



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Regulation and Disruption of Molecular Assembly in Intrinsically Disordered Protein by Molecular Chaperon [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	川向, ほの香
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第15861号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92262
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KAWAMUKAI_Honoka_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (理学) 氏名 川向 ほの香

学位論文題名

Regulation and Disruption of Molecular Assembly in Intrinsically Disordered Protein by Molecular Chaperon

(分子シャペロンによる天然変性タンパク質の分子集合制御メカニズムとその破綻)

第一章では本学位論文において、難治性神経変性疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因タンパク質 Fused in sarcoma (FUS) に対する液滴形成制御機構に着目した理由とその背景が述べられている。FUS は数種類までのアミノ酸が繰り返し頻出し、特定の構造をとらない柔軟な領域である低複雑性配列を有することから、天然変性タンパク質とよばれている。この低複雑性領域を介して分子間に π - π 、カチオン- π 、疎水性、さらには静電的相互作用が働くことで FUS は自己会合し、その結果、溶媒を排除して液滴を形成することにより、RNA の転写やスプライシングなどの RNA 代謝活性を示す。この FUS の自己会合が過剰に進行すると、ALS 疾患で観察される FUS の凝集体が形成されることから、分子シャペロンである Karyopherin β 2 (Kap β 2) が FUS と相互作用し、その自己会合を阻害することで、液滴形成を抑制すると考えられる。このような Kap β 2 の機能阻害は ALS 発症原因としても想定されているものの、その分子機構解明の基盤となる構造化学的知見は十分得られてはいない。本学位論文では、第二章、三章で Kap β 2 の FUS 液滴形成制御機能を阻害する分子との相互作用解析を行い、第四章では、その相互作用により液滴内部の分子にどのような構造的変化が誘起されるのか、新たな方法論の開発とその応用について検討することで、FUS の液滴形成を制御する分子機構の解明を目指している。

FUS の過剰な自己会合が進行する ALS において、ALS 関連遺伝子中のリピート配列が異常伸長した Pro-Arg ポリジペプチド (PRn) が産生されることから、第二章では、この PRn が Kap β 2 と相互作用することで、FUS の液滴制御機能を阻害すると想定して、Kap β 2 と PRn との相互作用部位の同定を試みている。まず、溶液中でのタンパク質間相互作用部位の同定に威力を発揮する溶液 NMR の利用を検討したが、Kap β 2 は分子量 101 kDa であることから、安定同位体で均一に標識してもその NMR 解析は困難であるため、アミノ酸側鎖選択的な ^{13}C ラベルを用いて、疎水性アミノ酸残基側鎖の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルを測定した (Fig.1)。その結果、PRn の添加により、特定の NMR シグナルの化学シフトに変化が観測され (Fig.1 で番号

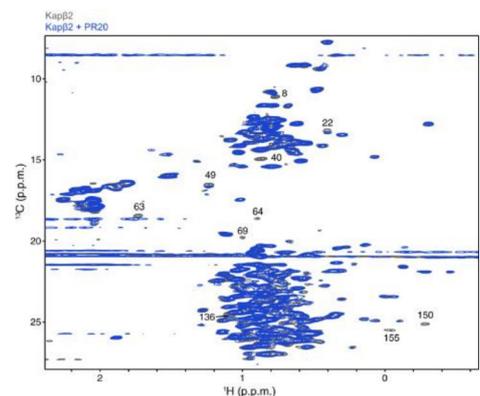


Fig.1 Kap β 2 に対する PRn の滴定結果
化学シフトが確認された信号は番号を表示した。

を付した信号)、その一部は Kap β 2 における核移行シグナル (NLS) 結合部位に帰属された。この Kap β 2 の NLS 結合部位には、FUS も結合することが報告されており、さらに、Kap β 2 に対する PRn と FUS の解離定数は同程度であったことから、PRn は、FUS と競合的に NLS 結合部位と結合することで、Kap β 2 と FUS の結合を阻害し、その結果、FUS の過剰な自己会合を引き起こし、FUS 液滴の凝集化を誘導することが示唆された。

PRnによるFUS液滴の凝集化は、その液滴密度の追跡からも示唆されているが、興味深いことにKapβ2に対する当量を超えてPRnを添加した場合、その密度はさらに増大することから、PRnはKapβ2のNLS結合部位に結合し、FUS液滴の解消を阻害するだけでなく、FUSの自己会合を促進することが示唆されている。そこで、第三章では、液滴内FUSの自己会合を検討するため、液滴内分子の拡散速度を追跡可能な光褪色後蛍光回復(FRAP)法を利用した。Kapβ2

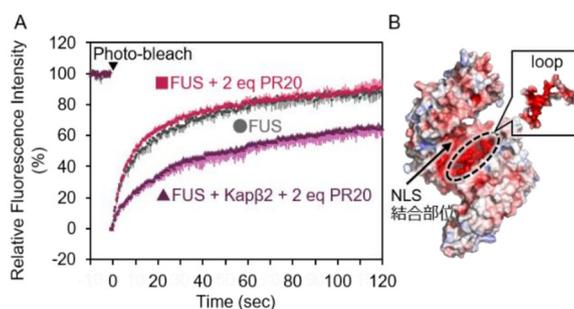


Fig.2 (A)FRAP測定, (B)Kapβ2のNLS結合部位とloop領域

と過剰量PRnの添加(Fig.2A▲)は、FUSのみ(Fig.2A●)に比べ、光照射による退色(Photo-bleach)からの蛍光の回復が遅く、液滴内の拡散速度の低下、つまりFUSの自己会合の促進が示された。一方、PRnのみ(Fig.2A■)ではこのような拡散速度の低下は観測されず、PRnはFUSではなく、Kapβ2と相互作用することにより、FUSの自己会合を促進させる可能性が示された。これらの結果から、PRnはKapβ2のNLS結合部位へのFUSの結合を阻害するだけでなく、別の部位でKapβ2と相互作用することにより、FUSの自己会合を促進させることが示唆された。このようなFUSの自己会合を促進させるKapβ2のPRn相互作用部位として、NLS結合部位と同様に負電荷アミノ酸残基が多数存在するloop領域に注目した(Fig.2B)。PRnとloop領域の相互作用を確認するために、loop領域のみを単離し、その¹H-¹⁵N HSQCスペクトルを測定したところ、loop領域の多くの負電荷のアミノ酸残基のNMR信号にPRn添加による化学シフト擾動が観測されたことから、静電的相互作用が示された。つまり、PRnはNLS結合部位に加えてloop領域とも相互作用することにより、FUSの拡散速度を低下させることが示唆された。

第四章では、液滴内部の分子にどのような構造変化が誘起され、その凝集が誘導されるのか検討するため、新たな方法論の開発とその応用について検討した。FUSはさまざまなコンフォメーションをとりうる天然変性タンパク質であり、また複数のコンフォメーションが平衡状態で存在していることから、結晶構造解析やNMR法では、その構造変化を追跡することは困難である。そこで、タンパク質の構造変化は、その配列中の特定の2つのアミノ酸残基間の距離やその距離分布の変化としても追跡できることに注目した。このような2点間の距離は、X線

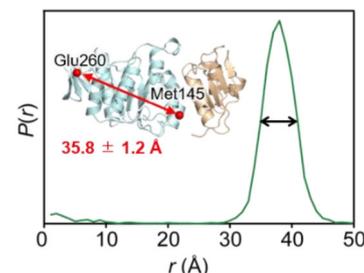


Fig.3 MurDの2点間距離分布

小角散乱(SAXS)における散乱干渉から算出できることから、特定の2つのアミノ酸残基付近に電子密度の高い金属イオンを固定し、タンパク質由来の散乱干渉からその金属イオン由来の散乱干渉のみを抽出することを試みた。まず、その手法を確立させるため、立体構造が報告され、電子密度の高いランタニド金属イオンが特定の部位(Met145とGlu260)に固定可能であるペプチドグリカン生成に関与するMurDを利用して、SAXSの散乱干渉からその2点間の距離分布($P(r)$)関数を求めたところ、Fig.3のような結果が得られた。ここで得られた $P(r)$ 関数からこの2点間距離は $37 \pm 3 \text{ \AA}$ と見積もられ、NMRによる構造決定から得られた距離 $35.8 \pm 1.2 \text{ \AA}$ と誤差の範囲で一致した。このような手法を応用することにより、さまざまなコンフォメーションを有しているFUSのような天然変性タンパク質であっても、特定の残基間の距離から構造やその分布の変化を見積もることが可能になると考えられ、凝集の際に液滴内部のFUSにどのような構造変化が誘起されるのか、追跡できると期待できる。

第五章では、本学位論文において得られた結果と今後の展望をまとめた。本学位論文では、FUSの液滴形成を制御する分子機構の解明を目的として、ALS原因遺伝子から産生されるPRnが分子シャペロンとして機能するKapβ2のNLS結合部位とloop領域に相互作用することにより、FUSの液滴制御機能を阻害することを明らかにした。さらに、SAXSの散乱干渉を利用して特定のアミノ酸残基間の距離変化が追跡でき、その手法は天然タンパク質のような一定の構造を示さない分子に対しても応用可能であることから、凝集する際の液滴内のFUSの構造変化を解明できる可能性も示された。本学位論文による成果は、FUSの液滴形成を制御する分子機構解明に貢献するとともに、広く天然変性タンパク質の構造機能相関の解明への展開も期待される。