

平成 31 年 5 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15104

研究課題名（和文）ストレス顆粒を形成する天然変性蛋白質の自己組織化メカニズムの解明

研究課題名（英文）Self-assembly mechanism of intrinsically disordered proteins in stress granules

研究代表者

関山 直孝 (Sekiyama, Naotaka)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：50758810

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ストレス顆粒を形成するIDR同士の相互作用を解析することで、IDRの自己組織化メカニズムを明らかにすることを目的とした。

初めに、RNA結合タンパク質であるTIA-1のIDR領域が液-液相分離（LLPS）を形成することを見出した。LLPS形成の温度依存性について調べたところ、家族性ALS変異が導入されると転移温度が高温側に移動したことから、ALS変異はLLPS形成を促進することがわかった。LLPS形成に働く相互作用を解析するため、核磁気共鳴法（NMR）とトリプトファン蛍光偏光消滅測定を行ったところ、芳香環を含むアミノ酸を介した相互作用が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、IDRをもつRNA結合蛋白質がLLPSを形成することが発見され注目を集めているが、IDRを対象とした構造学的研究は不足していた。さらにTIA-1に関する構造学的研究はほとんど行われていないことから、本研究の成果は学術的に意義深い。

また、ストレス顆粒に含まれるRNA結合蛋白質の機能不全は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）などの神経変性疾患の発症と深い関連があることが知られている。本研究では、家族性ALS変異が、LLPS形成を促進することを明らかにした。この発見は、TIA-1が関与する神経変性疾患の発症メカニズムの解明につながることで期待されることから、医学・薬学的な観点から意義深い。

研究成果の概要（英文）： Stress granule is an aggregation of protein and mRNA that is formed when cells sense stress. Intrinsically disordered proteins (IDPs) mediate the assembly of stress granules. In this study, we aimed to examine the self-assembly mechanism of the IDPs.

We elucidated that the IDR region in TIA-1 (T-cell intracellular antigen 1) formed LLPS (Liquid-liquid phase separation) in neutral pH buffer. The dependence of the LLPS on temperature showed that ALS mutations increased a transition point compared with wild-type, indicating ALS mutations promote LLPS formation. To dissect the interaction in LLPS, we conducted NMR or fluorescence polarization assay. These results suggested that amino acids containing aromatic rings played an important role in LLPS.

研究分野：構造生物学

キーワード：タンパク質 RNA 構造生物学 液液相分離

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞には、多様な環境変化に適応するため、遺伝子発現を精緻に制御する機構が備わっている。DNA から mRNA が合成される「転写」に比べて、mRNA からタンパク質が合成される「翻訳」は、より短期的な応答が可能であることから、ストレス応答に重要な役割を果たしている。翻訳に関わる防御機構の一つに、「ストレス顆粒の形成」がある。細胞が、熱ショックや低酸素などのストレスを感知すると、mRNA を保護・貯蔵するため「タンパク質-RNA 高次凝集体」を形成する。これがストレス顆粒である。このストレス顆粒の形成は、細胞のストレス適応機構として重要な役割を担っているにも関わらず、その形成過程に関する構造的知見はほとんど得られていなかった。

研究開始当初、ストレス顆粒形成の駆動力として注目を集めていたのが、天然変性領域 (IDR: Intrinsically Disordered Region) の自己組織化である。IDR とは、2 次構造など特定の立体構造を持たないアミノ酸領域のことで、ストレス顆粒に局在する RNA 結合タンパク質に多く含まれている。2015 年頃、IDR を含む RNA 結合タンパク質が、ある温度や溶液条件において、油滴のような相を形成すること (LLPS: Liquid-Liquid Phase Separation)、さらに時間経過とともにヒドロゲルを形成することが発見された (Kato et al. 2012 Cell, Burke et al. 2015 Mol Cell, Nott et al. 2015 Mol Cell)。これらの発見から IDR 同士の自己組織化こそがストレス顆粒形成の駆動力であると考えられたが、LLPS 内で働く相互作用様式やヒドロゲルを形成する繊維構造の構築原理は不明であり、原子レベルの構造情報が不足していた。

2. 研究の目的

研究開始当初、IDR による自己組織化に関する構造情報はほとんど得られていなかった。そこで、溶液中でのタンパク質の構造情報を取得できる核磁気共鳴法 (NMR) を用いて、ストレス顆粒を形成する IDR 同士の相互作用を解析することで、IDR の自己組織化メカニズムを原子レベルで明らかにすることを目的とした。

細胞内はタンパク質や核酸が密に詰まった状態であるため、水溶液中とは異なる自己組織化メカニズムが存在する可能性がある。そこで、生きた細胞内のタンパク質の構造情報や相互作用情報を取得できる In-cell NMR 法を用いて、細胞内における IDR 領域の挙動を解析し、細胞内と試験管内との自己組織化メカニズムの違いについて知見を得ることも目標とした。

3. 研究の方法

試料調製については、His-SUMO タグを融合させた TIA-1、および TIA-1 の IDR 領域である Prion-like domain (PLD) を、大腸菌発現系を用いてリコンビナントタンパク質として発現させ、アフィニティークロマトグラフィー等を用いて精製した。TIA-1 には家族性 ALS (筋萎縮性側索硬化症) における遺伝子変異が報告されており、その変異体の作成にも成功した (PLD_{mut})。

LLPS は、リコンビナントタンパク質を 50mM MES buffer, pH 6.5, 150mM NaCl, 1mM DTT の緩衝液に希釈することで調製した。TIA-1 が形成する LLPS の観察には、オリンパス社製倒立型顕微鏡 IX-51 を用いた。チオフラビン T 染色による LLPS の観察では、タンパク質量に対し 1 等量のチオフラビン T を加えた試料を用いて、蛍光顕微鏡観察を行った。

LLPS 形成の温度依存性を調べるための濁度測定は、Shimadzu 社製 UV-2450 を用いて行った。試料温度を 60°C から 10°C まで変化させる過程において、600nm の吸光度を連続測定した。

トリプトファンの蛍光偏光解消測定は、Shimadzu 社製 RF5300 (偏光板付) を用いて行った。蛍光偏光 (Fluorescence polarization: FP) の値は以下の式で計算した。

$$FP = (I_{vv} - GI_{vh}) / (I_{vv} + GI_{vh}) \quad (1)$$

$$G = I_{hv} / I_{hh} \quad (2)$$

ここで、 I_{vv} , I_{vh} , I_{vv} , I_{hh} はそれぞれ、励起光および蛍光の偏光角度が異なる蛍光強度を示す。添字の v は水平 (vertical)、 h は垂直 (horizontal) 方向の偏光を示し、各添字の先に書かれたものが励起側の、後に書かれたものが蛍光側の偏光角度を示す。例えば、 I_{vh} とは、水平の偏光で励起したときの垂直方向の偏光成分の示す蛍光強度を表す。ここで、 G は装置固有の補正值である。

NMR に用いる安定同位体標識試料は、 ^{13}C グルコースおよび ^{15}N 塩化アンモニアを含む M9 最小培地で培養し、上記と同様の方法で精製した $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識体 TIA-1 PLD を用いた。NMR 測定は、ブルカー社製 AVANCEII 800MHz (高感度クライオプローブ付) を用いて行った。

負染色による電子顕微鏡観察では、支持膜貼付メッシュに試料をのせ 1 分間静置した後、1% 酢酸ウラン溶液で洗浄・吸収を行い、乾燥させたものを用いた。測定には、日立社製透過型電子顕微鏡 H-7650 型を用いた。

4. 研究成果

His-SUMO タグを融合させた TIA-1、および TIA-1 の IDR 領域である Prion-like domain (PLD) をリコンビナントタンパク質として調整し、pH が中性付近の緩衝溶液中に希釈したところ LLPS を形成した (図 1)。次に、TIA-1 PLD が形成する LLPS にチオフラビン T を加えて蛍光顕微鏡観察を行った。チオフラビン T は、 β アミロイド繊維に結合し蛍光を発することが知られている。TIA-1 PLD が形成する LLPS にチオフラビン T を加えたところ、LLPS が発光したことから、LLPS 内で働く相互作用は β アミロイド繊維に類似のものであることが示唆された (図 1)。

ストレス顆粒は可逆的に凝集-解離する性質を持つが、TIA-1 PLD が形成する LLPS にもこのような性質があるのかについて解析した。これまでの研究で、LLPS は温度依存的に凝集-解離を繰り返すことが知られていたため、TIA-1 PLD の LLPS を加熱したところ LLPS が消失した。再び常温付近に戻すと LLPS が形成されたことから、TIA-1 PLD が形成する LLPS は可逆的な凝集体であることがわかった。さらにこの LLPS は、ATP-Mg や 1,6-hexanediol を加えることによっても溶解することを見出した。次に、家族性 ALS 変異が TIA-1 PLD が形成する LLPS にどのような影響を与えるかを調べた。野生型 PLD と変異体 PLD_{mut} の LLPS を上記の顕微鏡で観察したところ、PLD_{mut}の方が PLD よりも大きな LLPS を形成することがわかった (図 1)。次に PLD LLPS の温度依存性を調べた。LLPS は数 μm の粒子を形成するため、濁度を測定することでその形成過程をモニターすることができる。LLPS を形成しない 60°C から温度を下げていき、600nm の吸光度を連続測定した。その結果、全ての PLD についてシグモイド型の転移曲線が得られたが、野生型よりも変異体の方が転移温度が高温側に移動していた (図 2)。この結果は、ALS 変異が LLPS 形成を促進していることを示している。

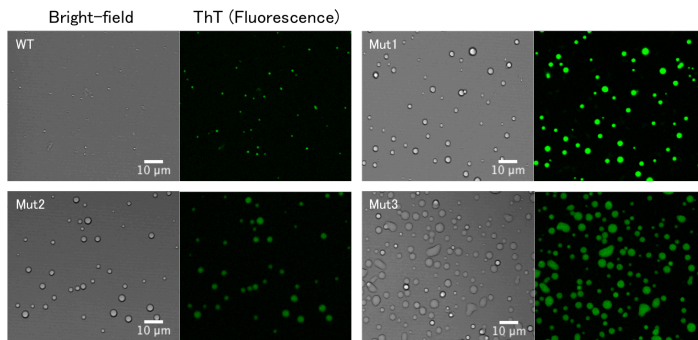


図 1 LLPS の明視野・蛍光顕微鏡観察

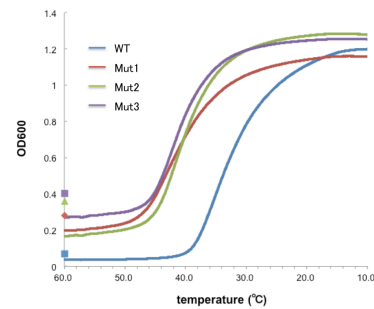


図 2 LLPS 形成の温度依存性

TIA-1 PLD が可逆的な LLPS を形成するのは、TIA-1 PLD 同士が相互作用すること、さらにその相互作用が複数のポイントで起こる多価相互作用であることを示唆している。そこで TIA-1 PLD 間の相互作用を解明するために、NMR による運動性の解析を行った (図 3)。これは、タンパク質主鎖中のアミド基の緩和時間がその運動性に影響を受けることを利用して、構造変化や相互作用している領域を同定する手法である。緩和時間の測定を行った結果、PLD のいくつかの領域で運動性が低下しているアミノ酸残基が存在することがわかった。この領域には芳香環を含むアミノ酸である Trp, Phe, Tyr などが含まれており、これらのアミノ酸残基間の相互作用が LLPS 形成に重要であることを示唆した。

TIA-1 PLD が形成する LLPS 内での運動性を解明するために、トリプトファン蛍光偏光測定を行った。タンパク質に含まれるトリプトファン蛍光は、分子の運動性の違いによって異方性の解消度が異なることが知られている。TIA-1 PLD のモノマー状態と LLPS でのトリプトファン運動性を比較するため、LLPS を形成している試料に 1,6-hexanediol を滴定し蛍光異方性を測定することで、LLPS が消失していく過程におけるトリプトファン運動性を比較した (図 4)。その結果、モノマー状態よりも LLPS においてトリプトファン側鎖の芳香環の

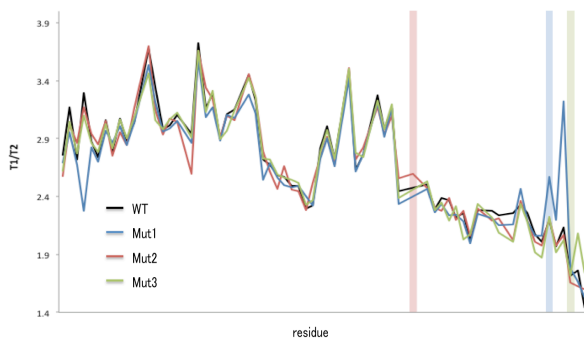


図 4 NMR による運動性の解析

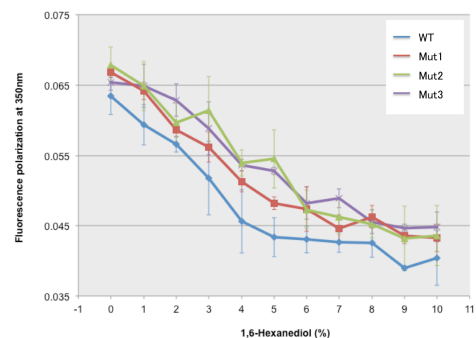


図 3 トリプトファン蛍光の異方性の測定

運動性が遅いことがわかった。これは、LLPS 内ではトリプトファンなど芳香環を含むアミノ酸が相互作用することで運動性が低下していることを示唆している。

TIA-1 PLD は pH が中性付近の緩衝溶液中に希釈した直後に LLPS を形成するが、その後 24 時間ほど経過すると LLPS は消失する。この溶液を電子顕微鏡により観察すると、アミロイド様繊維を形成していることがわかった (図 5)。さらにこのアミロイド繊維は、加熱すると再び溶解し LLPS を形成する可逆的なアミロイド様繊維であることから、この繊維構造の形成にも LLPS 内で働く相互作用が関与していると考えている。現在は、このアミロイド様繊維の構造を極低温電子顕微鏡により解析している。

以上のように、本研究は TIA-1 に含まれる IDR である PLD が形成する LLPS について、NMR や蛍光分光法を用いて相互作用を解析した。その結果、芳香環を含むアミノ酸を介した相互作用が重要であることを明らかにした。

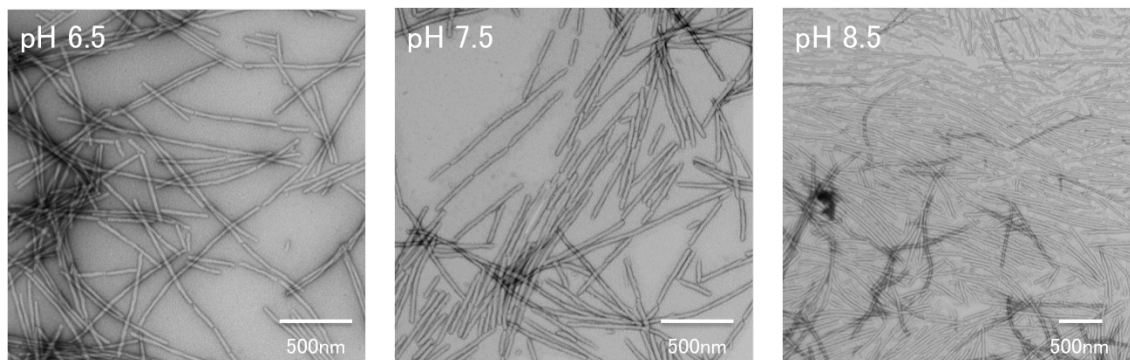


図 5 TIA-1 PLD が形成するアミロイド様繊維

5. 主な発表論文等 なし

〔雑誌論文〕 (計 件)

〔学会発表〕 (計 件)

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
なし

※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。