

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19246

研究課題名（和文）超天然変性タンパク質の個体レベルでの生理機能解析

研究課題名（英文）Analyses of physiological functions of super-disordered proteins

研究代表者

中川 真一（Nakagawa, Shinichi）

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：50324679

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質の機能は特定の立体構造によって決められていると考えられてきましたが、ゲノムの中には全長に渡って特定の立体構造をとりにくい配列を持つ「超天然変性タンパク質」が多数存在していることが明らかとなりつつあります。それらは既知の機能ドメインを全く持たないため、どのような生理機能を果たしているのか予測できません。そこで本研究ではそれらの機能未知の超天然変性タンパク質の変異マウスを作製し、どのような生理機能を持っているのかを調べることにしました。その結果、少なくとも4種類の超天然変性タンパク質の変異マウスは胎生致死となることがわかり、それらが重要な生理機能を持っていることが明らかとなりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な生物のゲノム配列が明らかとなるにつれて、生物を作るためのパーツの記載は終了した、これからはシステムを理解する時代だ、と言われるようになりました。ところが、ゲノムの中には配列からは機能を予測することが出来ないタンパク質がまだまだ残されています。我々はそれらの中でも特に特定の立体構造を取りにくいタンパク質を「超天然変性タンパク質」と呼んでいますが、今回の研究で、それらのタンパク質にも重要な生理機能があることが明らかとなりました。今後はこれら超天然変性タンパク質の機能を理解し、さらに応用へとつなげることで、従来型のタンパク質では不可能であった新たな分子操作技術の開発が期待されます。

研究成果の概要（英文）：It has long been thought that the function of a protein is determined by its specific three-dimensional structure. However, it is becoming clear that there are many "intrinsically disordered proteins" within the genome, which have sequences that make it difficult to adopt a specific structure throughout their entire length. These proteins lack any known functional domains, making it impossible to predict what physiological functions they perform. Therefore, in this study, we created mutant mice lacking these functionally uncharacterized intrinsically disordered proteins to investigate their physiological roles. As a result, we found that mutations in at least four types of these proteins cause embryonic lethality, indicating that they perform crucial physiological functions.

研究分野：分子生物学

キーワード：超天然変性タンパク質 変異マウス 胎生致死

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質はアミノ酸配列に基づいた特定の立体構造を持ち、その立体構造によって決定される特異性の高い分子間相互作用こそが生体内におけるおよそ全ての分子プロセスの基盤となっている、というのがこれまでの分子生物学の常識であった。ところがごく最近になって、高等真核生物のゲノムには全長に渡って特定の構造をとらないと予測される超天然変性タンパク質が多数コードされていること、それらの中には、各種タンパク質を熱変性や乾燥などのストレスから保護したり、病原性凝集体の形成を強力に阻害したりする活性を持つものがあることが明らかとなってきた (Tsuboyama et al., PLOS Biol 2020)。これら機能性の超天然変性タンパク質は煮沸してもその活性が失われないことから、Hero タンパク質 (Heat-resistant obscure proteins) と総称されている。驚くべきことに、Hero7 や Hero11 が持つ病原性凝集体形成抑制活性は、そのアミノ酸配列をランダムにシャッフルさせても失われない。この事実は、アミノ酸配列がタンパク質の機能を決定するという分子生物学の基本的な常識が全く通じない遺伝子がゲノム中にはまだ多数存在していることを示唆している。

### 2. 研究の目的

本研究においては、ゲノム中に少なくとも数百のオーダーで存在している超天然変性タンパク質の変異マウスをシステムチックに作製し、その表現型解析を行うことで生理機能を明らかにし、既知のタンパク質とは全く異なった動作原理で機能していると予測される、アミノ酸配列への機能依存性が低い新たな機能性遺伝子群の存在を確立することを目的としている。

### 3. 研究の方法

本研究では、全長に渡って特定の立体構造を取りにくい性質を示す超天然変性タンパク質に注目し、その変異体をシステムチックに作製して表現型解析を行う。特に、本研究では、東海大学医学部の大塚博士によって開発された迅速変異マウス作製法である iGONAD 法を用いる。iGONAD 法を用いると F0 個体においてホモ個体を得ることが可能であり、胎生致死になるかどうか、あるいは発生異常を示すかどうかを指標として迅速に生理機能の有無を判定することが可能である。超天然変性タンパク質はモデル生物を用いた順遺伝学によるスクリーニングの網をくぐりぬけてきた可能性が高く、このような逆遺伝学的なアプローチが、その機能を明らかにする上で非常に強力な手段となる。

### 4. 研究成果

本研究では、機能未知の超天然変性タンパク質 (SIDP) 12 種類についてノックアウトマウスの作製を試みた。その結果、少なくとも 4 種類 (SIDP1-4) のタンパク質をコードする遺伝子のノックアウトマウスが胎生致死になることが明らかとなった。

SIDP-1: この遺伝子のノックアウトマウスは着床直後に致死となった。さらに詳しくそのメカニズムを調べるために、HA タグをノックインしたマウスを作製してタンパク質の局在を調べたところ、核小体局在することが明らかとなった。一般に、SIDP は弱い分子間相互作用を介して「クライアント」のタンパク質をストレスから保護したりその機能を助ける役割があると考えられている。そこで、APEX2 との融合タンパク質を細胞に発現させ、近位ビオチンラベル法を用いて SIDP-1 のクライアントタンパク質を同定することを試みた。その結果、予想通り核小体に局在する複数のタンパク質を同定することが出来た。さらに、これらのクライアントのタンパク質と蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現するベクターを発現し、野生型から得られた ES 細胞、もしくはノックアウトマウスから得られた ES 細胞に導入し、その動態に変化が見られるかを FRAP 法を用いて検討した。その結果、通常の培養条件では大きな差は見られないものの、酸化ストレスを与えたときにどの動態が大きく変化するものがあることが明らかとなった。これらの結果から、SIDP-1 は細胞がストレスに置かれた際に核小体における分子の動態をコントロールし、適切な細胞応答を保証していることが予想された。

SIDP-2: この遺伝子のノックアウトマウスは、胎生 13.5 日目において、無眼、下顎形成異常、尾の形成異常、心臓の形成異常などの多様な表現型を示した。これらの表現型は個体によってばらついており、全く異常が見られないノックアウトマウス個体も存在した。しかしながら、新生児はすべて野生型とヘテロマウスであり、胎生中期から出産の過程で胎生致死になることが明

らかとなった。

SIDP-3: この遺伝子のノックアウトマウス胚は E9.5 以降は全く見られず、胎生初期に致死となっていることが予想された。

SIDP-4: この遺伝子のノックアウトマウスは胎生致死であるが、E13.5 まではノックアウト胚を回収することが出来た。それらの胚の肝臓では、顕著な組織学的な異常を検出することが出来た。

これらの結果から、これまで全く機能がわからなかった SIDP1-4 の遺伝子は重要な生理機能を持つことが明らかとなった。

近年、様々な生物のゲノム配列が決定され、ドメイン構造からそれらの機能を予測することが可能となり、生物を作るためのパーツの記載は終了した、と見るむきもあった。しかしながら、本研究により、配列から機能を予測できない遺伝子の中にも重要な機能を持つものがまだまだ数多く残されていることが明らかとなった。今後は、それらの詳細な分子動作メカニズムを明らかにすることが重要な課題となる。また、今回解析の対象とした超天然変性タンパク質は特定の立体構造を取りにくいという性質を持っており、強固な立体構造が機能の基盤となる従来型の他タンパク質とは全く異なった分子動作機構を持っていることが期待される。これらの超天然変性タンパク質を応用することで、従来は不可能であった新たな分子操作技術が開発されることが期待される。

#### <引用文献>

A widespread family of heat-resistant obscure (Hero) proteins protect against protein instability and aggregation.

Tsuboyama K, Osaki T, Matsuura-Suzuki E, Kozuka-Hata H, Okada Y, Oyama M, Ikeuchi Y, Iwasaki S, Tomari Y.

PLoS Biol. 2020 Mar 12;18(3):e3000632. doi: 10.1371/journal.pbio.3000632. eCollection 2020 Mar.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi O, Tanahashi M, Yokoi S, Kaneko M, Yanaka K, Nakagawa S, Maita H	4. 巻 27
2. 論文標題 The cell type-specific ER membrane protein UGS148 is not essential in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 43-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12910	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 Nakagawa S, Yamazaki T, Mannen T, Hirose T.	4. 巻 -
2. 論文標題 ArcRNAs and the formation of nuclear bodies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mammalian Genome	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00335-021-09881-5	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 Arakawa K, Hirose T, Inada T, Ito T, Kai T, Oyama M, Tomari Y, Yoda T, Nakagawa S.	4. 巻 28
2. 論文標題 Nondomain biopolymers: Flexible molecular strategies to acquire biological functions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 539-552
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13050	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7件（うち招待講演 4件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中川 真一
2. 発表標題 「非ドメイン型」バイオポリマーの生物学
3. 学会等名 第6回クマムシ学研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinichi Nakagawa
2. 発表標題 Biology of "nondomain" biopolymers
3. 学会等名 Kumamoto liaison lab seminar (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinichi Nakagawa
2. 発表標題 Biology of "nondomain" biopolymers
3. 学会等名 RIKEN BIE workshop (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinichi Nakagawa
2. 発表標題 Physiological analyses of super-disordered proteins mutant mice
3. 学会等名 第95回日本生化学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Riko Okabe, Kotaro Tsuboyama, Yukihide Tomari, and Shinichi Nakagawa
2. 発表標題 A super-disordered protein Hero11 is a novel nucleolar component essential in mice
3. 学会等名 CSHL ASIA (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Riko Okabe, Kotaro Tsuboyama, Yukihide Tomari, and Shinichi Nakagawa
2. 発表標題 Hero11 is a novel nucleolar disordered protein essential for mouse development
3. 学会等名 RNA2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Riko Okabe, Kotaro Tsuboyama, Yukihide Tomari, and Shinichi Nakagawa
2. 発表標題 Hero11 is a novel nucleolar disordered protein essential for mouse development
3. 学会等名 RNA granule meeting (国際学会)
4. 発表年 2023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	泊 幸秀 (Tomari Yukihide)  (90447368)	東京大学・定量生命科学研究所・教授  (12601)	

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
---------	---------