

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07270

研究課題名(和文) ALS病因タンパク質FUSの多量体化機構及び病態形成に与える役割の解明

研究課題名(英文) Study for the mechanisms of oligomerization and toxicity of FUS

研究代表者

橋本 唯史 (Hashimoto, Tadafumi)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第四部・部長

研究者番号：30334337

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)や前頭側頭葉変性症の病因タンパク質FUSがいかなる機序で異常性を獲得して、神経変性を発揮するか検討を行い、次の成果を得た。(1)FUSはoligomer化することでTBS不溶性(高塩濃度可溶性)を獲得する、(2)CK1 delta/epsilonによるLC領域のリン酸化によってFUSはTBS不溶性を喪失し、神経毒性は軽減する、(3)家族性ALS変異はFUSの細胞質局在を亢進して神経毒性を増悪させるが、TBS不溶性に影響を与えない、(4)FUSカルボキシ末端アルギニン(R495, R498, R503)の脱メチル化によりFUSの神経細胞間伝播が亢進する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経難病であるALSの病因タンパク質FUSが神経毒性を獲得するトリガーとして多量体化に伴う何らかの構造変化が必須であることを見出し、CK1 delta/epsilonによるリン酸化、あるいはアルギニンメチル化による翻訳後修飾がその毒性や伝播を軽減することを明らかにした。これらはFUSに起因する神経変性疾患治療に重要な情報を与えるものである。近年液-液相分離によるcondensationがタンパク質の機能発揮、そして病的作用発揮の場として注目されているが、本研究で見出したFUSの多量体化に伴う生化学的性質の変化は、condensationしたタンパク質の分離に応用されると期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated how the pathogenic protein FUS (fused-in-sarcoma), associated with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration, acquires abnormality and exhibits neurodegeneration through the following findings: (1) FUS acquires TBS-insolubility (high salt-solubility) by oligomerization, (2) Phosphorylation of the LC domain of FUS by casein kinase 1 / causes FUS to lose TBS-insolubility and reduces neurotoxicity in *Drosophila* model, (3) Familial ALS mutations exacerbate neurotoxicity by promoting cytoplasmic localization of FUS, without affecting TBS-insolubility, (4) Demethylation of arginine residues (Arg495, Arg498, Arg503) at the carboxyl terminus of FUS enhances intercellular transmission of FUS in neurons.

研究分野：病態生化学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 前頭側頭葉変性症 FUS 神経変性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1 (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) は上位及び下位運動ニューロンが進行性に脱落することにより、筋力低下や筋萎縮、呼吸困難を引き起こす神経難病である。ALS 患者の運動ニューロンでは、ユビキチン陽性の細胞質封入体が出現することが病理学的特徴である。FUS 遺伝子は家族性 ALS6 家系の病因遺伝子として同定され (Kwiatkowski TJ et al., *Science*, 2009; Vance C et al., *Science*, 2009)、さらに、孤発例を含めた ALS 患者や、アルツハイマー病に次いで頻度の高い変性性認知症である前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration, FTLD)、などにおいてユビキチン陽性封入体が FUS タンパク質に陽性を呈することが明らかとなり (Mackenzie IR et al, *Acta Neuropathol*, 2011)、ALS などの FUS 蓄積を伴う疾患を総称して FUS proteinopathy と呼ぶ疾患概念が提唱され、**FUS が何らかの共通機序で神経変性を引き起こす可能性**が考えられた。FUS は RNA 認識領域 (RNA recognition motif, RRM) を持ち、RNA processing に関与する DNA/RNA 結合タンパク質である。我々はこれまでに FUS による神経変性発現機序について研究を進め、FUS はアミノ末端に存在するアミノ酸組成の複雑性が乏しい領域 (Ixx-mocplexity domain (LCD)) を介して自己重合し、神経毒性を発揮することを見出した (Matsumoto T et al., *Hum Mol Genet*, 2018)。しかし、FUS の自己重合がどのように神経毒性を発揮するのか、また細胞質封入体形成に関与するのかが不明であった。

2. 研究の目的

本研究において我々は FUS proteinopathy に共通の疾患発症メカニズムを明らかにするため、新たに **FUS の段階的多量体化機構**を提唱し、培養細胞系、あるいはショウジョウバエモデル、マウスモデルを用いて **FUS の多量体化が封入体形成・伝播・神経変性機序に与える影響について検討を行う**ことで、FUS の病態形成・神経変性発現機序の解明を行い、本研究結果から「封入体は神経変性の原因となるか」という神経変性疾患の核心となる学術的問いに答えを導く。この目的を遂行するため、本研究では特に以下の3つの課題に注力して研究を遂行する。

- (1) FUS の段階的多量体化機構の分子機序解明
- (2) FUS の多量体化が封入体形成、及びその神経細胞間伝播に与える役割の解明
- (3) FUS の多量体化が FUS による神経毒性に与える役割の解明

近年 FUS や TDP-43、タウタンパク質などいくつかの神経変性疾患病因タンパク質がそれぞれの LCD 領域を介した**液 液相分離 (liquid-liquid phase separation, LLPS)**による膜構造を持たない液滴構造を形成することが報告された (Zbinden A, et al, *Dev Cell*, 2020)。そこで本研究では LLPS が FUS 多量体化の場となる可能性を考え、新たな生化学的・可視化技術を用いて検討する。

3. 研究の方法

培養細胞における FUS の段階抽出

12-well plate 上の培養細胞に、NP-40 バッファー (1% NP-40, 20 mM Tris-HCl (pH = 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% グリセロール, 1 mM DTT, 10 mM フッ化ナトリウム, 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム, 5 mM ピロリン酸ナトリウム) を加え、4℃ で 30 分間振盪した。20,000 xg で 15 分間遠心し、上清を NP-40 可溶画分として回収した。2 段階抽出の際には urea-SDS バッファー (8 M urea および 3% SDS / NP-40 バッファー) で可溶化し、上清を NP-40 不溶画分として回収した。5 段階抽出の際には、最初 TBS で可溶化後、沈殿を 1 M NaCl/TBS、1% Triton X-100/TBS、RIPA buffer、urea-SDS バッファーで順次可溶化させてサンプルを回収した。タンパク質の分解を避けるため、各バッファーには phosphoSTOP (Roche) と cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) を加えた。

PLA 法による FUS 多量体の検出

抗 FUS アミノ末端抗体 CL0190、及び抗 FUS カルボキシ末端抗体 BLR023E を用い、Duolink PLA (anti-mouse PLUS, PLA anti-rabbit MINUS)を用いて PLA 反応を行い、共焦点顕微鏡で観察を行った。

Split-luciferase 法を用いた FUS 伝播の測定

LgFUS あるいは SmFUS を stable に発現する HEK293 細胞を樹立し、96-well plate で共培養し、1 日後細胞を可溶化し、NanoLuc の luminescence を測定した。

ショウジョウバエの複眼厚測定方法

C02 麻酔下で 5 日、あるいは 10 日齢の雌個体の頭部を切断し、口器を切除し、PBS に浸した。その後 70%エタノールに 3 分間浸し、4%PFA 中で 2 時間浸透して固定を行った。固定した頭部は、エタノール系列で脱水、ブタノール系列で透徹処理をおこない、パラフィンに包埋した。パラフィンブロックは 4 μm 厚に薄切し、H&E 染色を行い、光学顕微鏡下で撮像を行った。撮影した H&E 染色標本から、個眼が水平になる高さのものを選び脳を中心から水平に引いた直線上の網膜細胞層の厚さを測定した。

4. 研究成果

(1) FUS の段階的多量体化機構の分子機序解明

(1-1) 生化学的性質を用いた FUS の段階的多量体化機構検出

これまでに FUS は LC を介して多量体化すること、また LC 領域の Tyr 残基を全て Ser に置換した A1IS 変異型 FUS は多量体化せず、また神経毒性も発揮しないことを見出した (Matsumoto T, *Hum Mol Genet*, 2018)。そこでまず野生型、及び A1IS 変異型 FUS の生化学的性質を検討したところ、野生型 FUS の一部は Tris-buffered saline (TBS) に不溶性を示すが、A1IS 変異型 FUS は全て TBS に可溶であることが分かった。そ

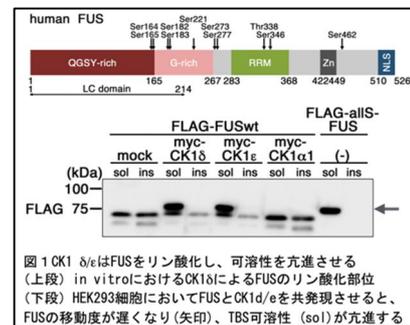


図 1 CK1 δ/ε は FUS をリン酸化し、可溶性を亢進させる (上段) in vitro における CK1δ による FUS のリン酸化部位 (下段) HEK293 細胞において FUS と CK1δ/ε を共発現させると、FUS の移動度が遅くなり (矢印)、TBS 可溶性 (sol) が亢進する

ここで A1IS 変異と同様の効果を示す翻訳後修飾を検討したところ、casein kinase 1 δ (CK1δ) あるいは CK1δ とキナーゼ領域の相溶性が高い CK1ε によって FUS はリン酸化を受け、TBS 可溶性が

亢進することが分かった (図 1)。In vitro 実験系で CK1δ によってリン酸化される Ser/Thr 残基を MS 解析により検討したところ主に LC 領域後半 Gly-rich 領域の Ser 残基がリン酸化を受けることが分かった (図 1)。この TBS 可溶性獲得は CK1 δ/ε 特異的阻害剤 PF670462 投与、あるいはキナーゼ活性を喪失した CK1 δ K38R では生じないことから CK1 δ/ε のリン酸化によって担われていることが確かめられた。さらに FUS の TBS 不溶性について詳細に検討したところ、TBS 不溶性 FUS は 1 M NaCl を含む TBS で可溶化されることが分かった (図 2)。一方、LC 領域、あるいは C 末端側を欠損させた FUS は TBS 可溶性を示すこと (図 2) また家族性 ALS に連鎖した P525L 変異型 FUS は野生型と同様に TBS 不溶・1 M NaCl/TBS 可溶性を獲得することから、de novo FUS は機能型となると TBS 不溶・1 M NaCl/TBS 可溶性を獲得し、その後何らかの神経毒性を獲得すること、一方で TBS 不溶・1 M NaCl/TBS 可溶性を獲得しない FUS は神経毒性を発揮しないことが示唆された。核内で RNA splicing に関与する nuclear speckles 局在タンパク質は TBS 不溶・0.5 M NaCl/TBS 可溶性を帯びることが報告されており、FUS も核内の何らかの nuclear body に局在することで TBS 不溶・1 M NaCl/TBS 可溶性を獲得して機能型となる可能性が考えられる。FUS が CK1 δ/ε によってリン酸化を受ける発見は原著論文として報告した (Kishino Y, et al., *J Biol Chem*, 2022)。

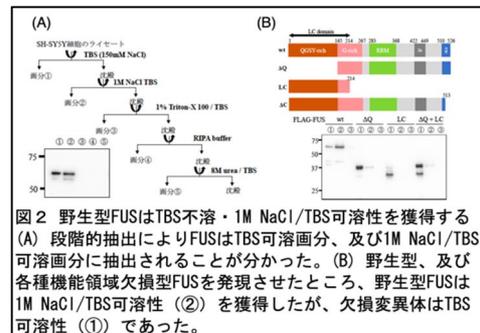


図 2 野生型 FUS は TBS 不溶・1M NaCl/TBS 可溶性を獲得する (A) 段階的抽出により FUS は TBS 可溶画分、及び 1M NaCl/TBS 可溶画分に抽出されることが分かった。(B) 野生型、及び各種機能領域欠損型 FUS を発現させたところ、野生型 FUS は 1M NaCl/TBS 可溶性 (②) を獲得したが、欠損変異体は TBS 可溶性 (①) であった。

(1-2) proximity ligation assay を用いた FUS の段階的多量体化機構検出

FUS の多量体化が細胞内のどこで生じるか可視化するため、FUS のアミノ末端とカルボキシ末端それぞれを認識する特異抗体を用いた proximity ligation assay (PLA)を行った。HEK293 細胞において PLA 法で観察したところ、核内に PLA 陽性の dot が観察され、FUS をノックダウンすると消失した (図3)この結果から、FUS は核内で多量体化する可能性が示唆された。

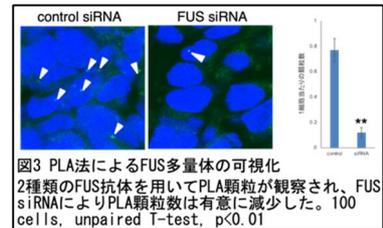


図3 PLA法によるFUS多量体の可視化
2種類のFUS抗体を用いてPLA顆粒が観察され、FUS siRNAによりPLA顆粒数は有意に減少した。100 cells, unpaired T-test, p<0.01

(1-3) 光遺伝学を用いた FUS 多量体化機構の検討

FUS の多量体化を誘導するため、青色光で多量体化する CRY2 タグを付加した FUS を作出し、CRISPR/Cas9 により内因性 FUS を欠損させた SH-SY5Y 細胞に発現させ、青色光依存性な FUS 多量体化実験を行った。しかし、FUS は青色光刺激非依存的に多量体化しており、光誘導依存性な多量体化実験系を構築することはできなかった。

(2) FUS の多量体化が封入体形成、及びその神経細胞間伝播に与える役割の解明

(2-1) 培養細胞を用いた FUS 伝播実験とその機序の検討

FUS の細胞間伝播を評価するため、FUS が多量体化する性質を利用して、アミノ末端に split-luciferase (NanoBit) tag を付加した FUS を作出し (LgBit-FUS(LgFUS), SmBit-FUS(SmFUS))、それぞれを恒常的に発現する HEK293 細胞を作出した。まず、LgFUS 細胞と SmFUS 細胞を共培養したところ、培養時間依存的に細胞ライセート中の発光が認められ、一方 LgFUS あるいは SmFUS 単独培養細胞ライセート中では発光が認められなかったことから、FUS は細胞間を伝播した可能性が示唆された。

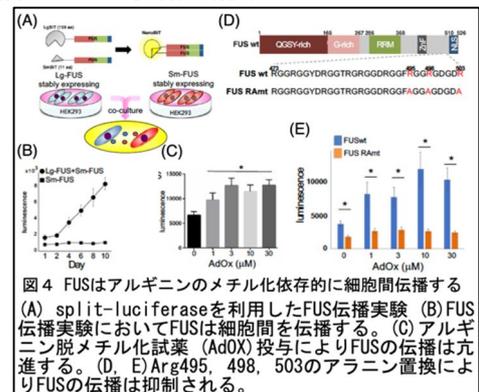


図4 FUSはアルギニンのメチル化依存的に細胞間伝播する
(A) split-luciferaseを利用したFUS伝播実験 (B) FUS伝播実験においてFUSは細胞間を伝播する。(C) アルギニン脱メチル化試薬 (AdOx) 投与によりFUSの伝播は亢進する。(D, E) Arg495, 498, 503のアラニン置換によりFUSの伝播は抑制される。

次に、この実験系を用いて FUS の細胞間伝播に関わる分子機序について検討したところ、AdOx 投与により FUS が脱メチル化するとともに発光が上昇することが分かった。そこで FUS のどのアルギニンが脱メチル化による伝播制御に関与するか検討したところ、Arg495, 498, 503 をアラニンに置換した変異体 (RAmt)では AdOx による FUS の細胞間伝播上昇が生じないことがわかり、FUS は細胞間を伝播すること、また Arg495, 498, 503 の脱メチル化により細胞間伝播が上昇することが分かった (図4)。

(2-2) AAV-FUS 発現系を用いた FUS の神経細胞間伝播とその機序の解明

FUS が神経細胞間を伝播するか検討するため、Synapsin I プロモーター下で自己開裂 P2A を挟んで bi-cistronic にヒト FUS と dTomato を発現する AAV を作出し、出生後 1-2 日の C57BL6 マウス側頭静脈より導入した (図5)。この実験系で FUS が神経細胞間を伝播するならば、dTomato 陽性の AAV 感染細胞以外に、FUS 陽性細胞が出現することが期待される。1ヶ月後マウス脳を観察したところ、FUS 及び dTomato 共陽性な AAV 感染神経細胞の周囲に、FUS 陽性 dTomato 陰性の神経細胞が観察され、FUS が神経細胞を伝播した可能性が示された。興味深いことに、AAV 感染神経細胞において FUS は核内と細胞質に陽性を示したが、伝播細胞において FUS は細胞質に局在し、非メチル化 FUS に陽性を呈した (図5)。そこで、FUS の神経細胞間伝播に Arg495, 498, 503 のメチル化が関与するかどうか明らかにするため、この3つのアルギニンをアラニンに置換した変異体 (RAmt)を発現させて検討した。

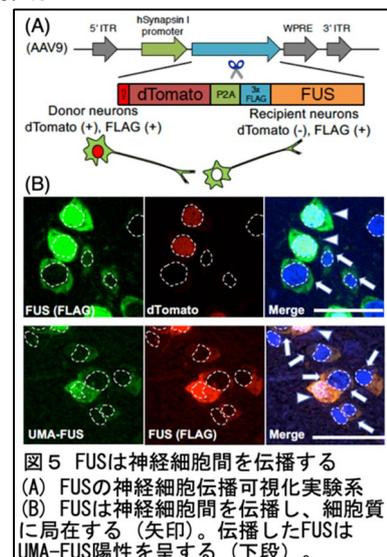


図5 FUSは神経細胞間を伝播する
(A) FUSの神経細胞伝播可視化実験系 (B) FUSは神経細胞間を伝播し、細胞質に局在する (矢印)。伝播したFUSはUMA-FUS陽性を呈する (下段)。

その結果、RAmt では FUS 伝播神経細胞数が減少し、FUS の神経細胞間伝播に Arg495, 498, 503 の脱メチル化が関与する可能性が示された。以上の結果から、FUS は神経細胞間を伝播し、伝播

先では細胞質に局在すること、また Arg495, 498, 503 が脱メチル化されることで神経細胞間伝播が亢進することが分かった。

(3) FUS の多量体化が FUS による神経毒性に与える役割の解明

(1)で明らかにした CK1 δ/ϵ によるリン酸化が FUS の神経毒性に影響を与えるか検討を行った。これまでに複眼にヒト FUS を過剰発現させることで複眼変性を呈するショウジョウバエモデルを作出していた (Matsumoto T et al., *Hum Mol Genet*, 2018)。そこで本モデルを用いてヒト CK1 α あるいは CK1 δ を site-directed に導入したショウジョウバエを FUS 野生型あるいは FUS P525L を発現するショウジョウバエと交配させたところ、CK1 δ を発現させると FUS 野生型あるいは FUS P525L による神経毒性を減弱させることが分かった (図 6)。

さらにこの現象に CK1 δ のリン酸化が関与していることを示すため、CK1 δ のショウジョウバエホモログ Dco あるいは kinase-dead 変異型である Dco K38R を発現するショウジョウバエと FUS 野生型あるいは FUS P525L を発現するショウジョウバエを交配させたところ、Dco の発現で神経毒性は減弱したが、Dco K38R の発現で神経毒性の減弱は認められなかった (図 6)。これらの結果から、CK1 δ/ϵ によるリン酸化は FUS の神経変性を抑制することが分かった (Kishino Y, et al., *J Biol Chem*, 2022)。

以上の結果、本研究において FUS は LC 領域を介して多量体化することで TBS 不溶・1M NaCl/TBS 可溶性を獲得し、神経変性を発揮すること、さらに FUS は Arg のメチル化依存的に神経細胞間を伝播することで、毒性分子種を拡大させ、FUS proteinopathy 発症に至る可能性が示唆された。

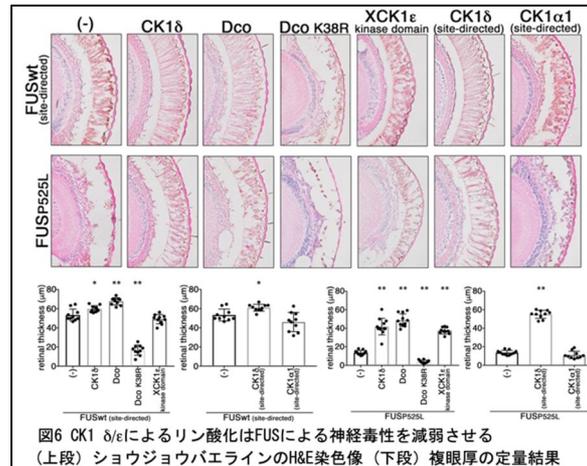


図6 CK1 δ/ϵ によるリン酸化はFUSによる神経毒性を減弱させる (上段) ショウジョウバエラインのH&E染色像 (下段) 複眼厚の定量結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kishino Yuya, Matsukawa Koji, Matsumoto Taisei, Miyazaki Ryota, Wakabayashi Tomoko, Nonaka Takashi, Kametani Fuyuki, Hasegawa Masato, Hashimoto Tadafumi, Iwatsubo Takeshi	4. 巻 298
2. 論文標題 Casein kinase 1 / phosphorylates fused in sarcoma (FUS) and ameliorates FUS-mediated neurodegeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102191 ~ 102191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsukawa Koji, Kukharsky Michail S., Park Sei-Kyoung, Park Sangeun, Watanabe Naruaki, Iwatsubo Takeshi, Hashimoto Tadafumi, Liebman Susan W., Shelkownikova Tatyana A.	4. 巻 18
2. 論文標題 Long non-coding RNA NEAT1_1 ameliorates TDP-43 toxicity in in vivo models of TDP-43 proteinopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RNA Biology	6. 最初と最後の頁 1546 ~ 1554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15476286.2020.1860580	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

1. 著者名 An Haiyan, Litscher Gioana, Watanabe Naruaki, Wei Wenbin, Hashimoto Tadafumi, Iwatsubo Takeshi, Buchman Vladimir L., Shelkownikova Tatyana A.	4. 巻 162
2. 論文標題 ALS-linked cytoplasmic FUS assemblies are compositionally different from physiological stress granules and sequester hnRNP A3, a novel modifier of FUS toxicity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 105585 ~ 105585
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2021.105585	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 橋本唯史
2. 発表標題 FUSの多量体化と神経毒性・伝播
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tadafumi Hashimoto, Naruaki Watanabe, Yuya Kishino, Koji Matsukawa, Dorothee Dormann, Takeshi Iwatsubo
2. 発表標題 Analysis of molecular mechanisms underlying neuron-to-neuron transmission of FUS
3. 学会等名 Neuroscience2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuya Kishino, Koji Matsukawa, Taisei Matsumoto, Tomoko Wakabayashi, Takashi Nonaka, Fuyuki Kametani, Masato Hasegawa, Tetsuo Ushiku, Tadafumi Hashimoto, Takeshi Iwatsubo
2. 発表標題 Deciphering the mechanism of neurodegeneration in FUS proteinopathies
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岸野祐也、松川浩二、松本大成、宮崎良太、若林朋子、野中隆、亀谷富由樹、長谷川成人、橋本唯史、岩坪威
2. 発表標題 Casein kinase 1d/εはfused in sarcoma (FUS)をリン酸化し、FUSを介した神経変性を軽減する
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮崎良太、松川浩二、橋本唯史、岩坪威
2. 発表標題 TDP-43によるマウスULK1のTGリピート配列を介したオートファジー制御
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岸野祐也、松川浩二、松本大成、宮崎良太、若林朋子、野中隆、亀谷富由樹、長谷川成人、橋本唯史、岩坪威
2. 発表標題 Casein kinase 1d/eがFUSの神経毒性に与える影響に関する検討
3. 学会等名 第41回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎良太、松川浩二、橋本唯史、岩坪威
2. 発表標題 ULK1がTDP-43の生理学的及び病的機能に与える役割の検討
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------