

2021.7.6 <計 3 枚>

報道機関 各位

立命館大学広報課

タンパク質の新しい異常凝集構造を発見 ～家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の疾患メカニズムの一部を解明～

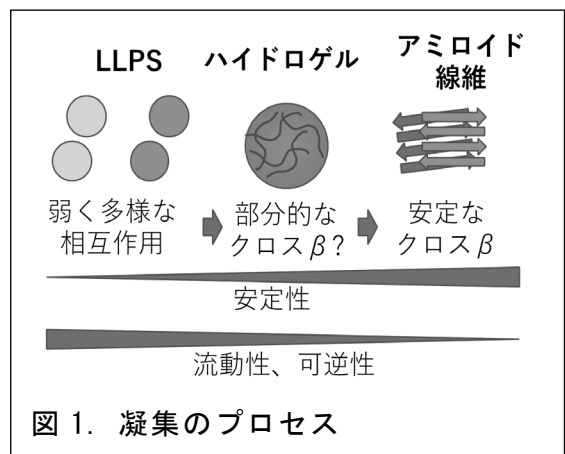
立命館大学薬学部の北原亮教授と生命科学部の吉澤拓也講師、産業技術総合研究所の亀田倫史主任研究員の研究グループは、タンパク質が形成する凝集状態の1つ「液-液相分離(LLPS)」状態を高圧力下で捉える手法を開発し、家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の発症に関わる RNA 結合タンパク質 Fused in Sarcoma(FUS)について、これまで知られていなかった新たな LLPS 状態の発見に成功しました。本研究成果は、2021 年 7 月 2 日(日本時間)にアメリカ化学会の国際誌「Journal of Physical Chemistry B」に掲載されました。

【本件のポイント】

- 家族性 ALS に関わる FUS について、これまで知られている液-液相分離(LLPS)と性質の異なる LLPS(HP-LLPS)を高圧力下で発見した。
- HP-LLPS は、細胞内で沈着しやすい水ゲルやアミロイド線維へ相転移しやすい性質を持つ。
- LLPS ⇄ HP-LLPS → 水ゲル → アミロイド線維という凝集過程を提案した。

【研究の背景】

アルツハイマー病や ALS など多くの神経変性疾患には効果的な治療薬がありません。神経変性疾患の多くは、タンパク質が細胞内に異常凝集することが原因と考えられており、LLPS 形成を経て水ゲル、アミロイド線維など不可逆な固体凝集物へ成熟していくと考えられています(図 1)。ALS の患者では、RNA 結合タンパク質である TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)や Fused in Sarcoma (FUS)の細胞質内での異常凝集が見られるため、その凝集メカニズムや疾患との因果関係について研究が進められています。FUS は一部の家族性 ALS について、その細胞質内での凝集形成が発症の原因であることがわかっているため(Brain 139, 2380-2394, 2016)、その異常凝集の形成メカニズムが盛んに研究されています。



【研究内容】

今回の研究では、高圧力顕微鏡法により FUS-LLPS の圧力と温度の効果を観察しました。この手法により、LLPS が 800 気圧までの加圧により溶けることがわかりました。更に高圧力下での影響を調べるために、3000 気圧以上の耐圧性を持つ光学セルを用いて、紫外可視分光光度測定を行いました。一般に、タンパク質水溶液中に相分離した液滴が形成されると濁度が増加するため、400 nm の光を用いた吸光度測定から LLPS 形成を評価できます。FUS では、2000 気圧までの加圧により濁度が低下し、2500 気圧程度から再び濁度の増加が見られました。加圧による濁度の減少と再増加は、LLPS の消失と新たな形成を意味します。様々な圧力と

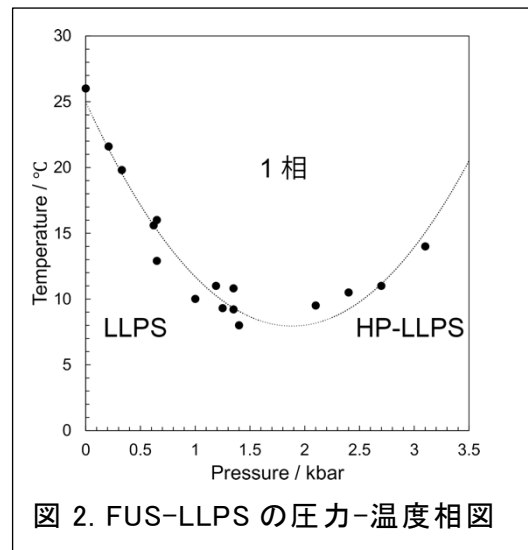


図 2. FUS-LLPS の圧力-温度相図

温度で濁度を測定し相転移点(曇点)を求めることで、LLPS の圧力-温度相図を作製しました(図 2)。2000 気圧(bar)を境に、低圧では通常の LLPS が安定で、高圧では高圧 LLPS (HP-LLPS) が安定であることがわかりました。また、通常の LLPS と HP-LLPS が共存することもわかりました。

図 2 は生理条件に近い 0.15 M NaCl 条件における相図ですが、1.0 M NaCl 条件でも相図を作製しました。また、FUS の LLPS 形成には、ペプチド鎖内に含まれる多数のチロシン(Y)とアルギニン(R)の相互作用が重要であることがわかっているため、5つのチロシンをアラニンに置換し Y-R 相互作用を減弱させた FUS(Y5A)変異体を作製し、同様に圧力-温度相図を作製しました。塩濃度の増加や Y-R 相互作用の減弱により、通常の LLPS と HP-LLPS が共に不安定化したことから、静電的相互作用と Y-R 相互作用が2つの LLPS の安定性に寄与していることがわかりました。

より詳細に相互作用の違いを評価するために、アミノ酸間の相互作用エネルギーを1気圧と3000気圧で分子動力学(MD)計算しました。正負の電荷を有するアミノ酸間の静電的な相互作用は高圧下で不安定化すること、疎水性相互作用と π - π 相互作用、カチオン- π 相互作用は安定化することがわかりました。

これらの結果から、HP-LLPS では静電相互作用が減弱し、疎水性相互作用と π - π 相互作用、カチオン- π 相互作用が強化していることが予想されます。HP-LLPS は、より強固な相互作用で、より密に集合した部分モル体積の小さい状態です。このような構造が、LLPS を溶かす性質を持つ 1,6-ヘキサジオールに対する耐性を生み出すものと考えられます。これらの結果から、LLPS \rightleftharpoons HP-LLPS \rightarrow ハイドロゲル \rightarrow アミロイド線維という凝集過程を提案しました。今後、HP-LLPS が細胞内でも形成されるかを検証する必要があります。

【今後の展開と社会へのインパクト】

神経変性疾患についてアミロイド線維を標的とした医薬品開発が進められていますが、今後、LLPS を標的とした医薬品開発も期待されます。圧力と温度を軸に、標的タンパク質が形成する多様な LLPS を解明することは、凝集メカニズムの解明や医薬品開発に有用であることは間違いありません。本手法は、あらゆるタンパク質に応用でき、タンパク質の産業応用や創薬研究を加速する可能性があります。

【論文情報】

題目: Pressure and Temperature Phase Diagram for Liquid-Liquid Phase Separation of the RNA-Binding Protein Fused in Sarcoma

著者: Shujie Li^a, Takuya Yoshizawa^b, Ryota Yamazaki^c, Ayano Fujiwara^a, Tomoshi Kameda^d, Ryo Kitahara^{c*}

所属: ^a立命館大学大学院生命科学研究科、^b立命館大学生命科学部、^c立命館大学薬学部、^d産業技術総合研究所人工知能研究センター

*: 責任著者

雑誌: Journal of Physical Chemistry B

巻ページ: 125, 6821-6829

DOI: /10.1021/acs.jpbc.1c01451

URL: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jpbc.1c01451>

【用語解説】

■液-液相分離

液体が2成分以上で形成されるとき、成分比が異なる複数の液相を形成する場合がある。FUS の場合は、タンパク質濃度が薄い相と濃い相に分離し、今回の実験では濃い相が液滴を形成し顕微鏡により観察できた。

■ π - π 相互作用

芳香環など π 電子を有する官能基間に働く相互作用である。アミノ酸ではトリプトファンやフェニルアラニン、チロシンの芳香族性は知られているが、アルギニンもそれらに匹敵する芳香族性を有する。

■カチオン- π 相互作用

正電荷を有する官能基と芳香環など π 電子を有する官能基間の相互作用である。中性付近で正電荷を有するアミノ酸として、リシンやアルギニン、ヒスチジンがある。

【取材・内容についてのお問い合わせ先】

(内容について)立命館大学薬学部 北原亮

TEL.077-561-5751 E-mail: ryo@ph.ritsumei.ac.jp

(取材について)立命館大学広報課 名和

TEL.075-813-8300 E-mail: r-koho@st.ritsumei.ac.jp