

液-液相分離と神経変性疾患の動的構造基盤

徳島大学 先端酵素学研究所 分子生命科学分野
齋尾 智英

1. 研究背景・目的

超高齢化社会を迎える我が国においては、加齢に伴ってリスクが上昇する神経疾患に対する治療法・予防法の確立による健康長寿社会の実現が急務である。近年、筋や中枢神経系などの多くの臓器にタンパク質凝集体を呈する多系統蛋白質症 (MSP) と呼ばれる疾患概念が提唱された。さらに、MSPの原因となるタンパク質凝集体やアミロイド線維が、液-液相分離 (liquid-liquid phase separation: LLPS) の制御破綻によって引き起こされることが明らかになり、神経変性疾患の研究分野に新展開をもたらした。

LLPSの多くが、アミノ酸組成が数種類に偏った低複雑性 (low-complexity: LC) ドメインを持つタンパク質によって駆動される。LCドメインは、比較的弱く流動的な相互作用によって自己集合することでLLPS液滴を形成し、細胞内夾雑環境において特定の分子を集めるという機能的意義があると考えられ、シグナル伝達や遺伝子発現制御、ストレス応答における翻訳制御など、様々な生命イベントに関与することが知られている。LCドメインによるLLPSは、LCドメインの集合・離散が制御され、そのバランスが適切に維持されることによって正常に機能する (Fig. 1)。しかし、LLPS液滴内部はタンパク質が高濃度の状態であるため、凝集のリスクが高い状態にあり、LLPS制御破綻はタンパク質凝集体やアミロイド線維形成の原因となり、神経変性疾患発症とも関連が深いと考えられている。そのため、LCタンパク質のLLPSやその制御破綻は、神経変性疾患の治療法・予防法開発のための新たな作用点として期待を集めている。しかし、LLPS制御については不明な点も多く、特に分子レベルでのメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。神経変性疾患の治療法・予防法の開発のためにも、LLPS制御の分子メカニズム解明が求められている。

そこで本研究では、LLPSの制御因子として機能する「相分離シャペロン」に注目した研究によって、LLPS制御および制御破綻の分子メカニズムを解明することを目指した。具体的には、核磁気共鳴 (NMR) 法を主体とした構造生物学研究、および構造生物学的知見を基盤としたツール開発に取り組んだ。

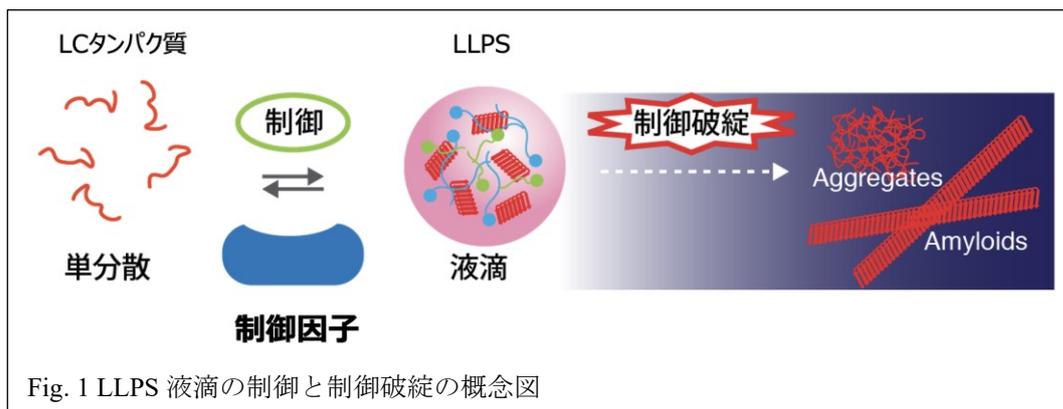


Fig. 1 LLPS 液滴の制御と制御破綻の概念図

2. 方法

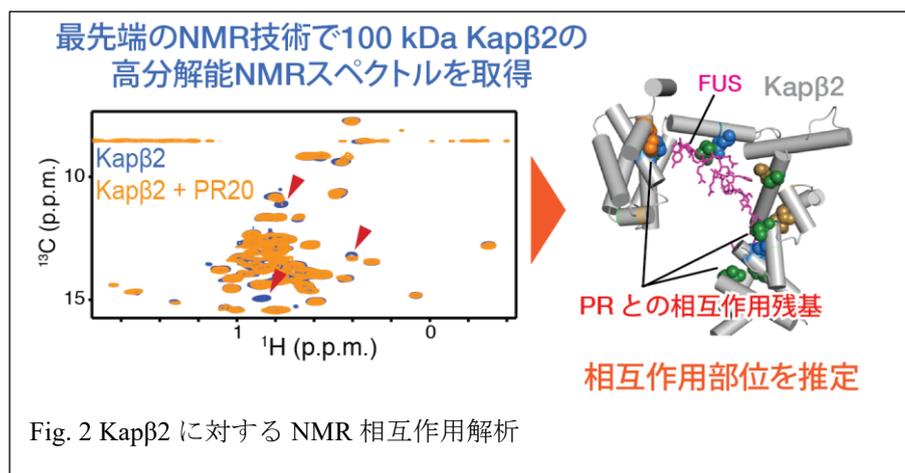
本研究では複数の相分離シャペロンを対象とした研究に取り組んだが、その主要なターゲットの一つはKapβ2である。Kapβ2は核輸送因子としても機能するが、近年fused in sarcoma (FUS) などのLCタンパク質の相分離シャペロンとしての機能も有することが明らかにされた因子である (Yoshizawa et al. 2018 Cell)。本研究では、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に関連する変異であるC9orf72挿入配列から産生される (Pro-Arg)_n などのジペプチドリピート (DPR) とKapβ2の相互作用を調べることによって、DPRによるKapβ2の機能阻害のメカニズムを明らかにする

ことを目指した。分子間の相互作用をアミノ酸残基レベルの分解能で評価するために、NMR法を用いた。ここでは、大腸菌発現系を用いて安定同位体標識されたタンパク質試料を調製した。NMR滴定実験によって、制御因子とLCタンパク質または制御破綻因子の相互作用を検証した。Kap β 2は100 kDa程度のサイズであり、NMRの観測対象としては高分子量である。そこで本研究では、メチル選択的標識やメチルTROSYなどの手法を用いることによって、Kap β 2について高分解能NMRスペクトルを取得することを可能にした。

3. 結果

ALS関連因子DPRによる相分離シャペロンKap β 2の機能障害のメカニズムを明らかにするために、DPRとして(Pro-Arg)₂₀を用い、NMRによる相互作用解析を行なった。安定同位体標識したKap β 2のNMR信号を観測し、DPR添加前後での信号摂動を評価した (Fig. 2)。その結果、DPRの添加によって、複数の信号に摂動が観測され、DPRがKap β 2の特定の領域に結合することが示された。

一方で、対照実験として、結晶構造解析によってKap β 2上の結合部位が明らかにされているペプチド阻害剤を加えた時の信号摂動と比較したところ、DPRによる摂動とペプチド阻害剤による摂動は、一部の信号において共通していることが明らか



になった。ペプチド阻害剤は、Kap β 2の核移行シグナル (NLS) 結合部位に結合することから、本研究のNMRの結果は、DPRがKap β 2のNLS結合サイトを部分的に占拠するということを示していると解釈された。NLS結合サイトへのDPRの結合は、分子動力学 (MD) シミュレーションによっても支持された。Kap β 2のNLS結合サイトは負電荷を持ったキャビティとなっていることから、DPRが持つArg残基との電荷の相互作用も重要であることが示唆された。この結果は、複数種類あるDPRの中でもArg残基を持つものが特にKap β 2の阻害活性が高いことも整合性が高い。Kap β 2による相分離制御においては、FUSなどのLCタンパク質が持つNLSの認識が重要であることから (Yoshizawa et al. 2018 *Cell*), NMRを用いた相互作用解析によって、NLS結合部位へのDPRの結合がKap β 2とFUSの結合を阻害する、というメカニズムが明らかになった (*Nat. Commun.* 2021)。

本研究では、Kap β 2だけではなく複数の相分離シャペロンについても対象とした。相分離制御についてはまだ未解明な点も多く、今後さらに多くの制御因子が明らかになると期待される。相分離シャペロンとして2018年に発表されたKap β 2 (Yoshizawa et al. 2018 *Cell*) は、以前より核輸送因子として認知されていた。今後もこのように、もともと異なる機能的側面について研究されてきた因子が、相分離制御という機能的二面性を持つ場合も多いと予想される。

さらに本研究では、相分離制御因子の構造情報を基盤とした、相分離操作ツールの開発についても推進した。具体的には、相分離制御因子の活性を任意に操作することによって相分離の形成と解除を任意に操作することを目指した。現在論文発表に向けて準備を進めているところである。

4. まとめ

本研究では、神経変性疾患の治療法・予防法開発のための新たな作用点として期待を集めるLLPSに着目し、特に相分離制御因子についての構造生物学研究に取り組んだ。中でも、FUSなどのLCタンパク質の相分離制御を担うKap β 2についてのNMRを主体とした研究から、ALS関連の毒性因子であるDPRによってKap β 2の機能が阻害されるメカニズムを明らかにした。そればかりではなく、他の相分離シャペロンを対象としたメカニズム解明、さらに構造情報に基づいたツール開発なども含め、多角的に研究を推進した。

また、著者は、研究課題採択時には北海道大学大学院理学研究院の所属であったが、本研究プロジェクト期間中に現職である徳島大学先端酵素学研究所に異動し、PIとして新たに研究室を立ち上げた。研究キャリアの変革期において本研究助成をいただけたことは大変な励みとなり、また研究装置の移設や、新研究室での研究環境の構築においても大きな支援となった。厚く御礼申し上げます。

5. 参考文献

C9orf72-derived arginine-rich poly-dipeptides impede phase modifiers.

Nanaura H, Kawamukai H, Fujiwara A, Uehara T, Aiba Y, Nakanishi M, Shiota T, Hibino M, Wiriyasermkul P, Kikuchi S, Nagata R, Matsubayashi M, Shinkai Y, Niwa T, Mannen T, Morikawa N, Iguchi N, Kiriyama T, Morishima K, Inoue R, Sugiyama M, Oda T, Kodera N, Toma-Fukai S, Sato M, Taguchi H, Nagamori S, Shoji O, Ishimori K, Matsumura H, Sugie K, ***Saio T**, *Yoshizawa T, *Mori E.

Nat. Commun. 2021 Sep 6;12(1):5301. doi: 10.1038/s41467-021-25560-0.

Zinc-Dependent Oligomerization of *Thermus thermophilus* Trigger Factor Chaperone.

Zhu H, Matsusaki M, Sugawara T, *Ishimori K, ***Saio T**.

Biology (Basel). 2021 Oct 26;10(11):1106. doi: 10.3390/biology10111106.

Conformational ensemble of a multidomain protein explored by Gd³⁺ electron paramagnetic resonance.

***Saio T**, Hiramatsu S, Asada M, Nakagawa H, Shimizu K, Kumeta H, Nakamura T, *Ishimori K.

Biophys. J. 2021 Aug 3;120(15):2943-2951. doi: 10.1016/j.bpj.2021.06.033.

Biological phase separation: cell biology meets biophysics.

Yoshizawa T, Nozawa RS, Jia TZ, **Saio T**, *Mori E.

Biophys. Rev. 2020 Apr;12(2):519-539. doi: 10.1007/s12551-020-00680-x. Epub 2020 Mar 18.

[Review]

Structural and Kinetic Views of Molecular Chaperones in Multidomain Protein Folding.

Kawagoe S, Ishimori K, ***Saio T**.

Int. J. Mol. Sci. 2022 Feb 24;23(5):2485. doi: 10.3390/ijms23052485.

[Review]