

令和元年6月14日現在

機関番号：24601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07031

研究課題名(和文) 中間径フィラメント・LCドメインの構造解明

研究課題名(英文) Structural study of LC domains of intermediate filaments

研究代表者

森 英一郎 (Mori, Eiichiro)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70803659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：デスミンミオパチーの様に、心筋や骨格筋の異常をきたす疾患がある。本研究課題では、その原因遺伝子であるDesminという中間径フィラメントの解析を行った。DesminのHeadドメインに変異導入を行うことで、cross-ポリマーの形成能に影響を与える知見を得た。また、中間径フィラメントのHeadドメインによって形成されるcross-ポリマーのNMRシグナルを検出することに成功した。さらに、Intein反応の効率化を行い収率の上昇を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後さらに、中間径フィラメントのHeadドメインによって形成されるcross-ポリマーの構造を明らかにすることで、中間径フィラメントによる細胞形態のより詳細な知見につながる。中間径フィラメントのHeadドメインのcross-ポリマー形成に着目した本研究は、他に類を見ない独創的な研究であり、本研究によってもたらされる成果は、細胞の形態のさらなる理解につながり、様々な生命科学領域に大きな影響を与えるであろう。これらの研究成果から、ミオパチーの疾患治療法の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Protein segments of low sequence complexity/intrinsic disorder (LC domains) are now recognized to play roles in the basis of the membrane-less organelles through cross-polymerization. Desmin myopathy is a disease associated with mutations in desmin gene, presenting skeletal myopathy combined with cardiomyopathy. Desmin is a type of intermediate filaments, one of the cytoskeletal proteins. All intermediate filaments contain LC domains on both the amino- and carboxyl-terminal sides of the central coiled coil domain. The amino-terminal LC sequences of intermediate filament proteins are referred to as head domains, the carboxyl-terminal LC sequences are termed tail domains. Introducing patient-derived mutations accelerates cross-polymerization. We detected signals by solid-state NMR, and with intein technology we successfully obtained the NMR signal out of segmentally labeled intermediate filaments.

研究分野：生化学、蛋白質科学、細胞生物学

キーワード：LCドメイン 中間径フィラメント Desmin Headドメイン cross-ポリマー 固体NMR Intein反応

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

従来、結晶構造（ α ヘリックスや β シート等の 2 次元構造）を持たないドメインやタンパク質は、その構造自体が不詳なため、機能解析がそもそも不可能とされてきた。ところが、近年これらの LC ドメインが実はタンパク質の機能において、構造を持つ領域と同じくらい重要な機能を有していることが少しずつ明らかになってきた。

研究代表者はこれまでに、LC ドメインが cross- β ポリマー（ β シート構造を介して形成されたポリマー）を形成することによって機能していること（図 1）、また筋萎縮性側索硬化症（ALS）において発現している PR ポリペプチドが cross- β ポリマーに選択的に結合することで LC ドメインの生理的機能を阻害していることを明らかにしてきた [Cell 2016・PNAS 2017]。また、LC ドメインによる cross- β ポリマーは、病的アミロイドと形態学的には類似しているが、化学的に安定な病的アミロイドと異なり、翻訳後修飾などによる動的調節が生物学的に機能する際に重要である可能性を示唆する結果を得てきた。

細胞骨格を構成するタンパク質は、3 種類（アクチン、チューブリン、中間径フィラメント）に大別される。研究代表者は、LC ドメインを有する中間径フィラメントに着目した。中間径フィラメントは、3 つのドメイン（Head、Rod、Tail）に分類される。中央に位置する Rod ドメインは、 α ヘリックス構造を有する。一方、Head ドメインと Tail ドメインは、LC ドメインである。これまでに、研究代表者は、Neurofilaments (Heavy、Medium、Light)、Vimentin や Peripherin では、Head ドメインが cross- β ポリマーを形成することを明らかにした [Cell 2016]。

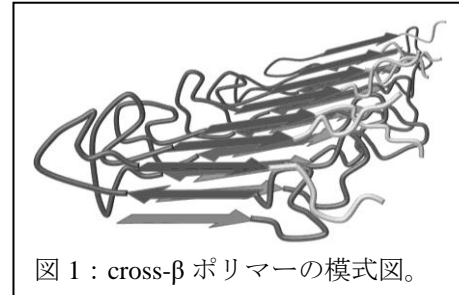


図 1 : cross- β ポリマーの模式図。

2. 研究の目的

研究目的 I : 化学的 Footprint 法を用いた中間径フィラメント・LC ドメインによるポリマー構造の解明

中間径フィラメントの LC ドメインのうち、Head ドメインが cross- β ポリマーを形成することはこれまで明らかにしてきたが、その構造は未解明である。本研究では、化学的 Footprint 法 [PNAS 2017] を用いて、cross- β ポリマーのコアとなる領域の配列とループと非コアとなる領域を識別する。

研究目的 II : 変異導入法を用いた中間径フィラメント・LC ドメインによるポリマーの安定性への影響解明

化学的 Footprint 法によって明らかになった cross- β ポリマーにおけるコア領域に変異導入を行うことで、ポリマー形成能、ポリマーへの結合能、ポリマーの安定性を評価することで、中間径フィラメントの Head ドメインによって形成される cross- β ポリマーの化学的な性質を明らかにする。

3. 研究の方法

研究計画 I : 化学的 Footprint 法を用いた中間径フィラメント・LC ドメインによるポリマー構造の解明

本研究計画では、研究代表者らが中心となって開発した化学的 Footprint 法 [PNAS 2017] を用いて、中間径フィラメントの LC ドメインによって形成される cross- β ポリマーの構造を解明に取り組む。まずは、中間径フィラメントの Head ドメイン（LC ドメイン）を大腸菌発現後、精製し、生理的条件下でポリマー形成させる。一方で、同位体でラベルした特定のアミノ酸を含んだ培養条件で発現した中間径フィラメントの Head ドメインは、変性条件下で精製する。これらポリマー（light サンプル）とモノマー（HEAVY サンプル）を化学的アセチル化処理し、混合後に質量分析を行うことで、ポリマー構造のコア領域と非コア領域とを識別する。

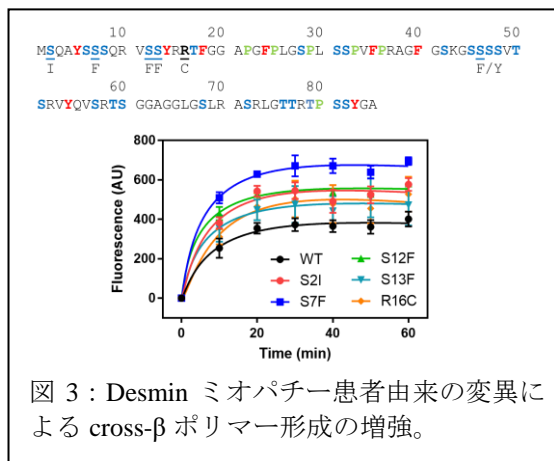
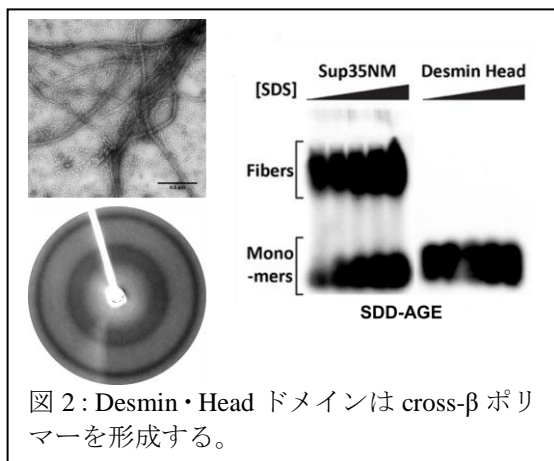
研究計画 II : 変異導入法を用いた中間径フィラメント・LC ドメインによるポリマーの安定性への影響解明

化学的 Footprint 法（研究計画 I）によって明らかになった構造情報を元に、変異導入を行う。SDD-AGE 法を行うことで、変異導入されたポリマーの化学的な安定性を評価する。具体的には、強力な変性剤である SDS に対して、ポリマーが溶解されるかどうかを、濃度ごとに電気泳動を行い評価する。このことで、構造の中のどのアミノ酸残基がポリマー構造の中でどのような役割を果たしているのかを詳細に調べる。

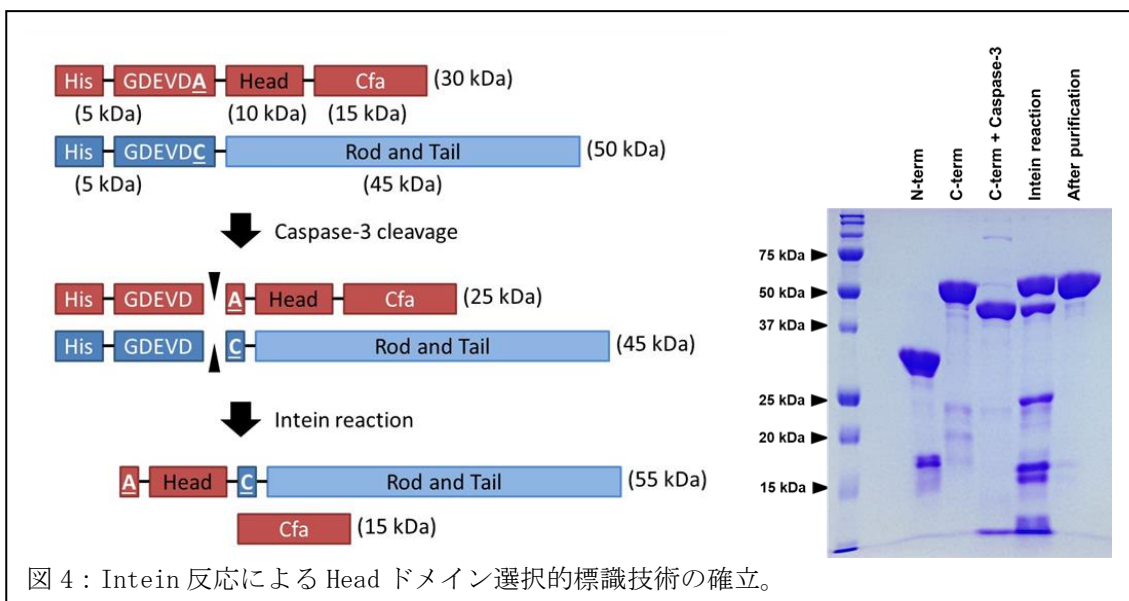
4. 研究成果

Desmin の Head ドメインに変異導入を行うことで、cross- β ポリマーの形成能に影響を与える知見を得た（図 2）。事実、ミオパチーや心筋症を生じさせる Desmin の変異を導入すると、Thioflavin-T による cross- β ポリマーの形成が促進され（図 3）、逆に F/Y などのアミノ酸に

変異を導入すると、形成過程が抑制されることが明らかになった。



本課題の研究計画 I で提唱していた化学的 Footprint 法を用いた際、hnRNP2 や Nup54 の場合は Footprint が得られたが、逆に FUS では Footprint を得られないことがあった。逆に、FUS の場合は、固体 NMR (solid-state Nuclear Magnetic Resonance) 法を用いたポリマー構造の解析に研究協力者である Masato Kato (University of Texas Southwestern Medical Center) が成功した [Cell 2017]。2018 年度は、この固体 NMR 法を用いることによって、ポリマーの核となる構造をシグナルとして同定することを目指した。中間径フィラメントの Head ドメインによって形成される cross-β ポリマーの NMR シグナルを検出することに成功した。さらに、Intein 技術を用いることで全長タンパク質における部分標識の実現を進めている。これまでに、Intein 反応の効率化を行い、収率の上昇を実現した (図 4)。結果として、Head ドメインによる cross-β ポリマーと全長の中間径フィラメントとで、同様のシグナルを得ることに成功した [未発表]。現在、これらの得られたシグナルと元、構造解析を進めている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

1. Matsui TK, Matsubayashi M, Sakaguchi YM, Hayashi RK, Zheng C, Sugie K, Hasegawa M, Nakagawa T, **Mori E** (corresponding author). Six-month cultured cerebral organoids from human ES cells contain matured neural cells. *Neurosci Lett* 2018; 670: 75-82.
2. Nakagawa Y, Kajihara A, Takahashi A, Murata AS, Matsubayashi M, Ito SS, Ota I, Nakagawa T, Hasegawa M, Kirita T, Ohnishi T, **Mori E** (corresponding author). BRCA2 protects mammalian cells from heat shock. *Int J Hyperthermia* 2018; 34(6):795-801.
3. Nakagawa Y, Kajihara A, Kirita T, **Mori E** (corresponding author). Heat Meets DNA: DNA Damage and Repair. *Thermal Med* 2018; 34(2): 15-22.
4. Matsui TK, **Mori E** (corresponding author). Microglia support neural stem cell maintenance and growth. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 503(3): 1880-1884.

[学会発表] (計 30 件)

1. **森 英一朗**. ストレス顆粒における LC ドメインの機能. 日本ハイパーサーミア学会第 34 回大会, 2017 年 9 月 15 日. (口演・発表賞)
2. **森 英一朗**. ヒト ES 細胞からの脳オーガノイドの作製. 日本宇宙生物科学学会第 31 回大会, 2017 年 9 月 21 日. (口演・ポスター)
3. **森 英一朗**, 長谷川 正俊. アセチル化による DNA-PKcs の制御. 日本放射線影響学会第 60 回大会, 2017 年 10 月 26 日. (口演)
4. **Eiichiro Mori**. Effects of aliphatic alcohols on labile amyloid-like cross- β polymers formed from low complexity domain of fused in sarcoma (FUS). 33rd International Symposium of Radiation Biology Center, Kyoto University, 2017 年 12 月 5 日. (口演・ポスター)
5. **森 英一朗**. ヒト脳オルガノイドを用いた神経再生への挑戦. iPS 細胞ビジネス協議会第 28 回情報交換会, 2018 年 6 月 12 日. (口演)
6. **Eiichiro Mori**. Toxic PR poly-dipeptides encoded by the C9orf72 repeat expansion block nuclear import and export. 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 2018 年 6 月 28 日. (ワークショップ口演)
7. **Eiichiro Mori**. Molecular characterization of toxic PR poly-dipeptides encoded by C9orf72 repeat expansion. II SCA36 International Symposium, 2018 年 6 月 29 日. (口演)
8. **森 英一朗**. Desmin・Head ドメインの構造解析. 日本筋学会第 4 回学術集会, 2018 年 8 月 10 日. (ワークショップ口演)
9. **Eiichiro Mori**. Toxic PR poly-dipeptides encoded by C9orf72 repeat expansion bind low-complexity domain polymers of intermediate filaments and nuclear pore proteins. International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave", 2018 年 8 月 28 日. (ポスター)
10. **森 英一朗**. 温熱と相同組換え修復. 日本ハイパーサーミア学会第 35 回大会, 2018 年 8 月 31 日. (シンポジウム口演)
11. **Eiichiro Mori**. Toxic PR poly-dipeptides encoded by C9orf72 repeat expansion bind intermediate filaments and nuclear pores. 第 40 回日本生物学的精神医学会・第 61 回日本神経化学会大会 合同年会, 2018 年 9 月 7 日. (口演・発表賞)
12. **森 英一朗**. C9orf72 関連 ALS/FTD の分子メカニズム. 第 33 回奈良脳神経ネットワーク研究会, 2018 年 9 月 28 日. (口演)
13. **森 英一朗**. LC ドメインによるタンパク質の機能制御. 日本放射線影響学会第 61 回大会, 2018 年 11 月 9 日. (ワークショップ口演)
14. Takeshi. K. Matsui, Nobuyuki Eura, Hitoki Nanaura, Tomo Shiota, Yasuhiko Saitoh, Kazuma Sugie, **Eiichiro Mori**. Induction of electrophysiologically-active brain organoids showing human midbrain-specific structure. The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress, 2019 年 3 月 29 日. (ポスター)
15. Nobuyuki Eura, Takeshi K. Matsui, Hitoki Nanaura, Tomo Shiota, **Eiichiro Mori**, Kazuma Sugie. A human cerebral organoid model for ZEB2-deficient Mowat-Wilson syndrome. 第 60 回日本神経学会学術大会, 2019 年 5 月 22 日. (ポスター)
16. Hitoki Nanaura, Takeshi K. Matsui, Tomo Shiota, Nobuyuki Eura, **Eiichiro Mori**, Kazuma Sugie. Rapid induction of midbrain-like organoids from human pluripotent stem cells. 第 60 回日本神経学会学術大会, 2019 年 5 月 22 日. (ポスター)
17. Tomo Shiota, Takeshi K. Matsui, Nobuyuki Eura, Hitoki Nanaura, **Eiichiro Mori**, Kazuma Sugie. Recapitulation of brain ischemia with human cerebral organoids. 第 60 回日本神経学会学術大会, 2019 年 5 月 23 日. (ポスター)
18. Takeshi K. Matsui, Nobuyuki Eura, Hitoki Nanaura, Tomo Shiota, **Eiichiro Mori**, Kazuma Sugie. Human cerebral organoids recapitulate brain formation and genetic developmental disorders. 第 60 回日本神経学会学術大会, 2019 年 5 月 23 日. (ポスター)
19. **Eiichiro Mori**, Tomo Shiota, Hitoki Nanaura, Kazuma Sugie. LC-domain misregulation leads to amyotrophic lateral sclerosis and related diseases. 第 60 回日本神経学会学術大会, 2019 年 5 月 25 日. (ワークショップ口演)
20. Kazuma Sugie, Hirofumi Komaki, Nobuyuki Eura, Tomo Shiota, Naohiko Iguchi, Kenji Onoue, Hiroyasu Tsukaguchi, Takao Kiriya, Hiroshi Kataoka, **Eiichiro Mori**, Yoshihiko Saito, Ikuya Nonaka, Ichizo Nishino. Significance of early diagnosis of Danon disease based on a nationwide survey in Japan. 第 60 回日本神経学会学術大会, 2019 年 5 月 25 日. (ポスター)
21. **Eiichiro Mori**. LC domains phase separate into cross- β polymers. ASUKA Symposium 2019, 2019 年 6 月 13 日. (口演)
22. Yoshihiko Sakaguchi, Masaya Matsubayashi, **Eiichiro Mori**. Single-cell RNA-sequencing analysis on uric acid transporters in adult human kidneys. ASUKA Symposium 2019,

- 2019年6月13日。(ポスター)
23. Masaya Matsubayashi, Yoshihiko M. Sakaguchi, **Eiichiro Mori**. URAT1 is regulated by endogenous SERM, 27-hydroxycholesterol. ASUKA Symposium 2019, 2019年6月13日。(ポスター)
 24. Nobuyuki Eura, Takeshi K. Matsui, Hitoki Nanaura, Tomo Shiota, **Eiichiro Mori**, Kazuma Sugie. A human cerebral organoid model for ZEB2-deficient Mowat-Wilson syndrome. ASUKA Symposium 2019, 2019年6月13日。(ポスター)
 25. Hitoki Nanaura, Takeshi K. Matsui, Tomo Shiota, Nobuyuki Eura, **Eiichiro Mori**, Kazuma Sugie. Rapid induction of midbrain-like organoids from human pluripotent stem cells. ASUKA Symposium 2019, 2019年6月13日。(ポスター)
 26. Tomo Shiota, Takeshi K. Matsui, Nobuyuki Eura, Hitoki Nanaura, **Eiichiro Mori**, Kazuma Sugie. Recapitulation of brain ischemia with human cerebral organoids. ASUKA Symposium 2019, 2019年6月13日。(ポスター)
 27. Riko Nagata, Masaya Matsubayashi, **Eiichiro Mori**. Arginine/Lysine-rich polypeptides bind LC domain cross- β polymers. ASUKA Symposium 2019, 2019年6月13日。(ポスター)
 28. Shinko Kobashigawa, **Eiichiro Mori**. Delayed ROS related to mitochondrial fission causes cellular senescence after radiation exposure. ASUKA Symposium 2019, 2019年6月13日。(ポスター)
 29. Soichiro S. Ito, Yosuke Nakagawa, **Eiichiro Mori**, Tadaaki Kirita. ATR inhibition enhances 5-fluorouracil sensitivity independent of non-homologous end-joining and homologous recombination repair pathway. ASUKA Symposium 2019, 2019年6月13日。(ポスター)
 30. **森 英一朗**. Cross- β ポリマー形成によるLCドメインの相分離. 第16回AMO討論会. 2019年6月15日。(口演)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 脳幹オルガノイドの作製方法

発明者: **森 英一朗**、松井 健、杉江 和馬、江浦 信之

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願2019-105186

出願年: 2019

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<https://www.mirai-nmu.com>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名: Masato Kato

所属研究機関名: University of Texas Southwestern Medical Center, TX, USA.

部局名: Department of Biochemistry

職名: Associate Professor

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。