

原子間力顕微鏡を用いた引張試験によるネスチンテール領域の機械的特性解析

○徳岡里奈¹・内田幸希¹・山岸彩奈^{1,2}・竹下大二郎³・中村史^{1,2} (1農工大院工、
2産総研細胞分子工学、3産総研バイオメディカル)

Analysis of mechanical property for nestin tail domain by tensile testing using AFM. (Graduate School of Engineering, Tokyo Univ. Agric. Technol.¹, Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST², Biomed. Res. Inst., AIST³)
TOKUOKA, Rina¹; UCHIDA, Koki¹; YAMAGISHI, Ayana^{1,2}; TAKESHITA, Daijiro³; NAKAMURA, Chikashi^{1,2}

細胞内部では、アクチンフィラメント、微小管、中間径フィラメント(IF)が相互に結合し、3次元的なネットワーク構造を形成することで、細胞形態の維持に重要な役割を担っている。このうち IF は、N 末端側からヘッド、ロッド、テールの 3 領域から成るタンパク質で構成されており、細胞の弾性維持に寄与している。IF の一種であるネスチンは、高転移性のがん細胞に高発現であることが報告されている。ネスチンは 170 kDa もの巨大なテール領域がその大きな特徴であるが、その詳細な機能は不明であった。これまでに、N 末端側に His-tag を融合したネスチンテール領域を Ni-NTA 経由で AFM 探針に修飾し、C 末端側を基板上的アクチン繊維に相互作用させ引張試験を行ったところ、ネスチンはテール領域の C 末端側でアクチンに結合し、弱い力で大きく伸展可能な構造を取ることが示唆された。しかし、この引張試験ではネスチンテールが伸びきる前に、Ni-NTA と His-tag 間の結合、またはネスチンテール領域とアクチン間の相互作用が解離している可能性が示唆された。そこで本研究では、SpyTag / SpyCatcher と SnoopTag / SnoopCatcher を用いてネスチンテール領域を固定化し引張試験を行うことで、ネスチンテール領域の機械的特性を調査することを目的とした(図 1)。

ガラス基板を MPTMS で修飾し、EMCS を介して SnoopCatcher を固定化した。SnoopCatcher 修飾基板に対して N 末端側に SpyTag、C 末端側に SnoopTag を融合したネスチンテール領域を反応させることで基板上にネスチンテール領域の C 末端側を固定化した。一方で、Au-S 結合によって金コート AFM 探針に Cys-SpyCatcher を固定し、引張試験に使用した。基板上的ネスチンテール領域に SpyCatcher 修飾カンチレバーを接触させ、基板から引き離す際のフォースカーブを解析したところ、タンパク質の伸展を示す特徴的なフォースカーブが得られた。このフォースカーブの結合破断力はアクチン繊維を用いた引張試験よりも大きな値が得られており、共有結合で修飾されていることが示唆された。また、このフォースカーブを Worm-like chain model 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、アクチン繊維を用いた引張試験と同程度であることが分かった。これより、アクチン繊維とネスチンテール領域の相互作用は、ネスチンテール領域が大きく伸展するために十分な強度であることが示唆された。ネスチンテールには転写関連因子が結合することから、がん細胞の浸潤に伴う細胞変形によって伸展した同領域から転写関連因子が解離し、下流のシグナル伝達経路を制御する機構が存在すると推察している。

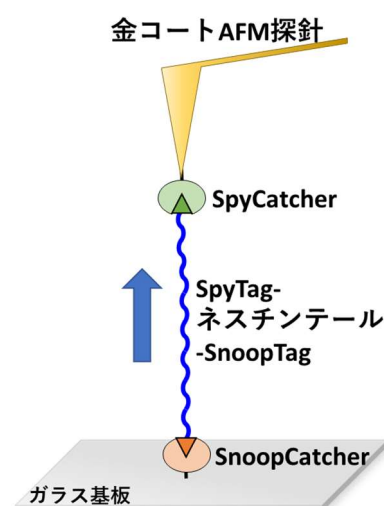


図1 共有結合で固定したネスチンテール領域の引張試験