



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 川向 ほの香

審査担当者	主査	教授	坂口 和靖	(徳島大学先端酵素学研究所)
	副査	教授	佐田 和己	
	副査	教授	松本 謙一郎	
	副査	教授	村越 敬	
	副査	教授	石森 浩一郎	
	副査	教授	齋尾 智英	

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)

本学位論文では、第一章において、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) の原因蛋白質 Fused in sarcoma (FUS) に対する分子シャペロン Karyopherin β 2 (Kap β 2) の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。この Kap β 2 は 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。そこで、本学位論文では、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や、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、学術的にも重要でありながら未知の部分の多い 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。

第二章では、FUS の過剰な自己会合が進行する ALS においては、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、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。ここでは、その方法論として溶液 NMR を利用しているが、Kap β 2 は分子量 101 kDa であることから、通常の 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ている。このような高度な測定法により、特定の NMR 信号の化学シフトに PRn の添加による変化を報告している。ここで化学シフト変化を示す NMR 信号の一部は Kap β 2 における FUS の結合部位である核移行シグナル (NLS) 結合部位に帰属されたことから、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すことで、FUS 液滴の凝集化を誘導することが示された。Kap β 2 のような分子量が十万を超える蛋白質における相互作用部位を NMR により決定することは容易ではなく、その方法論を含めてここで得られた結果は学術的にも重要と判断される。

第三章では、Kap β 2 による液滴内での FUS の自己会合制御機構とその PRn による影響を検討するため、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) 法を利用している。Kap β 2 と過剰量 PRn の添加は、FUS のみの場合に比べ、光照射による褪色 (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 のみの場合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、Kap β 2 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。このような Kap β 2 による FUS の自己会合促進は、PRn が Kap β 2 の天然変性領域である loop 領域と相互作用することにより発現することを明らかにし、Kap β 2 の loop 領域は FUS の自己会合抑制機能に重要な働きをしていることを見出した。さらに、この Kap β 2 の loop 領域を欠損させた変異体では、FUS への液滴抑制機能が失われるばかりか、逆に液滴形成を促進し、凝集させることを突き止めた。この結果は、一定の構造を有さない天然変性領域の新たな機能であり、これまでの液滴形成抑制機能を示す Kap β 2 が、PRn と

の相互作用することによって逆に液滴形成とその凝集を促進するという Kapb2 の機能を見直すことになる学術的に重要で興味深いものである。

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ている。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蛋白質であり、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、蛋白質の構造変化を、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追跡することに注目し、このような 2 点間の距離を、X 線小角散乱 (SAXS) における散乱干渉から算出している。このような距離の算出を、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することでその金属イオン由来の散乱干渉から求めることを試み、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に固定可能であるペプチドグリカン生合成に関与する MurD を利用して、SAXS の散乱干渉からその 2 点間の距離分布 ($P(r)$) 関数を求めている。その結果、ランタニド金属間距離は $37 \pm 3 \text{ \AA}$ 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 のような天然変性蛋白質であっても、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、その方法論の確立は、液滴中の蛋白質、特に一定の立体構造を有さない天然変性領域を有する蛋白質の構造変化について、これまでになく知見を与えると期待できる。

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られており、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、天然変性領域を有する蛋白質の新たな機能を提案し、生体内で様々な機能を有する天然変性蛋白質の構造機能相関の解明への展開も期待されることから、その学術的意義が認められ、博士 (理学) の授与に値すると判断する。