

# 液液相分離破綻による前頭側頭葉型認知症発症機構の解明

東京医科大学薬理学分野

主任教授 金蔵 孝介

(共同研究者)

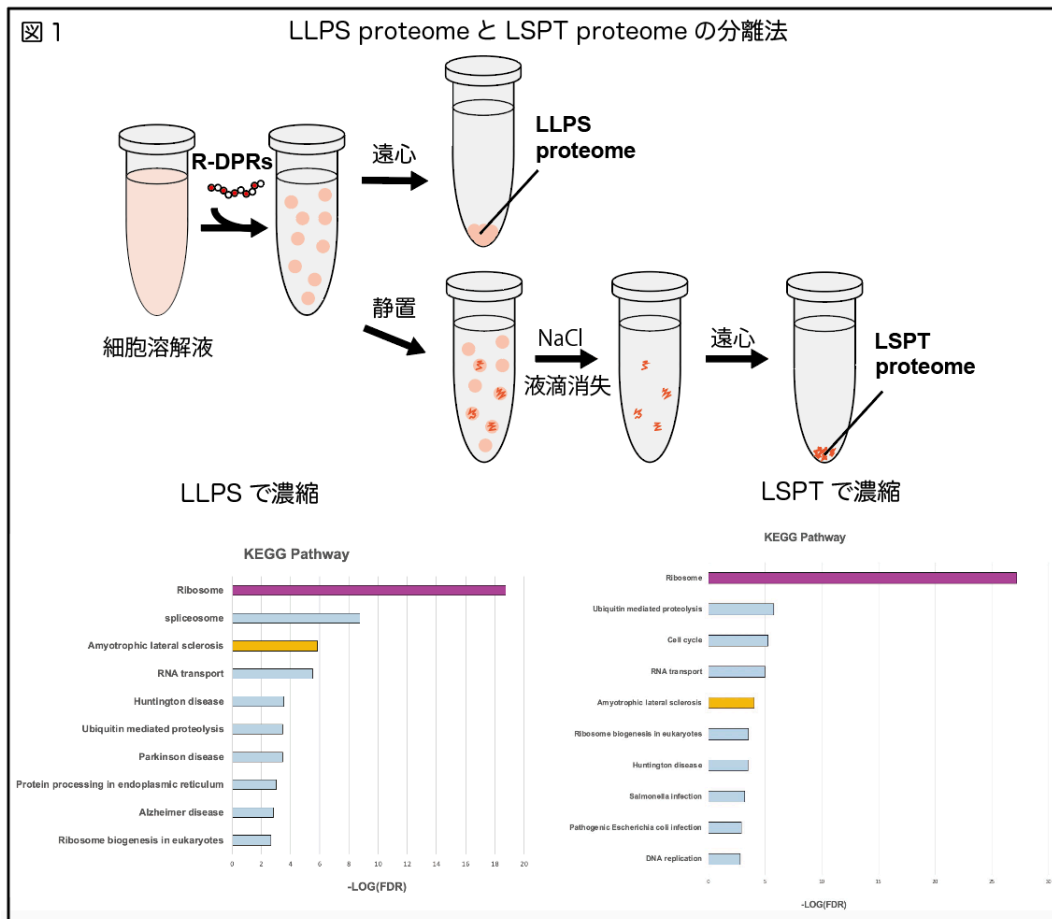
東京医科大学薬理学分野 大学院生 宮城 碧水

## はじめに

前頭側頭葉型認知症 (frontotemporal dementia: FTD) の多くは孤発性であるが、一部の症例では家族性を示す。近年最も高頻度なFTD原因遺伝子としてChromosome 9 open reading frame 72 (C9ORF72) 遺伝子が同定された<sup>(1)</sup>。また、同遺伝子は筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) の原因遺伝子としても同定されている。全てのC9-FTD/ALS患者は同様の変異を持つことが知られており、C9ORF72遺伝子のintron 1に存在する(GGGGCC) 繰り返し配列が異常伸長している。この異常伸長した(GGGGCC) 配列からrepeat-associated non-ATG translationと呼ばれる特殊な翻訳を介して、5種類[poly (GR)、poly (PR)、poly (GA)、poly (GP)、poly (PA)]のdipeptide repeat proteins (DPRs) が産生され、神経毒性を発揮すると考えられている。DPRsの中でも特にArgを含むpoly (PR) やpoly (GR) [Arg-rich DPRs: R-DPRs] が毒性が強いことが知られており、in vitroおよびin vivoにおいて神経毒性が確認されている<sup>(2)</sup>。これらR-DPRsの毒性機構として、電荷を持つArgを繰り返し持つことで静電相互作用やカチオン-パイ相互作用を介して酸性分子や芳香族分子と多価相互作用して液液相分離 (liquid-liquid phase separation: LLPS) を異常促進する。液液相分離した蛋白は局所での濃度が非常に上昇しており、通常では形成されない疎水結合を形成し、最終的には凝集体を形成 (liquid-solid phase transition: LSPT) することで毒性を発揮すると考えられている<sup>(3)</sup>。しかし、R-DPRsが液液相分離を促進する詳細な分子機構および相転移を誘導する分子機構は不明であった。本研究ではR-DPRsが誘導するLLPSプロテオームおよびLSPTプロテオームを網羅的に同定し、それらの生化学的な特徴を解析することで、R-DPRsによる相分離破綻機構の解明を行なった。

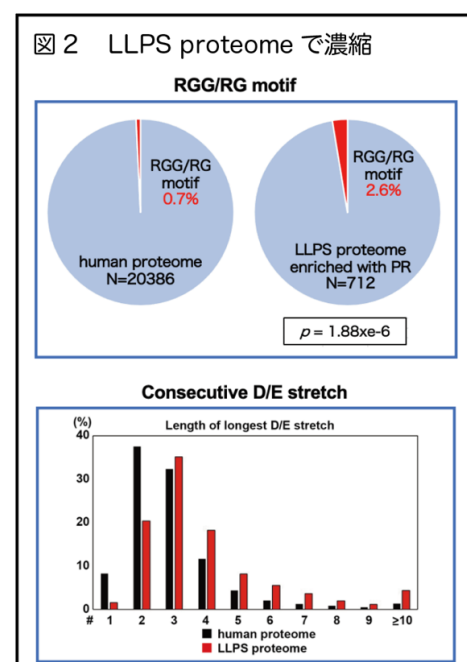
## 結 果

HeLa細胞溶解液に(PR) 20ペプチドまたは(GR) 20ペプチドを添加し、液液相分離を誘導した。相分離画分を遠心分離により回収し、定量的液体クロマトグラフィー/質量分析計で相分離プロテオームを網羅的に同定した。この際、細胞溶解液をコントロールとし、存在比が2.0倍以上濃縮されているものをLLPSプロテオームとした。また、同様に液液相分離

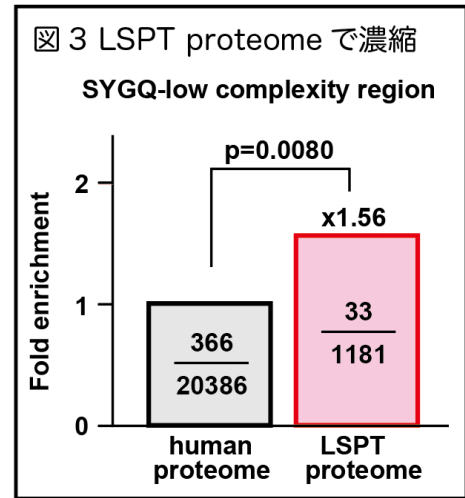


を誘導後30分間または60分間静置することで、相転移を誘導した。相転移したサンプルに高濃度のNaClを加え、静電遮蔽することで液液相分離の液滴は消失し、塩で影響を受けない疎水結合で形成された凝集体のみを回収することが可能となる。相転移した産物画分を遠心分離により回収し、定量的液体クロマトグラフィー/質量分析計で相転移プロテオームを網羅的に同定した。この際、細胞溶解液をコントロールとし、存在比が2.0倍以上濃縮されているものをLSPTプロテオームとした。LLPSプロテオームおよびLSPTプロテオームとして同定された蛋白群の機能解析として KEGG pathway解析を行なったところ、LLPSプロテオームとLSPTプロテオームの両方でAmyotrophic lateral sclerosis経路が濃縮されていた他、最も濃縮が見られたものとしてリボソームが抽出された。そのため、R-DPRsはリボソームを毒性標的としていると考え、現在さらなる解析を進めている(図1)。

さらにPythonを用いたデータマイニングを行い、LLPSプロテオームおよびLSPTプロテオームにおいてhuman proteomeと比較した際有意に濃縮され



る蛋白モチーフの探索を進めた。その結果、LLPSプロテオームではGly-Gly-Arg/Gly-Arg [(GGR) /GR] モチーフを持つ頻度が有意に高いこと、また連続するAsp/Glu酸性配列の長さが有意に長いことを明らかにした (図2)。これらはLLPSを起こしやすいタンパク質に共通してみられる特徴であり、R-DPRsが相分離を誘導する際に静電相互作用を介していることを示唆するものであった。次にLSPTプロテオームにおいて濃縮される蛋白モチーフを探索した結果、プリオンなどの凝集性が高いタンパクに共通してみられるSer-Tyr-Gly-Gln 低複雑性領域 (SYGQ-low complexity domain: SYGQ-LCD) が有意に濃縮されていた。これはR-DPRsが相分離を誘導した後、相転移へ移行する際SYGQ-LCDが関与している可能性を示唆するものである (図3)。



## 考 察

本研究では最も高頻度に見られるFTD原因遺伝子であるC9ORF72遺伝子産物R-DPRsが液液相分離を異常に促進し、タンパク恒常性が破綻して固体へ相転移することで細胞毒性を発揮する分子機構の解明を目指した。網羅的プロテオーム解析により、R-DPRsによって相分離が誘導されるタンパク質LLPSプロテオームが712個、相転移が誘導されるLSPTプロテオームが1,181個同定された。まずKEGG pathway解析でリボソームが強く濃縮されていたことから、R-DPRsが標的としているのはリボソームであると考えられる。実際に我々はR-DPRsがタンパク翻訳を阻害していることを世界に先駆けて報告しており、その内容とも一致している<sup>(4)</sup>。今後R-DPRsがリボソームの相転移を誘導する機構を解明していく予定である。

また、アミノ酸配列の解析から、LLPSプロテオームでGGR/GRやD/E配列が濃縮されていることを見出し、R-DPRsが静電相互作用を介して相分離を促進することを明らかにした。また、LSPTプロテオームで見られたSYGQ-LCDはFUSやhnRNPA1等神経変性疾患原因タンパクに共通するモチーフであり、R-DPRsはこれらのSYGQ-LCDを含むタンパク質の相転移を誘導することで神経変性を起こしているのではないかと考えている。

本研究結果から、R-DPRsはリボソームを標的として、相転移を誘導することが明らかとなった。LLPSプロテオームおよびLSPTプロテオームのアミノ酸配列の解析からR-DPRsはArg電荷を介した静電相互作用により、豊富に電荷を持つタンパク質の相分離を促進し、これらのタンパク質にSYGQ-LCDが含まれると相転移を起こして神経毒性を発揮するとの機構が明らかとなった。現在これらの結果を発表するための論文執筆中である。また、これらの知見をもとに、今後R-DPRsによる相転移を抑制する薬剤の開発を目指していきたい。

## 要 約

FTD原因遺伝子C9ORF72から産生されるR-DPRsはリボソームを標的として相転移を誘導する。アミノ酸配列の解析から、R-DPRsはArg電荷を介した静電相互作用により電荷を持つタンパク質の相分離を促進し、さらにSYGQ-LCDを含むタンパク質の相転移を誘導することを明らかにした。

## 文 献

1. DeJesus-Hernandez M et al、Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS、Neuron. 72巻：245-56、(2011)
2. Mizielinska S et al、C9orf72 repeat expansions cause neurodegeneration in Drosophila through arginine-rich proteins、Science. 345巻：1192-1194、(2014)
3. Chen C et al、Phase separation and toxicity of C9orf72 poly (PR) depends on alternate distribution of arginine、Journal of Cell Biology、220巻：e202103160、(2021)
4. Kanekura K et al、Poly-dipeptides encoded by the C9ORF72 repeats block global protein translation、Human Molecular Genetics、25巻：1803-13、(2016)