

## 【研究最前線】非ドメイン型のタンパク質・RNA による生体制御

RNA 生物学研究室・教授

中川 真一

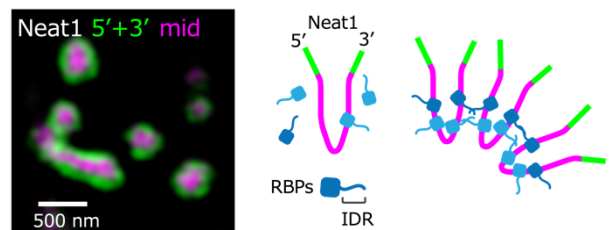
重要な機能を持つ RNA やタンパク質などの機能性高分子の一次配列は種間で広く保存されており、そのように高度に保存された配列は特定の立体構造へと折りたたまれ、その立体構造が特異的な分子間相互作用を仲介することで様々な生体反応が制御されている。

教科書から抜き出してきたようなこの一文。Anfinsen のドグマとも呼ばれる、配列-構造-機能のこの相関があるからこそ、新規に同定された分子であっても配列を BLAST に放り投げてクリック一発。その検索結果から、「あ、これはリン酸化酵素だね」とか、「なるほど細胞外に IgG ドメインを持つ接着分子か」のようにある程度機能に当たりをつけることができ、その機能予測に基づいた合理的な解析を行うことで、分子生物学は爆発的な発展を遂げたと言っても過言ではないと思います。

ところが最近になって、特定の決まった立体構造を取らなくても、というよりむしろ取らないからこそ機能を発揮できる一連のタンパク質や RNA が存在していることが次々と明らかになり、我々はそれらを総称して「非ドメイン型バイオポリマー」と呼んでいます。非ドメイン型バイオポリマーは特定の立体構造を取るドメイン型の生体高分子と協調して働き、極端な分子夾雑環境にある細胞内においても複数の反応が効率よく、かつ、混線せずに進行するための一種の「場」を提供していると考えられています。このような非ドメイン型バイオポリマーを利用することで、ALS やアルツハイマー病など、病理性凝集体の形成を伴う疾患の治療や、超高効率な *in vitro* の反応系の開発が期待されています。

では、具体的に、どのような局面で非ドメイン型バイオポリマーが働いている姿を見ることができるのでしょうか。その典型例の一つが、非膜オルガネラと呼ばれるサブミクロンスケールの細胞内の構造体です。細胞の中には、核小体を始めとして、周囲を囲む脂質二重膜がないにもかかわらず特定の反応に関わるタンパク質や RNA が集合した構造体が存在しており、それらは非膜オルガネラ、あるいは最近では分子凝集体とかコアセルベートとか呼ばれています。非膜オルガネラの特徴として、一部の例外を除いてほぼ全てのものについて RNA 分子が含まれていること、

また、タンパク質の構成成分の多くが、特定の構造を取りにくい「天然変性領域」と呼ばれる領域を持っていることを挙げるすることができます。非膜オルガネラの形成機構について、分子レベルでの解析が最も詳細に進められているのが、パラスペックルという核内構造体です。パラスペックルは Archa Fox 博士(現・西オーストラリア大学)が 2002 年に発見した構造体で、当時 Dundee 大学の Angus Lamond 研究室で核小体プロテオミクスプロジェクトを進めていた彼女は、そこで取れてきた PSP1 (paraspeckle protein 1) と PSP2 (paraspeckle protein 2) と名付けた新規 RNA 結合タンパク質が核小体とは別の核内構造体を形成することを見出し、それらが核スペックルと呼ばれる別の構造体に隣接して存在することから、オルトメタパラの「パラ」スペックルと命名しました<sup>(1)</sup>。その後、産総研の廣瀬哲郎博士(現・大阪大学生命機能研究科)が、全長 20 kb を超える巨大なノンコーディング RNA (タンパク質に翻訳されない RNA) である NEAT1 を同定し、この RNA がパラスペックルの骨格として機能していること<sup>(2)</sup>、20 種類以上の RNA 結合タンパク質が NEAT1 と協調して核内構造体パラスペックルを形成していることを明らかにしました<sup>(3)</sup>。



### 非膜オルガネラパラスペックルの微細内部構造と形成モデル

U 字型に折れたたまった NEAT1 は RNA 分子が持つ柔軟な性質を介して RNA 結合タンパク質 (RBP) が持つ天然変性領域 (IDR) 同士の間相互作用を誘導し、特徴的な内部微細構造を持ちながら柔軟な性質を示すパラスペックルの形成を制御している。

私自身は廣瀬博士との共同研究により、パラスペックルを欠損する NEAT1 のノックアウトマウスは外見上大きな異常を示さないこと<sup>(4)</sup>、しかしながらメス個体において妊孕性が著しく低下すること<sup>(5)</sup>、また、パラスペックルの中では U 字状に折りたたまれた NEAT1 が放射状に規則正しく配置されており、特徴的な core-shell 構造を形成していること<sup>(6)</sup>などを明らかにしてきました。ここで重要なのが、パラスペックルはプロテアソームや核膜孔複合体のように個々のパ

一つの位置が厳密に決められた分子複合体ではないということです。パラスペックルを構成する RNA 結合タンパク質の多くは顕著な天然変性領域を持っており、これらの領域がからみあって一種の相分離のような状態を誘導し、柔軟で巨大な分子凝集体が形成されていると考えられています。特定の立体構造に基づいた古典的な相互作用と、天然変性領域によって仲介される相互作用の違いを現した秀逸な例が積み木ブロックと焼きそばで、積み木は一つパーツを抜いてしまえば複合体が崩壊してしまいますが、焼きそばは一本や二本食べたところで焼きそばです。かつ、焼きそばの絡み合いはいわゆる「鍵と鍵穴」方式で決められているわけではなく、多価の弱い相互作用—特異性は低いけれども多数の弱い相互作用—によって担われています。骨格となる NEAT1 もリボソームを構成する rRNA のように硬くて強固な構造を持つわけではなく、柔軟な構造を取ることで、相互作用する RNA 結合タンパク質が持つ天然変性領域同士の焼きそば流の相互作用が起きる場を提供していると考えられています。

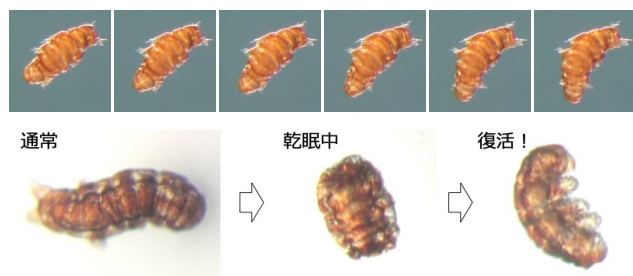
ドメイン型バイオポリマー      非ドメイン型バイオポリマー



ドメイン型バイオポリマーと非ドメイン型バイオポリマー

非ドメイン型バイオポリマーのもう一つの典型例が、クマムシが持つ種特異的な天然変性タンパク質です。最強生物クマムシという言葉はどこかで聞いたことがある方もおられるかと思いますが、緩歩動物門というグループを作るこの生き物、ただものではありません。橋の欄干に生える苔などに住んでいることが多いらしいですが、晴天が続いて乾燥すると、体から水分が失われて「乾眠」と呼ばれる状態に入ります。一度乾眠状態となったクマムシは強い強い。煮沸しても、真空状態に置いても、ヒトの致死量をはるかに超える放射線を照射しても耐え抜き、水分を与えると再び膨らんでモゾモゾと動き出し、何事もなかったように活動し始めます。イスラエルの宗教団体だったかが打ち上げた月探査機が着陸に失敗してクマムシを月面にぶちまけたというニュースが以前話題になりましたが、いつか月

に雨が降ってクマムシがむくむく動き出す日がくるかもしれないと想像すると、微笑ましい気分になってきます。話がそれてしまいましたが、このクマムシの極限乾燥耐性。どうせ保護剤としても使われているトレハロースか何かでしよ、と私も思っていた時期があったのですが、なんと、クマムシに特異的なタンパク質によって担われていることが東京大学の國枝博士や慶應義塾大学の荒川博士の最近の研究によって明らかとなってきました<sup>7)</sup>。これらの一つ、Dsupと呼ばれるタンパク質は、DNAの周りをふんわりと包み込み、ちょうど壊れやすい商品を含むプチプチのようにDNAを守っていることがわかっています。このDsup、一次配列から予測される機能ドメインというのはまったく持っていません。一方、配列を天然変性領域を予測するプログラムにかけてやると、全長に渡って天然変性領域を持つ、いわば「超天然変性タンパク質」であることが分かります。クマムシはDsup以外にも超天然変性タンパク質を数多く発現しており、細胞質に局在するもの、核に局在するもの、ミトコンドリアに存在するものなどが知られています。それらの超天然変性タンパク質が総出となって最強生物クマムシに環境耐性能力を与えている、というのが現在考えられているモデルです。余談ながら、モデルクマムシとして使われているヨコヅナクマムシは、現・慶應義塾大学の堀川大樹博士が札幌近郊に生えているコケから採集して実験動物として確立したものが使われており、札幌はクマムシ研究者にとって一種の聖地となっているそうです。



クマムシの動きと乾眠 (写真提供: 東大・理 國枝博士)

もう一つ、非ドメイン型バイオポリマーの典型例として、東京大学定量科学研究所の泊博士によって同定されたHeroタンパク質群を最後に紹介したいと思います。レントゲンによるX線の発見を始めとして、大きなブレイクスルーは偶然の産物からもたらされるものですが、Heroタンパク質も例にもれず、ひょんなことからその存在が明らかになりました。泊博士は長年RNAサイレンシングに関わるAgoタンパク質の研究を進めていましたが、Agoのリコンビナントタンパク質はnotoriousに精製しにくいことが知ら

れています。たとえばビーズでアフィニティー精製して TEV プロテアーゼでタグ部分を切り離して溶出する、というようなことがよく行われますが、ビーズにくっついた Ago のリコンビナントタンパク質は、くっついたまま、なかなかはがれてきません。どういう発想からそういう実験を行ったのか、この辺が実験者のセンスなのだと思いますが、ある時、彼らは、せつかく Ago を精製したビーズに、細胞の crude な抽出液を加えてみたそうです。そうするとあら不思議、TEV プロテアーゼで効率よく Ago が溶出されてくることを偶然発見。この観察事実は、crude な抽出液の中に Ago のリコンビナントタンパク質精製を助けてくれるなんらかの「お助け因子」が存在していることを示唆しています。次に、この抽出液を煮沸したところ、熱変性後も活性が残ることが明らかとなりました。これは、このお助け活性が DNA や RNA などの核酸によって担われていることを示唆しています。ところが奇妙なことに、抽出液をプロテアーゼで処理すると、活性が失われてしまいます。彼らは煮沸しても可溶性を失わない分画から複数のタンパク質因子を同定し、これらに Hero (Heat resistant obscure) タンパク質という名をつけました<sup>8)</sup>。Hero タンパク質は Ago の精製を助けるだけでなく、たとえば TDP43 など神経変性疾患関連のタンパク質の凝集体の形成を強力に抑制したり、脱水や加熱による変性から各種酵素を保護する活性もあります。クマムシタンパク質と同様、Hero タンパク質は、一次配列を見ても明確なドメイン構造は見られず、全長に渡って天然変性領域を持つ超天然変性タンパク質です。煮沸しても活性が失われなくても変なのには、フェノール・クロロホルム処理しても変性せずに水層に残る、クマシー染色をしても染まらない(極端なチャージを持っているので色素が結合しない)、さらにはアミノ酸の一次配列をランダムにシャッフルしても同じ活性を持つ(たぶん配列よりもアミノ酸組成のほうが重要)など、その奇妙さはもう変態レベルです。一次配列に機能が依存しないため、このような活性を持つタンパク質がゲノム中にどれぐらいあるのか全くわからないのですが、我々の研究室では泊博士と共同研究で同定済みの Hero タンパク質群の変異マウスを複製し、いくつかは胎生致死となることを確認しています。なぜそのように重要な遺伝子がこれまで見過ごされてきたのか。機能の一次配列への依存が低いために点変性による機能喪失が起きにくく変異体スクリーニングをすり抜けてきた、そもそも分子量が小さいものが多いので「的」が小さく変異体が取れにくかった、機能ドメインをまったく持たな

い新規遺伝子の解析は後回しにされてきた、など様々な理由が考えられますが、一つ一つ地道に変異体を作って解析してゆくことで、これまで光が当てられてこなかった新たな分子群の生理機能を明らかにしてゆくことができるのではないかと期待しています。

非ドメイン型バイオポリマーは新たな創薬ターゲットとなるのか。これに関しては、かなり大きな期待を寄せています。Hero タンパク質は培養細胞レベルで ALS 等の神経変性疾患で見られる異常凝集体の形成を強力に抑制しますし、Dsup を発現するヒト培養細胞では放射線に対する耐性が向上します。RNA 結合タンパク質の中には天然変性領域を持つものが多く、その分子凝集体の形成は RNA 分子によって制御されていることもわかりつつあります。基礎研究の成果はなかなか応用には繋がらないものですが、それらは役に立たないのではなく人類がまだ役立て方を知らないだけなのだ、世界を救った mRNA ワクチンの開発物語を見るにつけ、このごろ強く思います。非ドメイン型バイオポリマーの研究がこれまでの常識を打ち破る新たな創薬につながる日を、心待ちにしていってください。

#### 参考文献

- 1) A. H. Fox *et al.*, Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Curr Biol* **12**, 13-25 (2002).
- 2) Y. T. Sasaki, T. Ideue, M. Sano, T. Mituyama, T. Hirose, MENepsilon/beta noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2525-2530 (2009).
- 3) T. Naganuma *et al.*, Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles. *EMBO J* **31**, 4020-4034 (2012).
- 4) S. Nakagawa, T. Naganuma, G. Shioi, T. Hirose, Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. *J Cell Biol* **193**, 31-39 (2011).
- 5) S. Nakagawa *et al.*, The lncRNA Neat1 is required for corpus luteum formation and the establishment of pregnancy in a subpopulation of mice. *Development* **141**, 4618-4627 (2014).
- 6) J. A. West *et al.*, Structural, super-resolution microscopy analysis of paraspeckle nuclear body organization. *J Cell Biol* **214**, 817-830 (2016).
- 7) A. Yamaguchi *et al.*, Two novel heat-soluble protein families abundantly expressed in an anhydrobiotic tardigrade. *PLoS One* **7**, e44209 (2012).
- 8) K. Tsuboyama *et al.*, A widespread family of heat-resistant obscure (Hero) proteins protect against protein instability and aggregation. *PLoS Biol* **18**, e3000632 (2020).

同窓会 HP: 2022 年 9 月 30 日公開