

# 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）

## 【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、共同研究者・齋尾が有する 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解明を目的とした。

### [1-2]研究の方法・経過

以下の研究項目を実施することによって、LC タンパク質の液-液相分離制御のメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目指した。

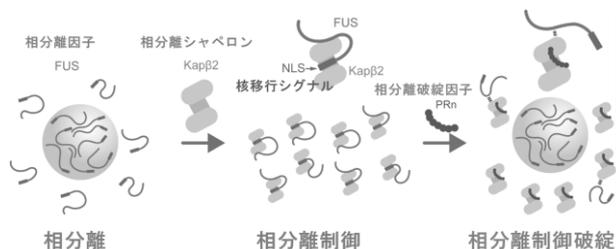
1. 相分離シャペロンの機能解析：生化学実験および細胞実験によって、相分離シャペロンの機能を評価した。特に、ヒドロゲル結合実験による LC タンパク質の多様体形成の評価や、濁度アッセイによる LC タンパク質の液-液相分離評価によって、相分離シャペロンの効果を検証した。Kap $\beta$ 2 を含む相分離制御との関与が示唆されている因子の機能、および LC タンパク質に対する特異性を評価した。
2. 相分離シャペロンと LC タンパク質の相互作用解析・立体構造解析：NMR や SEC-MALS を用い、相分離シャペロンと LC タンパク質の結合部位、結合ストイキオメトリーを明らかにした。さ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

本研究では、毒性ペプチドが相分離制御因子の機能を阻害するメカニズムを分子レベルで明らかにした。Kap $\beta$ 2 は FUS などの RNA 結合タンパク質の核移行シグナル（NLS）に結合して相分離を制御することがこれまで報告されていたが、今回の研究で、アルギニンを多く含む毒性ペプチド（PRn）が Kap $\beta$ 2 の NLS 結合部位を標的とすることで相分離を破綻させる、と

いうモデルが提唱された（下図）。



今回の研究では、まず *C9orf72* の非翻訳領域リピートの異常伸長から産生される5種類の毒性ペプチドが、Kapβ2の相分離制御能に与える影響を解析した。精製タンパク質を用いた濁度評価により、アルギニンを多く含む毒性ペプチドである GRn および PRn が、Kapβ2の相分離制御能を阻害することが明らかとなった。液滴形成の評価および、ヒドロゲルを用いた生化学的評価でも、PRnによる相分離制御能の阻害効果を確認した。

次に、PRnとKapβ2が細胞内で相互作用することを免疫沈降法により確認しました。また、等温滴定カロリーメトリー (ITC) およびサイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱法 (SEC-MALS) などの物理化学的解析により、Kapβ2とPRnは1:1で強固に結合することが示唆された。

さらに核磁気共鳴 (NMR) 装置により、Kapβ2とPRnの相互作用部位を詳細に解析した。まず、安定同位体で標識したKapβ2のNMRスペクトラムを取得した。Kapβ2は、FUSなどのRNA結合タンパク質の核移行シグナル (NLS) を認識して、相分離を制御していることがこれまで報告されていた。そこで、Kapβ2にPRnを加えた際のスペクトルと、Kapβ2のNLS結合部位に結合するM9Mペプチドを加えた際のスペクトルを比較したところ、共通して変化するピークがみられた。これによりPRnの標的部位は、Kapβ2のNLS結合部位と部分的にオーバーラップすることが示唆された。Kapβ2のNLS結合部位は負に帯電しており、正の電荷を持つPRnの標的部位となっていることが推察された。分子動力学 (MD) シミュレーションでも、Kapβ2とPRnとの相互作用を検討したところ、NMRの結果と合致した。

[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、Kapβ2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 [Nanaura et al. *Nat Commun* 2021] 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

1) **Nanaura H**, Kawamukai H, Fujiwara A, Uehara T, Aiba Y, Nakanishi M, Shiota T, Hibino M, Wiriyaermkul P, Kikuchi S, Nagata R, Matsubayashi M, Shinkai Y, Niwa T, Mannen T, Morikawa N, Iguchi N, Kiriya T, Morishima K, Inoue R, Sugiyama M, Oda T, Kodera N, Tomafukai 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; 12(1): 5301.

[3-2]学会発表

1) **Mori E**, Nanaura H, Shiota T, Iguchi N, Sugie K. Biological phase separation in neurological disorders. 第62回日本神経学会学術大会, 京都, 5月19日, 2021.

2) **森 英一朗**. 相分離生物学: 分子集合状態と分子シャペロンによる制御. 第38回日本ハイパーサーミア学会, つくば, 9月4日, 2021.

[3-3]成果資料等

該当無し。

### 【4】今後の課題等

これまでの研究では、相分離シャペロンとして機能するKapβ2の機能制御と破綻について調べてきたが、定量的な評価はまだ十分ではなく、より詳細な定量評価が求められる。さらに、他の制御因子による相分離制御機構についても未解明な点が多く残されており、今後の検討課題として取り組んでいく。