

研究終了報告書

「液液相分離誘導ペプチドを用いた標的分解オルガネラの創生」

研究期間：2021 年 10 月～2024 年 3 月

研究者：池之上 達哉

1. 研究のねらい

タンパク質の液-液相分離 (LLPS) は膜のないオルガネラとして生命科学全般で大きな関心を寄せられている。しかし、タンパク質の相分離・相転移を研究するうえで、相分離の挙動や液滴の流動性をどのように制御できるかという分子レベルでの理解は乏しく、LLPS を制御するような技術を 0 から創出する研究はこれまでになかった。ここで申請者は革新性の高い独自のスクリーニング技術である Random non-standard Peptide Integrated Discovery (RaPID) システムを用いて、パーキンソン病の原因とされる α -シヌクレイン (α Syn) を標的とし、非常に高効率で LLPS を誘導する *de novo* ペプチドを獲得することに成功した。タンパク質の LLPS を制御する本技術の革新性は他の追従を許さないブレイクスルーを引き起こし、様々な科学技術イノベーションの創出をもたらすと期待できる。

タンパク質の液-液相分離 (LLPS) によって形成される液滴には特定のタンパク質が濃縮されるため、細胞内環境では時空間的に制御された「反応の場」として働く可能性がある。最近ではこのような LLPS による動的な反応場制御機構が次々と見出されており、生化学反応制御の考え方にパラダイムシフトが起こっている。本研究では、LLPS 誘導ペプチドを応用し、LLPS させた標的の濃縮相 (液滴) に機能を持たせることを考えた。 α Syn を分解する人工分解オルガネラの創生を目的とし、LLPS 誘導ペプチドをベースにユビキチン-プロテアソーム系をリクルートする新規のキメラペプチドを開発する。これまでターゲットにできなかった天然変性タンパク質の分解誘導を可能にするだけでなく、必要な分子だけが濃縮されるため高効率で反応が進行する人工オルガネラが形成できると期待できる。

アルツハイマー病やパーキンソン病をはじめ高齢化社会の深刻な病気のほとんどにタンパク質の異常凝集が関わる。本研究の達成によりタンパク質の凝集が原因となる病気の治療や予防が大きく進展すると期待できる。加えて標的特異的な機能性人工オルガネラ形成の初めての例となるため、LLPS 研究の新たな地平を切り開く先駆的な研究となる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究で申請者は独自の LLPS 誘導ペプチドを用いて LLPS を介した反応制御や反応促進を目指してきた。パーキンソン病の原因とされる α -シヌクレイン (α Syn) を標的とし、標的分解オルガネラを創生することを目的とした。LLPS 誘導ペプチドによって形成された標的タンパク質の濃縮空間にタンパク質分解系(ユビキチン-プロテアソーム系)をリクルートする新規キメラ分子を開発してきた。片方に LLPS 誘導ペプチドを用いて α Syn を凝縮させた液滴を形成させ、他方の分子でユビキチン化酵素(E3)リガーゼを液滴中に局在化することで反応を促進させる(図 1)。 α Syn を対象とする E3 リガーゼとして Nedd-4 や CHIP が知られているため、Nedd-4 と CHIP に特異的に結合するリクルート分子を探索し、LLPS 誘導ペプチドとハイブリッドする。本研究期間で RaPID システムによるリクルート分子の獲得と LLPS 誘導ペプチドの最適化を達成した。また、ペプチドによる LLPS 誘導によって α Syn のユビキチン化反応が活性化することを示した。

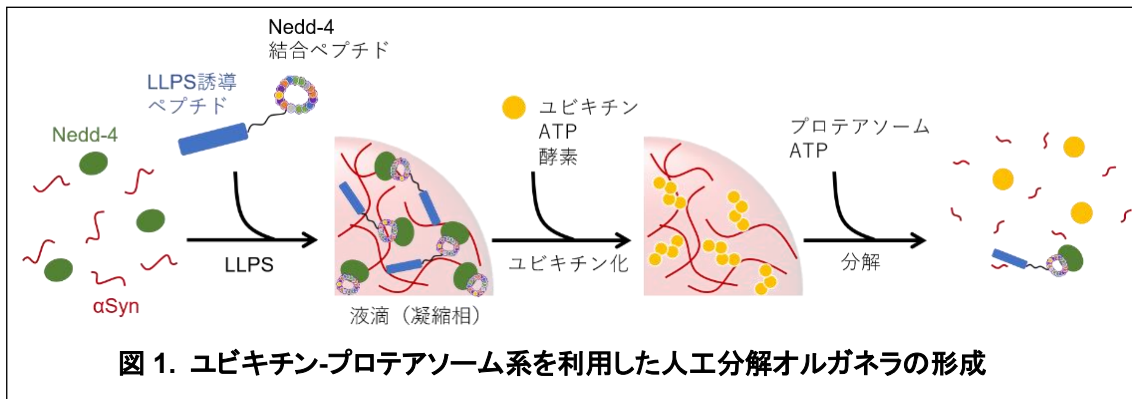


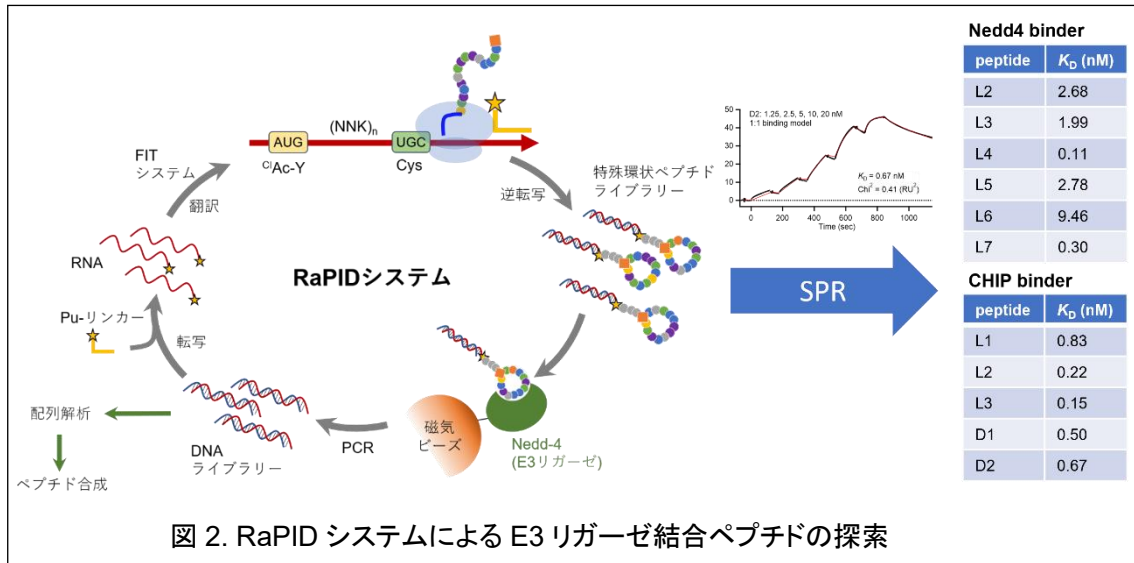
図 1. ユビキチン-プロテアソーム系を利用した人工分解オルガネラの形成

(2) 詳細

研究テーマ A「RaPID システムによる標的結合ペプチドの探索」

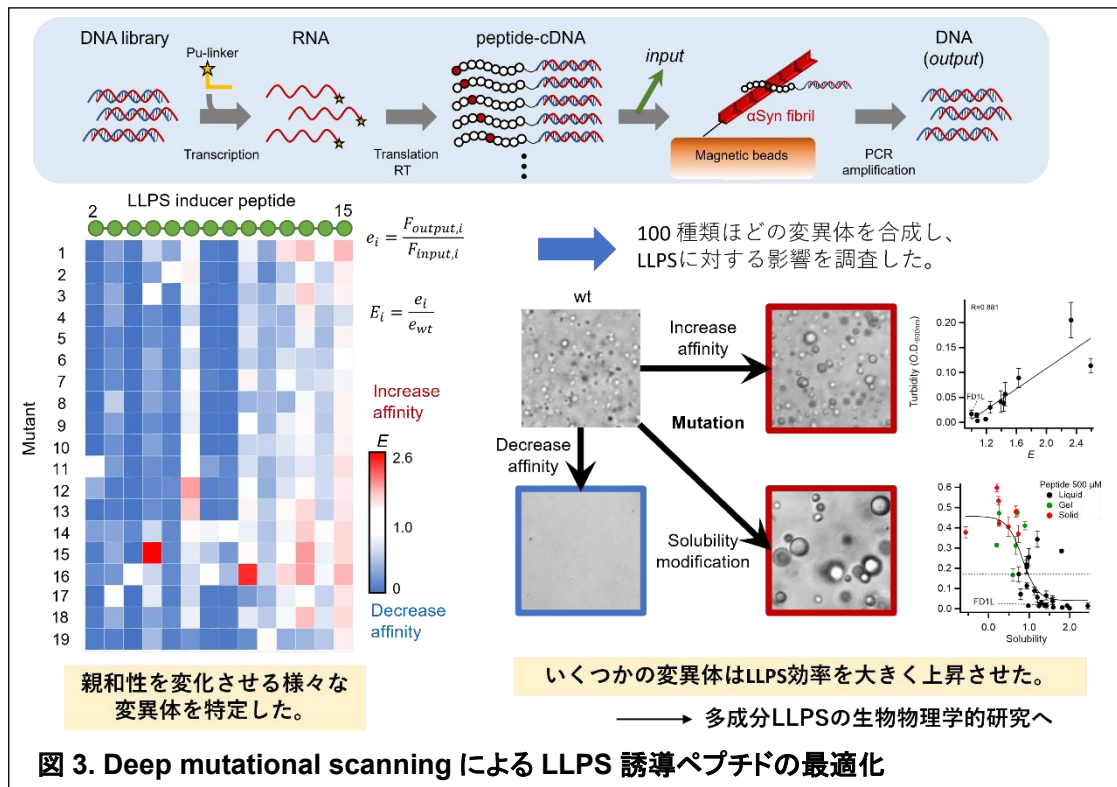
液-液相分離区画に目的の酵素を取り込むためのリクルーター分子を開発した。効果的なバインダーの開発の 1 つの有望な手段として、ペプチドの化学修飾や非天然アミノ酸の導入が考えられる。これらは独特な相互作用を可能し、これまでにない効果をもたらすと考えられるが、機能を持った特殊なペプチドを作り出すには時間と手間が掛かりすぎ、これらを達成するには技術的ブレイクスルーが必要であった。これを達成したのが現在所属する研究室の RaPID システム(図 2)であり、膨大な数の候補から最適な特殊ペプチドを迅速にスクリーニングすることを可能にしている。化学修飾されたアミノ酸の導入により翻訳後の環状ペプチドの合成も容易であり、様々な特徴を持った環状ペプチドを合成できる。

RaPID システムを用いたペプチドスクリーニングによって、2 種類の E3 リガーゼ(Nedd-4、CHIP)に対して結合する特殊環状ペプチドをそれぞれ特定した。得られたペプチド候補から特徴の異なる複数の配列をそれぞれ選択し、特殊環状ペプチドを合成した。ペプチドの標的酵素への結合能を評価するために表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定を行ったところ、いずれのペプチドもサブナノモラーからナノモラーレベルの解離定数をもつ強力なバインダーであることを示した(図 2)。



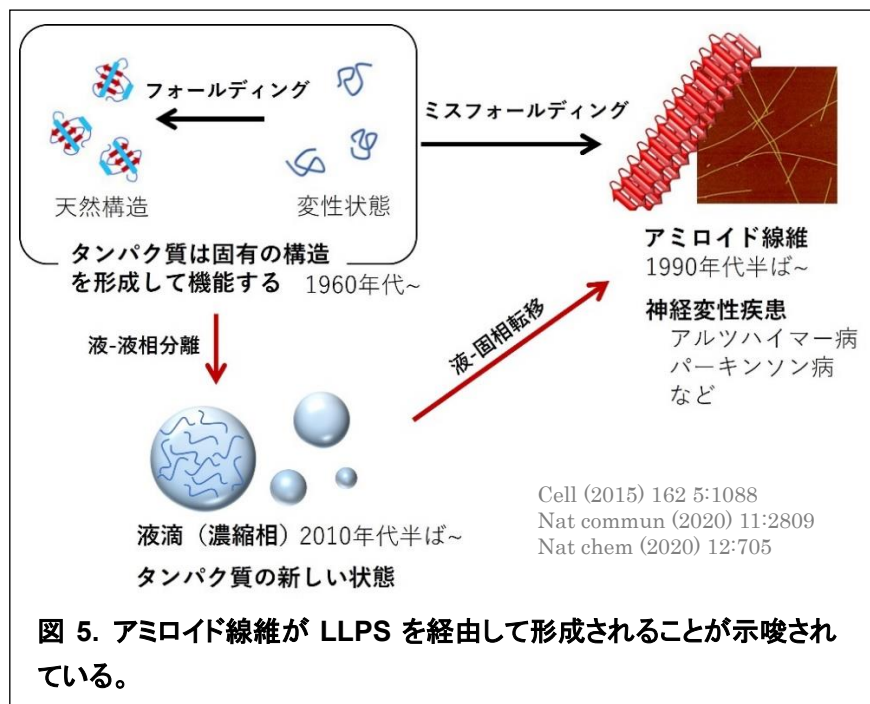
研究テーマ B「LLPS 誘導ペプチドの最適化」

LLPS 誘導ペプチドの α Syn に対する親和性、特異性、LLPS 誘導効率の向上や細胞系への応用を目指して、Deep mutational scanning 法を用いたペプチド配列の最適化を行った。RaPID システムのランダム配列の DNA ライブラリーの代わりに、LLPS 誘導ペプチドをコードする DNA に single mutation を導入したライブラリーでスクリーニングをかけた(図 3)。その結果、 α Syn への親和性を様々に変化させる変異を特定することができた。その配列情報をもとに 100 種類ほどのペプチドを化学合成し、LLPS への影響を評価した。LLPS 効率はペプチドの親和性や、溶解度に相関があることが分かった。その中で、LLPS 効率を 17 倍にする変異体や、形成される液滴の流動性を様々に変化させるペプチド変異も特定した。今後、変異ペプチドが引き起こす LLPS の物理化学的性質の評価を行い、ペプチド配列の最適化について論文をまとめ、投稿予定である。



3. 今後の展開

タンパク質の液-液相分離 (LLPS) は、細胞内で関連タンパク質群が濃縮された液滴を形成する。この液滴形成がアミロイド線維と呼ばれる線維状の異常凝集体の形成を促進するリスクを秘めていることが示唆されている (図 5)。アミロイド線維の形成はアルツハイマー病やパーキンソン病、II 型糖尿病など、アミロイド病と総称される数十種類もの疾患の原因となる。アミロイド病を分子レベルで理解するためにも、アミロイド線維形成の初期段階である LLPS の特性やメカニズムを解明することは重要な課題となっている。これまでの ACT-X の研究で、ペプチドによる α Syn の LLPS 誘導が α Syn のユビキチン化を活性化することを示し、さらには新た



に LLPS 制御に関連する知見を得た。これらの結果は標的分解オルガネラの創生への順調な進捗である一方で、新たにアミロイド研究への展開が期待できるものとなった。

4. 自己評価

LLPS 誘導ペプチドによって形成される液滴に特定のタンパク質を局在化し、液滴を機能化するという点で計画通り目的が達成された。当初予定していた細胞内での観察がいまだ課題であるが、問題解決に向けてペプチドの LLPS 誘導効率や特異性の向上を達成できた。ペプチドの最適化の過程で、LLPS に様々な影響を及ぼす変異体を得ることができ、生物物理学分野へのさらなる応用展開が期待できる成果を得ることができた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

1. **Tatsuya Ikenoue***, Masatomo So, Naohiro Terasaka, Wei-En Huang, Yasushi Kawata, Yohei Miyanoiri, Hiroaki Suga*, [*Corresponding authors]
“De novo peptides that induce the liquid-liquid phase separation of α -synuclein”
 PREPRINT (Version 1) available at *Research Square* [<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2112220/v1>], 2023

タンパク質の液-液相分離(LLPS)は細胞内で様々な機能を果たす重要な現象として注目を集めている。しかし、ターゲット特異的に LLPS を制御するような技術を 0 から創出する研究はこれまでになかった。RaPID スクリーニングにおいて、 α Syn が高次に会合したアミロイド線維を対象にスクリーニングを行った結果、 α Syn の液-液相分離を誘導する特殊ペプチドを獲得することに成功した。今後、タンパク質の相分離・相転移の研究を牽引する革新的な研究へと展開することが期待できる。

2. **Tatsuya Ikenoue***, Miki Oono, Masatomo So, Hodaka Yamakado, Toshiaki Arata, Ryosuke Takahashi, Yasushi Kawata, Hiroaki Suga*, [*Corresponding authors]
“A RaPID macrocyclic peptide that inhibits the formation of α -synuclein amyloid fibrils”
ChemBioChem, 24, e202300320, 2023

非天然アミノ酸を含み、かつ環状化された骨格をもつ特殊ペプチドは、一般的に高い生体内安定性と生理活性を有しており、薬剤としても需要が高い。本研究では α Syn の単量体を対象に RaPID システムによる特殊ペプチド薬剤の探索を行った。その結果天然変性タンパク質である α Syn と相互作用する特殊環状ペプチドが単離された。単離された特殊環状ペプチドは in vitro で濃度依存的にアミロイド線維形成に影響を与えアミロイド線維形成を阻害した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

人工ペプチドによる標的タンパク質の液-液相分離誘導

池之上達哉, 宗正智, 菅裕明

第 45 回日本分子生物学会年会 2022 年 11 月 30 日