

令和 7 年 3 月 3 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02533

研究課題名（和文）中間径フィラメントが媒介するメカニカルな転写モジュレーション

研究課題名（英文）Mechanical modulation of transcription with intermediate filament

研究代表者

中村 史（Nakamura, Chikashi）

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・客員教授

研究者番号：40357661

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：がん細胞の悪性度に関わる中間径フィラメント（IF）のネスチンは、170 kDaもの構造未知のテール領域によって細胞表層のアクチン繊維と結合することが示唆されている。本研究では、原子間力顕微鏡を用いたネスチンテール領域の引張試験により、同領域が弱い力で大きく伸展する構造を持つことを明らかにした。ネスチンテール領域には腫瘍の進展に深く関わる転写関連因子が結合することが報告されており、がん細胞が浸潤時に大きく変形する際にテール領域の伸展により同因子が放出され、がん関連遺伝子の転写を変調する機構が存在すると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機械刺激を受容するメカノセンサーと呼ばれるタンパク質は、その構造変化がメカノトランスダクションの起点となることで知られる。本研究で明らかとなったネスチンテール領域の機械的特性は、ネスチンによる転写モジュレーション機構の存在を示唆するものであり、細胞骨格そのものであるIFがメカノセンサーたり得ることを示す端緒となる成果である。特に本研究で標的としたネスチンはがん進展と関係することから新たな創薬標的としても期待される。

研究成果の概要（英文）：Nestin, an intermediate filament involved in cancer cell malignancy, has been suggested to bind to actin filaments on under the cell membrane by a tail domain of 170 kDa. In this study, tensile tests of the nestin tail domain using atomic force microscopy revealed that the region has a highly extensible structure with weak force. It has been reported that transcription-related factors that are closely involved in tumor progression bind to the nestin tail domain. Based on this report, we hypothesized that when cancer cells deform during the invasion process, the transcription-related factors are released by extension of the tail domain, thereby modulating the transcription of cancer-related genes.

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、上皮系細胞はケラチン、間葉系細胞はビメンチンと、細胞種ごとに異なる繊維を形成するため、細胞種を判別するマーカーとして用いられている。IFは細胞骨格として細胞に剛性を与えることが主たる役割だと考えられてきたが、近年、IFが転写因子やヒストン修飾酵素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明らかになりつつある。IFは、N末側からヘッド、ロッド、テール領域で構成されており、ロッド領域がコイルドコイル2量体を形成し、2量体2つが会合した4量体が8つ束化することでIFを形成する。これまで研究代表者は、がん細胞の悪性度に深く関わるIFのネスチンが細胞を柔軟化する機能を持つことを明らかにしてきた¹。最近になって我々はネスチンの170 kDaもの構造未知のテール領域が細胞表面のアクチン繊維と結合することを示唆する結果を得ている。このことから、巨大なネスチンテール領域ががん細胞の浸潤時に可逆的に伸展・収縮する特性を持つと推察し、この構造変化によってテール領域に結合した転写関連因子が解離、核移行することで下流の遺伝子発現が調節されているのではないかと考えた(図1)。

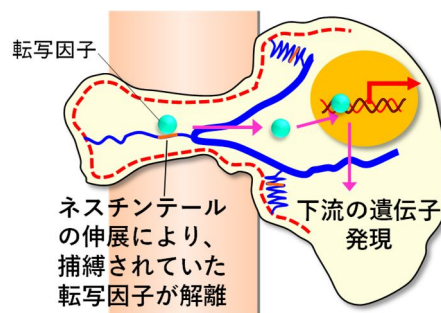


図1 ネスチンテール領域の伸展による転写モジュレーション

浸潤時に細胞の変形により大きく伸展したネスチンテール領域から転写関連因子が放出され、核内に移行する

2. 研究の目的

本研究では、ネスチンテール領域の伸展に伴う転写因子の放出と、これに続くシグナル伝達経路が存在するという仮説に基づき、ネスチンテール領域が実際に大きく伸展するのか、その機械的特性を調査することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アクチン-ネスチンテール領域の相互作用解析

基板に固定したアクチン繊維に対して、AFM探針に固定したネスチンテール領域を接触させ、これを引き離す際の結合破断力をフォースカーブから解析した。まず様々な材料に対して高い接着性を示す、*Acinetobacter* 属細菌 Tol5 由来の AtaA タンパク質を用いてガラス基板の被覆を行った。AtaA 被覆基板に対して、アクチン繊維を結合させた。基板を洗浄後、BSAによりアクチン繊維が結合していない AtaA 表面をブロッキングした。次に、シリコン製のカンチレバーに IgG 固定化バイオナノカプセル ZZ-BNC²を用いて抗 GFP 抗体を修飾し、これを經由して GFP 融合ネスチンテール領域を固定化した。ネスチンテールは、全長を四分割したうちの最も N 末端側に位置する Q1 領域と、最も C 末端側に位置する Q4 領域を使用した。基板上的アクチン繊維とネスチンテール領域固定化カンチレバーを接触させ、得られたフォースカーブからアクチン繊維と Q1 もしくは Q4 領域の結合破断力を解析した。

(2) AFMを用いたネスチンテール領域の引張試験

ガラス基板を APTES で修飾し、グルタルアルデヒドを介してローダミンファロイジン染色アクチン繊維を固定化した。次に、シリコン製の AFM 探針(バネ定数 0.04 N/m)に、シリコン表面に吸着する DOPA、非特異吸着を防止する HPA、一級アミンと反応してアミド結合を形成する NHS が 10:85:5 で重合されたポリマーを修飾した(図2)。探針表面の NHS エステルに対して NTA-アミンを反応させ、Ni 経由で N 末端に His-tag を付加したネスチンテール領域を修飾した。基板上的アクチン繊維にネスチンテール固定化探針を 1 nN の斥力がかかるまで基板に接触させ、1 μm/s で引き上げる操作を、1 回の測定において 64 点で行った。基板から引き離す際に得られたフォースカーブのうち、高分子の伸展によって得られる特徴的なピークを示すフォースカーブにおいて、線状高分子に対するモデルである Worm-like chain (WLC) モデルでフィッティングを行った。一つのピークに対し二本のフィッティング曲線が得られたカーブは、二個以上の分子を伸展していると考え、これを除いたフォースカーブにおいて結合破断力、経路長、及び持続長を算出した。

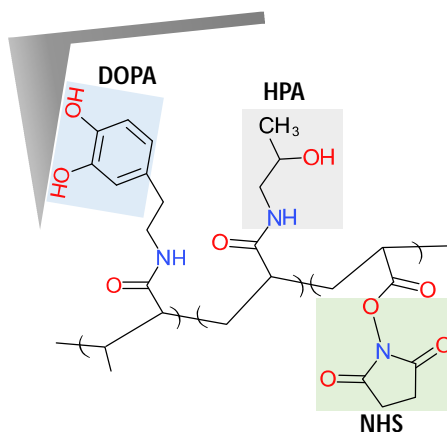


図2 AFM 探針の修飾に用いた DOPA/HPA/NHS ポリマー

(3) 抗体修飾ナノニードルを用いたネスチン - CLIC1 の相互作用解析

Alphaphold2 を用いた構造予測により、ネスチンテールに結合すると示唆されたがん浸潤関連タンパク質 CLIC1 に注目し、抗 CLIC1 抗体修飾ナノニードルを用いた力学検出により、CLIC1 とネスチンの結合を調査した。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、ZZ-BNC を用いて抗 CLIC1 抗体をナノニードル上に固定化した。測定細胞として、ネスチン及び CLIC1 を発現する高転移性マウス乳がん細胞 FO10SC2 株 (元株) 及びネガティブコントロールとして同株を用いて作製した CLIC1 ノックアウト(KO)株、ネスチン KO 株を使用した。これらに対して AFM を用いて抗 CLIC1 抗体修飾ナノニードルを 10 $\mu\text{m/s}$ で挿入し 60 秒間停留した後、10 $\mu\text{m/s}$ で引き上げることでフォースカーブを得た。抗体修飾ナノニードルを引き抜く際に、細胞骨格であるネスチンに CLIC1 が結合しており、ニードル上の抗体が CLIC1 と結合している場合には、抗 CLIC1 抗体と CLIC1 の結合を破断する、あるいは CLIC1 をネスチンから引き剥がす力 (結合破断力) が、フォースカーブ上に観察される。ネガティブコントロールである CLIC1 KO 株で得られた結合破断力の平均値 + 5SD を閾値として、元株及びネスチン KO 株で得られた結合破断力を解析した。

4. 研究成果

(1) ネスチンテール領域とアクチン繊維の結合破断力

アクチン繊維と Q1 もしくは Q4 領域の結合破断力を解析した結果、いずれの場合も繰り返し結合破断力を測定することが可能であり、抗体の脱離や、アクチン繊維の基板からの剥離はないものと推察された。Q4 領域を修飾したカンチレバーとアクチン繊維の結合破断力は、Q1 領域の結合破断力と比較して 2 倍程度大きいことが確認された (図 3)。このことから、ネスチンはテール領域の C 末端側にアクチン結合部位を持つことが示唆され、介在するタンパク質無しで、直接結合することが示された。

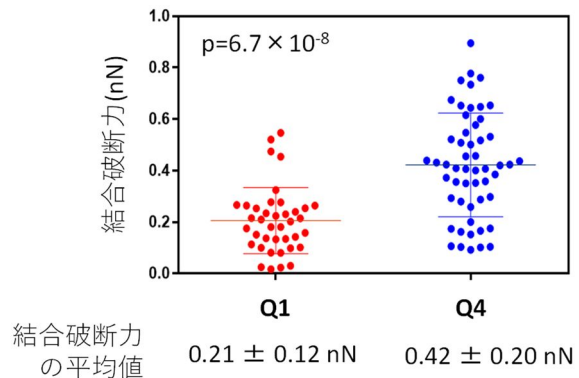
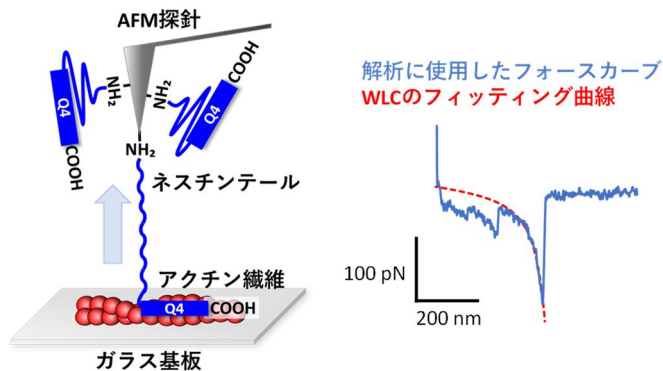


図3 ネスチンテール - アクチン繊維の結合破断力

(2) ネスチンテール領域の機械的特性

高分子の伸展によって得られる特徴的なピークを示すフォースカーブがアクチン繊維の存在する箇所得られた (図 4)。このカーブから結合破断力を算出したところ、最小値は約 80 pN であった (図 5)。His-tag と Ni-NTA 間の結合破断力は約 150 pN と報告されており³、この結合破断と区別は出来ないものの、ネスチンテール - アクチンの結合破断力は少なくとも 80 pN 以上であることが示唆された。また、WLC モデルでフィッティングし高分子鎖の長さを表す経路長を算出した結果、約 0.45 μm であった。これはネスチンテール領域の最大伸展長の約 8 割に達することから、ネスチンテールが大きく伸展可能な構造を取ることが明らかとなった。また、この平均経路長はネスチンテール 1275 残基分の長さに対応することから、ネスチンテールは 1275 残基目以降の領域でアクチンと結合することが示唆された。この結果は、



Worm-like Chain (WLC)モデル

$$f(x) = \frac{k_B T}{l_p} \left[\frac{1}{4(1-x/L)^2} + \frac{x}{L} - \frac{1}{4} \right]$$

L : 経路長
 l_p : 持続長
 k_B : ボルツマン定数
 T : 絶対温度

図4 ネスチンテール - アクチン繊維の引張試験により得られたフォースカーブと WLC モデルによるフィッティング

この結果は、四分割したネスチンテール領域の最も C 末端側のドメインがアクチン繊維と結合するという、*in vitro* 結合アッセイの結果とも一致する。さらに、分子の剛直性を表す持続長の平均値は 84 pm であった。この結果との比較のため、以前研究代表者が行った ヘリックスを形成する 30 残基のペプチドとこれを尿素で変性させたランダムコイルの引張試験で得たフォースカーブを再解析し持続長を算出した⁴。その結果、ネスチンテールの持続長の方が ヘリックス及びランダム

コイルの持続長より大きく、ある程度の構造を維持していると考えられた。一方で、過去に報告されている他のタンパク質の持続長と比較してもネスチンテールの持続長の方が小さいことから、ネスチンテール領域は非常に柔らかい分子であることが示唆された。以上より、ネスチンテール領域はC末端側でアクチンと結合し、曲がりやすく柔らかい分子、すなわち弱い力で大きく伸展する分子であることが示唆された。

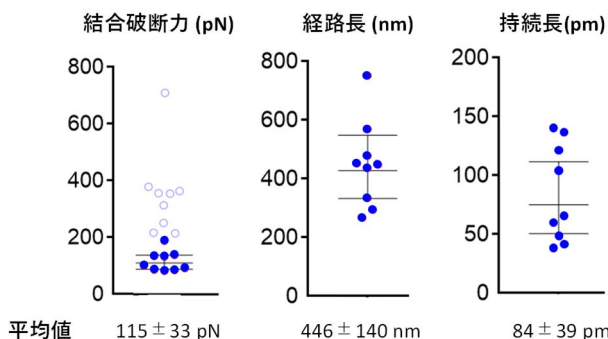


図5 ネスチンテール - アクチン繊維の引張試験により得られた結合破断力、経路長、及び持続長

(3) ネスチン - CLIC1 の相互作用

CLIC1 は構造転換により多機能性を示すメタモルフィックタンパク質であり、核移行し転写調節に関わること、がん細胞では膜貫通型の Cl⁻イオンチャネルとして発現し Cl⁻イオン排出チャネルとして機能することが報告されている。AlphaFold2 を用いたネスチンテール領域と CLIC1 の構造予測では、ネスチンテール領域のリピート配列に結合した 2 分子の CLIC1 が近接して存在していた。そこで、我々がこれまでに開発した抗体修飾ナノニードルによる細胞骨格タンパク質結合タンパク質の検出手法により⁵、ネスチンテール - CLIC1 相互作用について調査した。抗 CLIC1 抗体修飾ナノニードルを用いて CLIC1 KO 株で得られた結合破断力の平均値 + 5SD を閾値として評価を行ったところ、ネスチン KO 株では観察されない閾値を大幅に超える破断力がネスチン陽性の元株でのみ検出された(図6)。以上より、ネスチン繊維に CLIC1 が結合していることが示唆された。

CLIC1 は細胞質・細胞膜双方に局在し、細胞質で二量体化した後に細胞膜に局在するチャネル型へ移行すると考えられている。ネスチン発現細胞で CLIC1 の膜局在性が高いこと、ネスチンに CLIC1 が結合する可能性があることから、ネスチンは CLIC1 の核移行を抑制し、二量体化を促進する足場として機能することが推察される。

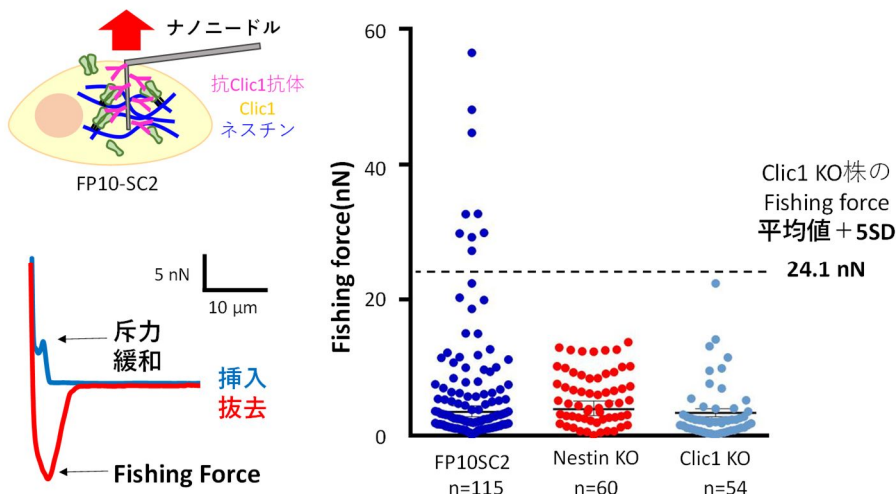


図6 抗 Clc1 抗体修飾ナノニードルの挿入・抜去により検出された細胞内における結合破断力(Fishing force)

< 引用文献 >

1. Int J Biol Sci, 15, 1546-1556, 2019
2. Biomaterials, 32, 1455-1464, 2011
3. J Mol Recognit, 20, 490-494, 2007
4. Surface Sci, 532-535, 244-248, 2003
5. 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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徳岡里奈・内田幸希・山岸彩奈・竹下大二郎・吉川千晶・山崎智彦・上田太郎・中村 史
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を用いたネスチンテール領域の機械的特性解析
3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳岡里奈・内田幸希・山岸彩奈・竹下大二郎・吉川千晶・山崎智彦・上田太郎・中村 史
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を用いたネスチンテール領域の引張特性
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳岡里奈・山岸彩奈・竹下大二郎・吉川千晶・山崎智彦・上田太郎・飯嶋益巳・黒田俊一・中村 史
2. 発表標題 抗体修飾ナノニードルを用いた ネスチン - Clic1相互作用の力学解析
3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 三元共重合体及びそれを用いた表面修飾針状物、並びにその使用方法	発明者 山岸彩奈・中村 史・山崎智彦・吉川 千晶	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-011017	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 https://unit.aist.go.jp/cmb5/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)	
研究分担者	黒田 裕 (Kuroda Yutaka) (10312240)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (12605)	
研究分担者	長崎 晃 (Nagasaki Akira) (30392640)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員 (82626)	
研究分担者	竹下 大二郎 (Takeshita Daijiro) (80613265)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員 (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
---------	---------