

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16259

研究課題名(和文) 神経変性疾患に見られる細胞質内タンパク質凝集によるRNA動態制御異常の解析

研究課題名(英文) Analysis of altered RNA behavior induced by neurodegeneration-associated cytoplasmic protein aggregation.

研究代表者

安田 恭大 (Yasuda, Kyota)

広島大学・統合生命科学研究所(理)・助教

研究者番号：40816344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)に見られる細胞質でのタンパク質凝集は、その病態形成との関わりが未だ不明である。本研究はALSに関連した異常凝集を起こすタンパク質の1つであるFUSを対象にした。FUS凝集は、凝集体内でのRNA翻訳の異常活性化を促す。本研究では主に、翻訳の異常活性化を引き起こす因子の探索・機能解析を行った。主たる成果としてFUSへのALS関連変異がVCPタンパク質とFUSの相互作用を減少させ、VCPの本来の役割であるATP濃度調整を介したFUSの凝集傾向の制御が破綻することを見出した。またVCP過剰発現が翻訳の異常活性化を緩和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

ALSは進行性の神経変性疾患の1つであり、最終的に呼吸筋麻痺に至る重篤な症状を示す。現在も多くの研究が病態解明を目指しているが、根本的な治療法は確立されていない。本研究では、ALS発症メカニズム解明を目的とし、ALSの病理的特徴であるFUSタンパク質凝集がRNAの翻訳制御異常を引き起こす仕組みに着目した。結果、VCPタンパク質によるFUS相分離制御機構が存在し、ALS関連変異がこれを阻害することを見出した。VCPの過剰発現が凝集による異常な翻訳活性化を緩和することを示唆するデータも得た。これらの成果は、細胞内でのFUS相分離制御機構を新たに提唱するとともに、ALS治療法確立にも一石を投じる。

研究成果の概要(英文)：The cytoplasmic protein aggregation found in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is still unclear in its relationship to pathogenesis. This study targeted FUS, one of the proteins undergoes ALS-associated cytoplasmic aggregation. Previous studies have shown that FUS aggregation promotes abnormal activation of RNA translation within the FUS aggregates. In this study, we mainly searched for factors that cause ectopic translation and analyzed their functions relating to ectopic translation. The main finding is involvement of VCP in FUS aggregation and ectopic translation. In brief, ALS-related mutation to FUS reduce the interaction between VCP protein and FUS protein. This reduction of VCP-FUS interaction disrupts the regulation of FUS aggregation by VCP. VCP regulates FUS phase separation through consuming ATP around FUS. We also found that the ectopic translation was alleviated by VCP overexpression.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ALS FUS RNA localization Translation regulation VCP MAP7 LLPS

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、その発症要因の多様さも相まって病態形成メカニズムの包括的な理解が困難であり、根本的な治療法の確立は現在でもなされていない。

これまでに家族性 ALS 患者で Fused in Sarcoma (FUS) や Tar DNA binding protein-43kDa (TDP-43) といった RNA 結合タンパク質の遺伝子変異が発見され、それぞれが疾患細胞の細胞質内で異常凝集していることが報告された。そして現在、この細胞内での RNA 結合タンパク質の凝集は ALS の病理的所見として認知されている。興味深いことに、これらのタンパク質凝集は、FUS や TDP-43 への直接の遺伝子変異を持たない患者の発症組織でも認められ、検査されたうちの実に 97% の ALS 患者の発病組織で観察されている<sup>1</sup>。このことは一部の家族性疾患だけでなく幅広い神経変性疾患患者に共通した疾患発症機序に、これらのタンパク質凝集が関与していることを示唆している。

我々はこれまでに、FUS および TDP-43 凝集体の形成が特定の RNA の細胞内局在を攪乱すること、またそれら凝集体では細胞内の翻訳活性部位が変化している (異所的な翻訳活性化) ことを見出している<sup>2,3</sup>。このことは RNA 局在や局所的翻訳制御機構の変容が神経変性の原因である可能性を示唆しているが、1) 細胞内 RNA 局在の異常による当該 RNA の翻訳活性への影響、2) FUS 凝集が翻訳活性に影響を与える分子基盤・機構といった点が未解明であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は ALS 関連 FUS 凝集体が神経変性を引き起こすメカニズムを、RNA の局在および翻訳制御異常の分子基盤・機構解明を通して明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### 1) RNA 局在の異常が翻訳活性へもたらす影響の解析

RNA そのものとその翻訳活性を蛍光標識にて観察する SUN-tag 法を用いたライブイメージングにより、対象とする局在 RNA がその輸送過程や最終目的地で、異なる翻訳制御を受けるかどうかを解析した。

#### 2) FUS 凝集が翻訳活性に影響を与える分子基盤・機構の解明

FUS 凝集体形成に際して相互作用が変化する因子を、光反応性 Halo タグ基質を利用した新規実験系を用いて探索した。候補因子について、機能解析および RNA の局在・翻訳制御に関わるか否かの解析を生化学・細胞生物学的アプローチから行った。

### 4. 研究成果

#### 1) RNA 局在の異常が当該 RNA の翻訳活性へもたらす影響

SUN-tag 法は、目的 RNA のコード領域に SUN-tag と呼ばれる短いペプチドのリピート配列を導入し、これを GFP 標識したナノボディ (scFv-GFP) が認識することで新規合成ペプチドの即時蛍光標識を可能にし、ライブイメージングする手法である。今回は、これまでに我々が FUS に影響を受ける局在 RNA として同定している、Rab13 RNA および Pkp4 RNA を対象とした。Rab13 RNA および Pkp4 RNA の細胞内局在は 3' UTR の情報に規定されるため、SUN-tag 配列に Rab13 または Pkp4 の 3' UTR を結合した RNA をデザインした。RNA の非コード領域に PP7 配列リピートを導入することで、PP7 と PP7 コートタンパク質 (PPC) の結合を利用し、mCherry 標識した PPC (mCherry-PPC) を導入することで RNA を蛍光標識した。同一細胞内で標的 RNA と scFv-GFP、mCherry-PPC を発現し、共焦点走査型レーザー顕微鏡を用いてライブ観察を行った。mCherry 蛍光を追跡することで、RNA の局在度合い (細胞突起からの距離) を解析し、その追跡過程での翻訳活性を GFP 蛍光強度で捉えた。

局在度合いと翻訳活性の関係をプロットし、相関解析を行った結果、予想に反し、その間に有意な差は見られなかった。具体的には、局在過程を通して、一定の翻訳活性を示し続けた。このことは、今回対象とした RNA は局在の途上にあるか目的地にあるかで大きな翻訳活性の差がない、言い換えれば従来の局在 RNA のセオリーである、「RNA はその局在過程で翻訳が抑制されている」ことに反する新しい発見である。

しかしながら、本実験の主目的である「局在の異常が翻訳活性へもたらす影響」という点では一旦、影響なしという答えになり、本研究が掲げる「RNA 局在や局所的翻訳制御機構の変容が神経変性の原因である」という仮説の修正を余儀なくした。従って、本研究ではその後、研究方法 2) FUS 凝集が翻訳活性に影響を与える分子基盤・機構の解明に注力し、新たな仮説の土台となる実験事実の積み重ねを優先した。

## 2)FUS 凝集が翻訳活性に影響を与える分子基盤・機構の解明

2-1)光反応性 Halo タグ基質を利用した新規実験系による FUS 凝集特異的な相互作用因子探索  
ALS 関連遺伝子変異の有無による、凝集体の形成しやすさを利用し、野生型あるいは ALS 関連変異型 FUS ( P525L ) を過剰発現させた細胞群で、FUS との相互作用が変化する分子からその候補因子を探索した。ここで我々は、光刺激により近傍分子と化学架橋を形成する新規の Halo タグリガンドを使用した<sup>4</sup>。Halo タグを融合した野生型・変異型それぞれの FUS タンパク質を過剰発現し、リガンドを添加・反応させ、その後 UV 照射により化学架橋を行った。LC-MS による分析結果を野生型、変異型 FUS とで比較し、変異の有無で相互作用する因子の候補を得た ( 図 1 )。この中の 2 因子 ( Valosin containing protein: VCP と Mictotubule associated protein 7: MAP7 ) について、さらに詳細に FUS 凝集や RNA 動態との関わりについて解析を進めた。いかにそれぞれの成果を記述する。

gene name (Uniprot ID)	Fold change (UV+/UV-)	
	wild type	P525L
FUS (P35637)	4.8	2.6
TNPO1 (Q92973)	44	3.7
KPNB1 (Q14974)	33	2.1
TBL3 (Q12788)	31	4.6
VCP (Q9H867)	31	1.7
DDX27 (Q96GQ7)	23	3.7
MATR3 (P43243)	0.8	2.3
SLTM (Q9NWH9)	0.6	2.2

図 1. 変異の有無による FUS との相互作用変化の一例。数字はスペクトルカウントを用いた相対量 ( 参考文献 5 より )。

## 2-2)VCP タンパク質は ATP 消費を介して FUS の形成・離散を制御する

VCP は AAA+ ATPase に属する多機能なタンパク質として知られる。質量分析結果から、VCP は野生型 FUS に比べて変異型 FUS との相互作用が減少していることが示唆された。実際に免疫沈降や蛍光免疫染色で比較した結果、どちらの結果からも、ALS 関連変異が FUS VCP 相互作用を減少させることが確認できた。ALS 関連 FUS 凝集体を形成している細胞で VCP を過剰発現すると FUS 凝集体に局在する VCP の割合が上昇するため、VCP が持つ FUS 凝集への役割をレスキュー実験様に解析することができる。この実験系を用いて、fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 計測にて凝集体を構成する FUS タンパク質のダイナミクスを解析した結果、VCP の凝集体への共同在は FUS のダイナミクスを低下させ、凝集体を rigid なものにすることが明らかとなった。さらに、継続的な培養と FUS 凝集体の形態および形成率観察から、VCP 過剰発現の継続が FUS 顆粒の消失を促すことを明らかになった。これらの結果は、細胞の ATP 枯渇処理でも再現されたこと、またプロテアソーム関連機能を消失し、ATPase 機能が向上した変異 VCP ( A232E ) を用いた実験でも再現できた。このことから、VCP による FUS 凝集は VCP の代表的な機能であるユビキチン依存的プロテアソーム経路を介さず、VCP の ATPase としての機能によって実現されていると考えられる。試験管合成した FUS タンパク質を用いた先行研究で、FUS の相分離には至適 ATP 濃度が存在することが報告されている。このことを踏まえて、VCP が ATP を消費することで FUS 周辺の ATP 濃度を至適濃度の範囲内外に調整し FUS 相分離を制御するという新たな FUS 相分離制御モデルを提唱した ( 図 2 )。これらの成果は FEBS letters に投稿、掲載済みである<sup>5</sup>。

さらに、その後の研究から、VCP 過剰発現が FUS 凝集による翻訳の異所的な活性化を緩和することも明らかにした。このことは、VCP FUS 相互作用の FUS 変異による減少が、翻訳の異所的な活性化に關与することを示唆する。

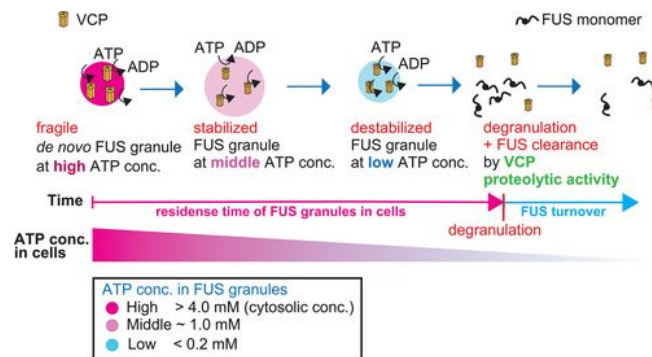


図 2. VCP による FUS 相分離制御機構のモデル (参考文献 5 より)。

### 2-3)MAP7 タンパク質は FUS 顆粒形成を阻害する

もう 1 つの候補因子として上がった MAP7 は VCP とは逆に、変異により FUS との相互作用が増加することが質量分析から示唆された。蛍光免疫染色の結果は FUS 顆粒への MAP7 の局在が見られたが、共免疫沈降では野生型、変異型 FUS と間に大きな差はなく、相互作用強度の変化についてはさらなる実験を必要とする。

MAP7 が変異 FUS 凝集体に局在することから、MAP7 の隔離による機能阻害が FUS 凝集に関わると仮定し、MAP7 の過剰発現によるレスキュー様実験を行った。結果として MAP7 の過剰発現は FUS 顆粒の形成率を有意に減少させた。また MAP7 を機能ドメインごとに分断し、その責任部位特定を行った結果、N 末端側の微小管結合ドメインが不可欠であることが明らかとなった。

MAP7 の微小管結合は、微小管の安定化を引き起こすと言われている。微小管安定化によって誘導される微小管の脱チロシン化は FUS 凝集により阻害されることを我々はすでに見出しているため<sup>2</sup>、MAP7 過剰発現と微小管脱チロシン化の関係を免疫染色により確かめた結果、MAP7 の過剰発現による FUS 凝集の緩和と微小管脱チロシン化度合いの間にある程度の相関があることが示唆された。脱チロシン化の回復が FUS 顆粒形成を抑制する分子機構を解明するため、脱チロシン化促進によって細胞内遊離チロシンが一時的に増加すると考え、細胞へのチロシンの直接インジェクションが FUS 顆粒の形態にどのような影響を与えるかをイメージングにより計測した。結果として、チロシンのインジェクションは時間経過とともに FUS 顆粒の縮小を促すことが示唆された。ただし、これらの脱チロシン化に関わる結果を最終的に結論づけるには、追加の試行を要する。

### [引用文献]

1. Ling SH, Polymenidou M, Cleveland D. Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. *Neuron*. 2013 Aug 7; 79(3):416-438. PMID: 23931993, DOI: 10.1016/J.NEURON.2013.07.033
2. Yasuda K, Clatterbuck-Soper S, Jackrel M, Shorter J, Mili S. FUS Inclusion Disrupts RRNA Localization by Sequestering kinesin-1 and Inhibiting Microtubule Detyrosination. *J. Cell Biol.* 2017 Apr 3; 216(4):1015-1034. PMID 28298410, PMCID: PMC5379945, DOI: 10.1083/jcb.201608022
3. Yasuda K, Zhang H, Loisel D, Haysted T, Macara I, Mili S. The RNA-binding Protein Fus Directs Translation of Localized mRNAs in APC-RNP Granules. *J. Cell Biol.* 2013 Dec 9; 203(5):737-46.

PMID 24297750, PMCID: PMC3857475, DOI: 10.1083/jcb.201306058

4. Mishra PK, Yoo CM, Hong E, Rhee HW. Photo- crosslinking: an emerging chemical tool for investigating molecular networks in live cells. *Chem. Bio.Chem.* 2020 Dec 3; 21:924–32. PMID: 31794116, DOI: 10.1002/cbic.201900600
5. Yasuda K, Watanabe TM, Kang M.G, Seo JK, Rhee HW, Tate S. Valosin-containing protein regulates the stability of fused in sarcoma granules in cells by changing ATP concentrations. *FEBS Lett.* 2022. Apr 21. doi: 10.1002/1873-3468.14353.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yasuda Kyota, Watanabe Tomonobu M., Kang Myeong Gyun, Seo Jeong Kon, Rhee Hyun Woo, Tate Shinichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Valosin containing protein (VCP) regulates the stability of fused in sarcoma (FUS) granules in cells by changing ATP concentrations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	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） 10.1002/1873-3468.14353	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

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kyota Yasuda
2. 発表標題 細胞局所でのタンパク質発現制御とヒト疾患の関係
3. 学会等名 第5回 HiHA(Hiroshima Research Center for Healthy Aging) Young Researchers Workshop (Webinar) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田恭大
2. 発表標題 Possible molecular entity for misdirected local translation caused by ALS-related inclusion formation identified with novel photo-activatable ligand.
3. 学会等名 日本分子生物学会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田恭大
2. 発表標題 細胞質内での液-液層分離現象を制御する時期・部位特異的因子の探索
3. 学会等名 日本生物物理学会第11回中国四国支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田恭大
2. 発表標題 細胞局所におけるRNAの振る舞いと液-液相分離現象
3. 学会等名 インド-日本合同セミナー（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田恭大
2. 発表標題 VCPIによるATPを介した筋萎縮性側索硬化症関連FUSタンパク質顆粒の形成制御
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田恭大
2. 発表標題 VCPIによるATPを介した筋萎縮性側索硬化症関連FUSタンパク質顆粒の形成制御
3. 学会等名 第13回日本生物物理学会 中国四国支部大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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			
米国	米国立衛生研究所			
韓国	ソウル大学			