

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：岸本 遼（北海道大学大学院総合化学院）

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：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

細胞生物学的研究の進展により、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・分散制御による液-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（図1）。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組んだ。さらに、相分離シャペロンについては、立体構造に基づいた分子設計によって、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。

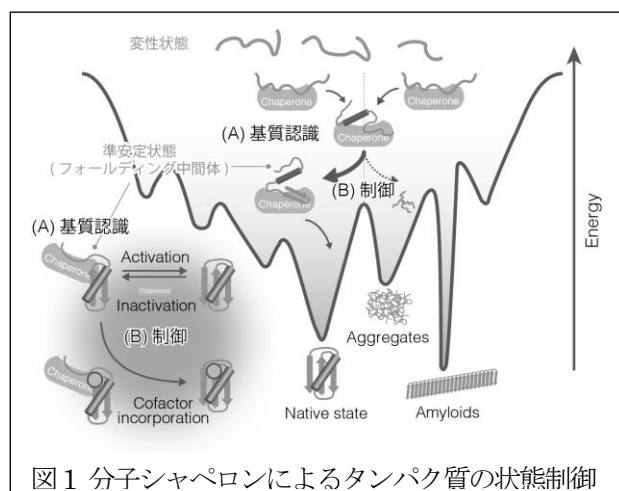


図1 分子シャペロンによるタンパク質の状態制御

[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。NMR解析のためには、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高純度に調製する必要があるが、そのために本研究では大腸菌発現系を用いたタンパク質発現系の構築に取り組んだ。シャペロンの基質となるタンパク質は、フォールディング途上の不安定なタンパク質であり、発現・精製系の構築には複数の条件検討が必要であったが、検討の結果、高純度のタンパク質が安定して調製できるようになりつつある。

相分離シャペロンについても、基質となる相分離タンパク質の発現・精製条件の検討に取り組んだ。これまでに、安定同位体標識した試料の調製に成功し、NMRによる相分離シャペロ

ンとの相互作用解析も実施した。

相分離の光操作のための「光応答シャペロン」の設計については、立体構造に基づいた分子設計に取り組んだ。調製した光応答シャペロンについて、光照射前後での NMR 測定を行うことにより、設計通りにシャペロンの状態が変化していることを確認した。さらに、in vitro での相分離操作を実証するために、顕微鏡観察、濁度アッセイを実施した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

相分離シャペロンの作用機序解明のために、本研究ではまず NMR を用いた相互作用解析を行なった。ここでは、相分離シャペロンを安定同位体標識し、基質となる相分離タンパク質の添加前後での NMR 信号を比較することによって相互作用を評価した。さらに、個々の NMR 信号を帰属することにより、相互作用をアミノ酸残基レベルで評価した。その結果、相分離シャペロンの基質認識部位が推定された。

相分離光操作については、立体構造に基づいて設計した光応答シャペロンを、大腸菌発現系を用いて大量・高純度で調製することに成功した。NMR を用いた解析によって、光応答性を確認した。さらに、光応答シャペロンの機能を評価するために、相分離タンパク質共存下で顕微鏡観察、濁度アッセイを行った結果、相分離液滴の形成・解消が光によって操作可能であることが実証された。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

相分離シャペロンの作用機序解明によって、神経疾患の分子病態の理解につながると期待される。特に、これまでの研究で相分離シャペロンの基質認識部位として推定された部位は、最近報告された疾患関連アミノ酸変異の部位とも近接していたことから、今後、疾患関連変異から機能障害に至るメカニズムについても理解が深まると期待される。

相分離光操作ツールの開発によって、生体内の特定の部位の相分離現象が任意に操作可能になり、生命現象を分子レベルから細胞レベルまで、シームレスに理解するための技術基盤が確立されると期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

Zhu H, Matsusaki M, Sugawara T, Ishimori K,

Saio T. Zinc-Dependent Oligomerization of *Thermus thermophilus* Trigger Factor Chaperone. *Biology*, 10, 1106, 2021.

Saio T, Hiramatsu S, Asada M, Nakagawa H, Shimizu K, Kumeta H, Nakamura T, Ishimori K. Conformational ensemble of a multidomain protein explored by Gd³⁺ electron paramagnetic resonance. *Biophys J*. 120, 2943-2951, 2021.

Kawagoe S, Ishimori K, Saio T. Structural and Kinetic Views of Molecular Chaperones in Multidomain Protein Folding. *Int J Mol Sci*. 23, 2485, 2022. (Review)

Nanaura H, Kawamukai H, Fujiwara A, Uehara T, Aiba Y, Nakanishi M, Shiota T, Hibino M, Wiryasermkul P, Kikuchi S, Nagata R, Matsubayashi M, Shinkai Y, Niwa T, Mannen T, Morikawa N, Iguchi N, Kiriya T, Morishima K, Inoue R, Sugiyama M, Oda T, Kadera N, Toma-Fukai S, Sato M, Taguchi H, Nagamori S, Shoji O, Ishimori K, Matsumura H, Sugie K, Saio T, Yoshizawa T, Mori E. C9orf72-derived arginine-rich poly-dipeptides impede phase modifiers. *Nat Commun*. 12, 5301, 2021.

[3-2]学会発表

太田 帆香, 川越 聡一郎, 松崎 元紀, 久米田 博之, 石森 浩一郎, 齋尾 智英, 新規光応答性シャペロンの創製とそれを利用した液-液相分離の制御], 2021年度生物物理学会 北海道支部・東北支部合同例会, オンライン, 3月9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

小胞体シャペロンの構造解析・相互作用解析については、これまでの研究で最適化された実験条件に基づき、構造解析のための安定同位体標識試料を調製し、NMR 構造解析を推進する。

相分離シャペロンについても、安定同位体標識パターンを変えた相互作用解析、さらには複合体立体構造解析によって、より詳細な立体構造情報を取得し、相分離シャペロンによる基質認識メカニズムを明らかにする。