

研究題目 分子シャペロンによる基質タンパク質の立体構造制御における 分子認識機構の解明と応用

研究組織

研究代表者：石森 浩一郎（北海道大学大学院理学研究院）

共同研究者：齋尾 智英（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：太田 帆香（北海道大学大学院総合化学院）

研究分担者：岸本 遼（北海道大学大学院総合化学院）

研究分担者：菅原 大翔（北海道大学大学院総合化学院）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

最近の研究によって、分子シャペロンの多彩な機能や疾病との関連が明らかになりつつある。新生タンパク質のフォールディングや輸送、または異常な機能や構造を示すタンパク質の分解など、以前より知られていた機能に加え、酵素の活性調節、天然変性タンパク質の集合・離散制御による液-液相分離制御など、分子シャペロンが様々な生命イベントに関与することが明らかになりつつある。その機能不全は、細胞内タンパク質恒常性を破綻させ、アルツハイマー病や筋委縮性側索硬化症 (ALS) などの神経疾患を誘導することから、分子シャペロンによる液-液相分離制御は、神経疾患の発症メカニズムを理解する新たな視点として、医学研究、創薬研究の分野においても注目されている。しかし、分子シャペロンの作用機序についての知見は乏しく、特にその基質認識についての分子レベルでのメカニズムは、ほとんど明らかにされていない。

本研究では、NMR を主体とした立体構造解析、相互作用解析、ダイナミクス解析によって、シャペロンの基質認識メカニズムを解明することを目指した。具体的には、小胞体および細胞質のフォールディングシャペロンおよび相分離シャペロンを中心に、基質タンパク質との相互作用解析、立体構造解析により取り組んだ。さらに、立体構造に基づいた分子設計によって、シャペロンの機能を光によって操作する「光応

答シャペロン」の設計に取り組んだ。

[1-2]研究の方法・経過

小胞体シャペロンの構造解析・相互作用解析については、NMR 構造解析に用いるための基質タンパク質の調製に取り組んだ。安定同位体標識したタンパク質試料をミリグラムスケールで調製するために、大腸菌発現系を用いた検討を行った。特に、これまでは安定性が悪く、大部分が不溶性画分に発現してしまっていた基質タンパク質について、発現コンストラクトの検討、発現タグの検討などを行うことにより、シャペロンとの複合体として数ミリグラムのタンパク質を調製することに成功した。さらに、調製したシャペロン-基質複合体については、NMR 測定を実施した。

相分離シャペロンについては、前年度までに NMR 解析のための安定同位体標識タンパク質の発現・精製系の構築を完了し、相互作用解析に着手していた。今年度は、相分離シャペロンとの相互作用が確認された相分離タンパク質の特定領域について、NMR 構造解析を試みた。具体的には、安定同位体標識された相分離シャペロン-基質複合体を調製し、NMR 測定を行った。

相分離の光操作のための「光応答シャペロン」の開発においては、立体構造に基づいた分子設計により作製した光応答シャペロンの機能評価を、精製タンパク質および細胞内タンパク質の相分離操作によって実施した。

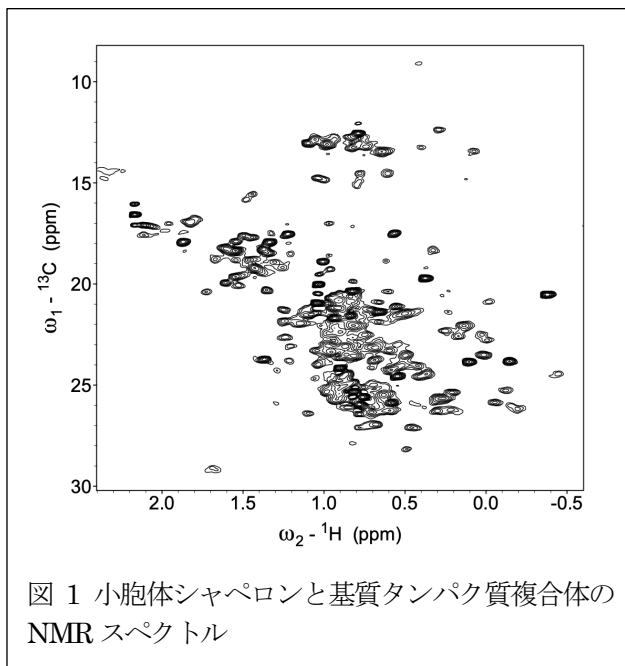
【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

小胞体シャペロンの NMR 解析においては、小胞体シャペロンと基質タンパク質の複合体について、高分解能 NMR スペクトルを取得することに成功した (図 1)。スペクトルの変化についての解析からは、小胞体シャペロンが基質タンパク質のフォールディング状態の違いを見分け、相互作用様式を切り替えている可能性が示唆された。

相分離シャペロンと相分離タンパク質の構造解析においては、NMR による複合体構造解析のため、核オーバーハウザー効果 (NOE) に基づいた構造情報取得を試みた。しかし、分子内の NOE 情報は取得されたものの、分子間での NOE 情報は不十分であり、今後の更なる条件検討が必要であることが考えられた。

光応答シャペロンの開発においては、精製タンパク質の相分離、および細胞内タンパク質の相分離操作が可能であることを示すデータが得られた。



[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

小胞体シャペロンの構造解析においては、シャペロン-基質複合体の構造解析に向け、NMR 測定条件の検討、信号帰属、NOE 情報の取得などを順次進める。本研究の推進によって、小胞体シャペロンによる基質タンパク質認識のメカニズムが明らかになり、小胞体内恒常性維持のメカニズムの一端が明らかになると期待さ

れる。

相分離シャペロンによる相分離タンパク質の認識メカニズムについては不明であるが、本研究によるメカニズム解明によって、相分離制御不良から神経変性疾患に至るメカニズムの一端が明らかになると期待される。

光応答シャペロンの開発によって、生体内の相分離が任意に操作可能になり、相分離を介した機能発現のメカニズムや、相分離制御異常から疾患に至るメカニズムなどの解明を目指した研究における有効なツールとなると期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし。

[3-2]学会発表

川向 ほの香, 石森 浩一郎, 齋尾 智英
核輸送因子 Kap β 2 の FUS に対する液-液相分離制御における Pro-Arg ポリジペプチドによる阻害機構の解明, 第 22 回日本蛋白質科学会年会, つくば, 6月7日, 2022年

川越聡一郎, 松崎元紀, 石森浩一郎, 齋尾智英
高次多量体形成が駆動する heat shock factor-1 液滴の酸化的相転移, 第 22 回日本蛋白質科学会年会, つくば, 6月7日, 2022年

太田 帆香, 川越聡一郎, 久米田 博之, 松崎 元紀, 石森 浩一郎, 齋尾 智英
新規光応答性シャペロンによる液-液相分離制御, 第 45 回日本分子生物学会年会, 幕張, 12月2日, 2022年

[3-3]成果資料等

なし。

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

小胞体シャペロンや相分離シャペロンの NMR 解析においては、今後、立体構造解析のための構造情報を取得する予定である。そこでは、十分な情報を得るために、測定条件の最適化などが必要になると想定される。溶液条件などの検討に加え、必要に応じて発現コンストラクトの最適化なども検討する。