

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03627

研究課題名（和文）液-液相分離関連分子SAM9/SAMD9Lの機能・構造・病態解析

研究課題名（英文）Functional, structural and pathological analysis of SAM9/SAMD9L, liquid-liquid phase separation-related molecules

研究代表者

鳴海 覚志（Satoshi, Narumi）

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・室長

研究者番号：40365317

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：生細胞イメージング技術およびタンパク質精製技術を駆使してSAM9と液液相分離の関わり、および変異による影響を検証した。全長SAM9分子の安定的な産生および精製に成功し、タンパク質溶液が塩強度依存的に液滴形成を示すことを示した。変異体を発現する293細胞では亜ヒ酸誘導性のストレス顆粒合成が低下したが、E974K変異体の精製サンプルは液滴形成が保持されていた。変異の影響は核酸結合能などSAM9の液滴形成以外の機能に影響している可能性がある。精製タンパク質サンプルを用いたクライオ電顕解析に挑戦したが、グリッド上でSAM9が凝集する現象を制御しきれず、十分な観察にはいたらなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SAM9/SAMD9Lは先天性疾患MIRAGE症候群および小脳失調汎血球減少症候群の責任遺伝子であるが、これら分子の機能は不明であった。本研究を通じ、SAM9/SAMD9Lが液液相分離に関与する分子であることを示し、その分子病態の背景には細胞内での適切な分子集合の障害がある可能性を示唆した。今後のMIRAGE症候群および小脳失調汎血球減少症候群の分子病態解明に向け重要な知見を得ることができた。研究期間中に臨床症例に対する遺伝子解析を積極的に進めた。研究プロジェクト全体としては、4年間の研究期間中に9編の査読つき英文論文を発表し、今後の研究基盤を形成する知見を提供した。

研究成果の概要（英文）：Using live cell imaging and protein purification techniques, we examined the relationship between SAM9 and liquid-liquid phase separation and the effects of mutations. Stable production and purification of full-length SAM9 molecules were successfully achieved, showing that the protein solution exhibits droplet formation in a salt-dependent manner. Arsenite-induced stress granule formation was reduced in 293 cells expressing the mutant, but purified samples of the E974K mutant retained droplet formation. It is possible that the mutation affects functions other than droplet formation of SAM9, such as nucleic acid binding ability. We tried cryo-EM analysis using purified protein samples, but could not fully observe the single SAM9 molecules due to aggregation.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：液液相分離 SAM9 MIRAGE症候群 先天性疾患 単一遺伝子疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核細胞は局所に生体高分子のやわらかな凝集を作り、細胞骨格形成などの反応を効率良く行うが、その機序に液-液相分離 (LLPS) が関わるということが理解されてきた。LLPS の研究対象は、当初 RNA 顆粒などに限られていたが、現在ではエンハンサー複合体、細胞骨格など多様な生命現象へ波及しつつある。しかし LLPS 機構の異常がヒト疾患にどのように関与するかは大部分不明である。本研究は、先天性疾患の原因分子であり、新タイプの LLPS 関連分子と考えられる SAMD9/SAMD9L に対し集中的な構造・機能解析を行う。これにより、LLPS 制御の分子機構を明らかにするとともに、ヒト LLPS 異常症解明の端緒となる知見を得ることを目指す。本研究の強みは遺伝子工学、構造生物学そして遺伝医学の融合にあり、特に LLPS 異常症としての先天性疾患を切り口とする点において独自性が高い。

2. 研究の目的

本研究の目的は LLPS 関連分子としての SAMD9/SAMD9L の機能の解明 LLPS 関連ドメインとしての SAM ドメインの構造の解明 先天的 LLPS 異常症としての SAMD9/SAMD9L 異常症の細胞レベル病態の解明 の 3 点である。3 テーマはそれぞれが補完関係にあり、LLPS 制御 (形成、維持、解消など) の生理と病理の解明を狙った。

3. 研究の方法

本研究の 3 つのテーマ (SAMD9/SAMD9L の機能の解明・SAM ドメインの構造の解明・SAMD9/SAMD9L 異常症の細胞レベル病態の解明) に対応した研究計画を遂行した。

テーマ SAMD9/SAMD9L の機能の解明

LLPS 関連分子は低濃度で LLPS を起こすスキャッフールドとこれら分子に同調して LLPS を起こすクライアントが知られており、両者の組み合わせの特定はコンパートメントの生物学的意義を把握する上で有用である。SAMD9/SAMD9L が関与するコンパートメントを特定するため、一過性の弱い相互作用を網羅的に同定する手法として近年開発された近接性標識法による解析を行った。また、精製 SAMD9/SAMD9L タンパク質が塩強度変化により LLPS を起こすかを検証した。具体的には pH、イオン強度、各種濃度の高分子 (核酸など) などで条件マトリックスを作り、混和・液滴形成実験を行って LLPS 規定条件を決定した。

テーマ SAMD9/SAMD9L の構造の解明

LLPS 関連分子の構造学的情報は乏しく、一部ドメインの構造解析でも重要な知見となる。本研究では SAMD9/SAMD9L が LLPS を起こす上で必須の SAM ドメインに着目し、集中的な構造解析を行った。SAM ドメイン (約 90 アミノ酸残基) の構造解析の第一選択は結晶構造解析であり、SAMD9/SAMD9L が塩強度変化により LLPS を起こすことから塩強度により結晶パッキングや結晶化速度が影響を受ける可能性を考慮し、塩強度と pH を中心としたマトリックスを持つ結晶化スクリーニングキットを選択した。放射光を利用した X 線結晶構造解析を行い、立体構造に関するデータを得た。また全長 SAMD9 分子の高純度サンプルを取得し、クライオ電顕による単粒子解析を試みた。

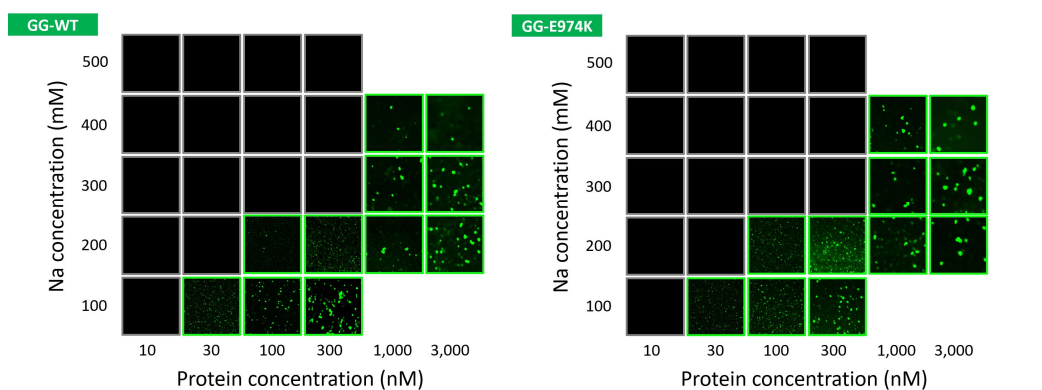
テーマ SAMD9/SAMD9L 異常症の細胞レベル病態の解明

研究代表者は SAMD9 異常症 (MIRAGE 症候群) と SAMD9L 異常症 (運動失調汎血球減少症候群) の遺伝子解析研究につき施設倫理委員会承認を受け、日本新生児成育医学会と連携した臨床調査を行った。SAMD9/SAMD9L 異常症は現在までに世界で約 50 例報告され、うち 15 例は研究代表者による報告であり単一研究機関として圧倒的最多である。研究期間中にさらに新規患者検体の収集と遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

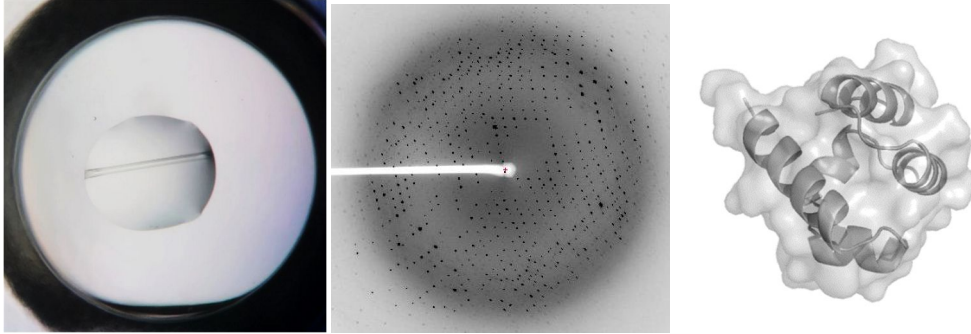
テーマ SAMD9/SAMD9L の機能の解明

全長 SAMD9 の C 末端側に遺伝子改変型ビオチンリガーゼ TurboID を付加したコンストラクトを HEK293 細胞に発現させ、細胞内で SAMD9 と近接する分子群の網羅的な同定を試みた。その結果、SAMD9 に対して有意に近接する分子として既知の LLPS 関連分子は同定されなかったが、逆に既知の LLPS 関連分子でありストレス顆粒形成に関与する G3BP1 が野生型 SAMD9 とは近接できない状態となっていることがわかった。同様の実験を R459Q 変異型 SAMD9 で行った所、G3BP1 との近接性はコントロール (TurboID-NES) と同水準であり、変異の特性のひとつは G3BP1 との相互作用の変化であることが示唆された。SAMD9 精製タンパク質を用いて、タンパク質濃度および塩強度を変化させた場合の液滴形成能の変化を系統的に検証した。その結果、SAMD9 は細胞内に存在する生理的濃度 (30 nM) においても *in vitro* における液滴形成能を有することが示された。この液滴形成能力が変異体においても保持されるのか影響を受けるのかに興味を持たれたが、E974K 変異体を用いた検討では液滴形成能には有意な変化は認めなかった (下図)。



テーマ SAMD9/SAMD9L の構造の解明

SAM ドメインタンパク質の高純度結晶を作成し、SPring-8 での X 線回折実験を行った。2.5 オングストローム分解能のデータセットが得られたため、原子分解能の立体構造を解析できた (下図)。SAM ドメインは自己重合ドメインであることが示唆され、実際に mVenus と mTurquoise2 を使った FRET により、SAM-SAM 会合が溶液中に起こることを示した。また、SAM-SAM 会合を阻害する人工変異を構造的に予測し、組み込んだところ、FRET 効率を変化させることができたことがわかった。



全長 SAMD9 分子のクライオ電顕観察用試料を作製しクライオ電顕観察に供したが、分子の凝集傾向が制御困難であり、適切な密度で分子が配置されたグリッドを作製することができなかった。限られた撮像枚数のデータから構築された立体構造の解像度は低く、全体構造を推測することはできなかった。

テーマ SAMD9/SAMD9L 異常症の細胞レベル病態の解明

研究期間中に臨床症例に対する遺伝子解析を積極的に進めた。研究プロジェクト全体としては、4 年間の研究期間中に 9 編の査読つき英文論文を発表し、今後の研究基盤を形成する知見を提供した。また、論文実績としては未刊行であるが、患者由来の皮膚線維芽細胞 3 ラインを研究期間中に作製した。うち 1 ラインは iPS 細胞の作製に成功しており、今後の研究に応用可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Kawashima-Sonoyama Y, Okuno K, Dohmoto T, Tanase-Nakao K, Narumi S, Namba N.	4. 巻 8
2. 論文標題 The case of a patient with MIRAGE syndrome with familial dysautonomia-like symptoms.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hum Genome Var.	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-021-00158-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Akiba K, Katoh-Fukui Y, Yoshida K, Narumi S, Miyado M, Hasegawa Y, Fukami M.	4. 巻 5
2. 論文標題 Role of Liquid-Liquid Separation in Endocrine and Living Cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Endocr Soc.	6. 最初と最後の頁 bvab126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/jendso/bvab126. eCollection 2021 Oct 1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Chen C, Yamanaka Y, Ueda K, Li P, Miyagi T, Harada Y, Tezuka S, Narumi S, Sugimoto M, Kuroda M, Hayamizu Y, Kanekura K.	4. 巻 220
2. 論文標題 Phase separation and toxicity of C9orf72 poly(PR) depends on alternate distribution of arginine.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 e202103160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202103160.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tanase-Nakao K, Kawai M, Wada K, Kagami M, Narumi S.	4. 巻 30
2. 論文標題 Acquired uniparental disomy of chromosome 7 in a patient with MIRAGE syndrome that veiled a pathogenic SAMD9 variant.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Pediatr Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 163-169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1297/cpe.30.163.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyagi T, Yamanaka Y, Harada Y, Narumi S, Hayamizu Y, Kuroda M, Kanekura K.	4. 巻 583
2. 論文標題 An improved macromolecular crowding sensor CRONOS for detection of crowding changes in membrane-less organelles under stressed conditions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 29-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.10.055.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida M, Tanase-Nakao K, Shima H, Shirai R, Yoshida K, Osumi T, Deguchi T, Mori M, Arakawa Y, Takagi M, Miyamura T, Sakaguchi K, Toyoda H, Ishida H, Sakata N, Imamura T, Kawahara Y, Morimoto A, Koike T, Yagasaki H, Ito S, Tomizawa D, Kiyokawa N, Narumi S, Kato M.	4. 巻 191
2. 論文標題 Prevalence of germline GATA2 and SAMD9/9L variants in paediatric haematological disorders with monosomy 7.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Haematol	6. 最初と最後の頁 835-843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.17006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishiwa S, Kamei K, Tanase-Nakao K, Shibata S, Matsunami K, Takeuchi I, Sato M, Ishikura K, Narumi S.	4. 巻 12
2. 論文標題 A girl with MIRAGE syndrome who developed steroid-resistant nephrotic syndrome: a case report.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Nephrol.	6. 最初と最後の頁 340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12882-020-02011-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akiba K, Narumi S, Nishimura R, Kato-Fukui Y, Takada S, Hasegawa Y, Fukami M.	4. 巻 87
2. 論文標題 SOX9 is colocalized with paraspeckle protein NONO in cultured murine sertoli cells and features structural characteristics of intrinsically disordered proteins.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Reprod Dev.	6. 最初と最後の頁 1124-1125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrd.23425	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitsui-Sekinaka K, Narumi S, Sekinaka Y, Uematsu K, Yoshida Y, Amano N, Shima H, Hasegawa T, Nonoyama S.	4. 巻 41
2. 論文標題 Clinical and Immunological Analyses of Ten Patients with MIRAGE Syndrome.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 709-711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-020-00964-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshizaki K, Hachiya R, Tomobe Y, Kaku U, Akiba K, Shima H, Narumi S, Hasegawa Y.	4. 巻 28
2. 論文標題 MIRAGE syndrome with recurrent pneumonia probably associated with gastroesophageal reflux and achalasia: A case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Pediatr Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 147-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1297/cpe.28.147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Onuma S, Wada T, Araki R, Wada K, Tanase-Nakao K, Narumi S, Fukui M, Shoji Y, Etani Y, Ida S, Kawai M.	4. 巻 7
2. 論文標題 MIRAGE syndrome caused by a novel missense variant (p.A1a1479Ser) in the SAMD9 gene.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hum Genome Var.	6. 最初と最後の頁 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41439-020-0091-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito K, Nakagawa R, Narumi S, Ohashi H, Ishiguro A, Kabe K.	4. 巻 in press
2. 論文標題 A Small-for-Gestational-Age Infant with MIRAGE Syndrome Who Developed Heat Stroke and Rhabdomyolysis due to Severe Temperature Instability	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neonatology.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000529762.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirai M, Yagasaki H, Kanezawa K, Ueno M, Shimozawa K, Imai K, Morio T, Kato M, Gocho Y, Narumi S, Ebihara Y, Morioka I.	4. 巻 45
2. 論文標題 Cord Blood Transplantation in 2 Infants Presenting Monosomy 7 Clonal Hematopoiesis: SAMD9 / SAMD9L Germline Mutation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Pediatr Hematol Oncol.	6. 最初と最後の頁 e290-e293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPH.0000000000002578.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Narumi S.	4. 巻 62
2. 論文標題 Discovery of MIRAGE syndrome.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatr Int.	6. 最初と最後の頁 e15283.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.15283.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanase-Nakao K, Kawai M, Wada K, Kagami M, Narumi S.	4. 巻 30
2. 論文標題 Acquired uniparental disomy of chromosome 7 in a patient with MIRAGE syndrome that veiled a pathogenic SAMD9 variant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Pediatr Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 163-169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1297/cpe.30.163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 鳴海覚志
2. 発表標題 新世代技術によるタンパク質相互作用解析
3. 学会等名 日本内分泌学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳴海覚志
2. 発表標題 成長障害をきたす全身性疾患MIRAGE症候群が教えてくれたこと
3. 学会等名 日本小児遺伝学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳴海覚志
2. 発表標題 たぶん医学系学会で最も詳しいAlphaFoldの解説
3. 学会等名 日本小児内分泌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中尾佳奈子，長谷川奉延，鳴海覚志
2. 発表標題 文献レビューに基づくMIRAGE症候群の臨床的特徴
3. 学会等名 日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳴海覚志
2. 発表標題 MIRAGE症候群とSAMD9変異
3. 学会等名 埼玉県立小児医療センター研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鳴海覚志
2. 発表標題 成長障害をきたす全身性疾患MIRAGE症候群の“発見”と“その後の学び”
3. 学会等名 東海小児内分泌講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中尾佳奈子、伊原健太郎、三嶋千恵美、新野睦子、白水美香子、鳴海覚志
2. 発表標題 SAMD9分子標的療法に向けた構造解析と治療薬スクリーニング系の開発
3. 学会等名 第53回日本小児内分泌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Narumi S
2. 発表標題 The Basic Research on the SAMD9 Protein: What, Where and With Whom?
3. 学会等名 Bone Marrow Failure Expert Meeting 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Narumi S
2. 発表標題 MIRAGE
3. 学会等名 Bone Marrow Failure Expert Meeting 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳴海寛志
2. 発表標題 先天性副腎低形成症における遺伝子変異
3. 学会等名 日本内分泌病理学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Narumi S.
2. 発表標題 Development of a drug screening method for molecular targeted therapy of MIRAGE syndrome.
3. 学会等名 11th International Meeting of Pediatric Endocrinology. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鳴海寛志
2. 発表標題 成長障害をきたす全身性疾患MIRAGE症候群の発見と見えてきた課題.
3. 学会等名 広島小児内分泌講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	金蔵 孝介 (Kanekura Kosuke) (10508568)	東京医科大学・医学部・准教授 (32645)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊原 健太郎 (Ihara Kentaro) (90647207)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関