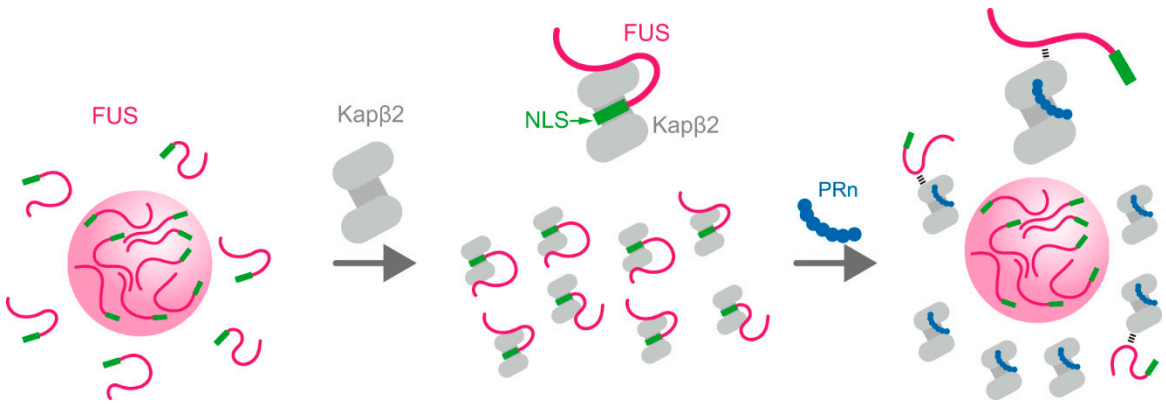
168　トランスポーチン1による相分離性タンパク質制御機構	吉澤　拓也

【目的】トランスポーチン1（カリオフェリンβ2：Kapβ2）は核内輸送受容体タンパク質であり、細胞質で翻訳されたタンパク質の核移行シグナル（Nuclear localization signal：NLS）を認識して結合し、核内へと輸送するはたらきを持つ。Kapβ2 が核内へと輸送するタンパク質群は高い相分離性を有しており、Kapβ2 のもうひとつの機能として相分離を抑制するはたらきが近年明らかとされた。相分離性タンパク質の相分離異常が基となる凝集沈着物は、疾患とも密接に関わることが示唆されている。したがって、Kapβ2 による輸送および相分離制御は極めて重要な機構であると考えられる。重篤な神経変成疾患である筋萎縮性側索硬化症 ALS において、Kapβ2 の輸送基質のひとつである RNA 結合タンパク質 FUS の細胞質での凝集体形成が報告されている。また、遺伝性 ALS の原因因子として *C9orf72* 遺伝子の繰り返し配列の増幅が挙げられる。*C9orf72* 遺伝子の繰り返し配列の増幅によって、5 種類の 2 アミノ酸の繰り返しペプチドが産出されるが、それらのうち、アルギニンを含むプロリン–アルギニン（PR）またはグリシン–アルギニン（GR）の繰り返しペプチドが特に高い毒性を示すことが報告されている。本研究では、これらの繰り返しペプチドが Kapβ2 による FUS の相分離制御に与える影響を明らかとし、繰り返しペプチドに起因する相分離破綻のメカニズムを解明することを目的とした。

【方法】本研究では生化学的な観点から、精製タンパク質を用いた相互作用解析を中心に行った。相分離の抑制制御は、濁度法および蛍光顕微鏡観察により評価した。相互作用解析にはプルダウンバインディングアッセイ法、等温滴定カロリメトリー法、SEC-MALS 法、NMR 法を用いた。

【結果】*C9orf72* 遺伝子の繰り返し増幅が産出し得る 5 種類の繰り返しペプチドが Kapβ2 による FUS の相分離抑制に与える影響を評価したところ、PR または GR の繰り返し配列が Kapβ2 の機能を阻害した。繰り返し PR（PRn）と Kapβ2 との相互作用をプルダウンバインディングアッセイ法により検出したところ、繰り返し回数依存的な結合であった。等温滴定カロリメトリー法および SEC-MALS 法により、PRn と Kapβ2 との結合が 1 対 1 であることを明らかとした。NMR 法により PRn は Kapβ2 の NLS 結合部位に、競合的に結合することが示唆された。

プロリン–アルギニン繰り返しペプチド（PRn）による Kapβ2 の相分離抑制阻害のモデル



168. トランスポーチン１による相分離性タンパク質制御機構

吉澤　拓也

立命館大学 生命科学部 生物工学科 構造生命科学研究室

Key words：相分離，RNA 結合タンパク質 FUS，核内輸送タンパク質 Kapβ2，*C9orf72*，ALS

緒　言

RNA 結合タンパク質の多くは、単独では特定の構造をとらない天然変成領域を有しており、その相分離性が注目を集めている。相分離により、関連分子群を液滴として集積させることで、様々な高次機能を発現すると考えられている。通常、相分離による液滴は流動的かつ可逆的であり、形成と消失を繰り返せる性質を持つが、液滴の状態が適切に制御されないと、不可逆的な凝集体を形成する場合がある。重篤な神経変成疾患では相分離性タンパク質の凝集沈着物がみられることから、相分離異常と疾患との関連が示唆されている。

高い相分離性を示す RNA 結合タンパク質 FUS は、主に核内で機能するタンパク質であり、転写やスプライシングなどに関与する。FUS の核内への輸送は、その輸送受容体であるトランスポーチン１（カリオフェリンβ2：Kapβ2）によって行われる。Kapβ2 は FUS の核移行シグナル NLS を認識して結合し、複合体となって核内へと入る。核内では低分子量 GTPase である Ran が Kapβ2 結合することにより、FUS が乖離することで輸送が完了する。遺伝性の筋萎縮性側索硬化症 ALS において、NLS 領域のミスセンス変異が多く見つかっており、これらの変異体は細胞質で凝集体を形成する［1〜3］。これまでに、Kapβ2 は核内へと輸送するだけでなく、FUS の相分離および凝集を抑制する働きを持つことが明らかとなっている［4〜7］。

遺伝性 ALS の原因遺伝子は多数報告されているが、その中でも最大の割合を占めるものが *C9orf72* 遺伝子の繰り返し配列の増幅である。イントロンの 6 塩基 GGGGCC の繰り返しが少なくとも 20 回以上に増幅することにより、ATG 非依存的な翻訳が起こり、センス鎖、アンチセンス鎖およびフレームの違いから、合計 5 種類の 2 アミノ酸の繰り返しペプチドが産出される。なかでも、アルギニン残基を含むプロリン-アルギニンまたはグリシン-アルギニンの繰り返し配列である PRn または GRn の毒性が特に高いといわれており、相分離に干渉することも示唆されている［8，9］。

我々は *C9orf72* 遺伝子由来のポリペプチドが Kapβ2 による FUS の制御機構に与える影響を調べた。その結果、PRn および GRn が Kapβ2 に繰り返し回数依存的に結合し、相分離抑制能を阻害することを見出した。PRn についてさらに解析を進めた結果、PRn は Kapβ2 の NLS 結合領域と相互作用することで、FUS との結合を阻害していることを明らかとした［10］。

方法および結果

1. 繰り返しペプチドによる Kapβ2 阻害

FUS の相分離が起こると液滴の形成に伴い溶液の濁度が上昇するため、濁度により相分離の程度を評価した。FUS の相分離に対して、Kapβ2 の有無に加え、*C9orf72* から産出される PR、GR、PA、GP、GA が 20 回繰り返されたものの存在下での濁度を評価した。FUS と Kapβ2 は大腸菌により発現、精製を行い試料調製した。繰り返しペプチドは化学合成したものを用いた。その結果、Kapβ2 存在下では濁度が低下したのに対して、PR20 または GR20 を加えた条件では、Kapβ2 による濁度の低下がみられなかった（図 1a）。PA20、GP20、GA20 は Kapβ2 による FUS の相分離抑制に大きな影響を与えなかった。PR20 を加えた条件について、顕微鏡観察を行った。FUS の C 末端に EGFP を付加したものを用いることで、蛍光観察を行った。その結果、Kapβ2 存在下で消失する FUS の液滴が PR20 の添

加により観察されたことから、PR20 により FUS の液滴形成が維持されることが明らかとなった（図 1b）。

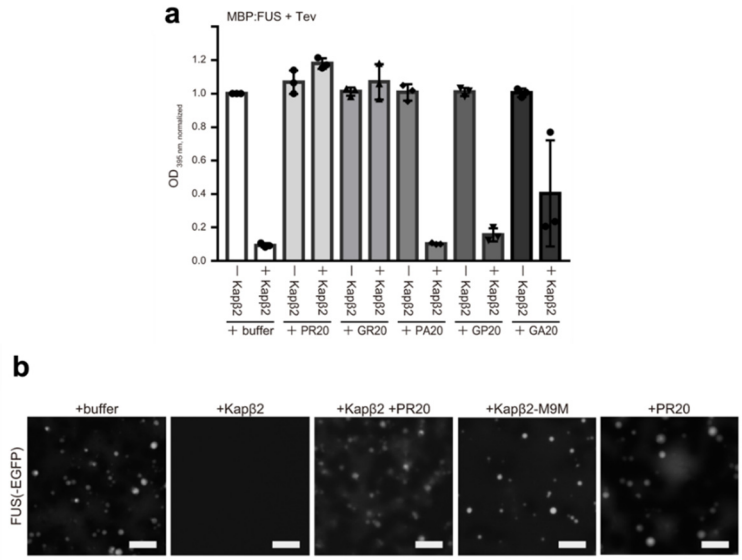


図 1. C9orf72 由来繰り返しペプチドによる Kap β2 阻害

a）各 20 回の繰り返しペプチド存在下での FUS に対する Kap β2 の相分離抑制能の濁度法による評価。全て等モルで加えた。

b）FUS の相分離液滴の蛍光顕微鏡観察像。Kap β2、PR20、Kap β2 抑制複合体（Kap β2-M9M）存在下で観察を行った（スケールバー：10 μm）。

2. Kap β2 と PRn との相互作用

異なる繰り返し回数の PRn を用いて、Kap β2 との相互作用をプルダウンバインディングアッセイにより評価した。MBP に 8 回または 18 回の繰り返しペプチドを融合したものを調製した。GST-Kap β2 を結合担体に固定し、そこに MBP 融合繰り返しペプチドを加えインキュベートし、洗浄後の結合画分を SDS-PAGE により評価した。その結果、Kap β2 は MBP-PR8 には結合せず、MBP-PR18 にのみ結合した（図 2a）。SEC-MALS による相互作用解析では、溶出位置の変化から Kap β2 と MBP-PR18 は 1：1 での相互作用が示唆された（図 2b）。等温滴定カロリメトリーによる結合解析を行ったところ、その結合定数 K_d は 80 nM と見積もられた。

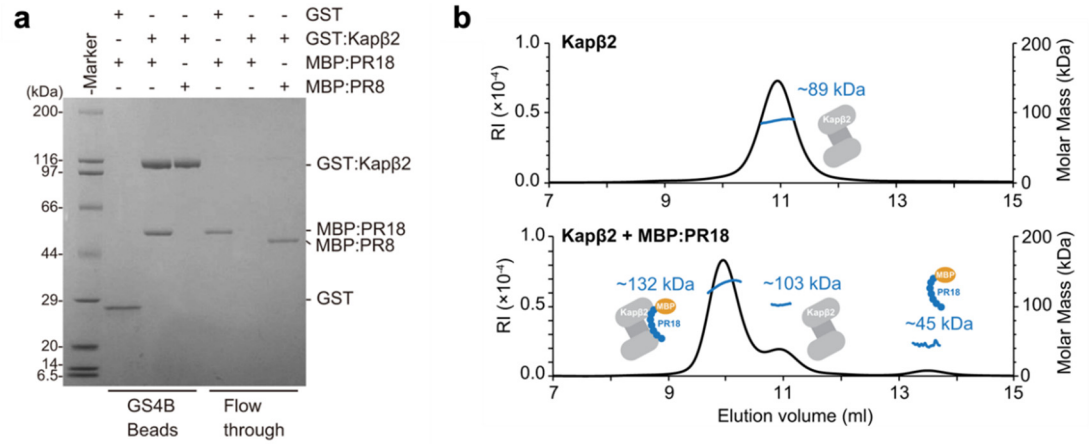


図 2. PRn と Kap β2 との相互作用

a）プルダウンバインディングアッセイによる結合実験。

b）SEC-MALS による相互作用解析。

3. NMR 法による相互作用部位解析

PRn が Kap β2 のどこに結合するかをより詳細に調べるために NMR 法による解析を行った。Kap β2 のメチル基を選択的に標識し、NMR 解析を行ったところ、良好に分散したスペクトルを得ることができた。PR20、NLS 結合部位に強力に結合する M9M ペプチド、FUS の NLS 欠損体を加え解析を行った。その結果、PR20 または M9M を加えた条件で、同様のスペクトルの変化が観察された（図 3）。PR20 存在下に特有のスペクトル変化も見られたことから、PR20 は Kap β2 の NLS 結合部位と部分的に重複することが示唆された。

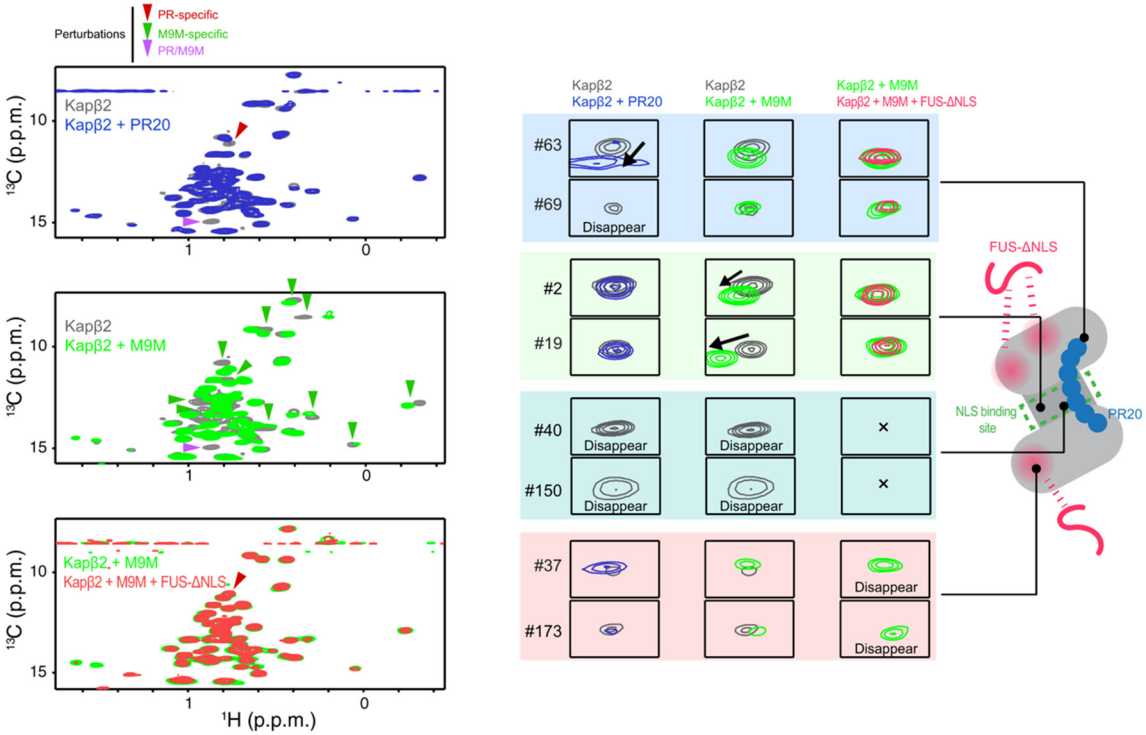


図 3. NMR 法による相互作用解析

Kap β2 に PR20、M9M、または M9M と FUS の NLS 欠損体（FUS-ΔNLS）を加えた際のスペクトル（左）。代表的なスペクトル変化と相互作用のモデル図（右）。

考　察

C9orf72 遺伝子の繰り返し増幅の影響については様々な可能性が示唆されており、未だ議論の途上ではあるが、本研究を通して *C9orf72* 遺伝子に由来する繰り返しペプチドによる新たな細胞毒性のメカニズムが提案された。*C9orf72* 遺伝子に由来するアルギニンリッチな繰り返しペプチドは、繰り返し回数依存的に Kap β2 に結合し、その相分離抑制能を阻害することが明らかとなった。PR20 は Kap β2 の NLS 結合部位に入り込み、核内輸送および相分離抑制の両方に重要な NLS との相互作用を阻害することで、細胞質中での FUS の相分離を促進し、異常な凝集沈着物を誘導すると考えられる。Kap β2 と NLS との相互作用は核内輸送のための選択性の高い認識であるが、単純なアルギニンリッチな繰り返し配列によって、その機能が阻害されてしまう点は興味深い。結合実験により明らかとした繰り返し回数依存的な結合や NMR 解析の結果から、繰り返しペプチドと Kap β2 との相互作用は NLS 結合部位以外を含む多点相互作用であることが示唆される。繰り返し配列ペプチドが NLS 結合部位以外の領域にどのように結合し、相分離抑制に影響を与えているかについては、今後明らかにすべき課題である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、立命館大学生命科学部の萬年太郎博士である。本研究の実施にあたり、奈良県立医科大学の森英一朗博士、七浦仁紀博士、徳島大学の斎尾智英博士ならびに多くの関係者に多くのご支援をいただきました。この場を借りてお礼申し上げます。本研究をご支援いただいた上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1) Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH Jr. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. Science. 2009 Feb 27;323(5918):1205-8. PMID: 19251627. doi: 10.1126/science.1166066.

2) Vance C, Scotter EL, Nishimura AL, Troakes C, Mitchell JC, Kathe C, Urwin H, Manser C, Miller CC, Hortobágyi T, Dragunow M, Rogelj B, Shaw CE. ALS mutant FUS disrupts nuclear localization and sequesters wild-type FUS within cytoplasmic stress granules. Hum Mol Genet. 2013 Jul 1;22(13):2676-88. Epub 2013 Mar 7. PMID: 23474818; PMCID: PMC3674807. doi: 10.1093/hmg/ddt117.

3) Dormann D. FUScinating insights into motor neuron degeneration. EMBO J. 2016 May 17;35(10):1015-7. Epub 2016 Apr 6. PMID: 27053723; PMCID: PMC4868949. doi: 10.15252/embj.201694397.

4) Yoshizawa T, Ali R, Jiou J, Fung HYJ, Burke KA, Kim SJ, Lin Y, Peeples WB, Saltzberg D, Soniat M, Baumhardt JM, Oldenbourg R, Sali A, Fawzi NL, Rosen MK, Chook YM. Nuclear Import Receptor Inhibits Phase Separation of FUS through Binding to Multiple Sites. Cell. 2018 Apr 19;173(3):693-705.e22. PMID: 29677513; PMCID: PMC6234985. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.003.

5) Guo L, Fare CM, Shorter J. Therapeutic Dissolution of Aberrant Phases by Nuclear-Import Receptors. Trends Cell Biol. 2019 Apr;29(4):308-322. Epub 2019 Jan 16. PMID: 30660504; PMCID: PMC6750949. doi: 10.1016/j.tcb.2018.12.004.

6) Gonzalez A, Mannen T, Çağatay T, Fujiwara A, Matsumura H, Niesman AB, Brautigam CA, Chook YM, Yoshizawa T. Mechanism of karyopherin-β2 binding and nuclear import of ALS variants FUS(P525L) and FUS(R495X). Sci Rep. PMID: 33580145; PMCID: PMC7881136. 2021 Feb 12;11(1):3754. doi: 10.1038/s41598-021-83196-y.

7) Yoshizawa T, Guo L. Karyopherin-βs play a key role as a phase separation regulator. J Biochem. 2021 Sep 22;170(1):15-23. PMID: 34223614; PMCID: PMC8457648. doi: 10.1093/jb/mvab072.

8) Lin Y, Mori E, Kato M, Xiang S, Wu L, Kwon I, McKnight SL. Toxic PR Poly-Dipeptides Encoded by the C9orf72 Repeat Expansion Target LC Domain Polymers. Cell. 2016 Oct 20;167(3):789-802.e12. PMID: 27768897; PMCID: PMC5076566. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.003.

9) Alberti S, Mateju D, Mediani L, Carra S. Granulostasis: Protein Quality Control of RNP Granules. Front Mol Neurosci. 2017 Mar 27;10:84. PMID: 28396624; PMCID: PMC5367262. doi: 10.3389/fnmol.2017.00084.

10) Nanaura H, Kawamukai H, Fujiwara A, Uehara T, Aiba Y, Nakanishi M, Shiota T, Hibino M, Wiriyasermkul P, Kikuchi S, Nagata R, Matsubayashi M, Shinkai Y, Niwa T, Mannen T, Morikawa N, Iguchi N, Kiriyama T, Morishima K, Inoue R, Sugiyama M, Oda T, Kodera 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. 2021 Sep 6;12(1):5301. PMID: 34489423; PMCID: PMC8421406. doi: 10.1038/s41467-021-25560-0.