

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16583

研究課題名（和文）筋萎縮性側索硬化症における液-液相分離制御シャペロンの機能解析

研究課題名（英文）Analyses for molecular chaperones regulating liquid-liquid phase separation in amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

七浦 仁紀 (Nanaura, Hitoki)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00827909

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）をはじめとする神経変性疾患は、細胞内にタンパク質凝集体を呈する疾患である。近年、ALSや関連疾患における凝集体形成に、液-液相分離の制御異常が関連していることが明らかとなってきた。また相分離を制御するシャペロンについても報告されている。本研究では、生化学的解析や生物物理学的解析などの分野横断的な手法を用いて、ALSで生じる毒性ペプチドが、相分離制御シャペロンの機能を阻害する詳細なメカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、毒性ペプチドが、相分離制御シャペロン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。相分離の制御とその破綻に着目した本研究成果から、ALS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事が期待される。

研究成果の概要（英文）：Aggregation and mislocalization of RNA binding proteins (RBPs) are observed in amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases. Regulating self-association of RBPs to suppress the formation of pathogenic fibrils is crucial in the prevention of neurodegenerative diseases. Nuclear import receptors (NIRs) karyopherin-2 (Kap 2) not only controls the nucleocytoplasmic distribution of RBPs but also acts as a phase modifier to regulate self-association of FUS by recognizing proline&#8211;tyrosine nuclear localization signal. Exploiting multiple biochemical and biophysical techniques, we revealed in this study that arginine-rich poly-dipeptides from repeat expansion in C9orf72 impede the ability of NIRs to modify phase transitions of RBPs.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 前頭側頭型認知症 液-液相分離 シャペロン アミロイド 神経変性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、運動神経が変性し、筋萎縮・構音嚥下障害が進行する神経難病である。ALS等の神経変性疾患では、神経細胞内にタンパク質の凝集体が形成され、根本的な治療法はない。近年、遺伝性ALSや関連疾患などの研究から、これらの疾患では細胞内における相分離という現象が重要であることが徐々に明らかとなっていた。

生物学的な相分離とは、核酸やタンパク質などの生体高分子が、弱い相互作用によって集まる現象のことで、液-液相分離することで液滴を形成し、ダイナミックに変化する。核小体やRNA顆粒などの「膜のないオルガネラ」は、細胞内における相分離により形成されている。FUSやhnRNP A2などのRNA結合タンパク質は、アミノ酸が数種類に偏った低複雑性(LC:low-complexity)ドメインを持ち、相分離しやすい性質をもつ。これらのRNA結合タンパク質は膜のないオルガネラにおいて相分離して機能しているが、遺伝子変異などにより相分離が破綻すると不溶性のアミロイド形成につながると推測されている。

また核-細胞質間のRNA結合タンパク質の輸送は、核内輸送受容体が担っているが、これらは相分離を制御するシャペロンとしても働いていることが近年報告されていた。

## 2. 研究の目的

上記のような背景から、相分離が破綻する機序、相分離を制御するシャペロンの機能を解析することが、ALSなどの神経変性疾患のメカニズム解明につながる可能性があり、本研究を行った。

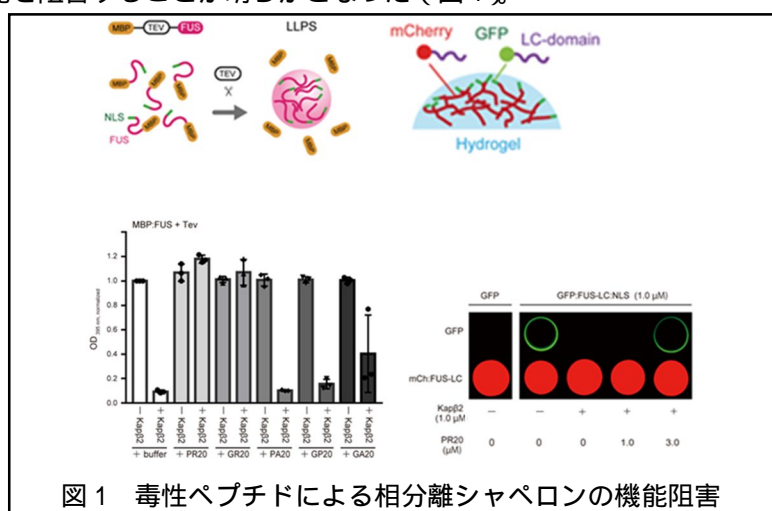
## 3. 研究の方法

本研究では、LCドメインを持つRNA結合タンパク質や、相分離制御機能をもつシャペロンに関して、生化学的解析や生物物理学的解析などの分野横断的解析を行うことで、ALSの背景にある分子メカニズム解明を試みた。

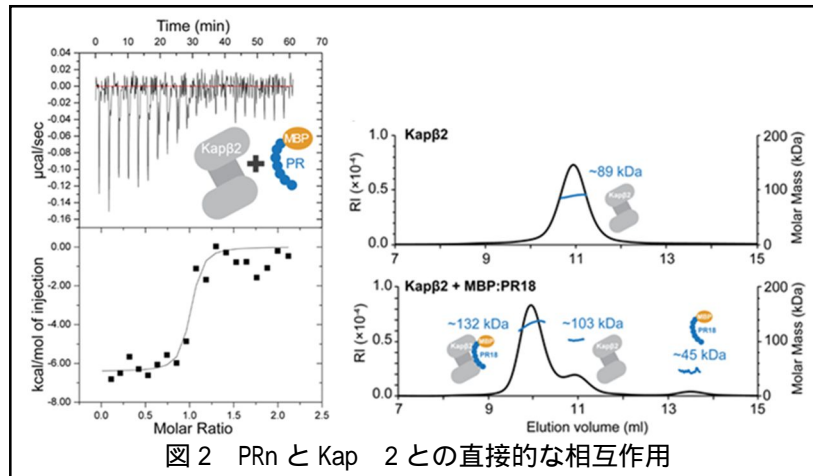
## 4. 研究成果

ALSの遺伝子変異で最も多いものとして、C9orf72遺伝子変異が報告されている。C9orf72の非翻訳領域におけるGGGGCCの6塩基リピートの異常伸長がみられるが、ここから開始コドンによらないRAN翻訳によって5種類のジペプチドリピートが産生される。このRAN翻訳産物である毒性ペプチドが、核内輸送受容体に結合して核-細胞質間の物質輸送を阻害することが近年報告されたが、その詳細な分子メカニズムや相分離への影響は不明である。そこで毒性ペプチドが、Karyopherin 2 (Kap 2)などの核内輸送受容体に与える影響に着目して解析を行った。

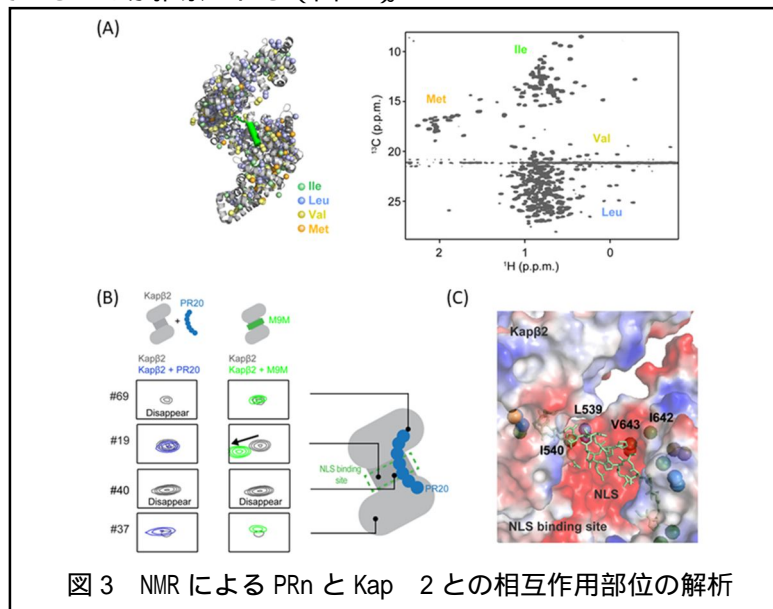
まず、C9orf72の非翻訳領域リピートの異常伸長から産生される5種類のジペプチドリピートが、Kap 2の相分離制御能に与える影響を解析した。精製タンパク質を用いた濁度評価やヒドロゲル結合法等により、アルギニンを多く含む毒性ペプチドであるGRnおよびPRnが、Kap 2の相分離制御能を阻害することが明らかとなった(図1)。



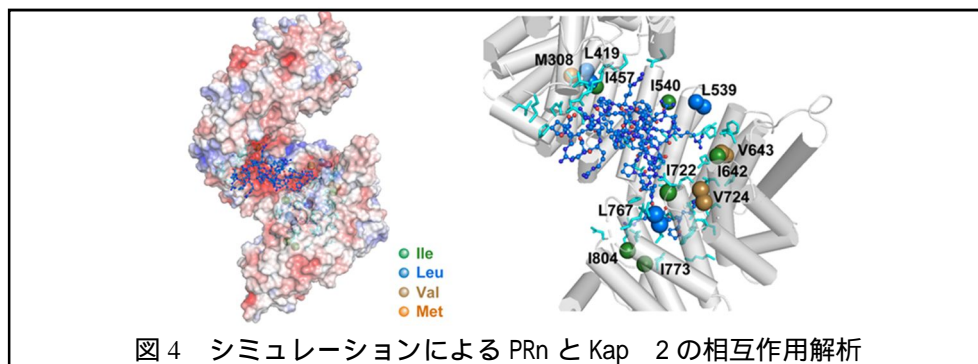
次に、等温滴定カロリーメトリー、サイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱法などの物理化学的解析により、Kap 2とPRnは1:1で強固に結合することが示唆された(図2)。



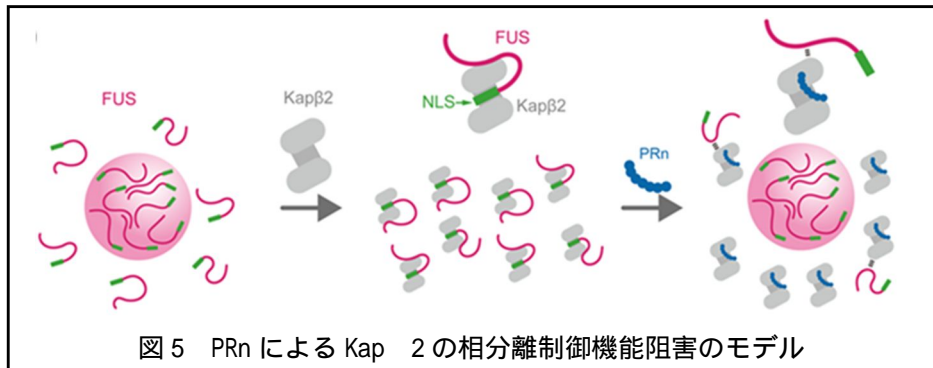
さらに、核磁気共鳴 (NMR) により、Kap 2 と PRn の相互作用部位を解析した。まず、安定同位体で標識した Kap 2 の NMR スペクトラムを取得した (図 3A)。Kap 2 は、FUS などの RNA 結合タンパク質の核移行シグナル (NLS) を認識して、相分離を制御していることがこれまで報告されていることから、Kap 2 に PRn を加えた際のスペクトルと、Kap 2 の NLS 結合部位に結合する M9M ペプチドを加えた際のスペクトルを比較したところ、共通して変化するピークがみられた (図 3B)。これにより PRn の標的部位は、Kap 2 の NLS 結合部位と部分的にオーバーラップすることが示唆された。Kap 2 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る (図 3C)。



分子動力学シミュレーションでも、Kap 2 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 (図 4)。



以上の結果から、アルギニンを多く含む毒性ペプチドが、Kap 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、という分子メカニズムを提唱した(図5)。



本研究から、ALSをはじめとする神経変性疾患の病態解明、治療法開発につながることを期待される。本研究成果は、Nature Communications 誌 (DOI:10.1038/s41467-021-25560-0)に発表した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Matsubayashi Masaya, Sakaguchi Yoshihiko M., Sahara Yoshiki, Nanaura Hitoki, Kikuchi Sotaro et al.	4. 巻 35
2. 論文標題 27 Hydroxycholesterol regulates human SLC22A12 gene expression through estrogen receptor action	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202002077R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ozawa Shota, Matsubayashi Masaya, Nanaura Hitoki, Yanagita Motoko, Mori Kiyoshi, Asanuma Katsuhiko, Kajiwara Nobuyuki, Hayashi Kazuyuki, Ohashi Hiroshi, Kasahara Masato, Yokoi Hideki, Kataoka Hiroaki, Mori Eiichiro, Nakagawa Takahiko	4. 巻 295
2. 論文標題 Proteolytic cleavage of Podocin by Matriptase exacerbates podocyte injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 16002 ~ 16012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013721	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ito Soichiro S., Nakagawa Yosuke, Matsubayashi Masaya, Sakaguchi Yoshihiko M., Kobashigawa Shinko, Matsui Takeshi K., Nanaura Hitoki, Nakanishi Mari, Kitayoshi Fumika, Kikuchi Sotaro, Kajihara Atsuhisa, Tamaki Shigehiro, Sugie Kazuma, Kashino Genro, Takahashi Akihisa, Hasegawa Masatoshi, Mori Eiichiro, Kirita Tadaaki	4. 巻 295
2. 論文標題 Inhibition of the ATR kinase enhances 5-FU sensitivity independently of nonhomologous end-joining and homologous recombination repair pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12946 ~ 12961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013726	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Eura Nobuyuki, Matsui Takeshi K., Luginbuhl Joachim, Matsubayashi Masaya, Nanaura Hitoki et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Brainstem Organoids From Human Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2020.00538	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nanaura Hitoki, Kawamukai Honoka, Fujiwara Ayano, et. al.	4. 巻 12
2. 論文標題 C9orf72-derived arginine-rich poly-dipeptides impede phase modifiers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25560-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shiota Tomo, Nagata Riko, Kikuchi Sotaro, Nanaura Hitoki, Matsubayashi Masaya, Nakanishi Mari, Kobashigawa Shinko, Isozumi Noriyoshi, Kiriyama Takao, Nagayama Kazuaki, Sugie Kazuma, Yamashiro Yoshito, Mori Eiichiro	4. 巻 10
2. 論文標題 C9orf72-Derived Proline:Arginine Poly-Dipeptides Modulate Cytoskeleton and Mechanical Stress Response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.750829	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 七浦 仁紀, 塩田 智, 森 英一朗, 杉江 和馬
2. 発表標題 C9orf72-derived PR poly-dipeptides target Kap 2 through NLS binding site and dysregulate LLPS
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 七浦仁紀、塩田智、森英一朗、杉江和馬
2. 発表標題 Dysfunction of molecular chaperones for phase separating proteins in ALS
3. 学会等名 第62回 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------