

研究題目 液-液相分離制御因子に着目した筋萎縮性側索硬化症の分子 メカニズム解明

研究組織

研究代表者：森 英一朗（奈良県立医科大学）

共同研究者：齋尾 智英（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：七浦 仁紀（奈良県立医科大学）、五十棲 規嘉（奈良県立医科大学）、
井口 直彦（奈良県立医科大学）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis: ALS）はアルツハイマー病、パーキンソン病に次いで多い神経変性疾患であり、また ALS の中には四大認知症の一つである前頭側頭型認知症（frontotemporal dementia: FTD）を呈する例がしばしばあり、他の神経難病との関連も深い。超高齢化社会を迎える我が国において、ALS/FTD の発症メカニズム解明と、治療法・予防法の確立が急務である。最近の研究によって、ALS や FTD に関与するタンパク質が、アミノ酸組成が数種類に偏った低複雑性（low-complexity: LC）ドメインを持ち、LC ドメインの自己集合によって液-液相分離液滴を形成し、機能していることが明らかにされている。さらに、LC タンパク質の液-液相分離は、「相分離シャペロン」によって制御され、その制御システムの不全が ALS や FTD などの神経疾患の発症に深く関与することが示唆されている。しかし、その液-液相分離の制御メカニズム、さらには制御破綻から疾病発症に至るメカニズムについては、ほとんど理解されていない。相分離シャペロンと LC タンパク質の相互作用は弱く動的、過渡的であり、こうした動的な性質が立体構造解析や相互作用解析を困難にし、分子レベルでの理解を妨げている。

そこで本研究では、生化学実験や細胞実験を用いた機能解析に加え、担当教員である齋尾が持つ NMR や SEC-MALS などの物理化学的測定技術を用いることによって、相分離シャペロン

による LC タンパク質の認識メカニズムを解明し、さらに LC タンパク質の液-液相分離制御のメカニズムを解明することを目指した。具体的には、ALS/FTD 関連 LC タンパク質である FUS、hnRNPA2、TDP-43、およびそれらの制御因子としての機能が示唆される Kap β 2 や PPIase 等を対象とした。申請者らは最近、転写因子 ZEB2 の持つ構造ドメインが LC タンパク質の液-液相分離を制御する可能性を新たに見出したことから、ZEB2 や共通の構造ドメインを持つタンパク質も対象とした。

[1-2]研究の方法・経過

本研究では、以下の3つの研究項目を実施した。

1. 相分離シャペロンの機能解析：生化学実験および細胞実験によって、相分離シャペロンの機能を評価した。特に、ヒドロゲル結合実験による LC タンパク質の多様体形成の評価や、濁度アッセイによる LC タンパク質の液-液相分離評価によって、相分離シャペロンの効果を検証した。Kap β 2 や Hsp90、PPIase など、相分離制御との関与が示唆されている因子の機能、および LC タンパク質に対する特異性を評価した。
2. 相分離シャペロンと LC タンパク質の相互作用解析・立体構造解析：NMR や SEC-MALS を使い、相分離シャペロンと LC タンパク質の結合部位、結合ストイキオメトリを明らかにすることに取り組んだ。さらに、NMR 立体構造解析によって、相分離

シャペロンと LC タンパク質の立体構造を決定し、LC タンパク質の認識メカニズムを明らかにすることに取り組んだ。

- 3) **疾患関連変異の評価**: LC タンパク質に多数報告される ALS/FTD 関連変異が LC タンパク質の多量体形成能や相分離シャペロンとの結合能に与える影響を検証し、遺伝子変異によって相分離制が破綻するメカニズムを明らかにすることに取り組んだ。具体的には、ヒドロゲル結合実験によって LC タンパク質の多量体形成を評価し、NMR 相互作用解析によって相分離シャペロンとの相互作用を評価した。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

当該課題での共同研究を通じて、これまでに AMED 脳とこころの研究推進プログラム(代表: 森, 分担: 丹羽, 富田, 齋尾; 2021-2024) や AMED 難治性疾患実用化研究事業(代表: 齋尾, 分担: 七浦, 協力: 森; 2020-2022) などの研究費を獲得しながら生物学的相分離の制御メカニズム解明を目指した研究を推進し、その成果の一部を学会発表や論文発表するなど (Nanaura et al. 2021 *Nat Commun*) 成果発表を行った。また、齋尾が代表の AMED 難治性疾患実用化研究事業については、その成果が評価され、2023 年度開始の新規課題にも採択されるなどの成果に繋がった。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究により、*C9orf72* 遺伝子異常を有する ALS/FTD において、アルギニンを多く含む毒性ペプチドが、 $\text{Kap}\beta 2$ などの相分離制御因子の機能を阻害する詳細な分子メカニズムが明らかとなった。相分離制御因子とその破綻に着目した本研究成果から、ALS や FTD をはじめとする神経変性疾患の病態解明、新たな治療法開発につながることを期待される。今回の成果の一部を論文発表するなど、当該共同研究は着実に成果に結びついており、今後のさらなる発展が期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

なし

[3-2] 学会発表

- 1) **森 英一朗**. 相分離破綻と *C9orf72*. 第 30 回

日本 Cell Death 学会学術集会, 東京, 6 月 25 日, 2022.

- 2) **森 英一朗**. 温熱ストレスに対する液-液相分離反応に関する研究. 第 39 回日本ハイパーサーミア学会, 福岡, 9 月 2 日, 2022.

- 3) **森 英一朗**. 生物学的相分離の駆動と制御. TI-FRIS/FRIS Life Science Seminar 2022-2023 (Vol. 5), 仙台, 9 月 22 日, 2022.

- 4) **森 英一朗**. 神経変性疾患における相分離生物学. 日本神経学会 難治性神経疾患基礎研究支援事業シンポジウム 脳神経内科ウェブセミナー: 神経変性疾患における「相分離制御」と「分解機構」の機能破綻, 檀原, 10 月 10 日, 2022.

- 5) **Mori E**. Recognition of cross- β structure. The 2nd International Symposium on Human InformatiX: Sensing, Modeling, and Controlling Omics in Biomedicine, 大阪, 10 月 24 日, 2022.

- 6) **森 英一朗**. 神経難病の病態解明と創薬への取り組み. 東京医科歯科大学 第 15 回 CBIR 若手シンポ・第 76 回大学院セミナー, 東京, 2 月 17 日, 2023.

- 7) **森 英一朗**. *C9orf72* 変異に関連した相分離異常と疾患発症. 第 21 回神経・筋の免疫疾患を考える会, 大阪, 2 月 17 日, 2023.

- 8) **森 英一朗**. 相分離の駆動・制御・破綻と神経難病. 第 4 回生体内超分子システム研究会, 川崎, 2 月 27 日, 2023.

- 9) **森 英一朗**. 神経変性疾患における相分離破綻モデル. 日本小脳学会 第 13 回学術集会・総会, 小平, 3 月 25 日, 2023.

[3-3] 成果資料等

なし

【4】今後の課題等

2021 年度開始の当該共同研究を通じて、既に共同研究の成果を論文発表 [Nanaura et al. *Nat Commun* 2021] するなど、研究成果の導出に取り組んできている。また、新たな成果も出てきており、2023 年度中に論文として成果を発表することを目指している。本共同研究を通じて明らかにした生命現象に基づき、更なる機序解明に取り組んでいきたい。