



## 神経筋疾患における生物学的相分離

五十棲規嘉<sup>1)</sup> 杉江 和馬<sup>2)</sup> 森 英一朗<sup>1)\*</sup>

**要旨：**生物学的相分離とは細胞内でタンパク質などの生体分子が液-液相分離する現象を示す。これまでに相分離性タンパク質の持つ低複雑性ドメインが相分離を駆動し、制御因子によって厳密に相分離が制御されることが分かっている。また、遺伝子異常が原因で相分離を破綻させる因子も見つかっている。以前から多くの神経筋疾患は原因タンパク質が異常な凝集体として蓄積することが知られていた。そして近年、神経筋疾患には相分離性のタンパク質が関わっており、それらの相分離制御に異常が起こることで凝集体を形成することが分かってきた。生物学的相分離はこれまで解明できなかった神経筋疾患の病態発症メカニズムを徐々に明らかにしつつある。

**Key words：**生物学的相分離、低複雑性ドメイン、神経筋疾患

### はじめに

近年、液-液相分離と呼ばれる現象が注目を集め、盛んに研究されている。液-液相分離とは二つの液体が混ざり合わずに二相に分離する現象のことを指し、例えば、サラダドレッシングが水と油に分離する現象である。このように相分離現象は日常の色々な場面で見ることができる身近な現象であり、古くから物理学や化学の分野で研究が進められてきた。そして近年、この現象が細胞内でも起こっていることが分かり、さまざまな分野で盛んに研究されるようになってきた。細胞内で起こる相分離現象は古典的な物理化学分野における相分離と区別して生物学的相分離と呼ばれ、核酸やタンパク質などの生体分子が濃い相と薄い相の二相の液体に分離する現象である。この生物学的相分離という概念によって、これまで良く知られていたさまざまな生命現象が再解釈され、今まで説明できなかった生命現象を理解できるようになってきた。このように生物学的相分離はゲーム・チェンジャーとしてこれまでの常識や既存概念を覆し始めており、今後も多くの未解決課題への貢献が期待される。それには神経筋疾患も含まれており、これまで解明できなかった神経筋疾患の発症メカニズムが生物学的相分離の観点から、徐々に解明されつつある。近年、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, 以下 ALS と略記) などの神経変性疾患には相分離性のタンパク質が関わっており、それらのタンパク質の液-液相分離の制御に異常が起こることでアミロイド様線維を形成すること

が分かってきた (Fig. 1)。本稿では生物学的相分離の視点から神経筋疾患について解説する。

### 生物学的相分離

古くから細胞内では膜によって囲まれていないオルガネラ (非膜オルガネラ) の存在が知られていた。例えば、核内のカハール体や核小体、核スペckル、パラスペckルなど、細胞質に見られるストレス顆粒やプロセッシング顆粒、生殖顆粒、神経顆粒などである。これらの非膜オルガネラは内部と外部を空間的に仕切る膜がないにもかかわらず、構造体として存在している。ところが、非膜オルガネラが構造体として、その存在を保っている理由は長年、謎のままであった。しかし近年、これら非膜オルガネラの構造基盤が核酸やタンパク質といった構成分子の液-液相分離によるものであるということが明らかになってきた<sup>1)2)</sup>。

生物学的相分離が注目されるきっかけとなったのは、2009年の Hyman らによる細胞内での相分離液滴の発見である<sup>3)</sup>。さらに2012年には McKnight らと Rosen らの二つのグループによって、天然に構造をとらない領域 (天然変性領域) を持つタンパク質 (天然変性タンパク質) が生物学的相分離に重要な役割を持つことが報告された<sup>4)5)</sup>。それ以降、世界中のあらゆる分野で相分離による生命現象の解釈が行われるようになり、盛んに研究が進められている。これまでに細胞内の恒常性維持のさまざまな過程において、相分離の制御が重要な

\*Corresponding author: 奈良県立医科大学医学部未来基礎医学 [〒634-8521 奈良県橿原市四条町 840 番地]

<sup>1)</sup> 奈良県立医科大学医学部未来基礎医学

<sup>2)</sup> 奈良県立医科大学医学部脳神経内科

(Received April 28, 2023; Accepted August 30, 2023; Published online in J-STAGE on November 22, 2023)

臨床神経 2023;63:799-805

doi: 10.5692/clinicalneuroi.cn-001877

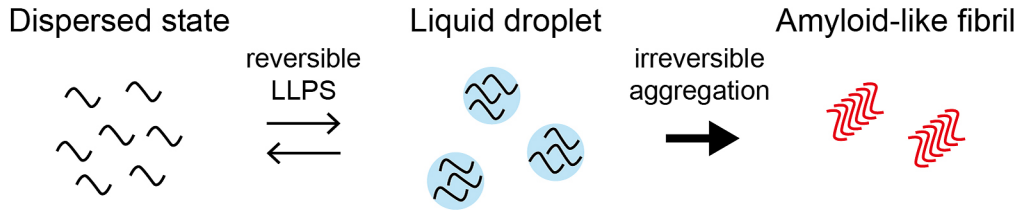


Fig. 1 Liquid-liquid phase separation (LLPS) and aggregation of proteins.

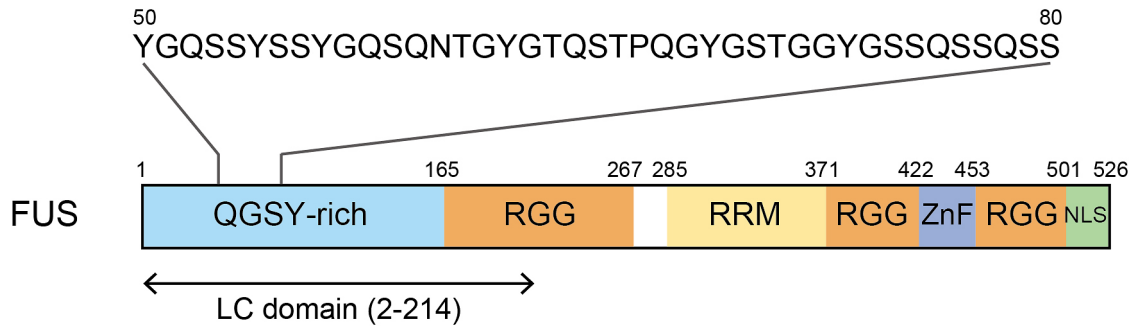


Fig. 2 Functional domains of fused in sarcoma (FUS).

FUS has a low-complexity (LC) domain on the N-terminal side, residues 2 to 214. QGSY-rich: glutamine, glycine, serine, and tyrosine-rich, RGG: arginine-glycine-glycine (RGG) repeat, RRM: RNA recognition motif, ZnF: zinc finger domain, NLS: nuclear localization signal.

役割を担っているということが分かってきた<sup>6)~9)</sup>。

タンパク質はアミノ酸配列によって決められた正しい構造に折りたたまれることで機能することが知られている。1990年代には構造生物学の台頭によって、タンパク質の立体構造が次々と明らかになり、タンパク質の構造から機能を説明できるようになっていった。その一方、転写因子の核酸認識部位などの天然変性領域の存在は以前から知られていたが<sup>10)~13)</sup>、天然変性領域は構造解析が非常に困難なことからもそれほど脚光を浴びていなかった。しかし、1999年にWrightとDysonによって天然変性タンパク質の持つ生命活動に重要な機能が報告されたことで、天然変性タンパク質の重要性は再認識されるようになった<sup>14)</sup>。これまでにヒトの全タンパク質の中で天然変性領域を持つタンパク質は30%以上も存在することが予測され<sup>15)~18)</sup>、さまざまな疾患に関連するタンパク質には天然変性領域が多くみられることも明らかとなっている<sup>19)</sup>。

これまでの研究から相分離性タンパク質は分子内に構造を持たない低複雑性 (low-complexity, 以下 LC と略記) ドメインを持ち、この LC ドメインが相分離を駆動することが分かってきた<sup>20)~24)</sup>。LC ドメインとは天然変性領域の中でもグリシン、セリン、グルタミン、チロシンなどの限られた数種類のアミノ酸が大部分を占める特徴的なドメインである。例えば、fused in sarcoma (FUS) は全長 526 残基のうち、残基番号 2-214 が LC ドメインであるが、N 末端の 165 残基は SYGQ-rich ドメインと呼ばれており、セリン、チロシン、グリシン、グルタミンが配列の 8 割を占めている (Fig. 2)。ヒトの持つ全てのタンパク質の 10% に LC ドメインが含まれており<sup>25)26)</sup>、

その多くが RNA や DNA 結合タンパク質である<sup>27)</sup>。LC ドメインを持つタンパク質として、FUS の他に TDP-43, hnRNP A1, hnRNP A2/B1, hnRNP DL, TIA-1 などが知られている。これまでに LC ドメインを持つ相分離性タンパク質の多くが神経筋疾患にかかわることが分かってきた (Table 1)<sup>28)~30)</sup>。多くの神経筋疾患では原因となるタンパク質が異常な構造へ変化した凝集体の蓄積が見られることが知られている。アルツハイマー病ではアミロイド  $\beta$  やタウの蓄積が、ALS では TDP-43 や SOD1 の蓄積が見られる。また、遺伝性封入体ミオパチー (hereditary inclusion body myopathy) では hnRNP A1 や hnRNP A2 などの蓄積が見られる。病原性アミロイド線維として知られるアミロイド  $\beta$  はその構造が非常に安定であるが<sup>31)32)</sup>、アミロイド様線維である LC ドメインの cross- $\beta$  ポリマーは動的かつ可逆的な構造であることが分かってきた (Fig. 3)<sup>33)34)</sup>。

### 相分離制御と破綻因子

RNA 結合タンパク質である FUS は、最も良く知られた相分離性タンパク質の一つであり、液-液相分離研究におけるモデルタンパク質として盛んに研究が行われている。FUS は転写やスプライシング、DNA 修復、軸索形成などのさまざまな場面で機能しており、その相分離性によって液滴中に関連分子を密に集めていると考えられている。FUS は家族性 ALS の原因遺伝子として知られ<sup>35)36)</sup>、日本では SOD1 に次いで頻度が高い<sup>37)</sup>。近年の研究から、FUS の相分離異常が神経変性疾患と関係することが徐々に明らかとなってきた。

Table 1 Human proteins with LC domain driving liquid-liquid phase separation.

Protein name*	Gene symbol	UniProt ID**	Related diseases***
FUS	<i>FUS</i>	P35637	ALS/FTD
hnRNPA2/B1	<i>HNRNPA2B1</i>	P22626	MSP
Matrin-3	<i>MATR3</i>	P43243	ALS
p62	<i>SQSTM1</i>	Q13501	PDB, FTD/ALS
Tau	<i>MAPT</i>	P10636	FTD, PSP, PD, AD
TDP-43	<i>TARDBP</i>	Q13148	ALS/FTD
TIA1	<i>TIA1</i>	P31483	WDM, ALS/FTD
UBQLN2	<i>UBQLN2</i>	Q9UHD9	ALS/FTD

FUS: fused in sarcoma, ALS: amyotrophic lateral sclerosis, FTD: frontotemporal dementia, MSP: multisystem proteinopathy, PDB: Paget’s disease of bone, PSP: progressive supranuclear palsy, PD: Parkinson disease, AD: Alzheimer disease, WDM: Welander distal myopathy. \*PhaSePro (<https://phasepro.elte.hu/>). \*\*UniProt (<https://www.uniprot.org/>). \*\*\*OMIM (<https://www.omim.org/>).

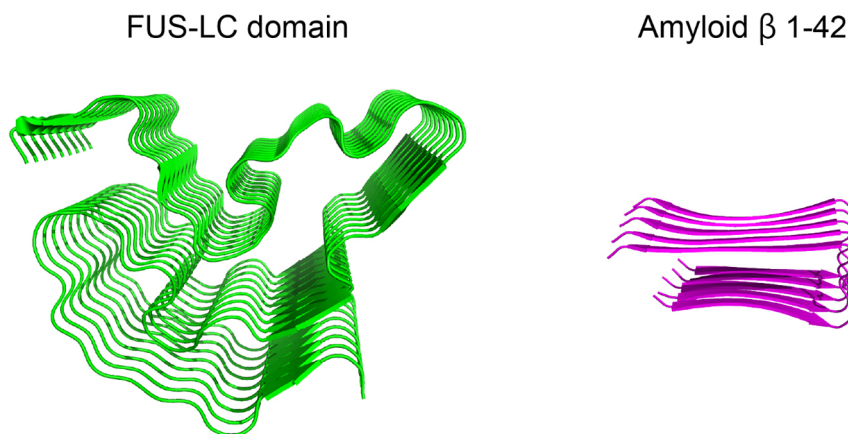


Fig. 3 Three dimensional structures of amyloid fibrils.

LC domain (2-214) of FUS (PDB ID: 5W3N, left panel) and amyloid  $\beta$  (1-42) (PDB ID: 2BEG, right panel) are shown as ribbon diagrams.

LC ドメインを持つ相分離性タンパク質は液滴状態が続くと、アミロイド様線維である cross- $\beta$  ポリマーを形成することが報告されている<sup>38)</sup>。そのため、生体内には相分離性タンパク質の液-液相分離を厳密に制御する相分離制御因子が備わっている。相分離シャペロンと呼ばれる相分離制御因子は相分離性タンパク質の相分離やアミロイド様線維の形成を抑制する機能を持つ。相分離シャペロンは相分離制御因子として注目される前から、タンパク質のフォールディング制御因子である分子シャペロンとして知られていた。近年の生物学的相分離の観点から、その機能が再解釈された分子群である。核内輸送受容体である Kap $\beta$ 2 は相分離シャペロンとしての役割を持ち、FUS の液-液相分離を抑制することが分かっている<sup>39)</sup>。Kap $\beta$ 2 は FUS の持つ Kap $\beta$ 2 特異的な核移行シグナル配列と強く結合すると同時に、FUS の別のさまざまな領域と弱く相互作用することで FUS の液-液相分離を抑制している。

また、相分離制御因子とは逆の働きをする相分離破綻因子の存在も明らかとなっている。プロリンとアルギニンの繰り返しペプチド (PR ポリペプチド) やグリシンとアルギニン

の繰り返しペプチド (GR ポリペプチド) は *C9orf72* 遺伝子由来の異常な繰り返し配列であり<sup>40)</sup>、LC ドメインを標的とする相分離破綻因子として知られている<sup>41)~43)</sup>。*C9orf72* は世界で最も多い家族性 ALS の原因遺伝子であり<sup>44)45)</sup>、産生される 5 種類のポリペプチドの中でもアルギニンを持つ PR ポリペプチドと GR ポリペプチドは強い細胞毒性を持つ。この原因として、PR/GR ポリペプチドだけが持つ正電荷のアルギニンが考えられているが、明確な理由は分かっていない。交互に繰り返すアルギニン配列は負電荷を持つタンパク質と弱く多点的に相互作用できることから、PR ポリペプチドを含む相分離の液滴に酸性モチーフを持つタンパク質が取り込まれるモデルが提案されている<sup>46)</sup>。PR/GR ポリペプチドは非膜オルガネラの構成因子や中間径フィラメントなどのさまざまなタンパク質と結合することから、細胞の構造変化や遺伝子発現の経路などの多様な機能障害が細胞毒性の原因と考えられている<sup>47)</sup>。

最近、PR ポリペプチドは相分離性タンパク質の LC ドメインと結合することで相分離破綻させるだけでなく、相分離シャ

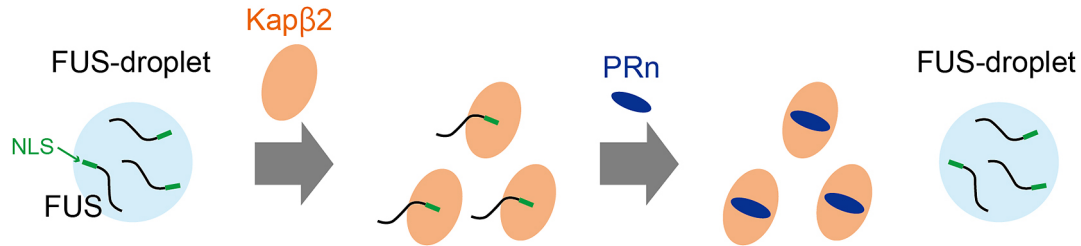


Fig. 4 Regulation of phase separation and its disruption.

Binding of Kapβ2 to the nuclear localization signal (NLS) of FUS inhibits the phase separation of FUS. Binding of PR polypeptide (PRn) to Kapβ2 leads to the disruption of the regulation of phase separation and formation of FUS droplets.

ペロンと結合することでその相分離制御を破綻させることも分かってきた。PR ポリペプチドは核内輸送受容体と結合することで、TDP-43 との結合が抑制されることが知られている<sup>48)49)</sup>。我々は核内輸送受容体の一つで相分離シャペロンでもある Kapβ2 に対し、PR ポリペプチドが与える毒性メカニズムの解明に成功した<sup>50)</sup>。まず、液滴観察やヒドロゲル結合実験によって PR ポリペプチドが Kapβ2 の相分離制御を阻害すること、プルダウン実験によって直接的に PR ポリペプチドが Kapβ2 と結合することを明らかにした。さらに PR ポリペプチドは Kapβ2 と 1:1 で結合し、その結合は FUS との結合よりも強いことを突き止めた。これらの結果から、PR ポリペプチドが Kapβ2 と直接的に結合することで Kapβ2 の相分離シャペロンとしての機能を阻害することが明らかとなった。また、核磁気共鳴法 (NMR) によって、PR ポリペプチドが Kapβ2 の核移行シグナル (nuclear localization signal, 以下 NLS と略記) 結合部位を標的としていることを突き止めた。分子動力学法による構造予測とプルダウン実験を組み合わせ、PR ポリペプチドと Kapβ2 との結合は FUS-NLS と Kapβ2 との結合と競合することを明らかにした。我々はこれらの知見から、相分離シャペロンである Kapβ2 は FUS などの NLS に結合して相分離を制御するが、PR ポリペプチドが Kapβ2 の NLS 結合部位を標的とすることでその相分離制御を破綻させることを提唱している (Fig. 4)。

#### 相分離から見る神経筋疾患

FUS や TDP-43, hnRNPA2/B1 などの LC ドメインを持つ RNA 結合タンパク質の遺伝子異常が ALS や前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia, 以下 FTD と略記)、ミオパチーの原因として知られている<sup>28)51)</sup>。家族性 ALS では FUS や TDP-43 の LC ドメインに遺伝子異常が集中しており<sup>52)53)</sup>、LC ドメインの変異による相分離の制御の破綻が病態発症につながることを示唆されている<sup>28)</sup>。神経筋疾患に関する変異が FUS や hnRNPA2 などの LC ドメインに入ることで、線維形成が促進されることから<sup>20)54)55)</sup>、この相分離異常が神経筋疾患における共通の発症メカニズムとして注目されている。ここでは最近明らかになってきた最新の知見について幾つか紹介したい。

最近、半化学的な合成で主鎖のアミド結合の窒素原子をメチル化した LC ドメインを用いて、LC ドメインの相分離における主鎖の水素結合の重要性が検証された<sup>56)</sup>。プロリン残基は主鎖のアミドプロトンを持たないため、この部分で水素結合をすることができない。しかし、他のアミノ酸へ変異することで主鎖に余分な水素結合が形成され、それが LC ドメインの可逆的な平衡を壊して自己会合を促進する可能性が示唆された。さらに TDP-43 や中間径フィラメントの構成タンパク質の一つであるニューロフィラメント軽鎖 (NFL)、タウ、hnRNPA2 において疾患の原因となるプロリン残基の変異体の主鎖をメチル化することによって、変異によって形成されたアミノ酸主鎖の水素結合がなくなり、LC ドメインの持つ本来の機能が回復することが分かっている。したがって、これがシャルコー・マリー・トゥース病、FTD、アルツハイマー病などに関係するプロリン残基の変異において、相分離が破綻するメカニズムと考えられる。

ALS の初期において、運動ニューロン (motor neuron, 以下 MN と略記) の長い軸索が損傷を受けることが知られている。最近の研究で、FUS 変異のヒト誘導多能性幹細胞 (human induced pluripotent stem cell, 以下 hiPSC 略記) 由来の MN の解析から、MN の軸索の異常な分岐が増加する新規フェノタイプが見つかっている。この hiPSC を用いた解析から、FUS 変異体の軸索分岐の重要な調節因子が Fos-B であることが明らかとなった<sup>57)</sup>。しかし、この FUS の変異は液-液相分離を駆動する LC ドメインではないことから、この FUS 変異が起因する ALS 発症メカニズムと相分離との関係性は不透明のままである。同様の試みは TDP-43 でも行われている<sup>58)</sup>。TDP-43 変異 (G376D) hiPSC 由来の MN の解析から、TDP-43 変異体における PHOX2B の発現低下が明らかとなった。この発現減少が ALS における MN の選択的な変性メカニズムの一端を担うことが推測されている。ALS における MN の損傷と相分離の関係については、今後の研究で明らかになることが期待される。

#### おわりに

生物学的相分離が注目されて始めてから 10~15 年でさまざまな相分離研究が盛んに行われ、相分離メカニズムや神経



筋疾患との関係が徐々に明らかとなってきた。遺伝子異常や相分離性タンパク質のミスフォールドによって相分離制御が破綻すると、異常な凝集体としてアミロイド様線維が蓄積していく。多くの神経筋疾患において、この異常な凝集体が細胞毒性を持つことで病態発症につながると考えられている。このように生物学的相分離はゲーム・チェンジャーとして、神経筋疾患の病態解明に大きく貢献しているが、まだその全容は解明できていない。新たに相分離性タンパク質だけではなく、その相分離の制御や破綻を担う因子も見つかっており、細胞内の相分離環境は非常に複雑である。このように生物学的相分離は神経筋疾患と密接に関わっており、相分離の制御が神経筋疾患の治療に向けた一つの鍵になることは間違いない。今後も相分離に関する新たな知見が次々と報告され、神経筋疾患の治療・予防につながることを期待する。

※本論文に関連し、開示すべきCOI状態にある企業・組織や団体  
○開示すべきCOI状態がある者

森 英一朗：株主の利益：モルミル株式会社（創業者・代表取締役社長として総株式の約半数を保有）、奨学（奨励）寄付などの総額：住友重機械工業株式会社、企業などが提供する寄付講座：V-iCliniX 講座（中谷医工計測技術振興財団）

○開示すべきCOI状態がない者

五十棲 規嘉, 杉江 和馬

本論文に関連し、開示すべきCOI状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

## 文 献

- Banani SF, Lee HO, Hyman AA, et al. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017;18:285-298.
- Shin Y, Brangwynne CP. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science* 2017;357:eaaf4382.
- Brangwynne CP, Eckmann CR, Courson DS, et al. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science* 2009;324:1729-1732.
- Kato M, Han TW, Xie S, et al. Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. *Cell* 2012;149:753-767.
- Li P, Banjade S, Cheng HC, et al. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature* 2012;483:336-340.
- Sabari BR, Dall'Agnesse A, Boija A, et al. Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science* 2018;361:eaar3958.
- Roden C, Gladfelter AS. RNA contributions to the form and function of biomolecular condensates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021;22:183-195.
- Alberti S, Hyman AA. Biomolecular condensates at the nexus of cellular stress, protein aggregation disease and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021;22:196-213.
- Lyon AS, Peeples WB, Rosen MK. A framework for understanding the functions of biomolecular condensates across scales. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021;22:215-235.
- Ma J, Ptashne M. A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* 1987;51:113-119.
- Sigler PB. Transcriptional activation. Acid blobs and negative noodles. *Nature* 1988;333:210-212.
- Weiss MA, Ellenberger T, Wobbe CR, et al. Folding transition in the DNA-binding domain of GCN4 on specific binding to DNA. *Nature* 1990;347:575-578.
- Kim YJ, Björklund S, Li Y, et al. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 1994;77:599-608.
- Wright PE, Dyson HJ. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* 1999;293:321-331.
- Ward JJ, McGuffin LJ, Bryson K, et al. The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics* 2004;20:2138-2139.
- Fukuchi S, Hosoda K, Homma K, et al. Binary classification of protein molecules into intrinsically disordered and ordered segments. *BMC Struct Biol* 2011;11:29.
- Oates ME, Romero P, Ishida T, et al. D<sup>2</sup>P<sup>2</sup>: database of disordered protein predictions. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D508-D516.
- Oldfield CJ, Dunker AK. Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions. *Ann Rev Biochem* 2014;83:553-584.
- Uversky VN, Oldfield CJ, Dunker AK. Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Ann Rev Biophys* 2008;37:215-246.
- Patel A, Lee HO, Jawerth L, et al. A liquid-to-solid phase transition of the ALS protein FUS accelerated by disease mutation. *Cell* 2015;162:1066-1077.
- Molliex A, Temirov J, Lee J, et al. Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *Cell* 2015;163:123-133.
- Xiang S, Kato M, Wu LC, et al. The LC domain of hnRNPA2 adopts similar conformations in hydrogel polymers, liquid-like droplets, and nuclei. *Cell* 2015;163:829-839.
- Lin Y, Protter DS, Rosen MK, et al. Formation and maturation of phase-separated liquid droplets by RNA-binding proteins. *Mol Cell* 2015;60:208-219.
- Elbaum-Garfinkle S, Kim Y, Szczepaniak K, et al. The disordered P granule protein LAF-1 drives phase separation into droplets with tunable viscosity and dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:7189-7194.
- Radó-Trilla N, Albà M. Dissecting the role of low-complexity regions in the evolution of vertebrate proteins. *BMC Evol Biol* 2012;12:155.
- Toll-Riera M, Radó-Trilla N, Martys F, et al. Role of low-complexity sequences in the formation of novel protein coding sequences. *Mol Biol Evol* 2012;29:883-886.
- March ZM, King OD, Shorter J. Prion-like domains as epigenetic regulators, scaffolds for subcellular organization, and drivers of neurodegenerative disease. *Brain Res* 2016;1647:9-18.
- Taylor JP, Brown RH Jr, Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* 2016;539:197-206.
- Alberti S, Dormann D. Liquid-Liquid phase separation in

- disease. *Ann Rev Genet* 2019;53:171-194.
- 30) Mészáros B, Erdős G, Szabó B, et al. PhaSePro: the database of proteins driving liquid-liquid phase separation. *Nucleic Acids Res* 2020;48:D360-D367.
  - 31) Lührs T, Ritter C, Adrian M, et al. 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17342-17347.
  - 32) Nguyen PH, Ramamoorthy A, Sahoo BR, et al. Amyloid Oligomers: a joint experimental/computational perspective on Alzheimer's disease, Parkinson's disease, type II diabetes, and amyotrophic lateral sclerosis. *Chem Rev* 2021;121:2545-2647.
  - 33) Murray DT, Kato M, Lin Y, et al. Structure of FUS protein fibrils and its relevance to self-assembly and phase separation of low-complexity domains. *Cell* 2017;171:615-627.e16.
  - 34) Lee M, Ghosh U, Thurber KR, et al. Molecular structure and interactions within amyloid-like fibrils formed by a low-complexity protein sequence from FUS. *Nat Commun* 2020;11:5735.
  - 35) Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2009;323:1205-1208.
  - 36) Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 2009;323:1208-1211.
  - 37) Nishiyama A, Niihori T, Warita H, et al. Comprehensive targeted next-generation sequencing in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 2017;53:194.e1-194.e8.
  - 38) Ray S, Maji SK. Predictable phase-separated proteins. *Nat Chem* 2020;12:787-789.
  - 39) Yoshizawa T, Ali R, Jiou J, et al. Nuclear import receptor inhibits phase separation of FUS through binding to multiple sites. *Cell* 2018;173:693-705.
  - 40) Mori K, Weng SM, Arzberger T, et al. The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTLD/ALS. *Science* 2013;339:1335-1338.
  - 41) Kwon I, Xiang S, Kato M, et al. Poly-dipeptides encoded by the C9orf72 repeats bind nucleoli, impede RNA biogenesis, and kill cells. *Science* 2014;345:1139-1145.
  - 42) Lin Y, Mori E, Kato M, et al. Toxic PR poly-dipeptides encoded by the C9orf72 repeat expansion target LC domain polymers. *Cell* 2016;167:789-802.e12.
  - 43) Shi KY, Mori E, Nizami ZF, et al. Toxic PRn poly-dipeptides encoded by the C9orf72 repeat expansion block nuclear import and export. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:E1111-E1117.
  - 44) Al Sultan AA, Waller R, Heath PR, et al. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights. *Degener Neurol Neuromuscul Dis* 2016;6:49-64.
  - 45) Trageser KJ, Smith C, Herman FJ, et al. Mechanisms of immune activation by C9orf72-expansions in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Front Neurosci* 2019;13:1298.
  - 46) Chen C, Yamanaka Y, Ueda K, et al. Phase separation and toxicity of C9orf72 poly(PR) depends on alternate distribution of arginine. *J Cell Biol* 2021;220:e202103160.
  - 47) Lee KH, Zhang P, Kim HJ, et al. C9orf72 dipeptide repeats impair the assembly, dynamics, and function of membrane-less organelles. *Cell* 2016;167:774-788.e17.
  - 48) Hayes LR, Duan L, Bowen K, et al. C9orf72 arginine-rich dipeptide repeat proteins disrupt karyopherin-mediated nuclear import. *elife* 2020;9:e51685.
  - 49) Hutten S, Usluer S, Bourgeois B, et al. Nuclear import receptors directly bind to arginine-rich dipeptide repeat proteins and suppress their pathological interactions. *Cell Rep* 2020;33:108538.
  - 50) Nanaura H, Kawamukai H, Fujiwara A, et al. C9orf72-derived arginine-rich poly-dipeptides impede phase modifiers. *Nat Commun* 2021;12:5301.
  - 51) Kim HJ, Kim NC, Wang YD, et al. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* 2013;495:467-473.
  - 52) Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 2010;9:995-1007.
  - 53) Harrison AF, Shorter J. RNA-binding proteins with prion-like domains in health and disease. *Biochem J* 2017;474:1417-1438.
  - 54) Murray DT, Zhou X, Kato M, et al. Structural characterization of the D290V mutation site in hnRNPA2 low-complexity-domain polymers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115:E9782-E9791.
  - 55) Ryan VH, Dignon GL, Zerze GH, et al. Mechanistic view of hnRNPA2 low-complexity domain structure, interactions, and phase separation altered by mutation and arginine methylation. *Mol Cell* 2018;69:465-479.e7.
  - 56) Zhou X, Sumrow L, Tashiro K, et al. Mutations linked to neurological disease enhance self-association of low-complexity protein sequences. *Science* 2022;377:eabn5582.
  - 57) Akiyama T, Suzuki N, Ishikawa M, et al. Aberrant axon branching via Fos-B dysregulation in FUS-ALS motor neurons. *EBioMedicine* 2019;45:362-378.
  - 58) Mitsuzawa S, Suzuki N, Akiyama T, et al. Reduced PHOX2B stability causes axonal growth impairment in motor neurons with TARDBP mutations. *Stem Cell Reports* 2021;16:1527-1541.

**Abstract****Biological phase separation in neuromuscular diseases**

Noriyoshi Isozumi, Ph.D.<sup>1)</sup>, Kazuma Sugie, M.D., Ph.D.<sup>2)</sup> and Eiichiro Mori, M.D., Ph.D.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Future Basic Medicine, Nara Medical University

<sup>2)</sup> Department of Neurology, Nara Medical University

Biological phase separation refers to the liquid-liquid phase separation of biomolecules such as proteins in cells. Phase separation is driven by low-complexity domains of phase-separating proteins and strictly controlled by regulatory factors. Phase separation has also been found to be disrupted by genetic abnormalities. Abnormal aggregates of causative proteins accumulate in many neuromuscular diseases. In recent years, it has become clear that phase separating proteins are associated with neuromuscular diseases, and that abnormalities in the regulation of phase separation leads to the formation of aggregates. Gains in our knowledge of biological phase separation is gradually elucidating the pathogenesis of neuromuscular diseases.

(Rinsho Shinkeigaku (Clin Neurol) 2023;63:799-805)

**Key words:** biological phase separation, low-complexity domain, neuromuscular disease

---