

生物学的相分離の制御

吉澤 拓也¹・森 英一朗²

はじめに

通常、構造を持つドメインは20種類のアミノ酸がバランス良く含まれていることが多く、Anfinsenのドグマに従い、特定の構造にフォールドする。しかし、タンパク質の配列を眺めていると、限られた種類のアミノ酸に富んだ領域を目にすることがある。実際には、こうした配列はプロテオーム全体の2～3割ほどを占めるとも言われている。これらは低複雑性 (low-complexity; LC) ドメイン (もしくは天然変性領域) と呼ばれ、相分離との関連が見いだされているものがあり注目を集めている。LCドメインは、繰り返しパターンを持つことが多いが、そうした配列の機能は長年謎に包まれてきた。単独では構造を取りにくいLCドメインだが、同じ配列同士が並び、βシートを形成する cross-βポリマーをつくり、機能的にも重要であることが明らかになりつつある。

生物学的相分離とFUS

生物学的相分離とは、細胞内 (溶液中) の生体分子が濃い相と希薄な相の二相の液体に分離する現象であり、濃い相として主にドロップレットが観察される。ドロップレットはさまざまな相互作用により形成されるが、基本となるのは一つの分子が二つ以上の分子と相互作用する多価相互作用である。もっとも研究が進められているRNA結合タンパク質fused in sarcoma (FUS) は、膜のないオルガネラとも呼ばれる細胞内のドロップレット形成の中心的な役割を果たすと考えられている。FUSが関与する膜のないオルガネラの中には、細胞質のストレス顆粒や、核内のDNA修復部位における顆粒、パラスペックルなどがある。FUSのドメインのうち、単独で構造を持つのはRNA結合モチーフ (RRM) とZnフィンガーモチーフ (ZnF) のみであり、大部分の領域でアミノ酸組成の偏りが見られる。特にN末端から始まるLCドメインはプリオン様ドメイン (PrLD) と呼ばれ、セリン (Ser)、グルタミン (Gln)、チロシン (Tyr)、グリシン (Gly) が全体の80%以上を占める。Gly/Ser-Tyr-Gly/Ser (G/S-Y-G/S) の繰り返しが多くみられるといった特徴を持つ。このほか、アルギニン (Arg)-グリシン (Gly)-グリシンの繰り返し領域であるRGGリピートも複数存在している (図1)。

FUS同士の相互作用についてWangらは、LCドメインにあるさまざまなアミノ酸を変異させてドロップレットの形成能を評価し、あらゆるアミノ酸がドロップレットに影響を与えることを明らかにした¹⁾。なかでも、N末端LCドメイン中のTyrとRGGリピート中のArgによるカチオン-π相互作用の重要性が示された。また、ドロップレットは溶液条件や温度などのわずかな変化によっても影響を受けるため、細胞内でも緻密な制御が行われていると考えられる。

cross-βポリマー構造

FUSは直鎖状ポリマー形成能を持つことが報告されており、X線の回折パターンよりβシート構造が見いだ

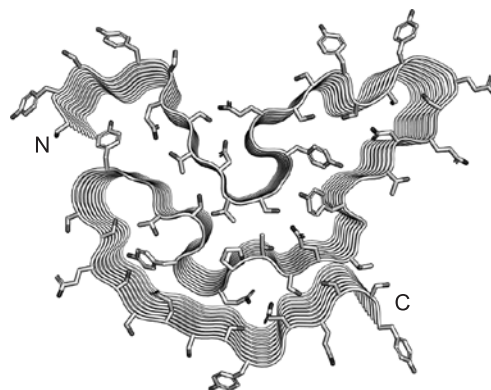
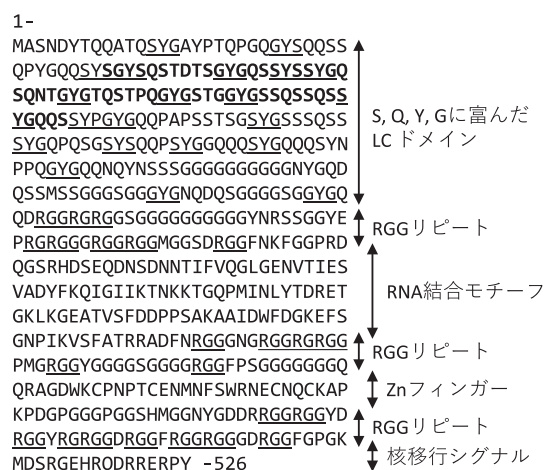


図1. FUSのアミノ酸配列 (上) と cross-βポリマー構造 (下)。G/S-Y-G/S配列およびRGG配列を下線で示した。構造で示している配列を太字で示した。ドメインを配列の右に示した。

著者紹介 ¹立命館大学 生命科学部 生物工学科 (助教) E-mail: t-yosh@fc.ritsumeai.ac.jp

²奈良県立医科大学 医学部 未来基礎医学 (准教授) E-mail: emori@naramed-u.ac.jp
生物工学 第98巻 第5号 (2020)

されたことから、アミロイド様のcross- β ポリマー構造が示唆された²⁾。Cross- β ポリマーには病気に関連する構造のイメージがあるが、FUSのcross- β ポリマーは転写調節において重要な役割を担うことが示唆されている。転写活性化の場においてcross- β ポリマー化したFUSがRNAポリメラーゼIIのC末端の繰り返し配列と相互作用することが明らかとされた。RNAポリメラーゼIIのC末端がリン酸化されることで相互作用が失われることも同時に示された³⁾。この研究により、cross- β ポリマーによる転写制御の可能性が示唆され、機能するcross- β ポリマーが強く印象付けられた。

さらに興味深いことに、FUSのcross- β ポリマーは、他の病的とされる凝集体をつくるアミロイドとは異なり、細胞内で機能する膜のないオルガネラと同様の柔軟性を示す。2017年には、固体NMR法により、FUSのcross- β ポリマーの立体構造がTyckoらのグループによって明らかにされた⁴⁾。LCドメインのうち、39番目から95番目のアミノ酸までの57残基がコア領域となる構造であった(図1)。彼らのグループはFUS以外にもアミロイド β や α シヌクレインのcross- β ポリマー構造も同様に決定することに成功しているが、これらの病的と考えられているcross- β ポリマーではアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニンといった疎水性のアミノ酸によるコアが形成されていた。一方、FUSは純粋な疎水性アミノ酸をほとんど含まず水素結合により安定化されていた。また、アミロイド β は伸長方向に対して2回軸あるいは3回軸の対称性を持っていた。他のcross- β ポリマーと比較した際のこれらの違いが、FUSのcross- β ポリマー特有の可逆的柔軟性、つまり生物学的機能性の要因となることが示唆された。

翻訳後修飾による制御

翻訳後修飾がFUSの相分離の状態を変化させることも徐々に明らかとなってきた。N末端のLCドメインのリン酸化がFUSの相分離を抑制することが報告されている^{5,6)}。リン酸化サイトにはDNA損傷部位で機能するキナーゼであるDNA-PK (DNA-dependent protein kinase) によるリン酸化部位も含まれている。このことから、DNA損傷部位では非リン酸化状態のFUSが相分離によりドロップレットを形成することで修復の場をつくり、修復の完了とともにDNA-PKによりFUSがリン酸化され、ドロップレットが解消することが示唆される。

他の翻訳後修飾として、アルギニン残基のメチル化についても研究が進められている。RGG中のアルギン残

基とN末端LCドメインのチロシン残基とのマルチバレント(多価的)なカチオン- π 相互作用が相分離を引き起こすが、メチル化によってアルギニン残基の電荷が弱まることにより、ドロップレットを形成する相互作用が減少することが明らかとなった^{7,8)}。

相分離シャペロンKap β 2による制御

翻訳後修飾以外のFUSの相分離の制御因子としては、近年明らかとなったFUSの相分離シャペロンとなる核輸送受容体タンパク質があげられる。FUSはC末端に核移行シグナルを持つことから、主に核内に局在する。輸送は核内輸送受容体であるインポーチン β ファミリーによって行われるが、FUSはそのうちKaryopherin β 2 (Kap β 2) によって輸送される。これまで、インポーチン β ファミリーは核内へと輸送する働きのみが知られてきたが、FUSの相分離を抑制する機能を有することが明らかとなった^{9,10)}。Kap β 2はFUSの核移行シグナルとの相互作用に加えて、相分離を促進するLCドメインとも弱く相互作用することでFUSの相分離を抑制する相分離シャペロンとして機能する。

膜のないオルガネラのうち、ストレス時に一時的に形成されるストレス顆粒があるが、FUSはストレス顆粒の構成要素としても知られている。FUSはストレス時にはKap β 2の機能の低下により細胞質に蓄積することでストレス顆粒の駆動因子となり、ストレスから解放された際にKap β 2はストレス顆粒からFUSを引き出し、核内へと輸送することでストレス顆粒を消失させると考えられる。

核内タンパク質はLCドメインを持つものが多いことが知られている。Kap β 2以外のインポーチン β ファミリーでも同様の相分離抑制能を持つことから、相分離シャペロンとしての機能は、インポーチン β ファミリーの共通の機能であることが示唆される。

破綻因子

これまで見てきたように、FUS単独で見てもさまざまな相互作用のバランスによって柔軟な相分離ドロップレットが形成されている。その破綻は、疾患と密接に関わると考えられている。FUSが注目を集められるようになった要因として、重篤な神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) に関連する遺伝子変異が数多く見つかったことがあげられる¹¹⁾。その多くは核移行シグナル領域のアミノ酸変異をもたらしものであった。それらの変異体ではFUSの局在が細胞質に偏ることから、Kap β 2によって認識されな

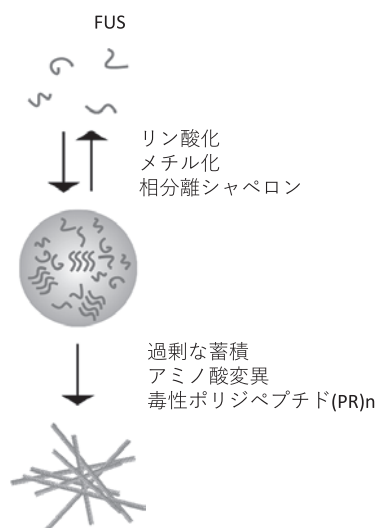


図2. FUSの状態変化と制御因子

くなることで、細胞質において相分離異常を起こすことが示唆された。試験管内実験でもFUSは時間経過によってドロップレットの状態から凝集体へと変化していく。形成物の内部の特定の相互作用が徐々に強固になることにより柔軟性が失われることが原因と考えられる。したがって細胞内では、強固な凝集体を形成する前に相分離シャペロンあるいは翻訳後修飾などによって適切に制御されることが重要である。

遺伝性ALSの因子として、*C9orf72* 遺伝子の繰り返し配列の増幅がある。イントロン領域の6塩基(GGGGCC)の繰り返し回数の増幅により、開始コドンATG非依存的翻訳[repeat-associated non-ATG (RAN) translation]により5種類のポリジペプチドが産出される。そのうち、アルギニンを含むプロリン-アルギニンポリジペプチド(PRn)とグリシン-アルギニンポリジペプチド(GRn)が高い細胞毒性を持つことが報告されている^{12,13}。これらの毒性ポリジペプチドは、FUSなどのcross-βポリマーと結合することが明らかとなっており、相分離異常をもたらすことが毒性のメカニズムとなると考えられている^{14,15}。

また、*C9orf72* 遺伝子の繰り返し増幅によって、核と細胞質の間の物質の輸送に異常をきたすことが知られており¹⁶、*C9orf72* 遺伝子由来の毒性ポリジペプチドが核輸送タンパク質に与える影響も示唆された。筆者らは最近、PRnが核輸送受容体かつ相分離シャペロンである

Kapβ2に結合し、結果として相分離シャペロンとしての機能阻害をもたらすことを見いだした¹⁷。細胞内の物質輸送を通じた恒常性維持と生物学的相分離の制御機序が、徐々に明らかになってきている。

以上のことから、FUSの相分離ドロップレットは細胞内においてもさまざまな因子による制御や影響を受けると考えられる(図2)。

おわりに

これまで、天然変性領域としてとらえられていたLCドメインがcross-βポリマーを形成して機能することが徐々に明らかとなってきた。しかし、cross-βポリマー形成の制御機構については未だ明らかにされていない点も多い。また、FUS以外にも特定のアミノ酸が並んだ配列は多く存在しており、謎の多いLCドメインが数多く残されている。今後のさらなる研究によりLCドメインの意義が明らかになっていくことを期待する。

謝 辞

筆者らは偶然、米国・テキサス大学の同じキャンパスで、同時期に独立してこれらに関連した成果をあげることができた。一連の研究を持続的に支援し、さらに日本での研究活動を進めていくにあたり支援を頂いた、Steven McKnight教授とYuh Min Chook教授に深く感謝する。本研究成果の一部は、AMED国際脳課題(JP19dm0307032)の支援を受けた。

文 献

- 1) Wang, J. *et al.*: *Cell*, **174**, 688 (2018).
- 2) Kato, M. *et al.*: *Cell*, **149**, 753 (2012).
- 3) Kwon, I. *et al.*: *Cell*, **155**, 1049 (2013).
- 4) Murray, D. T. *et al.*: *Cell*, **171**, 615 (2017).
- 5) Han, T. W. *et al.*: *Cell*, **149**, 768 (2012).
- 6) Ryan, V. H. *et al.*: *EMBO J.*, **36**, 2951 (2017).
- 7) Hofweber, M. *et al.*: *Cell*, **173**, 706 (2018).
- 8) Qamar, S. *et al.*: *Cell*, **173**, 720 (2018).
- 9) Yoshizawa, T. *et al.*: *Cell*, **173**, 693 (2018).
- 10) Guo, L. *et al.*: *Cell*, **173**, 677 (2018).
- 11) Kwiatkowski, T. J. *et al.*: *Science*, **323**, 1205 (2009).
- 12) Kwon, I. *et al.*: *P Science*, **345**, 1139 (2014).
- 13) Freibaum, B. D. and Taylor, J. P.: *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, 1 (2017).
- 14) Lin, Y. *et al.*: *Cell*, **167**, 789 (2016).
- 15) Shi, K. Y. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **114**, E1111 (2017).
- 16) Freibaum, B. D. *et al.*: *Nature*, **525**, 129 (2015).
- 17) Nanaura, H. *et al.*: *bioRxiv*, 812099 (2019).