

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06584

研究課題名(和文)天然変性蛋白質による可逆的凝集機構の構造学的解明

研究課題名(英文)Structural analysis of the reversible self-assembly mechanism by intrinsically disordered proteins

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：TIA-1は、プリオン様ドメイン(PLD)を介して自己組織化する機能を持つ。TIA-1のPLDには、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの神経変性疾患に関連するアミノ酸変異が同定されている。本研究では、これらの変異が引き起こす病態構造を明らかにした。NMR解析では、PLDの動的構造がアミノ酸の物理化学的性質によって決定されることを明らかにした。分子動力学計算と結晶構造解析では、ALS変異であるP362LとA381Tがそれぞれβシート相互作用と高密度な凝縮集合を誘導することを明らかにした。以上の結果は、これらの変異が液滴形成後の病原性アミロイド線維化の可能性を高めていることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TIA-1 PLDの構造学的研究により、神経変性疾患に関連するアミノ酸変異の影響が明らかになった。TIA-1は、何百種類ものタンパク質から構成されるストレス顆粒の中心的な役割を担っている。この事実は、TIA-1による自己組織化の破綻が、他のストレス顆粒構成因子との相互作用ネットワークを破壊し、不可逆凝集さらには神経変性疾患発症の発端になる可能性を示唆する。今回のTIA-1 PLDに関する詳細な構造学的知見により、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの神経変性疾患の発症メカニズムの解明につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：T-cell intracellular antigen-1 (TIA-1) plays a central role in stress granule (SG) formation by self-assembly via the prion-like domain (PLD). In TIA-1 PLD, amino acid mutations associated with neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) or Welscher distal myopathy (WDM) have been identified. In this study, we uncovered the implicit pathogenic structures caused by the mutations. NMR analysis indicated that the dynamic structures of PLD are synergistically determined by the physicochemical properties of amino acids. Molecular dynamics simulations and 3D electron crystallography together with biochemical assays revealed that the ALS mutations P362L and A381T enhanced the self-assembly by inducing β-sheet interactions and highly condensed assembly, respectively. These results suggest that the P362L and A381T mutations increase the likelihood of pathogenic amyloid fibrillization following phase-separated droplet formation.

研究分野：構造生物学

キーワード：液-液相分離 天然変性タンパク質 神経変性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は常に外部からのストレスに晒されており、生体内の恒常性を保つために様々な防御機構を持つ。その一つにストレス顆粒がある。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「蛋白質-RNA 高次凝集体」を形成する。これがストレス顆粒である。現在、この凝集の駆動力として注目を集めているのが、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 結合蛋白質に多く含まれている。2015 年頃、IDR を含む RNA 結合蛋白質が、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が発見された (LLPS: Liquid-Liquid Phase Separation)。この LLPS は、ストレス顆粒だけでなく転写調節やクロマチン動態など様々な細胞機能に関与していることが示唆されており、世界的なホットトピックとなっていた (Boeynaems et al. Trends in Cell Biology 2018)。

ストレス顆粒には、IDR を持つ RNA 結合蛋白質とともに、翻訳が停止した mRNA や 40S リボソーム、翻訳開始因子なども取り込まれる。ストレス顆粒内の蛋白質濃度は細胞質に存在する蛋白質濃度の約 100 倍との報告もあり (Li et al. 2012 Nature)、ストレス顆粒は mRNA と蛋白質を高濃縮することで mRNA をストレスから保護している。一方で、蛋白質分子が密集すると非特異的な相互作用を起こし、不可逆な凝集体を形成してしまう可能性が高くなるにもかかわらず、ストレスが解消されると、ストレス顆粒は拡散するように解離する。このように、IDR は凝集と解離という相反する性質を精緻に制御し、多くの蛋白質を可逆的に濃縮するが、そのメカニズムはわかっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、IDR による自己組織化が蛋白質を機能的なまま凝集・解離させる機構を明らかにすることである。これまでの研究では、IDR の凝集体が、熱変性した蛋白質の凝集体などとは異なり、なぜ可逆的な性質を持つのかと言う物理化学的な理解が不十分である。そこで、IDR が形成する LLPS やアミロイド様繊維などの高次凝集体構造を原子レベルで決定し、可逆的に凝集・解離を繰り返すことができるメカニズムを明らかにする。ストレス顆粒内で蛋白質同士が不可逆な沈殿を形成しないのは、IDR が緩衝材のような働きをしているためであると考えられる。LLPS 環境における IDR と蛋白質との相互作用を解析し、IDR が非特異的な相互作用を抑制し蛋白質を安定化しているメカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究ではモデル蛋白質として、TIA1 (T-cell intracellular antigen 1) を用いた。TIA1 はストレス顆粒に局在する RNA 結合蛋白質で、ノックアウトするとストレス顆粒の形成が抑制されたことから、ストレス顆粒の足場蛋白質であると考えられている (Gilks et al. 2005 Mol. Biol. Cell)。TIA1 は N 末端に RNA 結合ドメイン、C 末端に IDR の性質を持つプリオン様ドメインを持ち (TIA1 PLD)、TIA1 PLD は LLPS を形成する。そこで、LLPS 内での TIA1 PLD の相互作用様式や立体構造を解明するため、下記の実験を行った。

- (1) TIA1 PLD の局所的な構造や運動性を評価するために、核磁気共鳴法 (NMR) を用いた緩和時間測定を行なった。野生型および疾患関連変異型の緩和時間を比較することで、変異による局所的な構造および運動性の変化を残基レベルで特定することを目指した。
- (2) 1.で得られた局所的な運動性の変化を詳細に解析するため、GROMACS による全原子分子動力学計算を行なった。対象としたアミノ酸変異は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に関与することが知られている P362L 変異とした。
- (3) アミノ酸変異による相互作用変化を明らかにするために TIA1 PLD を断片化したペプチドの結晶構造解析を行なった。対象としたアミノ酸変異は、ALS に関与することが知られている A381T 変異とした。

## 4. 研究成果

TIA1 PLD の局所的な構造や運動性を評価するために、核磁気共鳴法 (NMR) を用いた緩和時間測定を行なった。野生型に加え、疾患関連アミノ酸変異型である P362L, A381T, E384K について解析を行なった。P362L, A381T, E384K の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルは、A381T と E384K の変異部位周辺の残基のピークシフトを除いて WT と同一であり、これらの変異体も WT と同様にランダムコイル構造であることが推測された。続いて、各残基の回転運動を探るために、主鎖アミド基の  $^{15}\text{N}$  緩和速度を測定したところ、WT と変異体の間に差異があることがわかった。我々は PLD の緩和速度には、相対的に高い緩和速度と低い緩和速度を持つ残基があることに着目した。この不均一な緩和速度には液滴形成に関わる分子間相互作用の情報が含まれており、その相互作用モードはアミノ酸配列に由来すると推察した。この推測を検証するために、以下の解析を行った。まず、アミノ酸の種類と緩和速度の関係を定量的に評価するために、アミノ酸の種類ごと

に局所構造指数 (ILD) と呼ばれる指標値を割り当て、その値を用いて緩和速度の復元を試みた。この作業は、同じ種類の残基は緩和速度に同じ程度寄与しているという考えに基づいている。しかし、実験値に合うように ILD 値をどのように最適化しても、予測値と実験値の相関係数は 0.5 を超えることはなかった。そこで、ある残基の局所運動は隣接する残基の影響を受けると仮定し、各残基の予測値をその残基とその周囲の残基の ILD 値の幾何平均で与えるモデルを考案した。予測値を算出する残基の領域を変えて様々なモデルを検討した結果、選択した残基とその周囲 4 残基からなる 5 残基の ILD 値の幾何平均 (5 アミノ酸モデル) が実験値を再現する最も良いモデルであることがわかった (図 1A)。予測値と実験値の相関係数は、R1、R2、hNOE でそれぞれ 0.78、0.83、0.81 であった (図 1B)。

(A)

Amino acid sequence	Y	G	Q	P	W	S	Q	Q	G	F
Index of Local Dynamics	1.83	1.35	1.51	1.31	2.25	1.39	1.51	1.51	1.35	1.90
Five amino acids model	geometric mean					geometric mean				
Predicted values	...	...	1.61	1.53	1.56	1.56	1.57	1.52	...	...

(B)

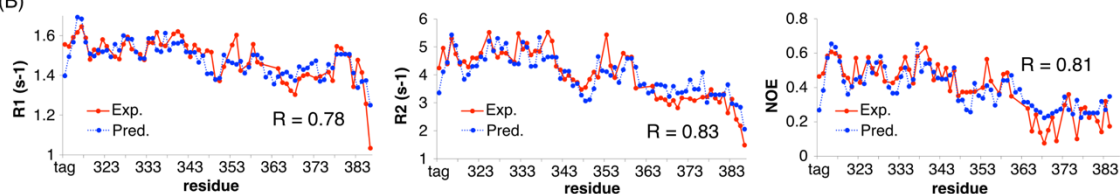
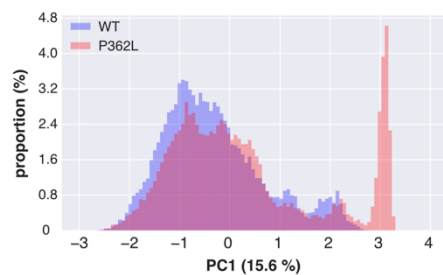


図 1 NMR の緩和速度解析

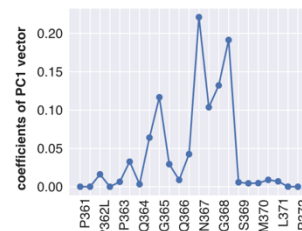
(A) 5 アミノ酸モデルの模式図 (B) 5 アミノ酸モデルによる予測値と実測値の比較

次に、疾患関連アミノ酸変異が動的構造に与える影響を原子レベルで解析するために、全原子分子動力学 (MD) シミュレーションを実施した。ここでは、領域 1 (P361-P372) の WT 型と P362L 型の MD シミュレーションを行った。2 つのトラジェクトリの構造アンサンブルを比較するために、主鎖二面角による主成分分析 (PCA) を行った (図 2A)。WT と P362L の PCA では、第 1 主成分 (PC1) の寄与が 15.6% で、完全に伸びた構造から曲がった構造への最も大きな構造変化を表していた (図 2B, C)。PC1 軸に投影した WT と P362L のヒストグラムから、P362L には WT にはない PC1 値 3.0 の明瞭な集団があることがわかった (図 2A)。この集団は、<sup>370</sup>MLP<sub>372</sub> と <sup>361</sup>PLP<sub>363</sub> モチーフの間の疎水性相互作用と水素結合によって安定化された  $\beta$ ヘアピン構造であり、後者には P362L 変異部位が含まれていた。WT は伸びた構造を保持したが、これは <sup>361</sup>PPP<sub>363</sub> モチーフの二面角の制限により  $\beta$ シート相互作用を形成できなかったためと推定された。これらの結果は、P362L が N 末端 <sup>361</sup>PLP<sub>363</sub> モチーフと C 末端 <sup>370</sup>MLP<sub>372</sub> モチーフの間の  $\beta$ シート相互作用を増強していることを示唆している。注目すべきは、MD シミュレーションで PC1 のダイナミクスに寄与している残基が、NMR 実験において WT と P362L とで一貫して異なる緩和速度を示したことである。

(A)



(B)



(C)

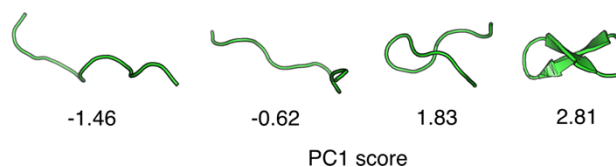


図 2 MD 計算による野生型と P362L の比較

(A) 主鎖二面角による PCA 解析 (B) PC1 固有ベクトルの係数 (C) 各 PC1 得点における代表構造

次に、TIA-1 PLD の自己組織化に対する A381T と E384K の影響を構造的に明らかにするために、領域 2 (G377-Q386) における分子間相互作用に注目した。我々は WT ( $R_{2WT}$ ), A381T ( $R_{2A381T}$ ), E384K ( $R_{2E384K}$ ) の領域 2 ペプチドの結晶化を試みたところ、 $R_{2E384K}$  では結晶を得ることができなかったが、 $R_{2WT}$  と  $R_{2A381T}$  では小さな針状結晶の取得に成功した。結晶が小さく薄いため、X 線回折は不可能であったため、クライオ電子顕微鏡を用いて電子線回折パターンを収集した。 $R_{2A381T}$  は直接法による位相決定を行い、 $R_{2WT}$  は  $R_{2A381T}$  モデルを用いた分子置換法により位相を決定した。その結果、 $R_{2WT}$  と  $R_{2A381T}$  の完全なモデルを構築し、それぞれ  $R_{work}/R_{free} = 25.98/32.54\%$ ,

27.90/34.85%の原子モデルを得た (図 3A, B)。

R2<sub>WT</sub> と R2<sub>A381T</sub> の結晶構造では、R2 ペプチドが形成する基本単位は、Y378, V380, Y383 の疎水的相互作用と R379 と E384 との静電的相互作用によって安定化した逆平行βシートであった。一方、WT と A381T では、逆平行シートが形成する階層構造が全く異なっていることがわかった。R2<sub>WT</sub> は、R2 ペプチドの末端にある YR:YE モチーフの水素結合によって R2 ペプチド同士が接着し (図 3C)、基本単位として 3 量体を形成した三角形のハニカム構造をとっていた (図 3A)。R2<sub>A381T</sub> はβシートを層状に積み重ね、変異部位を含む A381T, Y383, T385 からなる表面が Y383 の疎水性相互作用や A381T と Y378 との水素結合などの相互作用が形成されていた (図 3D, E)。このような明確な階層構造の違いは、領域 2 の中央部に起因する。WT の中間配列は <sup>380</sup>VAG<sub>382</sub> であり、結晶中の溶媒に露出している。一方、A381T の中間配列 <sup>380</sup>VTG<sub>382</sub> はタンパク質間相互作用に寄与し

(A) ていた。これらの結果から、R2<sub>WT</sub> ペプチドの中央部はタンパク質-溶媒相互作用に優先的に関与するが、A381T 変異は R2<sub>A381T</sub> ペプチドの中央部をタンパク質-タンパク質相互作用に有利に変換していることが示唆された。

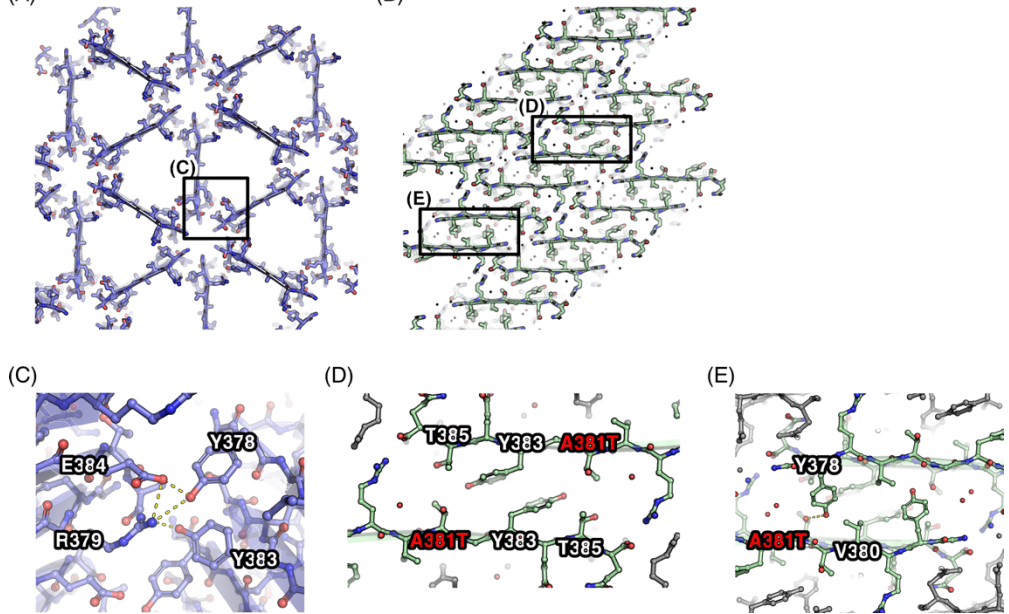


図 3 R2 ペプチドの野生型および A381T 変異型の結晶構造

- (A) R2<sub>WT</sub> の結晶構造 (B) R2<sub>A381T</sub> の結晶構造  
 (C) R2<sub>WT</sub> の末端にある YR:YE モチーフの水素結合  
 (D) R2<sub>A381T</sub> の Y383 による疎水性相互作用 (E) R2<sub>A381T</sub> の A381T と Y378 の水素結合

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関山 直孝、高場 圭章、赤木 謙一、大谷 寧子、今村 香代、寺川 剛、山下 恵太郎、米倉 功治、児玉 高志、朽尾 豪人
2. 発表標題 TIA-1 プリオン様ドメインの ALS 関連変異は高度に凝縮した病原体構造を引き起こす
3. 学会等名 蛋白質科学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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