

令和 元年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06755

研究課題名(和文) 高精細ハイスル-プット解析で迫るALSにおけるmRNAポリアデニル化制御障害

研究課題名(英文) Identification of the role of transcription termination and polyadenylation in the pathogenesis of ALS using multiple high-throughput sequencing analyses

研究代表者

増田 章男 (Masuda, Akio)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10343203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：従来法の100倍以上の感度で生体内RNA-protein相互作用部位を検出するtRIP法を確立した。tRIP法は、わずか4000個の細胞からRNA結合タンパク結合部位を再現性を持って検出できる。さらに、tRIP法の応用により、従来不可能であった細胞内のRNAP II転写複合体分画特異的なRNA-protein相互作用検出に成功した。

我々の解析により、ALS原因RNA結合タンパクであるFUSはRNAP II転写複合体中で、基本スプライシング因子U1 snRNPと複合体を形成し、この複合体がポリアデニル化を抑制することが明らかとなった。新規mRNA代謝制御機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生命の基本現象である、遺伝・転写・翻訳のうち、転写に関するものである。本研究により、従来の100倍以上の感度を持った転写制御解析法を確立した。この方法により、従来、解析することの出来なかった、細胞内の小器官内での転写の様子を見ることが可能になった。実際、本研究で、疾患原因因子FUSによる、従来知られていなかった新たな転写制御様式を発見している。本研究成果は、転写研究や転写異常が原因となる神経疾患の研究の進展に大いに貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：RNA metabolism occurs in specific machineries of RNA, including RNA polymerase II (RNAP II), spliceosome, and 3' end processing machinery. However, the transcriptome-wide detection of protein-RNA interactions in a subcellular component is challenging. Here, we developed the tRIP method (targeted RNA immunoprecipitation) to increase efficiency of RNA immunoprecipitation, which enables detection of UV-crosslinked protein-RNA interactions from thousands of cells. Application of tRIP to identification of protein-protein-RNA interactions revealed that FUS, a multifunctional RNA-binding protein associated with ALS, binds specifically upstream to alternative polyadenylation (APA) sites of nascent RNA engaged to RNAP II. Further tRIP analysis demonstrated that the FUS-U1 snRNP-RNA complex is the entity that suppresses APA.

研究分野：RNA代謝制御

キーワード：tRIP CLIP法 RNA代謝 ポリアデニル化 RNA-タンパク相互作用 ALS FUS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は、運動神経障害に伴う進行性の筋肉萎縮と筋力低下を特徴とする神経変性疾患である。ALS患者においてRNA結合蛋白TDP43に遺伝子変異が同定されて以降、2009年にFUS (Vance et al. Science 2009)、2011年~、EWSR1、TAF15、hnRNPA1など続々とRNA結合蛋白に遺伝子変異が同定され、RNA代謝異常が主要病態の一つと目されている(Ticozzi et al. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2011; Couthouis et al. Hum. Mol. Genet. 2012; Kim et al. Nature 2013)。しかし、これらRNA結合蛋白の遺伝子変異により、どのRNAに生じるどんなRNA代謝障害が、ALSに特徴的である運動神経特異的な変性をもたらすのか、断片的な情報にとどまっており、確定されていない。

申請者は、生化学実験解析とBioinformaticsを用いた網羅的解析を組み合わせた手法により、神経筋疾患におけるRNA代謝異常について、精力的に研究を行ってきた(Masuda et al. Hum. Mol. Genet. 2008; Bian et al. Hum. Mol. Genet. 2009; Fu et al. Nucleic Acids Res 2011; Rahman et al. Sci Rep 2013; Nasrin et al. Sci rep 2014)。RNA結合蛋白のin vivo標的RNAをゲノムワイドに明らかにする、CLIP-seq法に一早く取り組み、世界で5番目、国内では最初に実現している (Masuda et al. Sci Rep 2012)。また、ALS関連遺伝子では、機能未解明であったFUSに注目し、CLIP-seqとmicroarray (exon array) 解析を組み合わせ、FUSがalternative splicingを部位特異的に制御することを初めて明らかにした (Ishigaki\*, Masuda\*equal contribution, et al. Sci rep 2012)。

さらに、申請者は、Neuro2A細胞を用いた種々の大規模シーケンス解析 (high-throughput sequencing analysis) により、FUSがポリアダニル化転写終結点 (PolyA site) 制御因子であることを見出した。CLIP-seqに加え、通常のRNA-seqに比べ100倍以上の感度/精度で、mRNA 3'端-PolyA site を検出するPolyA-seq (Derti et al. Genome Res. 2012)、5'端-転写開始点を検出するCAGE-seqを行い、FUSは、RNA 結合を介して、3万ヶ所を超えるPolyA site制御を行っていることを見出した (図1、図2)。

FUS によるポリアダニル化転写終結制御は、スプライス制御や転写開始点制御に比べ、圧倒的に高頻度であり(図2)、FUS の主要機能がポリアダニル化転写終結制御であることが示唆された。また、FUS は、このポリアダニル化転写終結制御により、全発現遺伝子 (12733 個) の実に約半数の遺伝子において、それらの short isoform mRNA の発現を調節していた (図3)。

Gene Ontology 解析では、FUS 依存的にポリアダニル化制御される遺伝子は、neuronal activity, 中でもシナプス形成に関わる遺伝子群に集中していた。また、同様のポリアダニル化制御活性を、他のALS 関連 RNA 結合タンパク EWSR1、TAF15、TDP43 でも確認しており、ポリアダニル化制御のALS病態への関与が、強く示唆された。

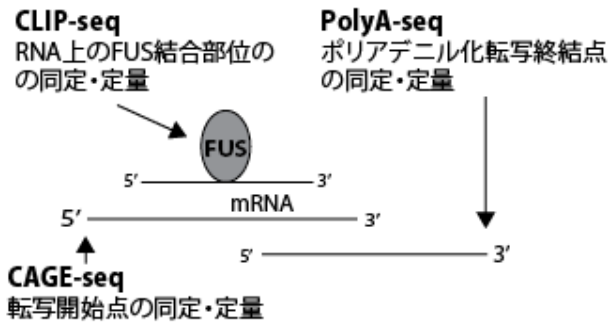


図1 High-throughput sequencingによるmRNA解析

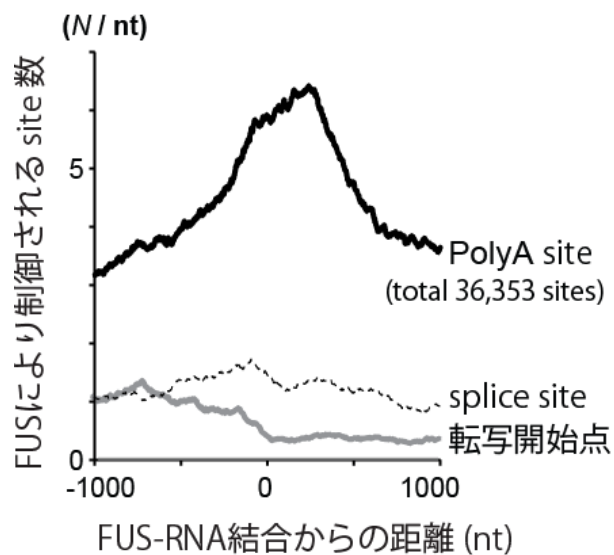


図2 FUSはRNAと結合し、PolyA化を制御する

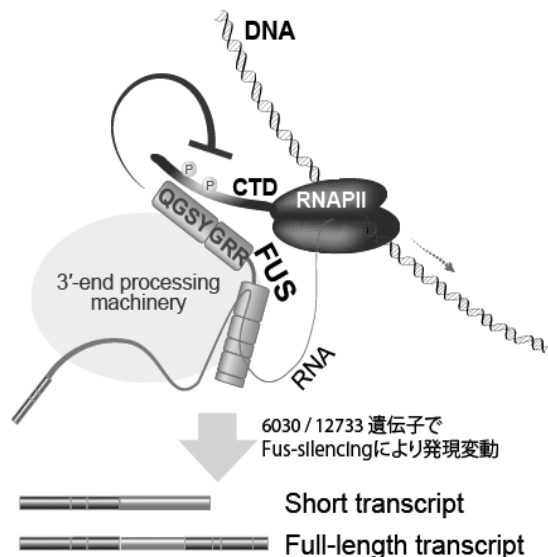


図3 FUSは、RNA結合を介してポリアダニル化制御を行い、short isoform mRNAの発現をコントロールする。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、高精度な RNA 代謝制御解析技術を開発し、それを用いた解析により、ALS の病態形成における、mRNA ポリアデニル化制御の重要性を明らかにすることである。ヒト遺伝子の半数以上が、short isoform の mRNA を有しており、ポリアデニル化転写終結制御は、各遺伝子の時空間特異的な機能制御に極めて重要な役割を持っていると考えられている。しかし、正常組織におけるポリアデニル化制御でさえ、さらなる解明が必要な現在、その ALS 病態における役割は、全く不明である。本研究が明らかにする *FUS* 遺伝子変異による RNA 代謝障害の解明は、ALS 病態研究・制御研究につながることを期待される。

## 3. 研究の方法

独自開発および既存の大規模シーケンス解析による高精細 RNA processing 解析を行い、ALS 病態におけるポリアデニル化制御の障害・意義を明らかにする。

神経系の組織や培養細胞を用いて、RNA-seq, PolyA-seq, FUS-CLIP-seq を行う。さらに、高精細な RNA-タンパク相互作用解析法を開発することで、神経細胞における正常ポリアデニル化転写終結制御の実態を把握する。さらにバイオインフォマティクス解析により、ポリアデニル化制御障害の neuronal activity への関与、および ALS 病態における意義を検討する。

## 4. 研究成果

(1) RNA-タンパク相互作用解析の標準手法 CLIP-seq 法の限界を克服する新手法 (tRIP 法) の開発に成功した。

CLIP 法では、標的タンパク-RNA 複合体の抽出に、SDS-PAGE と membrane transfer ステップを組み合わせた独特で難易度の高い精製ステップを行っている。このステップは、CLIP 法の高い特異性の達成に必須であるが、一方で試料の損失も大きい。我々の開発した tRIP 法では、このステップを省略し、代わりに exonuclease による酵素処理でバックグラウンド RNA と残存 linker を消失させることにより高効率化を達成している (図 4)。

CLIP 法でよく解析が行われている RNA 結合タンパク PTBP1 および RBM9 の RNA-タンパク相互作用解析を行ったところ、tRIP 法は、CLIP 法と同等の特異度を保持しながら (図 5)、最新の CLIP 法と比べても 100 倍以上の感度で RNA-タンパク複合体を検出できることが明らかとなった。少量試料から RNA-タンパク相互作用解析を検出できることも特徴であり、従来の CLIP 法では、通常、数百万個の細胞数が必要なところを、僅か 4000 個の細胞から RBP 標的 RNA 部位の大規模シーケンス解析が可能である (図 5A)。

また、高感度に加えて手技の簡素化も特徴である。プロトコールは、免疫沈降・酵素処理・ライブラリー構築から構成され、2 日で全工程が完了する (CLIP 法なら 4 日から 1 週間)。特殊な手技や試薬の必要は無い。

これらの利点を踏まえ、特許申請を行っている。

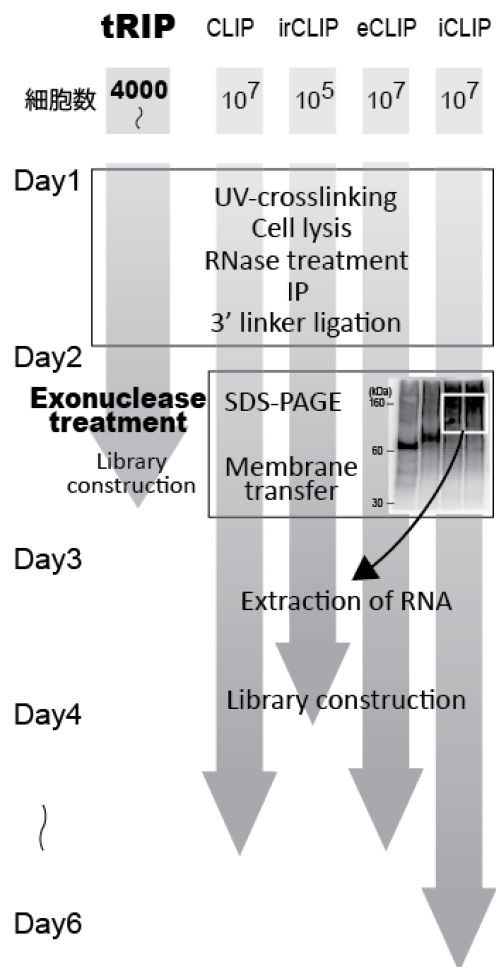


図 4 tRIPと各CLIP法のプロトコール比較

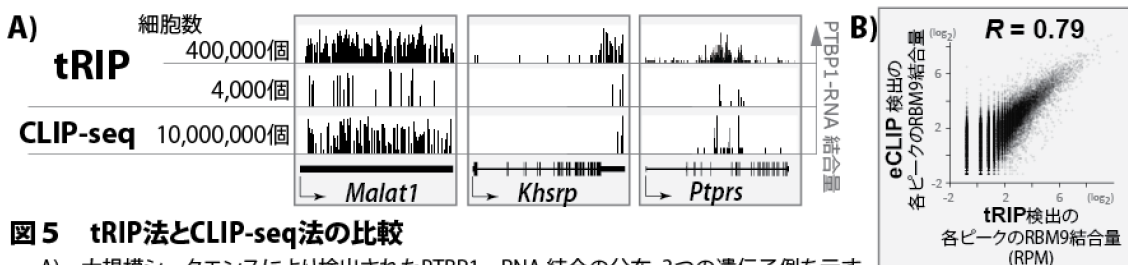


図 5 tRIP法とCLIP-seq法の比較

- A) 大規模シーケンスにより検出されたPTBP1-RNA 結合の分布。3つの遺伝子例を示す。  
 B) eCLIPとtRIPで検出されるRBM9-RNA結合の分布(ピーク17,903個の大きさの比較)は、グローバルに一致する。

tRIP 法は、4千個の細胞より解析可能。細胞40万個の解析は、細胞1千万個の CLIP-seq を超える検出力がある。

( 2 ) tRIP 法の応用により、機能性分画での RNA - タンパク相互作用検出を可能にした。

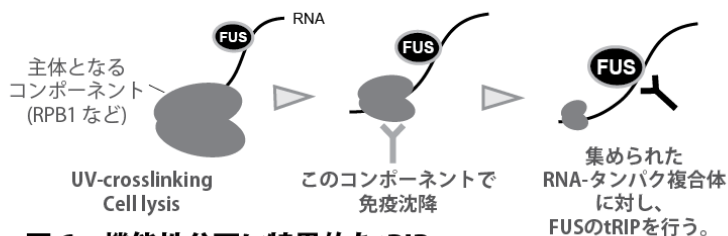


図 6 機能性分画に特異的なtRIP

現在、CLIP-seq は大量の細胞数が必要のため、RNA - タンパク相互作用解析は、total cell lysates を用いた解析が主体であり、細胞分画特異的な解析が課題となっている。我々の tRIP 法は、細胞分画内のさらに内部にある機能性分画に特異的な RNA - タンパク相互作用検出を可能にした。

図 6 に示すように、UV-crosslink により神経系培養セルライン N2A 細胞内の RNA - タンパク相互作用を固定した後、まず、各分画の主体となるコンポーネント(例えば、RNA polymerase II の main component である RPB1 subunit) に対する抗体で免疫沈降を行う。続いて、共沈され RNA - タンパク複合体に対して、RNA を限定分解した後、さらに抗 FUS 抗体で RNA-FUS 複合体の免疫沈降を行う。この複合体に対し tRIP 解析を行うことで、分画に特異的な FUS 標的 RNA 部位の検出を行う。我々は、本法により、RNA polymerase II 転写複合体および U1 snRNP スプライシング複合体の分画内特異的な RNA-タンパク相互作用が検出できることを確認した。

( 3 ) RNA polymerase II 転写複体内で、FUS はポリアデニル化部位の上流に結合し、mRNA のポリアデニル化転写終結を抑制していることを、初めて明らかにした ( 図 7 )。

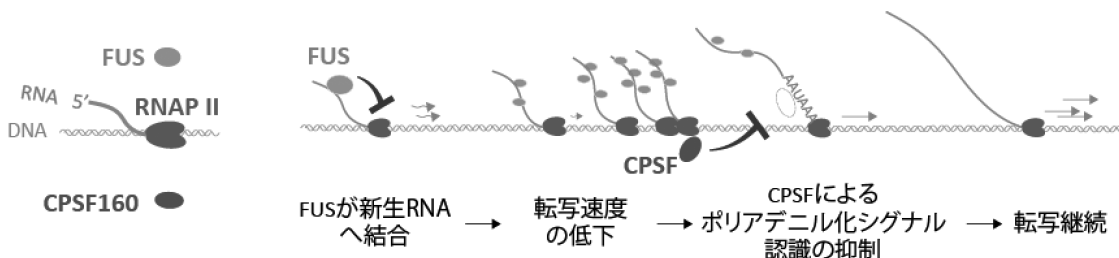


図 7 tRIPにより明らかとなったRNA polymerase II転写複体内での、FUS、CPSFの働き

tRIP 法をの FUS - RNA 結合解析に適用したところ、RNA - FUS 相互作用は、RNA polymerase II 転写複体内で、FUS 存在下で抑制されているポリアデニル化部位の数百塩基上流に集積していることが明らかとなった。さらに、RNA polymerase II およびポリアデニル化基本因子 CPSF160 の tRIP 解析を行ったところ、FUS が、ポリアデニル化部位の上流で RNA polymerase II の転写速度を低下させるとともに、CPSF によるポリアデニル化シグナル認識を抑制することで mRNA ポリアデニル化転写終結を抑制していることが明らかとなった ( 図 7 )。FUS による、転写制御機構の一端が解明できた。

( 4 ) RNA polymerase II 転写複体内でポリアデニル化抑制を行う実体は、FUS-U1 snRNP 複合体であり、この働きは神経発生・分化に関わることが、判明した ( 図 8 )。

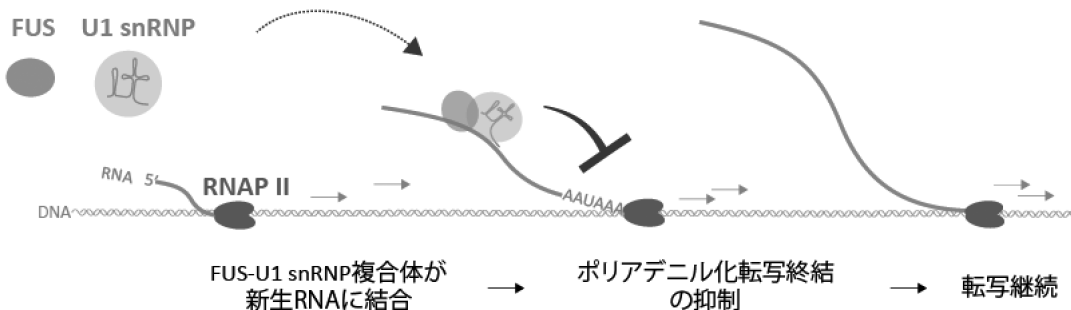


図 8 FUS-U1 snRNP複合体が、mRNA転写終結の抑制を行う実体である

基本スプライシング因子 U1 snRNP は、5' splice site の認識に必須であるが、トランスクリプトームワイドにポリアデニル化抑制に関わることが見出されている。しかし、現在、その機構は、全く明らかでない。また、FUS は、U1 snRNP と直接結合することが知られており、その複合体は、細胞内に豊富に存在する。

tRIP 解析により、U1 snRNP の RNA 結合部位を解析したところ、予期せぬことに、U1 snRNP は FUS と同様に、ポリアデニル化部位の数百塩基上流に集積し、やはりポリアデニル化を抑制していた。polyA-seq との統合解析では、FUS が抑制するポリアデニル化部位と U1 snRNP が抑制するポリアデニル化部位は、ほぼ同一であり、FUS / U1 snRNP のどちらが無くても、ポリアデニル化の抑制が出来ないことが明らかとなった。これらの結果は、FUS と U1 snRNP の複合体が、ポリアデニル化抑制を行う実体であることを示している (図 8)。

FUS と U1 snRNP の協調作用によるポリアデニル化制御は、現在、全く知られておらず、新規の mRNA 代謝制御機構の発見となった。このポリアデニル化制御障害は、神経発生・分化に関与する遺伝子によく認められた。また、FUS - U1 snRNP 結合は、ALS 変異をもった FUS では、変化することが知られている。変異にともなうポリアデニル化異常が ALS 病態に深く関与していることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 25 件)

Kurahashi H, Azuma Y, Masuda A, Okuno T, Nakahara E, Imamura T, Saitoh M, Mizuguchi M, Shimizu T, Ohno K, Okumura A

MYRF is associated with encephalopathy with reversible myelin vacuolization

*Annals of Neurology*; 83: 98-106. (2018) 査読有. doi:10.1002/ana.25125.

Ohno K, Rahman MA, Nazim M, Nasrin F, Lin Y, Takeda J, Masuda A.

Splicing regulation and dysregulation of cholinergic genes expressed at the neuromuscular junction.

*J Neurochem*; 142: 64-72. (2017) 査読有. doi: 10.1038/s41598-017-11036-z.

Takeda J, Masuda A, Ohno K.

Six GU-rich (6GUR) FUS-binding motifs detected by normalization of CLIP-seq by Nascent-seq

*Gene*; 618: 57-64. (2017) 査読有. doi:10.1016/j.gene.2017.04.008.

Nazim M, Masuda A, Rahman MA, Nasrin F, Takeda J, Ohe K, Ohkawara B, Ito M, Ohno K.

Competitive regulation of alternative splicing and alternative polyadenylation by hnRNP H and CstF64 determines acetylcholinesterase isoforms.

*Nucleic Acids Res*; 45:1455-1468. (2017) 査読有. doi: 10.1093/nar/gkw823.

Masuda A, Takeda J, Ohno K.

FUS-mediated regulation of alternative RNA processing in neurons: insights from global transcriptome analysis.

*Wiley Interdiscip Rev RNA*;7(3):330-40. (2016) 査読有. doi: 10.1002/wrna.1338.

Masuda A, Takeda J, Okuno T, Okamoto T, Ohkawara B, Ito M, Ishigaki S, Sobue G, Ohno K.

Position-specific binding of FUS to nascent RNA regulates mRNA length.

*Genes Dev*; 29(10):1045-57. (2015) 査読有. doi: 10.1101/gad.255737.

[学会発表](計 6 件)

Akio Masuda, Toshihiko Kawachi, Junichi Takeda, Kinji Ohno. 新規 RNA 免疫沈降法 (tRIP 法) による、FUS - U1 snRNP 依存性転写終結制御の解明 第 41 回日本分子生物学会 2018

増田章男、河地利彦、武田淳一、大野欽司。新規 RNA 免疫沈降法による生体内 protein-protein-RNA interaction の検出 第 19 回日本 RNA 学会年会 2017

Yoshihiro Yamashita, Akio Masuda, Kinji Ohno. Interaction between NIFK and ncRNA arising from Ccnd1 promoter region regulates myogenic differentiation. RNA society 2016

Takaaki Okamoto, Akio Masuda, Jun-ichi Takeda, Kinji Ohno. FUS はプロモーター領域のアンチセンス鎖 RNA (PROMPTs) に結合し、転写制御を行う 第 39 回日本分子生物学会 2016

Akio Masuda, Jun-ichi Takeda, Takaaki Okamoto, Kinji Ohno. Binding of FUS to promoter upstream transcripts, PROMPTs, globally regulates gene transcription. RNA society 2016

増田章男、武田淳一、大野欽司。神経疾患関連 RNA 結合蛋白 FUS による転写開始・終結制御 第 17 回日本 RNA 学会年会 2015

〔図書〕(計 2件)

増田章男 他、日本生化学学会、FUSによる mRNA 長の制御、生化学、2016、244-247  
Masuda A., Ohno, K. AoS Nordic AB, Stockholm. Neurodegeneration-associated RNA-binding protein, FUS, regulates mRNA length. ATLAS of Science 2016, 1

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称: タンパク質-RNA相互作用の検出

発明者: 増田章男 大野欽司

権利者: 国立大学法人名古屋大学

種類: 特許

番号: 2017-137406

出願年: 2017

国内外の別: 国内

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

名古屋大学大学院医学系研究科先端応用医学部門神経遺伝情報分野ホームページ

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。