

中間径フィラメントネスチンのテール領域伸展が誘起するテール結合タンパク質の解離

(産総研細胞分子工学¹・農工大院工²・東農大応生科³・阪大産研⁴) ○山岸彩奈^{1,2}・徳岡里奈^{1,2}・飯嶋益巳³・黒田俊一⁴・中村 史^{1,2}

Release of Tail-binding Proteins Induced by Stretch of Intermediate Filament Nestin (¹*Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST*, ²*Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.*, ³*Dept. Nutr. Sci. & Food Safety, Tokyo Univ. Agric.* ⁴*SANKEN, Osaka Univ.*) ○Ayana Yamagishi,^{1,2} Rina Tokuoka,^{1,2} Masumi Iijima,³ Shun'ichi Kuroda,⁴ Chikashi Nakamura^{1,2}

Intermediate filament nestin has been reported to be highly expressed in highly invasive cancer cells, but the function of the huge 170 kDa tail domain, which is exposed outside the nestin filament, is unclear. We have shown that the C-terminus of the tail domain binds to actin filaments, and that the domain contributes to the metastatic ability of cancer cells by making them flexible through its large extensibility. We further hypothesized that the stretched tail domain has a spring-like function to restore the cytoskeleton. We have demonstrated the existence of a repeating stretching structure in the single tail domain by analysis using AFM. On the other hand, the tail domain has been reported to serve as a scaffold for binding proteins. If the tail domain is stretched by an external force, the bound proteins may be dissociated and released. We first focused on the chloride ion channel CLIC1, which regulates cell volume by exporting the ions, and found a strong correlation between CLIC1 and nestin expression. Alpha Fold2 analysis suggested that CLIC1 also binds to the tail domain. Fishing force measurement, in which anti-CLIC1 antibody-modified nanoneedles were inserted in cell to mechanically detect CLIC1, showed that CLIC1 binds to nestin. We are now confirming whether CLIC1 dissociation occurs when the tail domain is stretched by external force applied to the cell.

Keywords : *Intermediate filament; Nestin; Atomic force microscope*

中間径フィラメントのネスチンは、高浸潤性のがん細胞に高発現であることが報告されているが、ネスチン繊維本体から外部に露出している 170 kDa もの巨大なテール領域がどのような機能を持つのか不明であった。我々はテール領域の C 末端側が細胞表層のアクチン繊維に結合しており、弱い力で大きく伸展する構造を持つことで細胞を柔軟化し、がんの転移能に寄与することを明らかにしてきた。さらに、伸展したテール領域が自発的に収縮するすなわち骨格を復元するバネ様の機能を有すると考えた。我々は AFM を用い 1 分子のテール領域を繰り返し伸展する解析により、伸展-収縮を繰り返す構造が存在することを証明した。一方このテール領域は、様々なタンパク質を結合する足場となることが報告されている。外力によりテール領域が伸展するならば、これにより結合タンパク質は解離すると考えられる。まず我々は、塩化物イオンを排出し細胞の容積を調節するイオンチャネル CLIC1 に注目した。CLIC1 はネスチンとの強い発現相関が認められ、Alpha Fold2 解析によりテール領域との結合も示唆された。抗 CLIC1 抗体修飾ナノニードルを細胞内に挿入し、CLIC1 を力学的に検出する Fishing force 測定を行った結果、CLIC1 とネスチンの結合が示された。細胞への外力印加刺激によりテール領域を伸展することで、CLIC1 解離が生じるかどうか現在確認している。