作用ネットワークを調査しているデータベースを参考に³。データベースには、ビメンチン結合タンパク質として 19 種類が挙げられており、ビメンチン発現細胞であるマウス乳がん細胞 FP10SC2 (元株) 同株を用いて CRISPR/Cas9 によるゲノム編集で作製された神経幹細胞で特異的に発現する IF であるネスチンをノックアウト (KO) した株、ビメンチン KO 株において RNA-seq 解析により mRNA 発現が確認された、Prohibitin2 (PHB2) を選出した。さらに、ウェスタンブロットにより PHB2 タンパク質発現を評価した。

(2) 抗体修飾ナノニードルを用いた IF 結合タンパク質の力学検出

集束イオンビームを用いたエッチングにより AFM 探針を加工し、長さ 15 μm、直径 200 nm 程度のナノニードルを作製した。これに対してフッ酸による酸化膜除去の後、抗体結合微粒子 ZZ-BNC⁴ を用いて抗 PHB2 抗体をナノニードル上に固定化した。この抗体修飾ナノニードルと AFM を用いて、元株、ビメンチン KO 株、もしくはネスチン KO 株における PHB2 の力学検出を行った。AFM でナノニードルを 10 μm/s で細胞に挿入し、60 秒間停留した後、10 μm/s で引き上げることで Force-distance 曲線を得た。

(3) ビメンチンテール領域におけるアクチン結合ドメインの解析

テール領域一部欠失ビメンチン発現ベクターを用いたビメンチン KO 株の相補試験を行い、免疫染色によりこれらの繊維形成状態を評価した。さらに、近接ライゲーションアッセイにより変異ビメンチン - アクチン間の結合点数を評価した。ビメンチンテール領域の構造予測には、AlphaFold2 を使用した。

4. 研究成果

(1) 各細胞株における PHB2 発現量

本研究では、ビメンチン陽性細胞としてマウス乳がん細胞株(元株)を使用した。この細胞株において、ビメンチンはネスチンと共重合繊維を形成する。IF は、ロッド領域で二量体化し、さらに束化することで繊維を形成するが、ネスチンは 170 kDa の巨大なテール領域を有するため、単独で繊維を形成することができず、ビメンチンと共重合する。このネスチンを KO した細胞株ではビメンチンのみで構成されるフィラメントが形成される。このような繊維の組成が異なる IF に結合する転写関連因子の力学検出効率を評価するため、ネスチン KO 株も測定に使用することとした。

ビメンチンに捕縛された転写関連因子を力学的に検出する際、同因子の発現量の違いが各細胞株における検出結果に影響する可能性を排除するため、標的とする転写関連因子の発現量は各細胞株間で差異がないことが望ましい。そこで元株、ビメンチン KO 株、及びネスチン KO 株の計 3 株において、ビメンチン結合転写関連因子として同定された PHB2 の発現量をウェスタンブロットにより確認した。その結果、全ての株において PHB2 は同程度の発現量であったことから、標的タンパク質として PHB2 を選択した。(図 2)

(2) PHB2 の Fishing force 測定

細胞に抗体修飾ナノニードルを挿入、抜去した際のフォースカーブを図 3B に示す。青いカーブはニードル挿入過程を示し、細胞にニードルが接触すると斥力が上昇する。斥力の緩和は細胞膜貫通を意味している。赤いカーブはニードルの抜去過程であり、抗体とビメンチンに捕縛された PHB2 が結合する場合には、ベースラインを下回る負のピークが観察される。負のピークは引力側の力であり、細胞内で抗体 - 抗原間の結合が逐次破断していく行程を示している。この最大値を我々は Fishing force と呼び、この値を解析することでビメンチンに捕縛された PHB2 の検出を試みた。

Fishing force 判定のネガティブコントロールとして抗 GFP 抗体を使用した。抗 GFP 抗体修飾ナノニードルを挿入した際の力を検出系のノイズと考え、このノイズの平均値 + 4SD を閾値に設定した。図 3C のように、抗 GFP

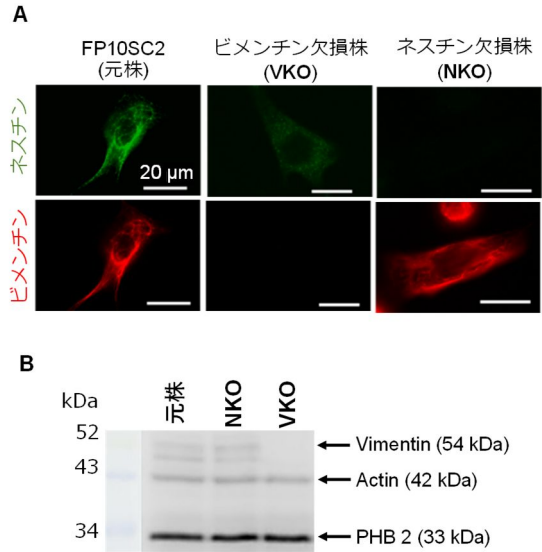


図2 使用した細胞株における PHB2 発現量
(A) ビメンチン及びビネスチンの免疫染色像、
(B) ウェスタンブロットにより評価した各細胞株における PHB2 発現量

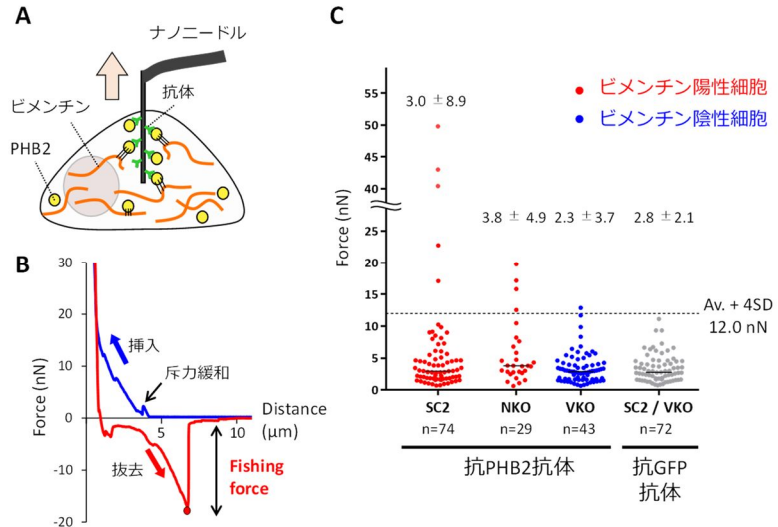


図3 抗 PHB2 抗体修飾ナノニードルによるビメンチン結合 PHB2 の力学検出

(A) 抗体修飾ナノニードルを用いたビメンチンに捕縛されている PHB2 検出の模式図、(B) 元株において抗 PHB2 抗体修飾ナノニードルを用いて得られたフォースカーブ、(C) 抗体修飾ナノニードルを用いて測定した Fishing force

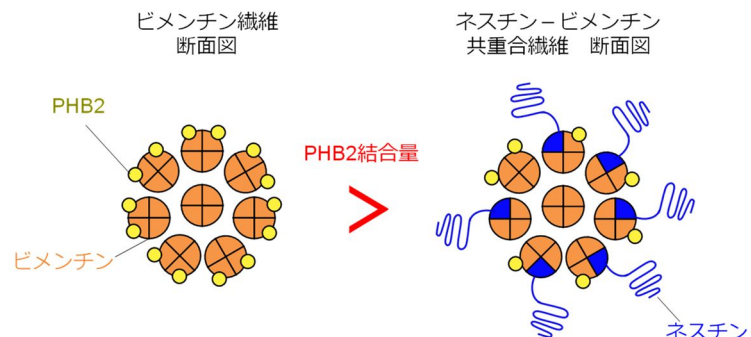


図4 ビメンチン・ネスチンにより形成される中間径フィラメントの繊維断面構造と PHB2 結合量

抗体を用いて得られた Fishing force は全て閾値以下の値であった。さらに抗 PHB2 抗体修飾ナノニードルを用いて Fishing force 測定を行った結果、ビメンチン KO 株では閾値以下の値であり、足場となるビメンチンがないためノイズと同等の値のみが検出されることが確認された。一方、ビメンチン陽性の元株では、閾値を超える Fishing force が複数回検出され、ビメンチンに捕縛された PHB2 を力学的に検出することに成功した。PHB2 検出頻度を算出したところ、元株では 6.8%、ネスチン欠損株では 13.8% であり、元株とネスチン欠損株におけるビメンチン発現量が同程度であるにも関わらず、PHB2 検出頻度に約 2 倍の差が確認された。この差は、ビメンチンとネスチンの共重合状態を反映していると考えた。IF は、2 量体が逆並行に 2 つ結合した 4 量体が、8 本束化することで繊維を形成する。ビメンチンとネスチンは 4:1 の割合で共重合繊維を形成していることが報告されており⁵、この共重合繊維を形成する際に、巨大なテール領域をもつネスチンは、繊維内部に入り込めず、繊維表面に配置されると我々は考えている。その結果、繊維表面のビメンチン占有率が約 50% に低下すると予想され(図 4) これにより PHB2 検出頻度はネスチン共重合繊維でおよそ半分になるものと推察している。以上より、ナノニードルと AFM を用いた IF 捕縛転写関連因子の検出手法開発に成功した。この結果は、さまざまな細胞骨格に結合するタンパク質を力学的に検出可能であることを意味し、非標識の生きた細胞に対してこれを適用することで、捕縛・放出のダイナミックな細胞内の変化を解析する手法となる。また、本手法により、繊維タンパク質の表面構造を解析することも可能であることが示された⁶。

(3) ビメンチンテール領域におけるアクチン結合ドメインの同定

捕縛された転写因子の放出に関する IF アクチン繊維結合に注目し、テール領域に存在すると考えられているビメンチンのアクチン結合ドメインについて解析した。テール全欠失、C 末端 1/2 欠失、C 末端 1/4B 領域を欠失したビメンチンは、細胞内で核近傍に凝集する様子が確認された(図 5)。さらにテール領域欠失ビメンチンとアクチンの結合を近接ライゲーションアッセイで評価した結果、細胞面積当たりの結合点の数はテール領域の欠失により顕著に減少しており、ビメンチンの凝集と結合点の減少に相関があることが確認された。以上より、ビメンチンのテール領域が欠失することでアクチンとの結合能が失われ、繊維展開不能となったビメンチンが凝集することが明らかとなった。

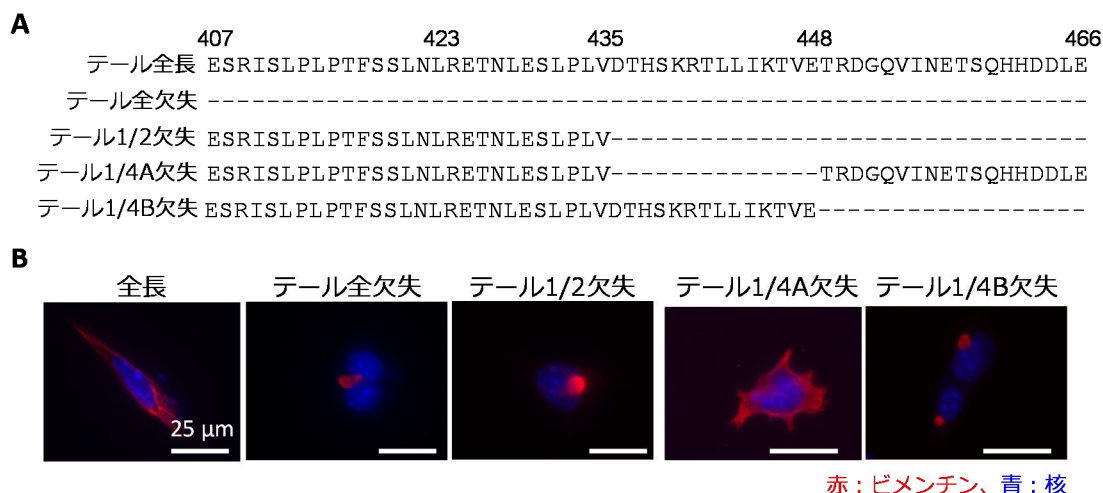


図5 ビメンチン KO 株を用いたテール領域一部欠失ビメンチンの相補試験

(A) ビメンチンテール領域のアミノ酸配列、
(B) テール領域一部欠失ビメンチン発現細胞の免疫染色像

さらに、AlphaFold2 を用いてビメンチンテール C 末端 1/2 領域の構造予測を行った結果、テールの C 末端側 17 残基に存在する シート構造が、III 型 IF のテール領域の共通の構造であることが示唆され、アクチン繊維との結合に重要なドメインであることが推察された。ビメンチン KO 株を用い、このドメインに変異を導入した遺伝子による相補試験を行い、ビメンチン繊維の細胞内での展開を確認することにより、アクチン繊維との結合を評価した。その結果、タ

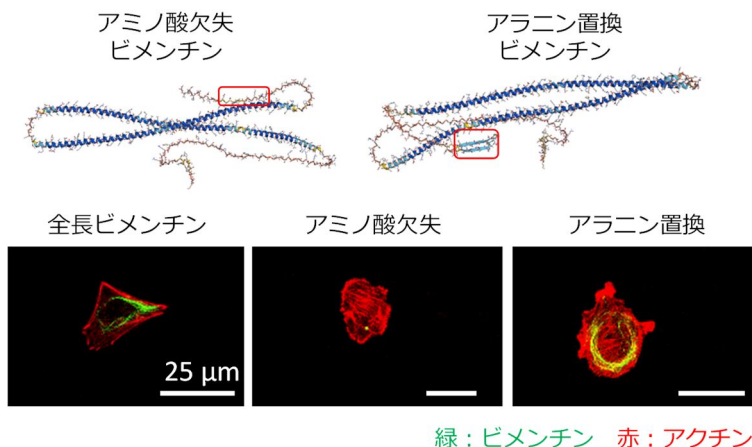


図6 アミノ酸欠失・アラニン置換ビメンチン発現細胞の観察

ーンをアラニン置換した遺伝子を導入した場合は、正常なビメンチン発現が認められた一方で、ターンに欠失変異を導入した遺伝子を導入すると、細胞内でビメンチン繊維は展開出来ず、凝集塊を形成した(図6)。AlphaFold2による構造予測からターンの欠失により、シート構造が崩壊することが示唆され、ビメンチン - アクチン繊維結合にはビメンチンテール領域のシート構造が重要であることが示唆された。同様の構造を持つIII型IFはテール領域のシート構造を含むドメインでアクチン繊維と結合するものと推察される。

<引用文献>

1. Cancer Res, 76, 5573-5583, 2016
2. Biosens Bioelectron, 31, 323-329, 2012
3. Cell, 163, 712-723, 2015
4. Biomaterials, 32, 1455-1464, 2011
5. J Biol Chem, 274, 9881-9890, 1999
6. Biosens Bioelectron, 216, 114603, 2022

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamagishi Ayana, Mizusawa Mei, Uchida Koki, Iijima Masumi, Kuroda Shun'ichi, Fukazawa Kyoko, Ishihara Kazuhiko, Nakamura Chikashi	4. 巻 216
2. 論文標題 Mechanical detection of interactions between proteins related to intermediate filament and transcriptional regulation in living cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 114603 ~ 114603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bios.2022.114603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水澤愛衣・山岸彩奈・中村 史
2. 発表標題 抗体修飾ナノニードルを用いた中間径フィラメント結合タンパク質の力学検出
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水澤愛衣・山岸彩奈・中村 史
2. 発表標題 ピメンチン - 転写関連タンパク質PHB2相互作用のin cell力学解析
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会 (2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田幸希・山岸彩奈・似田優太・三宅 淳・中村 史
2. 発表標題 アミノ酸一次配列を用いたAI予測に基づくアクチン-ピメンチン相互作用部位の同定
3. 学会等名 第73回 日本生物工学会大会 (2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田幸希・山岸彩奈・中村 史
2. 発表標題 アクチン相互作用部位を欠失した中間径フィラメントの繊維構造解析
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会 (2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内田幸希・山岸彩奈・長崎 晃・上田太郎・中村 史
2. 発表標題 中間径フィラメントのテール領域における二次構造とアクチン結合の関係
3. 学会等名 第74回 日本生物工学会大会 (2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内田幸希・山岸彩奈・長崎 晃・上田太郎・中村 史
2. 発表標題 中間径フィラメントにおける テール領域共通 シート構造の機能解析
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会 (2023)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立研究開発法人 産業技術総合研究所
<https://staff.aist.go.jp/chikashi-nakamura/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山岸 彩奈 (Yamagishi Ayana) (00778293)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関