

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03593

研究課題名（和文）ALS原因蛋白による液液相分離の機能構造連関とその病理的意義の解明

研究課題名（英文）Functional-structural relationship of liquid-liquid phase separation caused by ALS-causing proteins and its pathological significance.

研究代表者

金蔵 孝介（Kanekura, Kohsuke）

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10508568

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：C9ORF72ジペプチドやTDP-43などのALS関連蛋白は相分離異常を起こすことでALS発症に寄与すると考えられるが、その分子機構は不明な点が多かった。本研究ではC9ORF72由来poly(PR)がなぜ毒性を発揮するのかを様々な構造変異体、オミクス解析、in silico解析を組み合わせることで解析した結果、Argの間にスベーターとなるアミノ酸が挿入されることで結合エネルギー的には不利であるものの、多価結合を促進し、相分離を促進することで毒性を発揮することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、C9ORF72由来ジペプチドの機能構造連関が初めて明らかとなった。本研究を応用することで、C9ORF72-poly(PR)の毒性機構を理解し、さらに相分離異常を標的とした新規治療法の開発にもつながる可能性がある。また、本研究は非膜性オルガネラの形成機構など広く科学分野へ寄与する可能性がある。研究生は論文の出版や学会発表を通じて学术界で知見を共有し、さらに一般社会へ還元される。

研究成果の概要（英文）：ALS-related proteins such as C9ORF72 dipeptide repeat proteins and TDP-43 are thought to contribute to ALS pathogenesis by disturbing phase separation homeostasis, but their molecular mechanisms have remained unclear. In this study, we analyzed why C9ORF72-derived poly(PR) is toxic by combining various structural variants, multi-omics analyses, and in silico analysis, and found that although the insertion of Pro between Arg is disadvantageous in terms of binding energy, it promotes multivalent binding and enhanced phase separation, resulting in toxicity.

研究分野：神経内科学、細胞生物学

キーワード：液液相分離 筋萎縮性側索硬化症 C9ORF72 TDP-43

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物は細胞内の特定の部位において生体高分子のやわらかな凝集を作り、生命活動を効率よく進める。この凝集の形成過程に液液相分離(LLPS)と呼ばれる現象が関与することが明らかとなってきた。LLPSは広汎な生命現象への関与が示されているが、LLPSを制御する因子については不明な点が極めて多い。例えば、LLPSの液滴の内部環境の密度や流動性がどのように生命現象に関与するかは不明である。我々はC9orf72ジペプチドをLLPS分子モデルとして捉え、これを元に様々なペプチドを作成し、RNAや結合蛋白質とのLLPSを網羅的に観察し、蛋白翻訳への影響を観察しているが、予想に反して結合力強 = 強毒性であり、むしろ結合力弱 = 強毒性であることを実験的に確認している。また電荷の位置によってもLLPSの状態が変化することなど、その制御には複雑な機構が存在すると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は(1)ALS原因蛋白質のLLPS液滴の生化学的な理解 (2) ALS原因蛋白質のLLPSを制御する因子の原子・分子レベルでの解明 (3)LLPS異常によるALS発症機序の解明の3点である。これらはそれぞれが補完関係にあり、LLPSの制御(形成、維持、解消または固相への転移など)と異常の機構を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ALS原因蛋白質のLLPS液滴の生化学的な理解

in vitroにおけるLLPSと蛋白翻訳およびRNA代謝との詳細な解析

C9orf72ジペプチドは蛋白翻訳およびRNA代謝を障害し、FUSおよびTDP-43はRNAスプライシングやストレス顆粒形成の障害が示されている。我々はin vitroにおいてこれらの疾患原因蛋白質の野生型および変異型のリコンビナント蛋白を作成し、LLPSの内部環境とこれらの機能異常の相関について検討を進める。評価系としては無細胞翻訳系および細胞を用いた翻訳系を用いた。

プロキシミティラベリング法を用いたALS関連LLPSに含まれる因子の網羅的解析

LLPSは非常に柔らかな高分子の一過性集合体であるため、従来のALS原因蛋白質のプロテオミクス解析では真の複合体解析は困難である。そこで一過性の弱い相互作用を網羅的に同定する手法として近年開発されたプロキシミティラベリング法を導入し、解析を実現した。

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)によるALS-LLPSモニタリング法の開発

で同定されたLLPSに関連する分子が実際にLLPSに取り込まれているかを検討する。ただしこれらの分子との結合は直接的もしくは恒常的ではなく、間接的かつ一過性である可能性があるため、新規に開発されたLLPS内分子をラベルできるFRETプローブを改変したCRONOSセンサーを開発してLLPS液滴内混雑を観察した。

#### (2) ALS原因蛋白質のLLPSを制御する因子の原子・分子レベルでの解明

Gromacsを用いた分子動力学計算

C9orf72ジペプチドを用いたLLPSを一つの疾患モデルとして研究を進めているが、このジペプチドはPro-Argの繰り返し、またはGly-Argの繰り返しという非常に単純な構造を持つため、分子動力学計算でどの原子とどの原子が引き合うかを計算することが可能である。高い計算力が必要となるため、東京工業大学が所有するスーパーコンピュータ-TSUBAMEを使用した。

ALS原因蛋白質とRNAまたはLLPS関連蛋白質との結合の解明

LLPSを形成するためには分子同士が何らかの力で引き合う必要がある。これは一般的な生化学的手法で区別することは困難であるが、ラマン分光法を用いることにより、静電力による結合やカチオンπ相互作用といった結合を区別することに挑んだ。現在データを解析し、論文を投稿準備中である。

#### (3) LLPS異常によるALS発症機序の解明

C9orf72ジペプチドによる毒性機構を解明するために、定量的プロテオーム解析を行った。また、同定された蛋白質の情報のデータマイニングをPythonを用いて行った。さらに、小化合物により液液相分離を制御する技術を開発し、人工的にTDP-43の相分離を誘導する技法を開発した。

### 4. 研究成果

我々はC9orf72由来ジペプチドがなぜ毒性を持つのかについて様々な構造変異体、オミクス解析、in silico解析を組み合わせて解析した結果、Argの間にスパーサーとなるアミノ酸が挿入されることで結合エネルギー的には不利であるものの、多価結合を促進し、相分離を促進することで毒性を発揮することを見出し、報告した(Chen et al., J Cell Biol. 2021)。データマイニングによる結合蛋白質の解析により、poly(PR)の配列は特に酸性蛋白質との結合および相分離を促すことを同定した。本研究はなぜC9orf72ジペプチドが毒性を持つのかを解明し、C9orf72ジ

ペプチドの機能構造連関を世界で初めて報告したものである。現在さらにスパーサーの役割について研究を進めている。また、C9ORF72 由来ジペプチドの相分離液滴の固体液体界面での振る舞いについて、分子間相互作用の多価性が液滴の動きに与える影響について報告した(Chen et al., *Langmuir* 2021; Chen et al., *ACS Omega*, 2022)。

研究を進める過程で細胞内非膜性オルガネラ内部の環境測定の必要が出たため、新規マクロ分子クラウドセンサーCRONOSを開発し、様々なストレス環境下で細胞内非膜性オルガネラの内部の混雑度が変化すること、非膜性オルガネラ内部の混雑度がオルガネラの種類によって異なることなどを報告した(Miyagi et al., *BBRC* 2021)。本クラウドセンサーは *in vitro* での相分離液滴内部の環境測定にも有用である。

また、C9orf72 由来ジペプチドと同じように交互にアルギニンを持つジペプチドの細胞内局在を決定する中で、酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸が交互に存在する配列は核スペckルに集積すること、さらに正電荷と負電荷を分離させると核スペckルから核小体へと局在が変化したことから、核スペckルへの局在には正電荷と負電荷が交互に出現する zwitterion 構造が重要であることを明らかにした(Miyagi et al., *Int J Mol Sci.* 2022)。正電荷と負電荷が集積すると相分離しやすくなったことから、zwitterion 構造はむしろ核小体内 ribosomal RNA による引力から抜け出すのに必要と思われるが、その機序の解明については今後の課題である。

また、LLPS 異常による ALS 発症機構の解明のために、小分子 AP20187 による TDP-43 相分離誘導技術を開発し、細胞内で強制的に TDP-43 の相分離を誘導すると、細胞質内へ移行して相転移し、FUS や TIA1 など ALS 組織で見られる凝集体構成蛋白と共に凝集体を形成することを明らかにした(Yamanaka et al., *Lab. Invest.* 2021; Kanekura et al., *Neur. Reg. Res.* 2022)。

これらの研究計画を遂行したことで、C9orf72 ジペプチドや TDP-43 などの ALS 原因蛋白がどのようにして相分離し、さらに相分離の破綻へ繋がっていくのかを明らかにすることに貢献できたと考えている(Kanekura et al., *Lab. Invest.* 2022)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 18件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kanekura Kohsuke, Hayamizu Yuhei, Kuroda Masahiko	4. 巻 322
2. 論文標題 Order controls disordered droplets: structure-function relationships in C9ORF72-derived poly(PR)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C197 ~ C204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpcell.00372.2021	査読の有無 有
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 Miyagi Tamami, Yamanaka Yoshiaki, Harada Yuichiro, Narumi Satoshi, Hayamizu Yuhei, Kuroda Masahiko, Kanekura Kohsuke	4. 巻 583
2. 論文標題 An improved macromolecular crowding sensor CRONOS for detection of crowding changes in membrane-less organelles under stressed conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 29 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.10.055	査読の有無 有
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 Chen Chen, Yamanaka Yoshiaki, Ueda Koji, Li Peiying, Miyagi Tamami, Harada Yuichiro, Tezuka Sayaka, Narumi Satoshi, Sugimoto Masahiro, Kuroda Masahiko, Hayamizu Yuhei, Kanekura Kohsuke	4. 巻 220
2. 論文標題 Phase separation and toxicity of C9orf72 poly(PR) depends on alternate distribution of arginine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell 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) 10.1083/jcb.202103160	査読の有無 有
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 Jigjidkhorloo Narangerel, Kanekura Kohsuke, Matsubayashi Jun, Akahane Daigo, Fujita Koji, Oikawa Keiki, Kurata Atsushi, Takanashi Masakatsu, Endou Hitoshi, Nagao Toshitaka, Gotoh Akihiko, Norov Oyundelger, Kuroda Masahiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Expression of L-type amino acid transporter 1 is a poor prognostic factor for Non-Hodgkin's Lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-021-00811-8	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 Yamanaka Yoshiaki, Miyagi Tamami, Harada Yuichiro, Kuroda Masahiko, Kanekura Kohsuke	4. 巻 101
2. 論文標題 Establishment of chemically oligomerizable TAR DNA-binding protein-43 which mimics amyotrophic lateral sclerosis pathology in mammalian cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1331 ~ 1340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-021-00623-4	査読の有無 有
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 Chen Chen, Li Peiying, Luo Wei, Nakamura Yoshiki, Dimo Vanessa Seudo, Kanekura Kohsuke, Hayamizu Yuhei	4. 巻 37
2. 論文標題 Diffusion of LLPS Droplets Consisting of Poly(PR) Dipeptide Repeats and RNA on Chemically Modified Glass Surface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 5635 ~ 5641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.1c00493	査読の有無 有
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 Umezu Tomohiro, Takanashi Masakatsu, Murakami Yoshiki, Ohno Shin-ichiro, Kanekura Kohsuke, Sudo Katsuko, Nagamine Kenichi, Takeuchi Shin, Ochiya Takahiro, Kuroda Masahiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Acerola exosome-like nanovesicles to systemically deliver nucleic acid medicine via oral administration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development	6. 最初と最後の頁 199 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2021.03.006	査読の有無 有
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 Yagi Takuya, Asada Rie, Kanekura Kohsuke, Eesmaa Ave, Lindahl Maria, Saarma Mart, Urano Fumihiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Neuroplastin Modulates Anti-inflammatory Effects of MANF	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101810 ~ 101810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101810	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 Umezu Tomohiro, Tsuneyama Koichi, Kanekura Kohsuke, Hayakawa Michiyo, Tanahashi Toshihito, Kawano Mitsuoki, Taguchi Y-h, Toyoda Hidenori, Tamori Akihiro, Kuroda Masahiko, Murakami Yoshiki	4. 巻 10
2. 論文標題 Comprehensive analysis of liver and blood miRNA in precancerous conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78500-1	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 Yamaguchi Takefumi, Higa Kazunari, Yagi-Yaguchi Yukari, Ueda Koji, Noma Hisashi, Shibata Shinsuke, Nagai Toshihiro, Tomida Daisuke, Yasu-Mimura Ririko, Ibrahim Osama, Matoba Ryo, Tsubota Kazuo, Hamrah Pedram, Yamada Jun, Kanekura Kohsuke, Shimazaki Jun	4. 巻 6
2. 論文標題 Pathological processes in aqueous humor due to iris atrophy predispose to early corneal graft failure in humans and mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 5195 ~ 5195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aaz5195	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 Yakou Fumiyo, Suwanai Hirotsugu, Ishikawa Takuya, Itou Mariko, Shikuma Jumpei, Miwa Takashi, Sakai Hiroyuki, Kanekura Kohsuke, Narumi Satoshi, Suzuki Ryo, Odawara Masato	4. 巻 2020
2. 論文標題 A Novel Homozygous Mutation of Thyroid Peroxidase Gene Abolishes a Disulfide Bond Leading to Congenital Hypothyroidism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/9132372	査読の有無 有
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 Mahadevan Jana, Morikawa Shuntaro, Yagi Takuya, Abreu Damien, Lu Simin, Kanekura Kohsuke, Brown Cris M., Urano Fumihiko	4. 巻 100
2. 論文標題 A soluble endoplasmic reticulum factor as regenerative therapy for Wolfram syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1197 ~ 1207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-020-0436-1	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Ueda Shinobu, Takanashi Masakatsu, Sudo Katsuko, Kanekura Kohsuke, Kuroda Masahiko	4. 巻 100
2. 論文標題 miR-27a ameliorates chemoresistance of breast cancer cells by disruption of reactive oxygen species homeostasis and impairment of autophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 863 ~ 873
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-020-0409-4	査読の有無 有
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 Kanekura Kohsuke, Kuroda Masahiko	4. 巻 102
2. 論文標題 How can we interpret the relationship between liquid-liquid phase separation and amyotrophic lateral sclerosis?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 912 ~ 918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-022-00791-x	査読の有無 有
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 Miyagi Tamami, Yamazaki Rio, Ueda Koji, Narumi Satoshi, Hayamizu Yuhei, Uji-i Hiroshi, Kuroda Masahiko, Kanekura Kohsuke	4. 巻 23
2. 論文標題 The Patterning and Proportion of Charged Residues in the Arginine-Rich Mixed-Charge Domain Determine the Membrane-Less Organelle Targeted by the Protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7658 ~ 7658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23147658	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 Kanekura Kohsuke, Yamanaka Yoshiaki, Miyagi Tamami, Kuroda Masahiko	4. 巻 17
2. 論文標題 Chemically oligomerizable TDP-43: a novel chemogenetic tool for studying the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neural Regeneration Research	6. 最初と最後の頁 2434 ~ 2434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.335803	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 Chen Chen, Jia Han, Nakamura Yoshiki, Kanekura Kohsuke, Hayamizu Yuhei	4. 巻 7
2. 論文標題 Effect of Multivalency on Phase-Separated Droplets Consisting of Poly(PR) Dipeptide Repeats and RNA at the Solid/Liquid Interface	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 19280 ~ 19287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.2c00811	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 Ohno Shin-ichiro, Oikawa Keiki, Tsurui Toshiaki, Harada Yuichirou, Ono Kana, Tateishi Mizumo, Mirza Aashiq, Takanashi Masakatsu, Kanekura Kosuke, Nagase Kumiko, Shimada Yoshihisa, Kudo Yujin, Ikeda Norihiko, Ochiya Takahiro, Wang Xiaozhong, Kuroda Masahiko	4. 巻 39
2. 論文標題 Nuclear microRNAs release paused Pol II via the DDX21-CDK9 complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110673 ~ 110673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110673	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

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 金蔵孝介
2. 発表標題 Alternating Arg distribution controls phase separation and toxicity of poly(PR).
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金蔵孝介
2. 発表標題 The alternating structure controls phase separation and toxicity of poly-PR C9orf72 dipeptides.
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金蔵孝介
2. 発表標題 C9orf72遺伝子産物poly-PRの構造機能連関と毒性獲得機構の解明
3. 学会等名 日本認知症学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chen Chen, Kohsuke Kanekura, Yuhei Hayamizu
2. 発表標題 Molecular interactions of poly(PR) dipeptides in liquid liquid phase separation.
3. 学会等名 応用物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金蔵孝介
2. 発表標題 Alternating Arg distribution controls phase separation and toxicity of poly(PR).
3. 学会等名 Neuro2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金蔵孝介
2. 発表標題 アミノ酸の性質から紐解くALS原因ジペプチドリピートの相分離と毒性機構
3. 学会等名 第16回日本アミノ酸学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮城碧水、金蔵孝介
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症(ALS)原因ジペプチドリピートの細胞内局在および毒性メカニズムの解明.
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kohsuke Kanekura
2. 発表標題 Order controls disordered droplets: structure-function relationships in C9ORF72-derived poly(PR).
3. 学会等名 2nd International research conference on neurodegenerative diseases (IRCND 2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Research Map <a href="https://researchmap.jp/10508568">https://researchmap.jp/10508568</a>
---

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
研究分担者	早水 裕平  (Hayamizu Yuhei)  (80443216)	東京工業大学・物質理工学院・准教授    (12608)	

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
---------	---------