

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：24601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23976

研究課題名（和文）プロリンの異性化制御異常による神経変性疾患発症機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenic mechanism of neurodegenerative diseases related to abnormal regulation of isomerization of proline

研究代表者

中西 真理（Nakanishi, Mari）

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40850102

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000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に関して、LCドメインの機能異常が関連していることが明らかとなっており、LCドメインにおける遺伝子変異の多くがプロリンに生じているという特徴がある。そこで、様々な条件下でhydrogel binding assayによってポリマー化を評価したところ、ポリマー化が制御されることが示された。

また、家族性ALSで最も頻度の高い遺伝子異常であるC9orf72の繰り返し配列がある。そこで、相分離制御に与える影響を評価したところ、ポリマー化が促進された。これにより、ALSに関連する遺伝子異常がLCドメインの制御異常を引き起こすことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LCドメインを有するタンパク質のプロリン変異を含む疾患由来変異の解析と、プロリンの異性化を制御しているPPIaseの構造解析を行うことにより、LCドメインに遺伝子異常を持つ神経変性疾患の病態機序の解明を目指している。そのことが治療方法と薬の開発につながり、本研究での成果がそのための第一歩だと考える。

研究成果の概要（英文）：It has become clear that dysfunction of the LC domain is associated with neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and many gene mutations in the LC domain occur in proline. Therefore, when the polymerization was evaluated by the hydrogel binding assay under various conditions, it was shown that the polymerization was controlled. There is also a repetitive sequence of C9orf72, the most common genetic abnormality in familial ALS. Therefore, when the effect on phase separation control was evaluated, polymerization was promoted. This indicates that ALS-related genetic abnormalities cause dysregulation of the LC domain.

研究分野：医学

キーワード：ALS LCドメイン PRポリジペプチド PPIase

1. 研究開始当初の背景

多系統蛋白質症(MSP)は、筋や中枢神経系など多くの臓器に蛋白凝集体を呈する疾患であり、封入体ミオパチーや筋萎縮性側索硬化症(ALS)など多彩な神経症状を示す疾患概念として提唱された。ALSをはじめとする神経変性疾患は、その原因遺伝子が多岐にわたることから、分子生物学的な病態が未だに明らかでなく、有効な治療法はない。

ここ数年、MSP や関連疾患に、low-complexity (LC) ドメインの機能異常が関連していることが明らかとなってきている。細胞の中には、ミトコンドリアや小胞体のように膜によって分画されるオルガネラに加えて、核小体や RNA 顆粒などのような膜を持たないオルガネラ (membrane-less organelle) が存在し、その形成と制御には LC 配列を有するタンパク質による **cross- ポリマー形成**(図1)や**液-液相分離** (liquid-liquid phase separation) (図2)という現象が重要であるということが徐々に明らかになってきた。研究協力者である奈良県立医科大学 森 英一朗 准教授は、MSP/ALS の原因遺伝子の一つである hnRNPA2 の LC ドメイン内に生じた変異によって、ポリマーの化学的安定性が変化することを見出し [Lin, Mori et al. *Cell* 2016] また核・細胞質間の物質輸送において核膜孔の LC ドメインが重要な機能を有していることを明らかにした [Shi, Mori et al. *PNAS* 2017] しかし、LC ドメインの機能異常と疾患との関連性が指摘されていながら、その詳細な機序は不明である。

LC タンパク質のアミノ酸組成は数種類に偏り、一般的なタンパク質が取るような高次構造を形成しない。興味深いことに、LC ドメインを構成するアミノ酸の中にはプロリン残基が多く含まれ、LC ドメインにおける遺伝子変異の多くがプロリンに生じている。さらに、hnRNPA2 の LC ドメインの生化学的解析によって、プロリンの *cis/trans* 異性化を制御する peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase (PPIase) が、LC ドメインによって形成されるポリマー形成の制御に非常に重要な働きをしていることが明らかになっている [Xiang et al. *Cell* 2015] また、液-液相分離がシャペロンによって制御されることが、最近次々に報告されている [Yoshizawa et al. 2018 *Cell*; Qamar et al. 2018 *Cell*]。このように、PPIase 等のシャペロンによる LC ドメインの制御と、LC ドメインの遺伝子変異によるその制御の破綻が ALS を含む神経変性疾患のメカニズム解明の鍵を握ると考えられるが、その分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。LC ドメインの動的な性質や PPIase 等のシャペロンとの弱く過渡的な相互作用が構造解析、相互作用解析を困難にし、メカニズムの解明を妨げてきた。

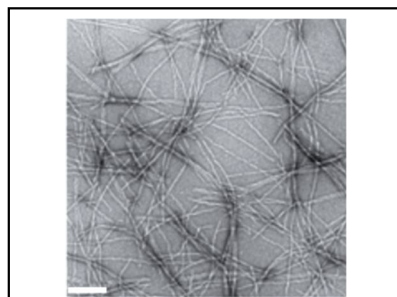


図1: cross- ポリマー形成

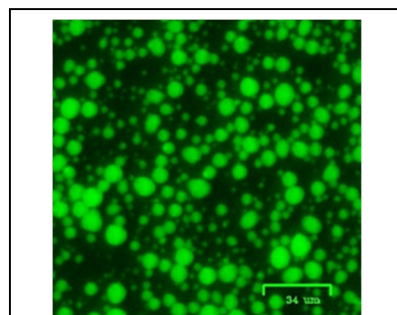
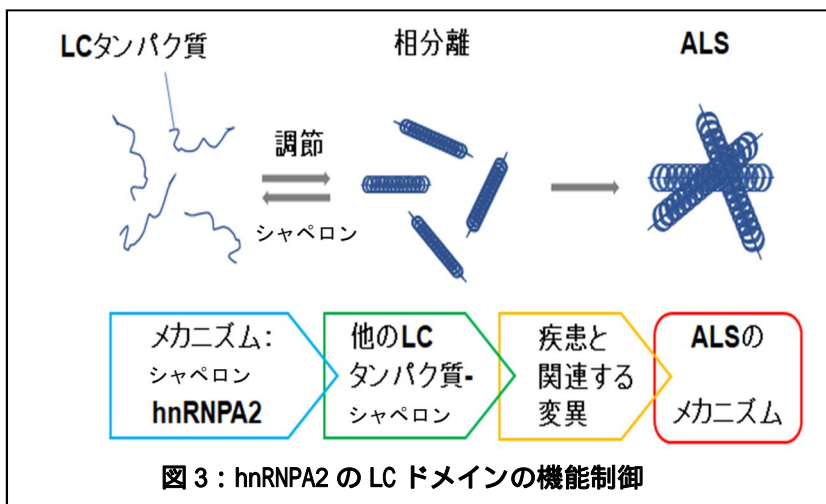


図2: 液-液相分離

2. 研究の目的

本研究は、hnRNPA2 の LC ドメインについて、cross- ポリマー形成における生化学的な評価と、研究協力者である徳島大学 齋尾智英 教授が持つ最先端の NMR 解析技術 [ *Science* 2014; *Nature* 2016 ] の技術的支援を得ることによって、PPIase 等のシャペロンによる hnRNPA2 の LC ドメインの制御メカニズムを明らかにし、ALS 発症の謎を解明することを目指す (図3)。



### 3. 研究の方法

本研究は、以下に記すような手法を組み合わせで行う。

#### ALS 遺伝子変異の生化学的解析

ALS の遺伝子変異が、LC ドメインの動態や PPIase 等のシャペロンとの相互作用に与える影響を調査し、遺伝子変異による ALS 発症のメカニズムを明らかにする。生化学的手法によって変異の影響を検証する。具体的には、LC ドメインを含むタンパク質を精製し、Hydrogel binding assay (図 4) による解析を行う。

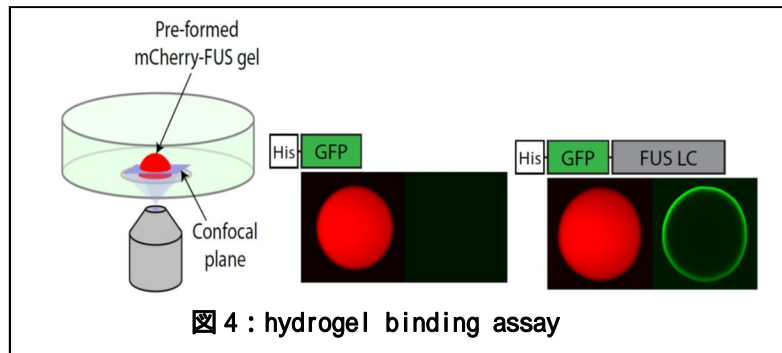


図 4 : hydrogel binding assay

#### NMR 立体構造解析

NMR 立体構造解析によって、シャペロンによる LC ドメインの認識メカニズムを詳細に明らかにする。また疾患由来変異による LLPS への影響を NMR により解析する。PPIase などのシャペロンと LC ドメインのように、弱く動的な相互作用によって形成される複合体についての立体構造解析は、これまで困難であったが、研究協力者である徳島大学 齋尾智英 教授がもつ最新の NMR 解析 [ Science 2014; Nature 2016 ] による技術的支援を得ることで、動的複合体の高分解能立体構造解析が可能となる。

### 4. 研究成果

His-GFP/mCh tag を付加した hnRNP A2 の LC ドメイン (図 5) の発現コンストラクトを大腸菌に形質転換し、IPTG を加えてタンパク発現させた後にペレットを回収、Ni-NTA ビーズを用いて精製タンパクを得た。濃縮してヒドロゲルを作製し、hydrogel binding assay によってポリマー化を評価した。

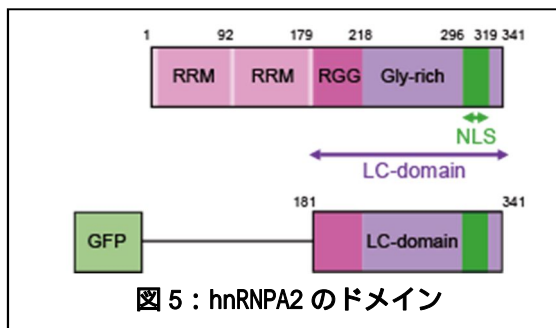


図 5 : hnRNP A2 のドメイン

また、先行研究 [ Xiang et al. Cell 2015 ] によって PPIase が、MSP/ALS 原因遺伝子の一つである hnRNP A2 の LC ドメインのポリマー形成に影響を与えることが示唆されていることから、PPIase についても発現コンストラクトを作製し、同様の手法でタンパク精製を行った後、hnRNP A2 の hydrogel binding assay への影響を評価したところ、PPIase を加えた場合に、hnRNP A2 の LC ドメインのポリマー化が制御されることが示された (図 6)。

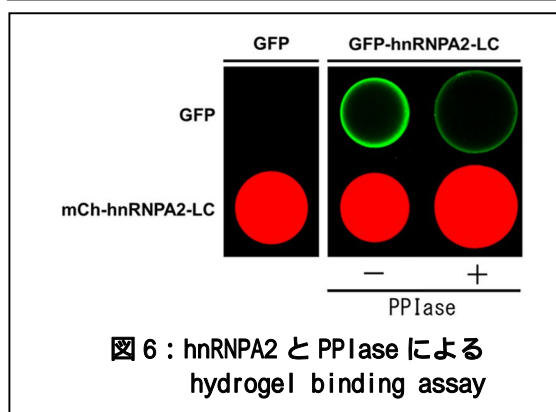


図 6 : hnRNP A2 と PPIase による hydrogel binding assay

さらに、近年液-液相分離がシャペロンとして報告された Kap 2 [Yoshizawa et al. 2018 Cell; Qamar et al. 2018 Cell] についても、同様の手法を用いて評価を行ったところ、Kap 2 の濃度依存性に hnRNP A2 の LC ドメインのポリマー化が制御されることが示された (図 7)。

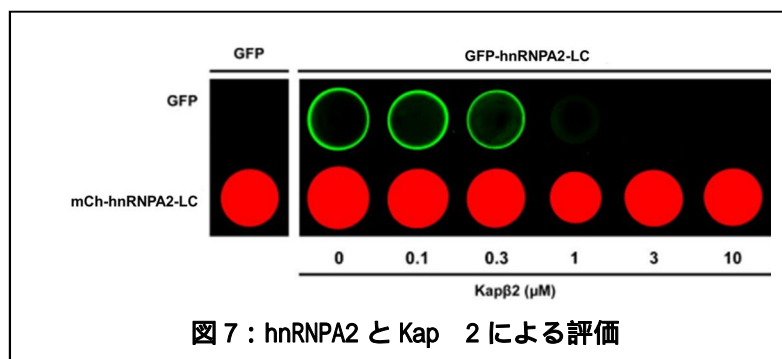
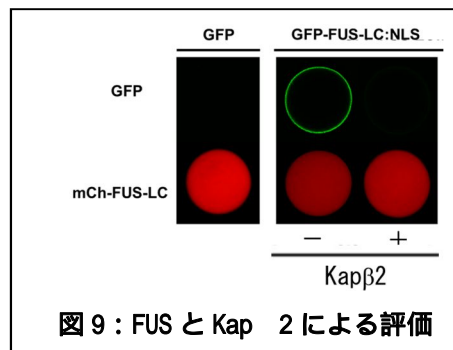
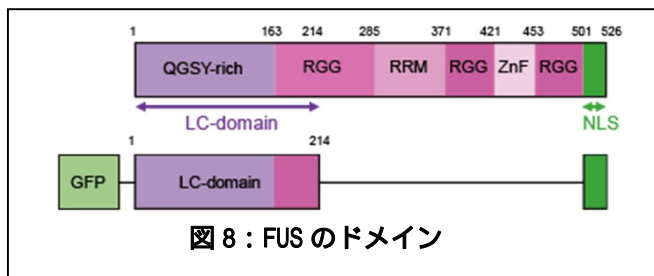
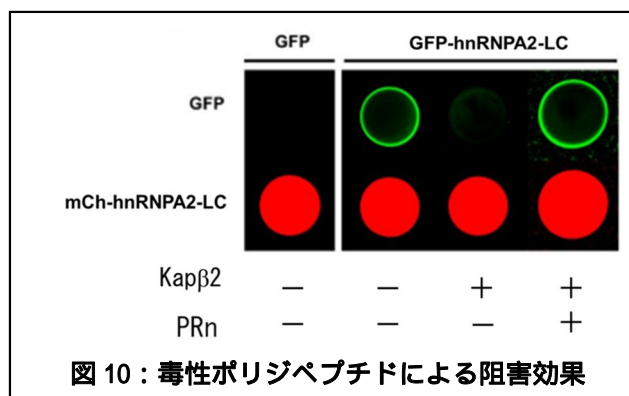


図 7 : hnRNP A2 と Kap 2 による評価

さらに、他の LC ドメインを持つタンパク質として、FUS についても His-GFP/mCh tag を付加した発現コンストラクト(図 8)を用いて精製タンパクを得て、同様に hydrogel binding assay を行ったところ、Kap 2 の存在下で FUS の LC ドメインのポリマー化が制御されることが示された(図 9)。



また疾患と関連する遺伝子変異として、家族性 ALS で最も頻度の高い遺伝子異常である C9orf72 の第 1 イントロンにおける GGGGCC の繰り返し配列がある。この繰り返し配列からプロリン・アルギニンポリジペプチド(PRn)を含む複数の病的な毒性ポリペプチドが産生される。そこで、PRn が相分離制御に与える影響を、hydrogel binding assay により評価した。PRn 存在下では、Kap 2 の液-液相分離制御能が阻害され、LC ドメインのポリマー化が促進された(図 10)。これにより、ALS に関連する遺伝子異常が、LC ドメインの制御異常を引き起こすことが示された。



PRn によって Kap 2 の液-液相分離制御能が阻害されるという結果をふまえて、研究協力者の齋尾のもとで、NMR により PRn と Kap 2 の相互作用解析を施行、Kap 2 上の PRn の結合部位を推定した。

本研究成果から、LC ドメインの制御異常と、ALS をはじめとした疾患との関連が示唆される。以上の成果を、プレプリント(BioRxiv 2019 doi: <https://doi.org/10.1101/812099>)として報告した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

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., Luginbhl Joachim, Matsubayashi Masaya, Nanaura Hitoki, Shiota Tomo, Kinugawa Kaoru, Iguchi Naohiko, Kiriyama Takao, Zheng Canbin, Kouno Tsukasa, Lan Yan Jun, Kongpracha Pornparn, Wiriyasermkul Pattama, Sakaguchi Yoshihiko M., Jong Miyong, Kobashigawa Shinko, Nakanishi Mari 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 1 ~ 14
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 Matsubayashi Masaya, Sakaguchi Yoshihiko M., Sahara Yoshiki, Nanaura Hitoki, Kikuchi Sotaro, Asghari Arvand, Bui Linh, Kobashigawa Shinko, Nakanishi Mari 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 Federation of American Societies for Experimental Biology journal	6. 最初と最後の頁 1 ~ 15
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 Nanaura Hitoki, Kawamukai Honoka, Fujiwara Ayano, Uehara Takeru, Nakanishi Mari et. al.	4. 巻 preprint
2. 論文標題 Toxic PR poly-dipeptides encoded by the C9orf72 repeat expansion target Kap 2 and dysregulate phase separation of low-complexity domains	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/812099	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiota Tomo, Nagata Riko, Kikuchi Sotaro, Nanaura Hitoki, Matsubayashi Masaya, Nakanishi Mari, Kobashigawa Shinko, Nagayama Kazuaki, Sugie Kazuma, Yamashiro Yoshito, Mori Eiichiro	4. 巻 preprint
2. 論文標題 C9orf72- derived proline:arginine poly-dipeptides disturb cytoskeletal architecture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1~18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.10.14.338566	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------