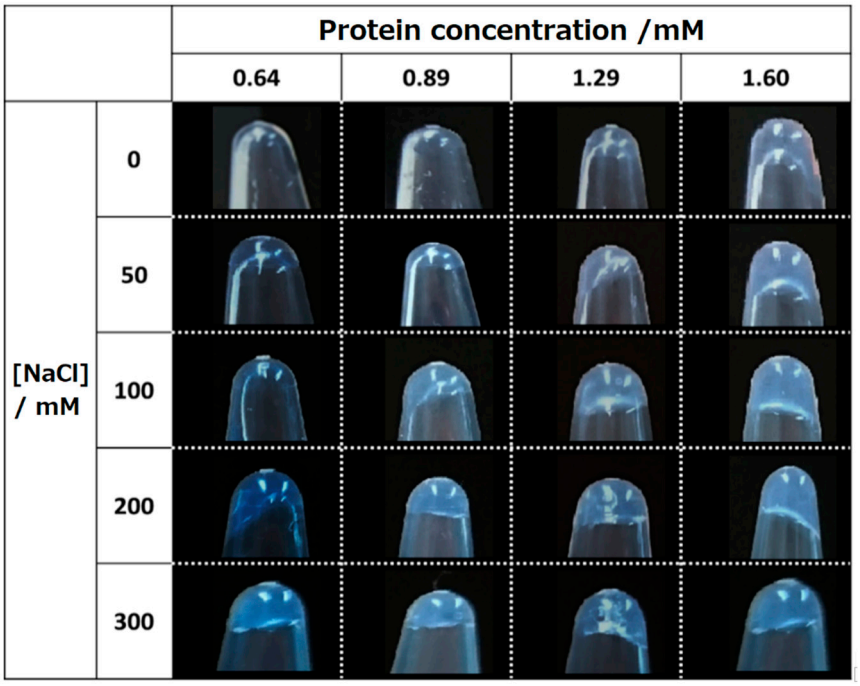
185　家族性変異によるストレス顆粒過剰形成の分子機序解明	吉村　優一

【目的】細胞は外部からのストレス刺激に応答して、組織化した構造体であるストレス顆粒を一過的に形成する。ストレス顆粒は、mRNA の翻訳を一時的に停止することでストレス環境下での細胞の生存を図る。その一方で、ストレス顆粒が細胞内で過剰に蓄積すると、不溶性の異常凝集体へと相転移して、神経変性を誘導する。重篤な神経変性疾患の予防法や有効な治療法を確立するためには、異常凝集体の形成を制御する原理を理解する必要がある。ストレス顆粒を構成する RNA 結合蛋白質の天然変性領域 （プリオン様ドメイン、PrLD）は、凝集しやすいアミノ酸組成で構成されることからストレス顆粒や不溶性凝集体の形成において重要な役割を果たすと考えられる。遺伝性の疾患では、PrLD のアミノ酸変異が同定されている。本研究では、PrLD の自己重合における蛋白質変異の影響を分子レベルで明らかにすることを目指した。

【方法】RNA 結合蛋白質 T-cell intracellular antigen 1（TIA-1）が構造転移する条件を体系的に検証して相図を作成し、得られた相図に基づいて、NMR 解析を遂行した。

【結果】蛋白質濃度および塩濃度の上昇に伴い、TIA-1 は溶液状態からハイドロゲルへと相転移した。TIA-1 ハイドロゲルの NMR 測定において、運動性の高い領域および低い領域の NMR 信号をそれぞれ取得することができた。

TIA-1 RRM3-PrLD ハイドロゲル形成の観察



185. 家族性変異によるストレス顆粒過剰形成の分子機序解明

吉村　優一

*広島大学 大学院理学研究科 数理分子生命理学専攻 分子生物物理学研究室

Key words：ストレス顆粒，相転移，T-cell intracellular antigen 1，天然変性領域，核磁気共鳴

緒　言

ストレス顆粒は、熱や酸化などの外部刺激に応答して細胞内で組織化する顆粒状構造体である。ストレス顆粒は、mRNA を顆粒内に取り込み翻訳を一時的に停止することで、蛋白質の蓄積による細胞の損傷を防ぐ［1］。ストレス顆粒の形成は可逆的であり、細胞がストレスから回復するとストレス顆粒は消失 （脱重合） し、翻訳が再開する。ストレス顆粒の主要構成成分として T-cell intracellular antigen 1（TIA-1）などの RNA 結合蛋白質が同定されている［2］。TIA-1 は、3 つの RNA 認識モチーフ（RRM）および prion-like domain（PrLD）とよばれるプリオン蛋白質とアミノ酸組成が類似するドメインをもつ（図 1）。PrLD は特定の立体構造をもたない天然変性領域であり、*in vitro* 実験では容易にハイドロゲル状態へと相転移する。このことから、TIA-1 は PrLD の自己重合を介してストレス顆粒へ構造転移し、細胞内での反応を区画化する場を提供すると考えられる［3］。

ストレス顆粒は生体の防御機構の一翼を担う一方で、ストレス顆粒の可逆性が失われると、筋萎縮性側索硬化症（ALS）などの神経変性疾患の原因となる封入体（不溶性凝集体）の蓄積が認められる［4］。遺伝性の疾患では、PrLD のアミノ酸変異が同定されている［5，6］。TIA-1 の PrLD 変異が原因となる遺伝性疾患として Welander 遠位型ミオパチーが知られている［7，8］。これらの重篤な疾病の予防法や有効な治療法を確立するためには、PrLD の自己重合に着目したストレス顆粒の形成や不溶性凝集体形成のメカニズムを解明することが重要である。本研究では、野生型および変異型の TIA-1 が顆粒状構造体や不溶性凝集体へと状態転移する条件を体系的に検証して相図を作成し、得られた相図に基づいて TIA-1 が構造転移する分子機序を明らかにすることを目的とした。

野生型 TIA-1 の RRM3-PrLD を発現・精製し、蛋白質濃度および塩濃度に依存した相転移を観察したところ、蛋白質濃度・塩濃度の上昇に伴い溶液状態からゲル状態への相転移が見られた。ゲル化した試料について、固体 NMR 測定をおこない、運動性の高い領域および低い領域の NMR 信号が検出された。今後は、野生型と変異型における相図および固体 NMR スペクトルの異同から、PrLD の自己重合を介した構造転移のメカニズムを明らかにする。

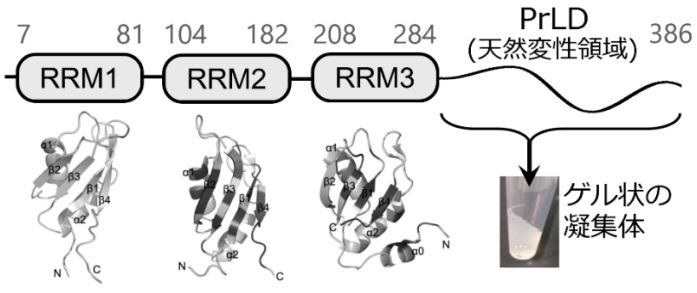


図 1. TIA-1 の構造と PrLD の凝集

*現在の所属：広島大学 大学院統合生命科学研究科 数理生命科学プログラム

方　法

1.　目的蛋白質の発現・精製

大腸菌を用いた組換え蛋白質として、N 末端側に His タグを融合した TIA-1 PrLD（291–386）および RRM3-PrLD（199～386）を調製した。NMR 測定のための安定同位体 （$^{13}C/^{15}N$） 標識した蛋白質の調製では、^{13}C-グルコースおよび ^{15}N-塩化アンモニウムを M9 培地に添加して、目的の蛋白質を発現した。His タグを融合した蛋白質は、ニッケルカラムおよびゲル濾過カラムを用いて精製した。精製中の溶液は、50 mM Tris-HCl および 2 M 尿素を含む緩衝液（pH 9.0）を使用し、His タグの除去を目的として蛋白質本体との間に Tobacco Etch Virus（TEV）プロテアーゼ認識配列を挿入したが、His タグは除去せずそのまま利用した。

TIA-1 の天然変性領域である PrLD（291～386）単独では精製過程で凝集体を形成したため、以下の実験ではすべて RRM3-PrLD（199～386）を使用した。ゲル濾過カラムで精製した RRM3-PrLD は、50 mM Tris-HCl（pH 9.0）で透析して濃縮した後、凍結保存した。溶液は、実験の直前に限外濾過もしくは透析によりバッファー置換した。

2. NMR 測定

固体 NMR 測定は、^{1}H 共鳴周波数 400 MHz NMR 装置（Bruker）を使用した。プローブは 4 mm wide variable temperature（WVT）マジック角回転（MAS）プローブを用いた。

結果および考察

1. TIA-1 RRM3-PrLD のハイドロゲル相転移

In vitro 実験において、TIA-1 はハイドロゲル状態へと相転移する［3］。溶液状態からゲル化する条件を検証するために、RRM3-PrLD の相転移の蛋白質濃度および塩濃度依存性を調べた（図 2）。蛋白質濃度および塩濃度の増加に伴い、RRM3-PrLD は溶液状態からゲル状態へと相転移した。

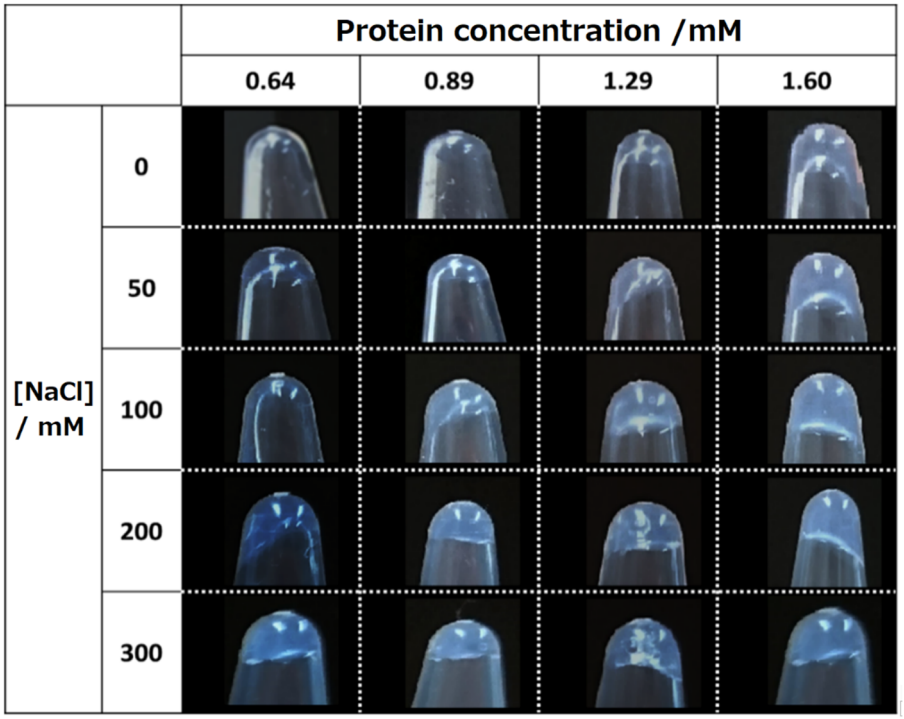


図 2.　TIA-1 RRM3-PrLD ハイドロゲル形成の観察
蛋白質濃度および塩濃度を上昇させると、蛋白質溶液はゲル化した。

2. TIA-1 RRM3-PrLD ハイドロゲルの NMR 解析

NMR 測定のための安定同位体（$^{13}C/^{15}N$）標識した RRM3-PrLD を発現・精製し、固体 NMR スペクトル測定をおこなった（図 3）。交差分極（CP）／MAS 測定では運動性が低く、CP による ^{1}H から ^{13}C への磁化移動が起こりやすい領域の NMR 信号が検出されるのに対して、パルス飽和移動（PST）／MAS 測定では運動性が高い領域の NMR 信号が強調される。双極子デカップリング（DD）／MAS 測定では、運動性による強調の無い NMR スペクトルが得られる。図 3 に示すように、CP／MAS 測定と PST/MAS 測定で得られる NMR スペクトルは大きく異なった。

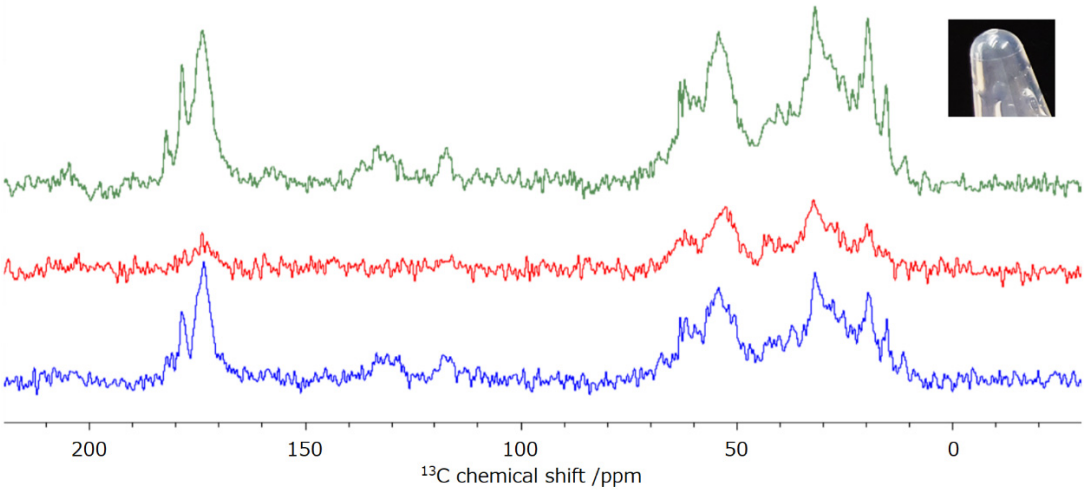


図 3. TIA-1 RRM3-PrLD ハイドロゲルの固体 NMR スペクトル
50 mM Tris-HCl（pH 9.0）、50 mM NaCl 条件下で 1.0 mM RRM3-PrLD が形成するハイドロゲル（右上図）の NMR スペクトルを測定した。試料回転 3 kHz。スペクトルは、DD/MAS（青）、CP/MAS（赤）、PST/MAS（緑）。

3. 今後の展望

我々の先行研究では、相図を利用することで蛋白質凝集化が蛋白質の濃度に依存することを明らかにしてきた［9］。本研究では、蛋白質の濃度に着目するとともに、TIA-1 の NMR 解析から、PrLD の重合を介したストレス顆粒への構造転移や不溶性凝集体への相転移の分子機序を明らかにすることを目的として、研究をすすめてきた。PrLD 自己重合への分子間相互作用の寄与を調べるために、異なる塩濃度（50、100、200、300 mM NaCl）における RRM3-PrLD（蛋白質濃度 1.0 mM）ハイドロゲル試料を準備し、現在までに各種 ^{13}C NMR スペクトルを取得している。今後は、NMR 信号の帰属し、運動性の高い領域および低い領域をアミノ酸残基レベルで同定する。また、疾患に関連する変異体（E384K）についても、相図の作成および NMR 測定を遂行し、野生型と変異型における相図および固体 NMR スペクトルの異同から、PrLD の自己重合を介した構造転移のメカニズムの解明を目指し、研究をすすめる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、広島大学大学院理学研究科の楯眞一教授である。

文　献

1） Anderson P, Kedersha N. RNA granules. J Cell Biol. 2006 Mar 13;172(6):803-8. Epub 2006 Mar 6. PMID: 16520386 DOI: 10.1083/jcb.200512082

2） Tian Q, Streuli M, Saito H, Schlossman SF, Anderson P. A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. Cell. 1991 Nov 1;67(3):629-39. PMID: 1934064 DOI: 10.1016/0092-8674(91)90536-8

3) Kato M, Han TW, Xie S, Shi K, Du X, Wu LC, Mirzaei H, Goldsmith EJ, Longgood J, Pei J, Grishin NV, Frantz DE, Schneider JW, Chen S, Li L, Sawaya MR, Eisenberg D, Tycko R, McKnight SL. Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. Cell. 2012 May 11;149(4):753-67. PMID: 22579281 DOI: 10.1016/j.cell.2012.04.017

4) Fan AC, Leung AK. RNA Granules and Diseases: A Case Study of Stress Granules in ALS and FTLD. Adv Exp Med Biol. 2016;907:263-96. PMID: 27256390 DOI: 10.1007/978-3-319-29073-7_11

5) Kim HJ, Kim NC, Wang YD, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z, MacLea KS, Freibaum B, Li S, Molliex A, Kanagaraj AP, Carter R, Boylan KB, Wojtas AM, Rademakers R, Pinkus JL, Greenberg SA, Trojanowski JQ, Traynor BJ, Smith BN, Topp S, Gkazi AS, Miller J, Shaw CE, Kottlors M, Kirschner J, Pestronk A, Li YR, Ford AF, Gitler AD, Benatar M, King OD, Kimonis VE, Ross ED, Weihl CC, Shorter J, Taylor JP. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. Nature. 2013 Mar 28;495(7442):467-73. Epub 2013 Mar 3. PMID: 23455423 DOI: 10.1038/nature11922

6) Li YR, King OD, Shorter J, Gitler AD. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. J Cell Biol. 2013 Apr 29;201(3):361-72. PMID: 23629963 DOI: 10.1083/jcb.201302044

7) Hackman P, Sarparanta J, Lehtinen S, Vihola A, Evilä A, Jonson PH, Luque H, Kere J, Screen M, Chinnery PF, Åhlberg G, Edström L, Udd B. Welander distal myopathy is caused by a mutation in the RNA-binding protein TIA1. Ann Neurol. 2013 Apr;73(4):500-9. Epub 2013 Feb 11. PMID: 23401021 DOI: 10.1002/ana.23831

8) Klar J, Sobol M, Melberg A, Mäbert K, Ameur A, Johansson AC, Feuk L, Entesarian M, Orlén H, Casar-Borota O, Dahl N. Welander distal myopathy caused by an ancient founder mutation in TIA1 associated with perturbed splicing. Hum Mutat. 2013 Apr;34(4):572-7. PMID: 23348830 DOI: 10.1002/humu.22282.

9) Yoshimura Y, Lin Y, Yagi H, Lee YH, Kitayama H, Sakurai K, So M, Ogi H, Naiki H, Goto Y. Distinguishing crystal-like amyloid fibrils and glass-like amorphous aggregates from their kinetics of formation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Sep 4;109(36):14446-51. Epub 2012 Aug 20. PMID: 22908252 DOI: 10.1073/pnas.1208228109