

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16060

研究課題名(和文)インポーチンによる液-液相分離の抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanism of regulation of liquid-liquid phase separation by importin-beta

研究代表者

吉澤 拓也 (Yoshizawa, Takuya)

立命館大学・生命科学部・講師

研究者番号：50779056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：核内輸送受容体であるインポーチンファミリーは輸送基質となる核内タンパク質の液-液相分離を抑制する機能を持つ。この機能の阻害は、液-液相分離の破綻による異常凝集をもたらし、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの重篤な神経変性疾患に関わるとされている。本研究では、輸送基質の変異に伴う制御破綻ならびにインポーチンを阻害する繰り返しペプチドによる制御破綻の解析を行なった。さらに、液-液相分離により形成される液滴の新規解析法の開発も行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

液-液相分離を調節するタンパク質の解析は未だ事例が少なく、新たなシャペロンのカテゴリーとして開拓されつつある領域であり、そのメカニズムに迫った(学術的意義)。また、液-液相分離相分離の状態は解析が困難であり、新規な解析法を開発した(学術的意義)。タンパク質の凝集は重篤な疾患とも密接に関わり、疾患関連変異体や関連遺伝子産物を用いた本研究は、病態の発症メカニズムに迫るものである(社会的意義)。

研究成果の概要(英文)：Nuclear import receptors, karyopherin- β s inhibit liquid-liquid phase separation (LLPS) of client proteins. Dysregulation of LLPS leads to an aggregation of the client proteins, eventually causing fatal neurodegenerative diseases including amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We studied dysregulation by mutations of the client protein or repeat peptide inhibitor bound to karyopherin- β s. In addition, we developed a new technique to track forming or vanishing droplets by LLPS.

研究分野：相分離生物学

キーワード：液-液相分離 核内輸送受容体 RNA結合タンパク質 筋萎縮性側索硬化症

1. 研究開始当初の背景

RNA 結合タンパク質 FUS は主に核内で機能するタンパク質であり、液-液相分離により液滴化することで、関連分子を集積させ、DNA 修復、転写、スプライシングなどの場の形成に寄与すると考えられている。FUS の核内移行は、核内輸送受容体インポーチン β ファミリーの Kap β 2 が行う。Kap β 2 は FUS を核内へと輸送するのみならず、細胞質での液-液相分離を抑制する液-液相分離抑制シャペロンとしての機能を持つ。Kap β 2 は FUS の核移行シグナル (NLS) を認識し核内輸送するが、重篤な神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では、FUS 遺伝子の NLS 領域のミスセンス変異が複数報告されている。NLS に変異を有する FUS は細胞質で凝集化することから、Kap β 2 による FUS の核内輸送と液-液相分離の抑制は、細胞維持に極めて重要なメカニズムであると考えられる。また、ALS でみられる遺伝子異常として、C9orf72 遺伝子のイントロン領域の 6 塩基の繰り返し配列の増幅がある。この繰り返しが生産するプロリン-アルギニンのリピートペプチドは、液-液相分離の異常をもたらすことが示唆されているが、そのメカニズムは明らかとされていない。

2. 研究の目的

上述の背景から、Kap β 2 による FUS の液-液相分離の制御機構を、ALS との関連の観点から明らかにするために以下の (1) と (2) を目的とする研究を行なった。また、解析が困難である液-液相分離の過渡的状態を明らかとするため (3) の研究を行なった。

- (1) FUS の ALS 関連変異体の Kap β 2 による制御機構の解明
- (2) PR リピートペプチドによる Kap β 2 阻害機構の解明
- (3) 圧力を用いた液-液相分離の解析法の開発

3. 研究の方法

- (1) FUS の ALS 関連変異体の Kap β 2 による制御機構の解明

FUS の ALS 関連変異のうち 525 番目のプロリンがロイシンに置き換わる FUS(P525L)について、Kap β 2 との複合体の X 線結晶構造解析を行なった。FUS(P525L)に加え 495 番目のアルギニンがストップコドンに変わる FUS(R495X)について、Kap β 2 による液-液相分離抑制能を濁度法により解析した。Kap β 2 と相互作用する FUS の領域を決定するため、各種フラグメントを用いたプルダウン結合実験および等温滴定型カロリメトリーによる解析を行なった。FUS(R495X)の細胞内局在解析を行い、アルギニンメチル化による影響を検証した。

- (2) PR リピートペプチドによる Kap β 2 阻害機構の解明

リピート回数が 20 回である PR20 が Kap β 2 の FUS の液-液相分離抑制に与える影響を濁度法および顕微鏡観察により評価した。リピート回数の異なる PR と Kap β 2 とのプルダウン結合実験を行なった。等温滴定型カロリメトリー、ゲル濾過クロマトグラフィー、分析超遠心による相互作用解析を行なった。同位体標識した Kap β 2 を調製し、PR20 との相互作用部位を NMR 法により解析した。さらに分子動力学シミュレーションにより評価した。

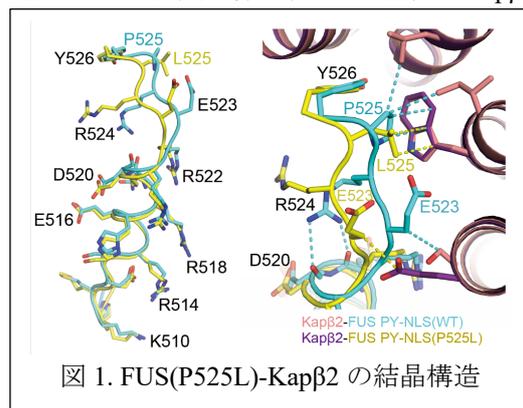
- (3) 圧力を用いた液-液相分離の速度論的解析法の開発

耐圧セル中の FUS 溶液に対して定温環境下で圧力を変化させながら濁度を測定し、濁度から液-液相分離の程度を解析した。様々な温度で同様の実験を行い、温度と圧力を軸とする相図を作成した。圧力を 1 bar から 1.2 kbar に瞬時に変化させ、濁度の時間変化を測定した。続けて、1.2 kbar から 1 bar に瞬間的に変化させ、濁度の時間変化を測定した。同様の実験を 2.0 kbar と 3.0 kbar の圧力で行なった。

4. 研究成果

- (1) FUS の ALS 関連変異体の Kap β 2 による制御機構の解明 (引用文献①)

FUS(P525L)と Kap β 2 との複合体の X 線結晶構造解析の結果を図 1 に示した。過去に報告されている野生型 FUS と Kap β 2 との複合体構造と比較すると P525L の変異に伴い、FUS の主鎖が Kap β 2 から離れる方向に移動していた。この移動は、FUS の分子内相互作用にも影響を与えていることが明らかとなった。濁度法による解析結果からは、Kap β 2 は NLS を欠失した FUS に対しても相分離抑制能を持つことが明らかとなった。各フラグメントを用いた相互作用解析から、FUS のアルギニン-グリシン-グリシン (RGG) のリピート領域が NLS の代わりに Kap β 2 に結合することが明らかとなった。細胞内局在解析では、メチル化抑制剤によって核局在が回復することを見出した。未メチル化状態の RGG リピートが NLS の代わりに機能し、核内移行が行われることを明らかとした。



(2) PR リピートペプチドによる Kapβ2 阻害機構の解明 (引用文献②)

FUS はバッファー溶液中では液-液相分離による液滴を形成し、Kapβ2 は FUS の液滴形成を阻害した。Kapβ2 と PR20 の存在下では FUS の液滴が観察された (図 2A)。濁度法でも同様の結果が得られ、PR20 の存在下では FUS の液-液相分離に由来する濁度の上昇がみられた。したがって、PR20 は Kapβ2 の相分離抑制シャペロンとしての機能を阻害することが示された。PR20 の他に GR20 も Kapβ2 の機能を阻害することを明らかとした。続けて、PR リピートペプチドと Kapβ2 との直接的な相互作用の解析を行なった。プルダウン結合実験では、PR18 は Kapβ2 に結合したが PR8 は結合しなかった。したがって、PR リピートペプチドと Kapβ2 との相互作用はリピート回数依存的事であることが明らかとなった。また、FUS の NLS フラグメントを用いた競合的結合実験を行なった (図 2B)。PR20 の存在下で Kapβ2 は FUS の NLS と結合できなくなったことから、PR20 は Kapβ2 と NLS との相互作用を阻害することが明らかとなった。NMR による結合部位解析の結果、NLS と部分的に競合的に結合することで阻害していることが示唆された。分子動力学シミュレーションによっても PR20 は Kapβ2 の NLS 結合部位に結合することが示唆された。以上のことから、PR20 は Kapβ2 との結合により輸送基質との結合を阻害し、液-液相分離を抑制解消できなくし、残された輸送基質が細胞質で凝集化すると考えられる。

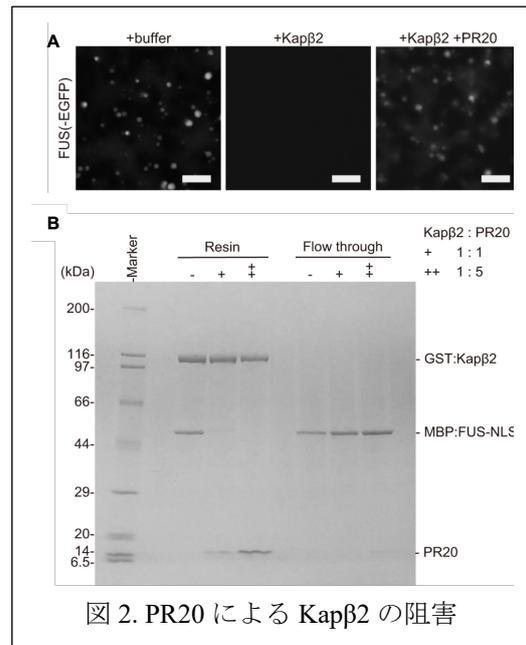


図 2. PR20 による Kapβ2 の阻害

(3) 圧力を用いた液-液相分離の解析法の開発 (引用文献③④)

野生型 FUS は 15°C 付近では液-液相分離状態であるが、800 bar の圧力を加えることで、液-液相分離が解消された。さらに圧力を上げると 3 kbar で再び液-液相分離相分離することが明らかとなった (図 3)。どちらの液-液相分離も圧力や温度変化により可逆的であった。我々は常圧での液-液相分離を Low pressure liquid-liquid phase separation (LP-LLPS) とし、高圧で形成されるものを high pressure LLPS (HP-LLPS) と名づけた。FUS の 5ヶ所のチロシンをアラニンに変異させたもの FUS(Y5A) は分子間カチオン- π 相互作用の減少により FUS の液-液相分離能を低下させるものであるが、これを用いた同様の解析では相図全体の境界が下にシフトしたことから、分子間カチオン- π 相互作用は LP-LLPS と HP-LLPS の両方に寄与していることが示唆された。圧力ジャンプにより LP-LLPS と HP-LLPS の形成と消失過程を速度論的に解析した結果、HP-LLPS は LP-LLPS よりも形成過程で 2 倍遅く、解消過程で 20 倍遅いことが明らかとなった。

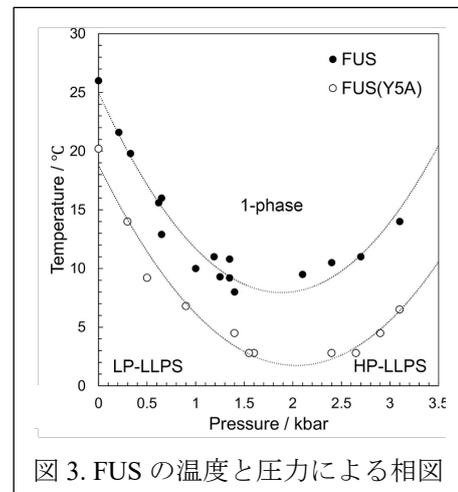


図 3. FUS の温度と圧力による相図

引用文献

- ① Gonzalez A, Mannen T, Çağatay T, Fujiwara A, Matsumura H, Niesman AB, Brautigam CA, Chook YM, **Yoshizawa T**. Mechanism of karyopherin-β2 binding and nuclear import of ALS variants FUS(P525L) and FUS(R495X). *Sci Rep*. 2021 Feb 12;11(1):3754.
- ② Nanaura H, Kawamukai H, Fujiwara A, Uehara T, Aiba Y, Nakanishi M, Shiota T, Hibino M, Wiryasermkul 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. C9orf72-derived arginine-rich poly-dipeptides impede phase modifiers. *Nat Commun*. 2021 Sep 6;12(1):5301.
- ③ Li S, **Yoshizawa T**, Yamazaki R, Fujiwara A, Kameda T, Kitahara R. Pressure and Temperature Phase Diagram for Liquid-Liquid Phase Separation of the RNA-Binding Protein Fused in Sarcoma. *J Phys Chem B*. 2021 Jul 1;125(25):6821-6829.
- ④ Kitahara R, Yamazaki R, Ide F, Li S, Shiramasa Y, Sasahara N, **Yoshizawa T**. Pressure-Jump Kinetics of Liquid-Liquid Phase Separation: Comparison of Two Different Condensed Phases of the RNA-Binding Protein, Fused in Sarcoma. *J Am Chem Soc*. 2021 Dec 1;143(47):19697-19702.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Gonzalez Abner, Mannen Taro, Cagatay Tolga, Fujiwara Ayano, Matsumura Hiroyoshi, Niesman Ashley B., Brautigam Chad A., Chook Yuh Min, Yoshizawa Takuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Mechanism of karyopherin- 2 binding and nuclear import of ALS variants FUS(P525L) and FUS(R495X)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83196-y	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 該当する
1. 著者名 Ferrer-Gonzalez Edgar, Fujita Junso, Yoshizawa Takuya, Nelson Julia M., Pilch Alyssa J., Hillman Elani, Ozawa Mayuki, Kuroda Natsuko, Al-Tameemi Hassan M., Boyd Jeffrey M., LaVoie Edmond J., Matsumura Hiroyoshi, Pilch Daniel S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Structure-Guided Design of a Fluorescent Probe for the Visualization of FtsZ in Clinically Important Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Pathogens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56557-x	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 該当する
1. 著者名 Yoshizawa Takuya, Fujita Junso, Terakado Haruna, Ozawa Mayuki, Kuroda Natsuko, Tanaka Shun-ichi, Uehara Ryo, Matsumura Hiroyoshi	4. 巻 76
2. 論文標題 Crystal structures of the cell-division protein FtsZ from Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 86 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X2000076X	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 Yoshizawa Takuya, Matsumura Hiroyoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Effect of nuclear import receptors on liquid-liquid phase separation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 25 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.BSJ-2019052	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 Takuya Yoshizawa, Ryu-Suke Nozawa, Tony Z. Jia, Tomohide Saio, Eiichiro Mori	4. 巻 12
2. 論文標題 Biological phase separation: cell biology meets biophysics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 519 ~ 539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-020-00680-x	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 Kitahara Ryo, Yamazaki Ryota, Ide Fumika, Li Shujie, Shiramasa Yutaro, Sasahara Naoya, Yoshizawa Takuya	4. 巻 143
2. 論文標題 Pressure-Jump Kinetics of Liquid-Liquid Phase Separation: Comparison of Two Different Condensed Phases of the RNA-Binding Protein, Fused in Sarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 19697 ~ 19702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c07571	査読の有無 無
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 Yoshizawa Takuya, Guo Lin	4. 巻 170
2. 論文標題 Karyopherin- s play a key role as a phase separation regulator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 15 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab072	査読の有無 無
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 Li Shujie, Yoshizawa Takuya, Yamazaki Ryota, Fujiwara Ayano, Kameda Tomoshi, Kitahara Ryo	4. 巻 125
2. 論文標題 Pressure and Temperature Phase Diagram for Liquid-Liquid Phase Separation of the RNA-Binding Protein Fused in Sarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 6821 ~ 6829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.1c01451	査読の有無 無
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 Nanaura Hitoki, Kawamukai Honoka, Fujiwara Ayano, ...、Saio Tomohide, Yoshizawa Takuya, Mori Eiichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 C9orf72-derived arginine-rich poly-dipeptides impede phase modifiers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25560-0	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takuya Yoshizawa, Taro Mannen, Ayano Fujiwara, Hiroyoshi Matsumura
2. 発表標題 Molecular basis of Karyopherin- 2 binding and nuclear import of ALS-related FUS
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉澤拓也
2. 発表標題 ほどける相分離：シャペロンとしてはたらく核輸送タンパク質
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Yoshizawa
2. 発表標題 Nuclear import receptor blocks liquid-liquid phase separation of RNA binding protein
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉澤拓也
2. 発表標題 FUSの液-液相分離とImportin ファミリー
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉澤拓也、藤原綾乃、上原武尊、井手郁佳、笹原直哉、松村浩由
2. 発表標題 相分離するRNA結合タンパク質と相分離を制御する核輸送タンパク質
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会 (2022) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉澤拓也
2. 発表標題 アルギニンリッチ配列と相分離制御
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉澤拓也
2. 発表標題 RNA結合タンパク質の相分離制御に関する研究
3. 学会等名 日本結晶学会 2021年度年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉澤拓也
2. 発表標題 相分離性タンパク質FUSとその制御タンパク質karyopherin- 2
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会第38回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究ハイライト：相分離がつなく生命現象と今後の展望
www.elsi.jp/ja-JP/news_events/highlights/2020/20200326_tjia

プレスリリース：神経変性疾患における相分離制御破綻の機序解明 -ALSなどの神経難病の病態解明に光-
https://www.amed.go.jp/news/release_20210907.html

プレスリリース：タンパク質の新しい異常凝集構造を発見 -家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の疾患メカニズムの一部を解明-
http://www.ritsumei.ac.jp/profile/pressrelease_detail?id=486

プレスリリース：タンパク質の異常凝集を観測する新たな測定法を開発 -タンパク質が作る液-液相分離(LLPS)の解明に期待-
http://www.ritsumei.ac.jp/profile/pressrelease_detail?id=558

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

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