



## 2021年度助成 研究 終了 報告書

※ゴシック文字で記入下さい。

研究テーマ	動的分子足場を用いたメカノセンサータンパク質の機械特性イメージング
研究の結果	<p><b>[2021年9月～12月] メカノセンサータンパク質のアクチン線維への固定①:</b> メカノセンサータンパク質(カドヘリン)にモノマーstreptavidin (mSA2)を融合することで、ビオチン化アクチン線維と結合させることを検討した。ビオチン化アクチン線維の再構成には成功したが、カドヘリンとmSA2の融合タンパク質では、カドヘリンの機能的活性(カドヘリン同士が結合する活性)が消失することを確認した。そこで、カドヘリンとmSA2が適切な3次構造を保持し得るか検証するために、タンパク質の構造予測プログラムである、AlphaFold2 (AF2)を利用した結果、カドヘリンとmSA2の結合領域で立体障害が生じている可能性が示唆された。AF2で予測された立体障害を排除するために、カドヘリンとmSA2の境界に、フレキシブルリンカーとして知られるGGGGSのアミノ酸配列を3回繰り返した配列を導入した結果、カドヘリンの結合活性を保持した分子を作製することに成功した。</p> <p><b>[2022年1月～8月] メカノセンサータンパク質のアクチン線維への固定②:</b> 上記の検討で作製した、mSA2融合カドヘリンをビオチン化アクチン線維に固定して、高速AFMで観察した結果、現時点で原因は不明であるが、カドヘリンとアクチン線維が結合しないことがわかった。2者の分子間の結合界面で立体障害が生じている可能性を考慮し、ビオチン化したカドヘリン結合抗体と、streptavidinの2種類の分子を用いて、カドヘリンとビオチン化アクチン線維を繋ぐことが出来ないか、検討を続けている。</p> <p><b>[2021年12月～2022年8月] 学会発表と論文投稿:</b> mSA2融合カドヘリンの作製と並行して、カドヘリンの構造変換に影響を与える変異体を網羅的に作製し、高速AFMで観察した結果、アクチン線維の動的足場がない状態で結合構造を頻繁に変換する変異体を発見した。本発見を元に5件の学会・シンポジウム発表、1件の論文投稿を行い、論文に関してはPNAS誌に受理された(実績を参照)。カドヘリンとアクチン線維を用いたイメージング方法の開発についても、本助成の支援で得た実験結果を元に、引き続き検討を続ける予定である。</p>
研究発表 (実績)	<p><b>原著論文</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <u>Nishiguchi, S, Furuta, S, Uchihashi, T.</u> (2022). Multiple dimeric structures and strand-swap dimerization of E-cadherin in solution visualized by high-speed atomic force microscopy. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.</i>, 原著論文(査読有)</li> </ol> <p><b>受賞</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>2. <u>西口茂孝.</u> 最優秀発表賞, 動的ダイマーを介した細胞間接着分子の多段階結合過程, 令和3年度生物物理学会中部支部講演会, 2022年3月</li> </ol> <p><b>招待講演</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3. <u>西口茂孝.</u> 高速原子間力顕微鏡で明らかになった細胞間接着分子 E-cadherin のダイマー形成過程, 第4回 ExCELLS セミナー, 2022年3月8日</li> <li>4. <u>西口茂孝.</u> 高速 AFM による細胞間接着分子のダイマー形成メカニズムの解析, 第2回発動分子科学研究会, 2021年12月1日</li> </ol> <p><b>学会・シンポジウム発表</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>5. <u>Nishiguchi, S, Furuta, S, Uchihashi, T.</u> Strand-swap dimerization through dynamic interactions of E-cadherin in solution visualized by high-speed atomic force microscopy, 発動分子科学 第十回 領域会議, 2022年5月30日</li> <li>6. <u>西口茂孝, 内橋貴之, 笠井倫志,</u> 高速原子間力顕微鏡で明らかになったクラシカルカドヘリンと Celsr カドヘリンのトランス結合モードの多様性, 第4回 ExCELLS シンポジウム, 2021年12月20日</li> </ol>

提出期限: 研究期間終了後、すみやかに助成金の「必要経費使途明細書」「領収書」と合わせて提出下さい。  
年度をまたぐ場合は毎年3月末日までに、途中経過をご記入の上、報告願います。