

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・細胞生物学的な機能解析に加え、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。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 等を対象とする。申請者らは最近、山中 4 因子の 1 つである KLF4 や転写因子 ZEB1/2 等が 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、これらのタンパク質も対象とする。

[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ー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。

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、これまでも、齋尾との共同研究については、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)、AMED 難治性疾患実用化研究事業 (代表: 齋尾, 分担: 五十棲, 協力: 森, 2023-2025) や基盤研究(B) (代表: 森, 分担者: 齋尾, 2020-2023) 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た。また、その成果の一部を論文発表するなどしてきた (Nanaura et al. 2021 *Nat Commun*, Iguchi et al. 2023 *bioRxiv*)。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究によって得られる ALS/FTD の分子メカニズムの理解は、LLPS が関与する他の多くの難病の理解を飛躍的に加速させると期待される。また、本研究によって確立される解析戦略は、タンパク質凝集体を伴う他の疾患の研究にも適用され、多くの研究の発展に寄与すると期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1) Sakaguchi YM[#], Wiriyaermkul P[#], Matsubayashi M[#], Miyasaka M, Sakaguchi N, Sahara Y, Takasato M, Kinugawa K, Sugie K, Eriguchi M, Tsuruya K, Kuniyasu H, Nagamori S*, **Mori E***. Identification of three distinct cell populations for urate excretion in human kidneys. *J Physiol Sci* 2024; 74(1): 1.

2) **Iguchi N[#]**, **Isozumi N[#]**, Hattori Y, Imamura T, So M, **Nanaura H**, Kiriya T, Eura N, Yamaoka M, Nakanishi M, Mori M, Ohki S, Kumeta H, Koga H, Watabe M, Mabuchi T, Kanemura S, Okumura M, Yoshizawa T, Ota I, Suzuki N, Aoki M, Yamashiro Y, **Saio T**, Sugie K*, **Mori E***. Zinc finger domains bind low-complexity domain polymers. *bioRxiv*

2023.10.29.564599.

doi: 10.1101/2023.10.29.564599 (プレプリント)

[3-2]学会発表

1) **森 英一朗**. 生物学的相分離：最近の研究動向と創薬に向けた取り組み. 千里ライフサイエンスセミナーV1「相分離がもたらす医療・創薬の新展開」, 大阪, 5月26日, 2023.

2) **森 英一朗**. 相分離メガネがあぶりだした生命科学の課題. 第23回蛋白質科学会 [WS3「遅延制御による相分離現象の理解」共催: 学術変革領域研究B「遅延制御超分子化学」], 名古屋, 7月5日, 2023.

3) **森 英一朗**. 相分離生物学の基礎と神経変性疾患への応用可能性. シンポジウム4「神経変性疾患の相分離」, 第17回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRESS, 大阪, 7月21日, 2023.

4) **Eiichiro Mori**. Recognizing cross- β polymers. The 46th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society [IS06m: Molecular mechanism of motor neuron disease unravelled: achievements from the interdisciplinary collaboration], 仙台, 8月1日, 2023.

[3-3]成果資料等

該当無し。

【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年度中にプレプリントとして成果を発表した。現在、当該プレプリント論文のリサイズ対応に取り組んでいる状況である。本共同研究を通じて明らかになっ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。