

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293038

研究課題名(和文) 中間径フィラメント蛋白質の時空間動態制御機構の解明

研究課題名(英文) Structure and dynamics of intermediate filament proteins

研究代表者

寺田 純雄(Terada, Sumio)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00262022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：中間径フィラメントタンパク質についてその重合・脱重合動態を制御する分子メカニズムはほとんど解明されていない。ニューロフィラメントタンパク質を中心として研究を行い、主に以下の二つの成果を得た。まず、細胞内におけるニューロフィラメントタンパク質重合体の微細形態をその場観察する為に、アンルーフィングと呼ばれる技術を適用した標本を直接原子間力顕微鏡により観察し、その微細構造を明らかにすることに成功した。二つ目は細胞骨格タンパク質の蛍光偏光顕微鏡観察に適した蛍光標識技術の開発である。独自の蛍光タンパク質変異体を使用することにより、遺伝子にコードされる形でこの種の蛍光標識が可能となることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we applied the modified 'cells on glass sandwich' method to exteriorize intracellular neurofilaments, reducing the risk of causing artefacts through sample preparation. The observed thin filaments, considered to retain native structures of the neurofilaments, exhibited an approximate periodicity of 50-60 nm along their length. Our success of semi- in situ atomic force microscopy of exposed bona fide assembled neurofilaments through separating the sandwich suggests that it can be an effective and alternative method for investigating cytoplasmic intermediate filaments under physiological conditions by atomic force microscopy. In addition, we could develop new methods to label cytoskeletal proteins for fluorescent polarization microscopic analysis.

研究分野：解剖学、細胞生物学

キーワード：細胞骨格 中間径フィラメント

### 1. 研究開始当初の背景

成熟した中枢神経系神経細胞における中間径フィラメントの主たる構成タンパク質はニューロフィラメント L (NF-L)、M (NF-M)、H (NF-H)、 インターネキシン (int) である。いずれも神経細胞特異的に発現し神経細胞の特徴的な形態形成、維持を担っている。これら神経系中間径フィラメントタンパク質についてその重合・脱重合動態を制御する分子メカニズムはほとんど解明されていない。動態制御機構について研究が進まなかった原因の一つはその極端な重合体安定性にある。生化学的に脱重合させる場合に高濃度の尿素を添加するなどの変性状態におく必要があることから、細胞内においても翻訳後直ちに重合体を形成するものとされ、動態調節因子は存在しないと考えられてきた。軸索内の NF 重合体は、細胞体で重合後、重合体が軸索輸送により輸送されてつくられるとする重合体輸送説も同様の概念に依拠している。

我々は、過去にマウス生体神経細胞内において、NF タンパク質が重合体を形成することなくサブユニット状態で輸送され得る証拠を提示した (Science 273:784-788, 1996)。また細胞骨格タンパク質や細胞質性タンパク質の神経細胞内輸送が、キネシン 1 複合体をその駆動モーターとしていることを明らかにした (Cell 103:141-155, 2000)。更に、一般的な細胞質性タンパク質輸送において、Hsc70 が細胞質性タンパク質とキネシン 1 複合体をつなぐ足場タンパク質として働いていること、キネシン 1 複合体と Hsc70 との結合の有無が、キネシン 1 複合体の細胞質性タンパク質輸送モードと膜器官輸送モードの振り分けを決めていることを解明した (EMBO J 29:843-854, 2010)。

しかしながら、他方で培養神経細胞における NF タンパク質重合体の輸送を主張するデータや重合体とサブユニットの輸送の共存を示唆するデータも提出されている。生体中の主要な輸送形態が重合体・サブユニットのどちらであるかは決着がついていなかった。

このような状況下、副腎腫瘍由来の細胞株 SW13 細胞の中間径フィラメント欠損株 SW13vim-細胞に NF-L、-M、int を組み合わせ発現させ、重合・脱重合状態を制御する系を利用し、神経系中間径フィラメントタンパク質の動態に影響を与える小分子化合物のスクリーニングを行った結果、中間径フィラメントタンパク質重合体形成を促進する複数の薬剤を発見した他、細胞骨格要素の相互関係の変調をきたす薬剤が中間径フィラメントタンパク質動態に影響を与えることを見出していた。更に、重合体形成を促進する薬剤作用下のフィラメント動態を薄層斜光照明顕微鏡で観察すると、重合体の端から重合体どうしの端端吻合が起きる他、NF-L と M の共重合ではサブユニットが既存の重合体の端に取り込まれて重合するこ

とを見出し、更に培養神経細胞では、その分化過程において、輸送形態が変化する所見を得ていた。

### 2. 研究の目的

以下の 2 項目を研究の目的とした。

- (1) 諸説あって決着のついていない生体内神経細胞内の中間径フィラメントタンパク質の動態様式を一分子レベルで明らかにする。
- (2) 神経系中間径フィラメントタンパク質の動態制御機構を分子細胞生物学的解析を駆使して解明する。

### 3. 研究の方法

以下の各項目に述べる手法に従って研究遂行を予定した。

- (1) 蛍光タンパク質標識ニューロフィラメントタンパク質発現トランスジェニックマウスを作成し、神経系中間径フィラメントタンパク質動態の生体内観測を、薄層斜光照明顕微鏡もしくは蛍光偏光顕微鏡により、一分子レベルかそれに近い分解能で実施する。また培養細胞中の神経系中間径フィラメントタンパク質の重合過程を超解像原子間力顕微鏡によりナノメートルオーダーで観察、明らかにする。
- (2) 中間径フィラメントタンパク質を欠損する出芽酵母をモデル系とし、神経系中間径フィラメントタンパク質動態を調節する因子群の探索を試み、同時に生育温度の重合に与える影響について検討する。
- (3) 神経系中間径フィラメントタンパク質動態と脂質代謝・他の細胞骨格系との相互関連について、ケミカルスクリーニングにより得られている結果を援用しつつ、質量分析、タイムラプス観察など細胞生物学的、遺伝学的手法により探索する。

### 4. 研究成果

主な成果は二つである。

一つ目は原子間力顕微鏡による成果である。細胞内における NF タンパク質重合体の微細形態をその場観察する為に、アンルーピングと呼ばれる技術を適用した標本を直接原子間力顕微鏡により観察し、その微細構造を明らかにすることに成功した (参考文献)。in vitro で再構成したのではなく、実際に細胞内で重合した NF の形態をナノメートルレベルに近い空間分解能で観察する糸口となる成果である。成果は英文誌、学会にて発表し、反響を呼んでいる (後述の論文発表、学会発表)。

二つ目は蛍光偏光顕微鏡観察に適した蛍光標識技術の開発である。当初、項目 3 研究方法の (1) で述べたように、蛍光偏光顕微鏡観察のためのトランスジェニックマウス作成を目指し、相互に立体的位置関係が固定された状態で NF タンパク質を蛍光タンパク

質で標識することを試みた。しかしながら事前の検討で得られた条件では標識 NF タンパク質は他の中間径フィラメントタンパク質と共重合はするものの、更に詳細な解析によって、生理的な重合能が十分に保持されていないことが判明した。標識条件を検討する等、さまざまな試行錯誤の結果標識法の確立には新規技術の開発が必要なことが明らかとなったため、トランスジェニックマウス作成をいったん中止し、標識技術の開発に方針を転換した。

蛍光偏光顕微鏡による観察に使用するためには、蛍光タンパク質により被標識タンパク質を「固く」かつその機能を阻害しないように融合させる必要がある。これまで蛍光偏光観測のためのユニバーサルな標識手法は知られていなかったが、独自の蛍光タンパク質変異体を使用することにより、遺伝子にコードされる形でこの種の蛍光標識が可能となることが明らかとなった。テストケースとしてアクチンを対象に標識を行い、細胞中で1分子計測に成功した(米国ウッズホール海洋生物学研究所・谷知己研究員の協力による)。成果の一部は国内学会にて発表した(後述の学会発表)。この標識法は極めて汎用性の高い基盤技術であり、国内外において類をみないものである。顕微鏡観察に限らず広く蛍光偏光を利用した観測法への展開の糸口となるもので、ウッズホール海洋生物学研究所の研究者を初めとして共同研究を開始する端緒となった。

その他の項目については、酵母遺伝学の実験で成果が得られつつある。出芽酵母に適切な条件下で中間径フィラメントタンパク質遺伝子を各種導入し、重合・脱重合動態と生育への影響をみたところ、試行錯誤の上、中間径フィラメントタンパク質発現に伴い、生育の抑制する株の分離に成功している。現在これを指標として生育相補スクリーニングを行い、中間径フィラメントタンパク質動態調節に関わる因子群の探索を行っている。

質量分析、ケミカルスクリーニング関連等の実験からは現状では特筆すべき成果は得られていない。

<引用文献>

Fumiya SATO, Hitoshi ASAKAWA, Takeshi FUKUMA, Sumio TERADA Semi-in situ atomic force microscopy imaging of intracellular neurofilaments under physiological conditions through the 'sandwich' method Microscopy (Oxford)、査読有、65 巻、2016 、 316 - 324 、 DOI:10.1093/jmicro/dfw006

##### 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 3件)

Fumiya SATO, Hitoshi ASAKAWA, Takeshi FUKUMA, Sumio TERADA Semi-in situ atomic force microscopy imaging of intracellular neurofilaments under physiological conditions through the 'sandwich' method

Microscopy (Oxford)、査読有、65 巻、2016 、 316 - 324 、 DOI:10.1093/jmicro/dfw006

佐藤啓介、寺田純雄 MAP2、脳科学辞典、査読有、2014、DOI:10.14931/bsd.4347.

佐藤啓介、寺田純雄微小管、脳科学辞典、査読有、2014、DOI:10.14931/bsd.4389.

[学会発表](計 5件)

佐藤文哉、谷知己、寺田純雄、PANDIA: a novel marker for fluorescence polarization microscopy of actin dynamics in living cells、第122回日本解剖学会全国学術集会、2017年3月28日~30日、長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市)

TERADA Sumio、Cytoskeletal dynamics in neurons and beyond、Seminar Soochow University CAM-SU GRC (Cambridge-Soochow Genomic Resource Center) China (招待講演)(国際学会)、2016年1月4日、Soochow (China)

Terada Sumio、Close-up pictures of cytoskeletal dynamics in neurons、The 7<sup>th</sup> Asia Pacific International Congress of Anatomists (招待講演)(国際学会)、2016年3月18日、Singapore (Singapore)

佐藤文哉、浅川雅、福間剛土、寺田純雄、Semi-in situ atomic force microscopy imaging of intracellular neurofilaments under physiological conditions through the 'sandwich' method、第121回日本解剖学会全国学術集会、2016年3月28日~30日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

佐藤文哉、浅川雅、福間剛土、寺田純雄、Semi-in situ atomic force microscopy imaging of intracellular neurofilaments under physiological conditions through the 'sandwich' method、第39回日本神経科学大会、2016年7月20日~22日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]  
該当なし

[その他]  
ホームページ等  
該当なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺田 純雄 (TERADA Sumio)  
東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究  
科・教授  
研究者番号：00262022

(2)研究分担者

川岸 将彦 (KAWAGISHI Masahiko)  
東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究  
科・助教  
研究者番号：60323606

齊藤 健太 (SAITO Kenta)  
東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究  
科・助教  
研究者番号：60374659

佐藤 啓介 (SATO Keisuke)  
東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究  
科・助教  
研究者番号：60644044

(3)連携研究者

福間 剛士 (FUKUMA Takeshi)  
金沢大学・理工学部・教授  
研究者番号：90452094

上杉 志成 (UESUGI Motonari)  
京都大学・物質 - 細胞統合システム拠点・  
教授  
研究者番号：10402926

(4)研究協力者

谷 知己 (TANI Tomomi)  
米国ウッズホール海洋生物学研究所・  
研究員

佐藤 文哉 (SATO Fumiya)  
東京医科歯科大学大学院・  
医歯学総合研究科・大学院学生

田口 美恵 (TAGUCHI Mie)  
東京医科歯科大学大学院・  
医歯学総合研究科・医療技術職員

湯浅 磨里 (YUASA Mari)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・  
特任助教

笠間 健嗣 (KASAMA Kenji)  
東京医科歯科大学・  
医歯学研究支援センター・准教授

幸田 尚 (KOHDA Takashi)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・  
准教授