

アクチン相互作用部位を欠失した中間径フィラメントの繊維構造解析

(農工大院工¹・産総研細胞分子工学²) ○内田 幸希¹・山岸 彩奈^{1,2}・中村 史^{1,2}
(¹Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST) ○Koki Uchida,¹ Ayana Yamagishi,^{1,2} Chikashi Nakamura^{1,2}

Nestin, a type of intermediate filament (IF), is known as a marker for neural stem cells, but has recently attracted attention due to its high expression in highly metastatic cancer cells. IFs consist of three regions, head, rod, and tail, from the N-terminal side. Because nestin has a large 170 kDa tail region, it cannot form filament structure by itself. In the highly metastatic mouse breast cancer cells, the same IF is copolymerized with vimentin, a marker for mesenchymal cells. We have previously shown that vimentin and nestin each bind to actin filaments below the plasma membrane in the tail domain. By binding to actin, vimentin and nestin are thought to localize throughout the cytoplasm, but the details of the binding mode have not been clarified.

Therefore, we performed complementation studies on vimentin-knockout mouse breast cancer cells using a plasmid expressing vimentin partially lacking the tail region. The results showed that vimentin lacking the C-terminal 17 residues was not able to form filament. In addition, when the binding sites between vimentin and actin were observed by proximity ligation assay, the binding sites were significantly reduced in the cell expressing vimentin with the deletion of the C-terminal 17 residues. These results suggest that the actin-vimentin interaction site is located at the C-terminal 17 residues of vimentin. We are currently working on a plasmid that expresses nestin with a partial deletion of the tail region, and we will also report the results of complementation studies using this plasmid.

Keywords : *Intermediate filament; Actin; Vimentin; Nestin; Protein-protein interaction*

中間径フィラメントの一種であるネスチンは、神経幹細胞のマーカーとして知られているが、近年高転移性のがん細胞で高発現であることから注目されている。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領域で構成されており、ネスチンは170 kDaの巨大なテール領域を持つことから単独では繊維形成できず、我々が使用する高転移性マウス乳がん細胞では同じ中間径フィラメントで間葉系細胞のマーカーであるビメンチンと共重合している。これまでに我々はビメンチン及びネスチンがそれぞれテール領域で細胞膜直下のアクチンフィラメントと結合することを明らかにしてきた。アクチンと結合することで、ビメンチン・ネスチンは細胞質全体に展開していると考えられるが、その結合様式の詳細は未だ明らかになっていない。

そこで我々は、テール領域の一部を欠失したビメンチンを発現するプラスミドを作製し、これを用いてビメンチン欠損マウス乳がん細胞に対する相補試験を行った。その結果、テール領域のC末端17残基を欠失したビメンチンは細胞質に繊維展開できず、凝集することが確認された。さらに近接ライゲーションアッセイによりビメンチン-アクチン間の結合点を観察したところ、ビメンチン全長を発現させた細胞と比較して、C末端17残基を欠失したビメンチンにおいて有意に結合点が減少した。以上より、アクチン-ビメンチン間相互作用部位はビメンチンC末端17残基に存在すると考えられた。現在、テール領域の一部を欠失したネスチン発現プラスミドを用いた相補試験も行っており、その結果も併せて報告する。