

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：川向 ほの香（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・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。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、溶液中でのタンパク質の動的な姿を高分解能で捉えることができる NMR を用いた立体構造解析、相互作用解析、ダイナミクス解析を主体とした解析によって、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、シャペロンや液-液相分離タンパク質などの動的なタンパク質やその複合体の立体構造を評価するための手法開発にも取り組んだ。

[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、前年度に引き続き、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。特に、基質として用いたタンパク質は可溶性が低く不安定であり、高純度・高濃度での調整が困難であったため、発現コンストラクトの検討、発現タグの検討などによって改善を試みた。調製したタンパク質については、NMR 測定によって立体構造を評価した。

相分離シャペロンの作用機序解明を目指した研究については、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、NMR を用いた相互作用解析を進めていた。さらに、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 構造解析に着手していた。今年度は、構造解析を継続するとともに、相分離シャペロンが相分離タンパク質の集合状態に与える影響を評価した。また、複数の変異体を用いた機能評価にも着手した。

溶液中での動的タンパク質の構造評価のための手法開発としては、具体的には金属イオンを用いた手法開発に取り組んだ。ここでは、金属イオン、特にランタノイドイオンをタンパク質の特定部位に固定し、X 線小角散乱 (SAXS) 測定を行った。タンパク質に対する一般的な SAXS 測定においては、溶液中でのタンパク質の動的な状態を評価することが可能であるが、そこから得られる情報はタンパク質の概形に関するものであり、タンパク質の特定の部位の

構造状態やその変化についての情報を得ることは困難であった。本研究では、タンパク質を構成する炭素や窒素などの原子と比較して X 線散乱能が高いランタノイドイオンをタンパク質の特定の部位に固定し、コントラスト・マッチ SAXS を行うことによって、ランタノイドイオン間の X 線散乱を検出し、ランタノイドイオン間の相対的な距離情報を取得することを試みた。

【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を目指した研究においては、複合体の立体構造を決定するために、NMR を用いた解析を行った。複合体の構造計算に必要な束縛条件を取得するため、3 次元 NMR 測定を実施した。現在スペクトル解析等を進めている。

溶液中での動的タンパク質の構造評価のための手法開発として、ランタノイドイオンを用いた SAXS 測定を実施した。ここでは、タンパク質の特定の 2 箇所に、ランタノイドタグを固定したサンプルを調製し、スクロース溶液を用いたコントラスト・マッチ条件において SAXS 測定を行った。コントラスト・マッチ条件においては、スクロース溶液の平均電子密度がタンパク質のそれと等しくなり、タンパク質中の原子間に由来する X 線散乱は観察されなくなる。一方で、ランタノイドイオンは窒素や炭素と比較して電子数が多いために、コントラスト・マッチ条件においても X 線散乱が観測され、タンパク質の 2 箇所に固定した金属イオンからの散乱が観測される。本研究では、ランタノイドイオンを固定したタンパク質から、ランタノイドイオンに由来する X 線散乱を観測し、その散乱データからランタノイドイオン間の距離情報を取得することに成功した [Kawamukai et al. *J Phys Chem Lett* 2024]。本手法から得られる距離情報には、存在比率の情報も含まれるため、溶液中のタンパク質が複数のコンフォメーション状態として存在する場合、そのコンフォメーション多型の存在比を反映した距離情報が取得できる。実際に、本研究での測定から、タンパク質の構造多型や、リガンド結合に伴う構造多型の変化を検出することに成功した。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

溶液中での動的タンパク質の構造評価のための手法開発においては、これまでにマルチド

メインタンパク質を対象とした実験を行い、マルチドメインタンパク質の溶液中での構造多型が評価できることを実証したが、本手法は、より動的な性質を持つタンパク質、特に天然変性タンパク質の動的構造の評価にも適用できると期待される。天然変性タンパク質の動的構造は、液-液相分離のメカニズムの解明や、液-液相分離を介した疾患発症のメカニズムの解明において重要な情報となるため、本研究で開発に取り組んだ構造解析手法は、関連分野に波及効果もたらすと期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

Kawamukai H, Takishita S, Shimizu K, Kohda D, Ishimori K, Saio T. Conformational Distribution of a Multidomain Protein Measured by Single-Pair Small-Angle X-ray Scattering. *J Phys Chem Lett*. 2024

[3-2] 学会発表

川向ほの香, 加藤胡都菜, 松崎元紀, 久米田博之, 石森浩一郎, 齋尾智英, 第 23 回日本蛋白質科学会年会, つくば, 2023 年 7 月 5 日, Pro-Arg ポリジペプチドによる核内輸送受容体 Kap β 2 の機能阻害メカニズムの解明

[3-3] 成果資料等

なし。

【4】今後の課題等

相分離シャペロンの作用機序解明を目指した研究においては、相分離シャペロンと基質タンパク質の複合体立体構造の解析を推進する。さらに、立体構造解析から明らかになる相互作用様式を確認・検証するために、立体構造に基づいて設計した変異体を用いた生化学実験などを推進する。さらに、ランタノイドイオンを用いた SAXS 解析を取り入れることによって、相分離タンパク質の溶液中での構造多型を評価し、加えて、相分離シャペロンがその構造多型に与える影響を評価する。以上のように、今後は、立体構造解析から相分離シャペロンの基質認識メカニズムを明らかにすることに加えて、相分離シャペロンが相分離タンパク質の構造多型に与える影響を評価することで、相分離シャペロンの作用機序を詳細に明らかにする。