

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

Analysis of mechanical properties of nestin tail domain by AFM

東京農工大工¹, 東京農工大院工², 産総研細胞分子工学³, 産総研バイオメディカル⁴,
物材研機能性材料⁵, 早大院先進理工⁶ ○(B)徳岡 里奈¹, 内田 幸希², 山岸 彩奈^{2,3},
竹下 大二郎⁴, 吉川 千晶⁵, 山崎 智彦⁵, 上田 太郎⁶, 中村 史^{1,2,3}

Fac. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.¹, Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.², Cell. Mol.
Biotech. Res. Inst., AIST³, Biomed. Res. Inst., AIST⁴, Res. Cent. Funct. Mater., NIMS⁵,
Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.⁶, ○(B)Rina Tokuoka¹, Koki Uchida², Ayana Yamagishi^{2,3},
Daijiro Takeshita⁴, Chiaki Yoshikawa⁵, Tomohiko Yamazaki⁵, Taro Q. P. Uyeda⁶,

Chikashi Nakamura^{1,2,3}

E-mail: chikashi-nakamura@aist.go.jp

中間径フィラメントの一種であるネスチンは、神経系幹細胞のマーカーとして知られるが、高転移性のがん細胞で高発現であることに近年注目が集まっている。産総研で樹立された高転移性マウス乳がん細胞株もネスチン高発現であり、ビメンチンと共重合繊維を形成している。中間径フィラメントはN末端側からヘッド、ロッド、テールの3領域で構成されているが、ビメンチンはテール領域で細胞表層のアクチン繊維と直接結合し、細胞骨格のネットワークを形成することが知られている。一方ネスチンは170 kDaもの巨大なテール領域がその大きな特徴であるが、その機能はほとんど明らかになっていなかった。これまで我々はネスチンテール領域がビメンチン-アクチン間の結合を阻害することで細胞を柔軟化することを明らかにした。またその一方で、ネスチン自身もテール領域のC末端側でアクチンに結合することを見出している。C末端側でアクチンに結合し、弱い力でネスチンテール領域が大きく伸展するならば、その可動性の高い細胞骨格は細胞弾性の低下すなわち細胞柔軟化に寄与するものと推察される。そこで本研究では、原子間力顕微鏡のカンチレバーに修飾したネスチンテール領域を基板上のアクチン繊維に結合させ、引張試験を行うことで、同テール領域の機械的特性を調査することを目的とした。

ガラス基板をAPTESで修飾し、グルタルアルデヒドを介してアクチン繊維を固定化した。一方AFM探針(バネ定数0.04 N/m)はNTA-アミンを修飾し、N末端にHis-tagを付加したネスチンテール領域をNi-NTA経由で固定化した。基板上のアクチン繊維にネスチンテール固定化探針を接触させ、基板から引き離す際のフォースカーブを解析した結果、アクチン繊維が固定化された箇所ですべて特異的に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。得られたフォースカーブの結合破断力の最小値は約100 pNであり、His-tag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100 pN以上であることが示された。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経路長を算出した結果、およそ0.4 μmであり、ネスチンテール領域の最大伸展長の7割に達することが分かった。この結果は、アクチンとの結合によりネスチンテール領域が大きく伸展するという我々の仮説を支持するものである。