

C9ORF72 ジペプチドの相分離制御機構の解明

東京医科大学薬理学分野

金蔵 孝介

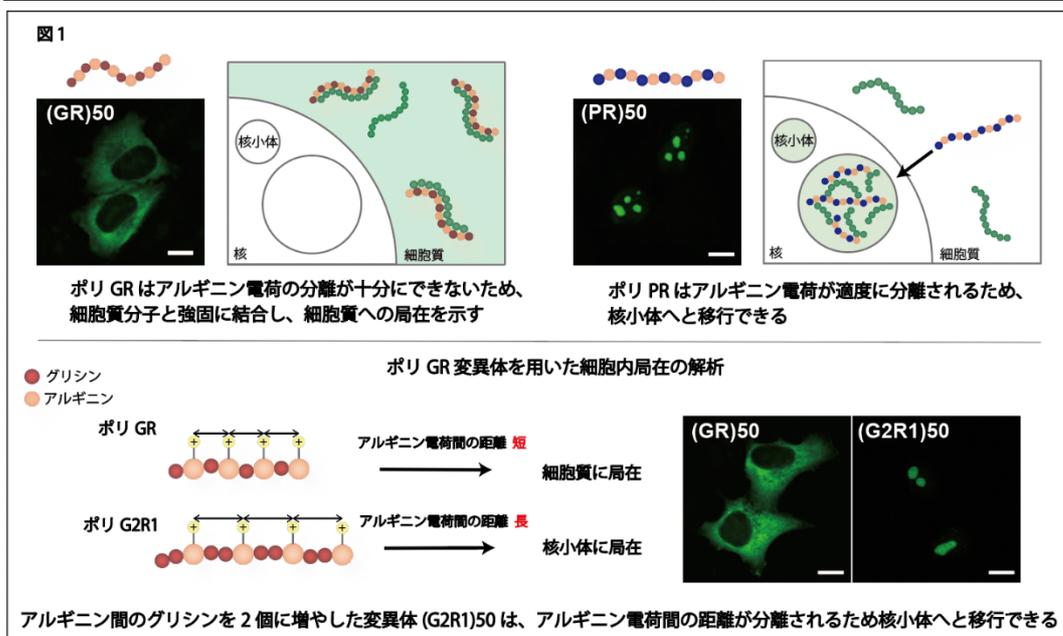
【研究の背景】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動神経細胞が進行性に変性し、全身の筋肉が次第に動かなくなる神経難病である。人工呼吸器を装着しない場合、発症からの余命は2～5年と短く、根治療法も確立されていないため、早期の病態解明および治療法の開発が望まれている。

2011年に同定された家族性ALS原因遺伝子 *C9ORF72* は、家族性ALS患者の約40%で変異が見られ、また孤発性ALS患者の10%においても変異が見られることから、最も重要なALS原因遺伝子の1つであると考えられる。*C9ORF72* の異常を伴うALS患者は、全て同じタイプの変異を持ち、イントロン1における (GGGGCC) 6塩基リピート配列が異常に伸長している。このリピート配列伸長によりALSを発症する機構として様々なモデルが提唱されているが、リピート長依存性ATG非依存性翻訳と呼ばれる特殊な翻訳により産生される毒性ジペプチド（ポリPRおよびポリGR）による神経毒性仮説が有力である。ポリPRとポリGRは、Argが交互に存在する非常に似た特徴を持つ配列であるが、細胞内局在や毒性の強さ、毒性機構が大きく異なる。しかし、このような違いが生じる詳細なメカニズムは不明であった。そこで本研究では、これらのジペプチドの細胞内局在や毒性を制御する分子機構を明らかにし、ALS発症機構の解明を目指した。

【結果】

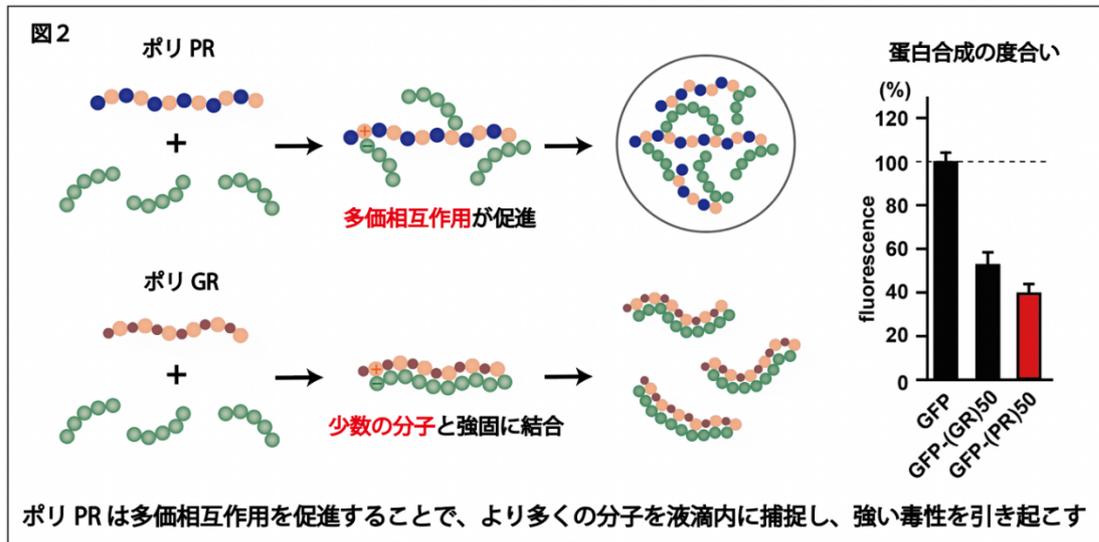
① ポリPRおよびポリGRの細胞内局在の違いは、連続するArg電荷の分離の度合いにより決定される



ポリPRやポリGRのアミノ酸の比率を変えた種々の変異体を用いた細胞内局在の解析や、蛍光消光回復法（FRAP法）を用いた解析により、ProとArgを交互に持つポリPRは、立体障害が大きく構造的に剛性を持ち、自由なペプチドの動きを障害するProがArgとArgの間に存在することによってArgの持つ正電荷が適度に分離され、細胞質から核小体へと移行できるが、GlyとArgを交互に持つポリGRは、側鎖が小さくペ

プチドの自由な動きを可能にするGlyはArgの持つ正電荷を十分に分離できないため、細胞質分子と強固に結合し、細胞質への局在を示すことを見出した。Arg電荷の分離の度合いが細胞内局在を制御することは、ポリGR変異体 [Arg間にGlyが1個存在するポリGRと、Arg間にGlyが2個存在する変異体であるポリG2R1] を比較し、Argが十分に分離された変異体は、核小体へと移行できることで確認した (図1)。

② ポリPRおよびポリGRの毒性の違いは、周辺分子との結合様式の違いにより決定される



我々はこれまでにポリPRおよびポリGRは、蛋白合成を阻害することで毒性を発揮し、特にポリPRが強い毒性を示すことを報告している。ポリPRがより強い毒性を持つ分子機構を解明するため、定量的プロテオーム解析を用いて、ポリPRおよびポリGRと結合する蛋白の種類と量を検討した。その結果、ポリPRはポリGRと比較して、質的には類似した蛋白と結合しているものの、結合する量が大きく異なり、特定の蛋白との結合がポリPRにおいて増強していた。ポリPRがより多くの分子と結合できるメカニズムを解明するため、ポリPRやポリGRとの結合が知られているKAPB2-H8ペプチドとの結合様式を水溶液中で観察した。ポリPRやポリGRは、液液相分離(LLPS)と呼ばれる現象を起こして酸性アミノ酸を多く含む蛋白と結合し、水溶液中で水と油のように分離した液滴を形成することが知られているが、ポリPRはポリGRと比較して量的に多くの酸性分子と結合できることを明らかにし、ポリPRが1つの分子が多数の分子と結合する多価相互作用を促進することで、より多くの分子を液滴内に捕捉して強い毒性を獲得することを明らかにした。一方でポリGRは少数の分子と強い結合を示すため、細胞質分子と強固に結合し、細胞質における毒性に関与していると考えている (図2)。

【結語】

本研究により、これまで不明であったポリPRおよびポリGRの細胞内局在や毒性の違いを制御する分子機構を解明した。本研究の成果は、ALSの病態解明だけでなく、ポリPRおよびポリGRの毒性を阻害する新規ALS治療薬の開発に繋がると期待している。この度は本研究をご支援頂き心より感謝申し上げます。

【論文】

Tamami Miyagi, Koji Ueda, Masahiro Sugimoto, Takuya Yagi, Daisuke Ito, Rio Yamazaki, Satoshi Narumi, Yuhei Hayamizu, Hiroshi Uji-i, Masahiko Kuroda*, Kohsuke Kanekura*. Differential toxicity and localization of arginine-rich *C9ORF72* dipeptide repeat proteins depend on de-clustering of positive charges. *iScience* 2023. 106957.