

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：35407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430080

研究課題名(和文) 家族性筋萎縮性側索硬化症タイプ6におけるRNA代謝異常の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis of aberrant RNA metabolism in familial ALS type6

研究代表者

藤井 律子 (Fujii, Ritsuko)

広島文教女子大学・人間科学部・教授

研究者番号：90342716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：家族性筋萎縮性側索硬化症タイプ6(FALS6)は、TLS/FUS(以下TLS)遺伝子の特異的な点変異に基づく、TLSの機能不全と細胞内蛋白質凝集が原因である。しかし、その発症機序は明らかにされていない。脊髄運動ニューロンにFALS6特異的な点変異体TLSと正常TLSを共発現させた場合、蛋白凝集体形成はむしろ増強され、さらにTLS点変異体の発現自体はオートファジーを誘導しない。そこで本研究では、RNA結合蛋白としてのTLSの機能に着目し、TLSの選択的なRNA代謝が機能的に破綻することにより異常な細胞内Ca²⁺流入が起こることや、またその結果としてFALS6が発症する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Familial amyotrophic lateral sclerosis type6 (FALS6) is caused by aberrant expression of TLS/FUS with ALS-specific point mutations, which leads to intracellular aggregations of the dysfunctional TLS proteins. The protein aggregation of the ALS mutant TLS is not rescued by an expression of wild type TLS. Furthermore, overexpression of ALS mutant TLS does not induce autophagy in spinal cord motor neuron-derived cells, suggesting that pathogenesis of FALS6 is distinct from that of other FALS. Here we show that dysfunctional TLS cannot regulate the expression of Ca²⁺ channel proteins such as specific types of NMDA receptor 1 subunits with high Ca²⁺ permeability, and also that D-serine content in TLS knockout mouse brains is elevated due to the higher expression of serine racemase. Our findings provide the evidence that motor neurons expressing the mutant TLS responsible for the defective RNA metabolism are susceptible to ALS development.

研究分野：神経科学

キーワード：ALS FUS/TLS RNA代謝 RNA輸送

1. 研究開始当初の背景

私たちは、中枢神経系細胞における RNA 結合蛋白 TLS (Translocated in liposarcoma /FUS (以下 TLS) の機能解析を進めてきた (Fujii et al. Curr Biol 2005 他)が、2009 年に遺伝性の脊髄運動ニューロン変性疾患である“家族性筋萎縮性側索硬化症 (以下 FALS) タイプ 6”の患者の TLS 遺伝子に特異的な点変異が存在することが相次いで報告されたことから (Vance ら 2009, Kwiatkowski ら 2009) (図 1)、「細胞内 mRNA 輸送系」や「RNA プロセシング」など多岐にわたる RNA 代謝経路における“TLS の機能不全”が遺伝性神経変性疾患である FALS6 の発症要因となる可能性が高まった。

図 1
TLS-C末端における特異的な点変異はALSタイプ6の病因である



神経細胞の‘ mRNA-蛋白輸送複合体の構成タンパク質’でもある TLS は、アクチン依存性モーター蛋白ミオシン Va と会合するほか、微小管依存性の順行性モーター蛋白キネシン (吉村、藤井ら 2006) および逆行性微小管モーター蛋白ダイニンなどと会合して神経樹状突起内を移動する (藤井ら 2005)。私たちは、脊髄運動ニューロン由来の培養細胞においても TLS がこれらのモーター蛋白と会合し、さらに FALS にみられる TLS 点変異体をトランスフェクションして培養細胞に強制発現させた場合にも、点変異 TLS がこれらの輸送タンパクと会合することができることを確認している (未発表データ)。さらに、脊髄運動ニューロン由来の培養細胞においては、正常な TLS 蛋白を強制発現した場合も、点変異体 TLS と同様の細胞内凝集体が少なからず観察される。また、正常 TLS 蛋白を共発現させた場合にも、点変異体 TLS の凝集体形成がレスキューされることはない。さらに、RNA 結合領域 (285-526 アミノ酸残基) をコードする蛋白も、点変異体 TLS 発現による凝集体形成をレスキューすることはない。これらの知見は、TLS - RNA 会合体が細胞質内に貯留した場合に凝集体のコアとなることを示唆している。また、TLS 欠損マウスの胎児から調製した MEF (マウス胎児線維芽細胞) を用い、内在性 TLS の発現がしていない状態で正常 TLS や点変異体 TLS を強制発現させると、正常 TLS は内在性 TLS に特徴的な核内局在や細胞内動態を示すが、点変異体 TLS は顕著な細胞内凝集体を形成する。これらの結果を総

合すると、細胞質内に TLS 蛋白が過剰発現した場合や、あるいは核 - 細胞質間の TLS - RNA 複合体のシャットリングが阻害されるような場合に、神経変性を誘引する細胞内凝集体が形成されると考えられる。

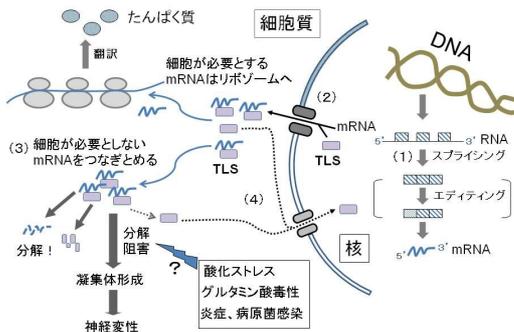
一方、私たちは各種の神経細胞株において“興奮性神経細胞のイオンチャネル型グルタミン酸レセプター-NMDAR を長期活性化させるとカルシウムイオン (Ca²⁺) 透過性の高い NMDAR を形成する NR1 サブユニットの alternative splice variant mRNA に TLS が結合し、その翻訳を抑制すること”、また“ TLS ノックアウトマウスの大脳皮質で高 Ca²⁺透過性を呈する NR1 スプライズバリエーションの転写およびタンパク発現量が上昇していることを見出した (Selamat ら 2009, Yamamoto ら 2013)。グルタミン酸は主要な興奮性神経伝達物質のひとつであるが、グルタミン酸受容体の過興奮によって細胞内 Ca²⁺濃度上昇が遷延化すると神経細胞死を誘導することが知られており、AMPA レセプターの発現調節異常が ALS を発症させることが広く認知されている。私たちが得たデータは、“ TLS が神経活動依存的に NR1 サブユニットの発現を制御することによって NMDA レセプターの Ca²⁺透過量を調節し、神経細胞の Ca²⁺恒常性を維持する”ことを支持するものであった。このような背景から、ALS の発症過程の1つとして『RNA 代謝異常を基盤とした脊髄運動ニューロン変性の分子機構』が存在することを証明することを目的として本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究は、TLS 蛋白の機能不全が誘引する“RNA 代謝異常による脊髄運動ニューロンの変性機構”を解明することを目的として実施した。特に、家族性筋萎縮性側索硬化症タイプ 6 (FALS タイプ 6) の患者で同定された点変異体 TLS 蛋白による“RNA の核 - 細胞質間輸送障害”と“神経変性を誘発する RNA スプライズバリエーションの発現と細胞内蓄積”が ALS の発症要因となる可能性を、分子生物学的手法、蛍光分子イメージングおよび TLS の機能的欠損マウスのオミックス解析により検証することにした。これらの結果をもとに、FALS タイプ 6 の治療標的となりうる RNA の代謝過程を同定することができるはずである。本研究は、TLS 蛋白の RNA 代謝における多機能に着目しつつ多角的アプローチによって FALS の発症機構を理解するものである。特に TLS と結合する標的 RNA の神経細胞内代謝異常が FALS を発症させるかどうかを検証するもので、ALS 研究の中でも、新規の ALS 発症分子機構の解明を目指したものと見える。また本研究は、「なぜ TLS の点変異体だけでなく、部分欠損変異体も ALS を発症させるのか」、「RNA 結合蛋白 TDP-43 の点変異による ALS 発症機序との差異は何か」という疑問を明らかにすることも視野に入れた研究である。さらに FALS タイプ 6

にみられる TLS 凝集体内の RNA/mRNA を特異的に結合して分解できるような RNA アプタマーを特定できれば、非常に有効な FALS タイプ 6 に対する薬剤治療法の確立につながるはずである。将来的には、FALS タイプ 6 の患者の iPS 細胞から分化させた運動ニューロンを「疾患特異的な invitro アッセイ系」として利用することにより効果的なアプタマー薬剤による治療法を開発することも可能となろう。本研究は、非常に困難な「遺伝性 ALS 治療のオーダメイド化」への橋渡しとなることを目指していた研究でもある。

図2 RNA代謝におけるTLSの機能



3. 研究の方法

本研究では、TLS 蛋白の機能不全を原因とする「RNA 代謝異常による脊髄運動ニューロンの神経変性機構」を解明する一端として以下の研究を実施した。特に、家族性筋萎縮性側索硬化症タイプ 6 (FALS タイプ 6) の患者で同定された点変異型 TLS 蛋白による「RNA の核 - 細胞質間輸送障害」と「神経変性を誘発する RNA スプライズバリエーションの発現と細胞内蓄積」が ALS の発症要因となる可能性を検証するために、分子生物学的手法、蛍光分子イメージング、および TLS の機能的欠損マウスの解析を行った。

(1) 点変異体 TLS 蛋白と TLS 蛋白会合体形成

GFP タグ点変異 TLS 蛋白 (R521G) を脊髄運動ニューロンモデル細胞株 NSC-34 細胞に強制発現させたのち、抗 GFP 抗体および抗 TLS 抗体によるプルダウンを行い、すでに藤井らが同定している TLS の結合パートナー蛋白質とともに会合体として共沈降するかどうかを各蛋白に対する特異的抗体を用いたウエスタンブロットで解析した。TLS/FUS の結合パートナーとして、他研究グループから、アルギニン残基のメチルトランスフェラーゼ PRMT1 が候補蛋白として報告されているが、藤井らのプロテオミクス解析では、TLS の凝集形成を抑制することで知られる Nucleolin やアルギニンメチルトランスフェラーゼ PRMT 8 など (藤井ら、2012) 会合体に含まれていた (藤井ら、2012)。Nucleolin も点変異体 TLS (R521G) と会合しており、免疫蛍光染色や各細胞画分のウエスタンブロットの結果からも細胞内分布には変化がみ

られず、点変異体 TLS 蛋白と結合パートナー蛋白との間で異常な細胞質内凝集が形成されることはなかった。また凝集形成を抑制する蛋白との会合が阻害されることもなかった。ただし、TLS の機能的欠損ノックアウトマウス脳から調製した正常 TLS が発現しない細胞では、TLS の結合パートナー蛋白の細胞内局在は変化し、核内蛋白 (例: Nucleolin, MeCP2) の核内移行が顕著に阻害されることが明らかとなった。

(2) 点変異体 TLS による TLS 特異的スプライズバリエーション mRNA の発現への影響

藤井らは興奮性神経細胞の NMDAR をピククリンの長期投与により恒常的に活性化させると、NR1 サブユニットのうち、最も高い Ca²⁺透過性をもつ NMDAR を形成する NR1 のスプライズバリエーション (NR1 C2') の mRNA に TLS が結合すること、また、TLS ノックアウトマウス的大脑皮質では高 Ca²⁺透過性を呈する NR1 スプライズバリエーションの発現量が有意に増加することを見出した (藤井ら、2009)。この結果は、TLS が神経の興奮性が上昇した場合に NR1 C2' mRNA を細胞質につなぎとめ (図 2)、特異的にその蛋白発現を制御することで神経細胞の Ca²⁺恒常性を維持していることを示唆している。FALS タイプ 6 の発症に際して、グルタミン酸毒性による Ca²⁺恒常性の破綻が起こることが考えられた。そこで、NSC-34 細胞に点変異体 TLS を発現させたのち、細胞質画分と核画分の蛋白-RNA 抽出液を各々用いて、抗 TLS 抗体 (N 末ペプチド抗原) による IP/RT-PCR (藤井ら、2005) を行い、既知のスプライズバリエーションの発現量と会合様式を解析し、TLS の機能的欠損ノックアウトマウスの脳で得られた iCLIP の結果 (Rogel ら、2012) と比較検討することにした。しかしながら、細胞質画分の点変異体 TLS 蛋白の免疫沈降物中に既知の RNA プライマーで検出できる TLS 結合 mRNA (例: アクチン結合蛋白、NR1 スプライズバリエーション) は認められなかった。mRNA 回収量の問題は否定できないものの、この結果は、TLS の点変異 (R521G) は正常 TLS や他の会合蛋白との結合は阻害しないが、特定の mRNA との結合や mRNA の正常な細胞質内輸送を阻害する可能性を示唆している。

(3) TLS のノックアウトマウスおよび脊髄運動ニューロン細胞を用いた RNA 解析

TLS ノックアウトマウスは、生後 16 時間以内に死亡するため、ヘテロマウスの交配で得た胎児脳から RNA 試料を調製した。TLS によるスプライズ調節が示唆されているグルタミン酸レセプターの mRNA について、スプライズバリエーションの発現変動を定量的 PCR によって解析した。抗体が入手できるスプライズバリエーション蛋白については、脊髄運動ニューロン由来細胞 NSC-34 を、高濃度 KCl (75mM ~ 90mM) やグルタミン酸、および NMDAR 阻害剤 D-AP5 で処理後の細胞から RNA ならびに蛋白を抽出して、定量的

RT-PCR を行い、既知のスプライスバリエーションの mRNA と蛋白の両方レベルにおける発現変動を比較した。脊髄運動ニューロン由来の NSC-34 細胞は、Ca²⁺透過性が高いグルタミン酸レセプター (NMDAR 1、GluR2) が発現しており、Ca²⁺流入による過興奮に対する感受性が高いことが予想された。

(4)L-セリン/D-セリンのアミノ酸定量解析

TLS の機能的欠損ノックアウトマウス脳および正常マウス脳で、NMDAR の活性化に必要な D-セリンの定常時のアミノ酸生成量を定量し、正常マウス脳と比較したところ、TLS ノックアウトマウス脳で D-セリン量が有意に増加していた。TLS ノックアウトマウスでは、L-セリン/D-セリン変換酵素であるセリンラセマーゼの発現量が mRNA と蛋白の両方のレベルにおいて上昇していた。しかし、D-セリンの代謝分解酵素であるデアミノオキシダーゼの発現には変動が見られなかった。ただし、胎児脳 (胎生 19.5 日) では、デアミノオキシダーゼの発現変動が起こらない可能性もある。一方、NSC-34 細胞に高濃度 D-セリン (500 μM) や高濃度 KCl (75mM) を投与するとセリンラセマーゼの発現量が抑制される。したがって、正常な TLS は、NMDAR を介して起こる異常な神経興奮に対しては Ca²⁺流入を抑制するように働くと考えられる。一方、TLS が機能的に欠損すると、D-セリン量が上昇し、加えて Ca²⁺透過性の高い NMDAR を介した過興奮が遷延化することになるため、脊髄運動ニューロンの変性が容易に誘導されると考えられる。

(5)脊髄運動ニューロン由来細胞の exosome 分泌

FALS タイプ 6 特異的な点変異体 TLS 蛋白は、核内移行できない。上述のとおり、TLS の会合蛋白との会合は正常に起こることから、RNA 結合領域の翻訳語修飾が阻害されることにより核内輸送が阻害されていることが考えられた。そこで、NSC-34 細胞に高濃度 KCl を投与した場合の正常 TLS の C 末のチロシンリン酸化の状態を調べた。NSC-34 細胞に過興奮を誘導した後、経時的に細胞内蛋白を回収し、抗リン酸化チロシン抗体と抗 TLS 抗体を用いて免疫沈降とウエスタンブロットを行い、並行して細胞免疫染色を行った。過興奮を誘導後 15 分から 30 分でチロシンリン酸化を受けた TLS 蛋白量が上昇し、核内で認められるチロシンリン酸化 TLS も経時的に増加した。したがって、正常な TLS で RNA を結合していない TLS は過興奮に伴い C 末のチロシンリン酸化を受けて核内へ移動することが、他方 mRNA 輸送を行うため細胞質へ移動した TLS はリボソームへ運ばれるか、またはニューロンの興奮状態によってそのまま細胞質内につながとめられる ("stall" される) と考えられた。正常な TLS のみが発現している場合には、"stall" された TLS-RNA 会合体も凝集体を形成することなく処理されていることから、次に TLS-RNA 会合体が exosome

を形成したのち細胞外へ放出される可能性を検討することにした。NSC-34 細胞に過興奮を誘導した後、経時的に細胞の培養上清を回収し、この中から exosome を抽出した。exosome の放出量は、過興奮誘導後 30 分から 60 分の間に定常時よりも上昇していた。また、exosome の総蛋白質についてウエスタンブロットを行った結果、exosome/lysosome マーカーの LAMP-1 と TLS (または TLS の N 末断片) が exosome 中に含まれることが確認された。しかし、同じく exosome マーカーとして知られる軸索蛋白 MAP1B は検出できなかった。脊髄運動ニューロンの exosome 放出には MAP1B は関与していないようである。exosome に含まれている RNA のプロファイルについては、現在、引き続き解析を進めている。

4. 研究成果

(1) FALS タイプ 6 特異的な TLS 点変異体発現による細胞内凝集体形成

TLS の RNA 結合領域に結合する蛋白質と FALS タイプ 6 に特異的な点変異体 TLS の会合体形成について検討した結果、点変異体 TLS 自体が凝集体を形成するコアになるのではなく、点変異によって核内へ移行できなくなった点変異体 TLS と正常 TLS が、TLS 蛋白-RNA 会合体へ取り込まれることによって異常な細胞内凝集体を形成することを示唆する結果が得られた。すなわち、FALS タイプ 6 では、TLS が RNA/mRNA と結合したまま翻訳が抑制されるような場合に細胞内凝集が誘導されるようである。実際、FALS6 に特異的な点変異には劣性と優性のものがあることが知られており、点変異体 TLS が発現したとしても TLS が RNA/mRNA をリボソームへ輸送し、正常な TLS の核内移行や RNA 代謝が行われる場合には神経変性が誘導されないことを支持する結果が得られた。

FALS タイプ 6 の発症段階で形成される TLS 会合体/凝集体に特異的に含まれる RNA のコンセンサス配列は明らかになっていないが、今後 FALS タイプ 6 にみられる TLS の細胞内凝集体に含まれる RNA のコンセンサス配列が同定できれば凝集体の特異的分解が可能で RNA アプタマーを利用した治療も可能となるだろう。

(2) TLS の機能的欠損による脊髄運動ニューロン変性

家族性 ALS の発症要因として、イオンチャネル型グルタミン酸レセプターの関与が広く知られている。中でも AMPA レセプター GluR2 は、脊髄運動ニューロンにおける発現量が高いことから、GluR2 の Ca²⁺透過性調節が異常を来すと興奮性神経細胞死が誘導されるとする説が受け入れられてきた。しかし、実際には ALS 患者における GluR2 の発現量の量的変化は顕著ではない。私たちは、興奮性神経細胞の NMDAR をピククリンの長期投与により恒常的に活性化させると、NR1 サブユニットのうち最も高い Ca²⁺透過性をもつ

NMDAR を形成する NR1 のスプライスバリエーション (NR1 C2') の mRNA に TLS が結合し細胞質に貯留されることや TLS ノックアウトマウスの大脳皮質では高 Ca²⁺透過性を呈する NR1 スプライスバリエーションの発現量が有意に増加することを見出している (藤井ら、2009)。この結果は、正常な機能を持つ TLS が、神経の興奮性が異常に持続した場合に NR1 C2' mRNA を細胞質につなぎとめ (図 2)、特異的にその蛋白発現を制御することで神経細胞の Ca²⁺恒常性を維持していることを示唆している。脊髄運動ニューロン由来細胞 NSC-34 では、Ca²⁺透過性が高いグルタミン酸レセプター (NMDAR 1、GluR2) が発現しており、脊髄運動ニューロンは、元来 Ca²⁺流入による過興奮等の影響への感受性が高い神経細胞といえる。また、NMDAR の活性化に必要な D-セリンの生成量が、TLS の機能欠損マウスの脳では有意に増加する。この理由は、セリンの光学異性体変換酵素であるセリンラセマーゼの発現量が TLS の機能欠損マウスで定常的に上昇していることによる。本研究期間では、TLS によるセリンラセマーゼ遺伝子の転写調節機構は明らかにすることは出来なかったが、脊髄運動ニューロンで TLS の正常な RNA 代謝機能が失われると、外的要因による細胞内ストレスにより (細胞外 D-セリン濃度上昇、グルタミン酸濃度上昇、細胞内 RNA/mRNA 貯留など)、興奮性神経細胞死を誘導しやすい状態となることが確認された。

本研究計画当初にあった FALS6 疾患モデルマウスの作製が諸事情により頓挫しているが、今後これらの知見の詳細な検証を疾患モデルマウスを用いて行いたい。

(3) TLS 特異的なチロシンリン酸化と RNA 代謝調節

FALS6 特異的な点変異は、TLS の C 末にある RNA 結合領域に比較的集中しており、複数のリン酸化コンセンサス部位があるため、当初よりこれらのリン酸化パターンにより細胞内凝集形成が影響されていることが予想された。今回、NSC-34 細胞を用いた実験から、正常な TLS は過興奮に伴い C 末のチロシンリン酸化を受けて核内へ移動することが明らかとなった。正常 TLS は、核内へ移行して転写制御に関わるほか、一時的に RNA/mRNA を細胞質内へつなぎとめた後、RNA/mRNA をリリースして核内へ戻ることがあると考えられる。また、正常な TLS は RNA/mRNA を結合しても細胞内凝集を起こすことはなく分解処理されているはずだが、点変異体 TLS を NSC-34 細胞に強制発現させ、細胞内凝集体を形成させてもコピキチン化やオートファジーの活性化は起こらない (藤井ら、未発表データ)。今回、TLS が脊髄運動ニューロンの過興奮時に起こる exosome の形成と放出に関与することが明らかになったことから、FALS6 が RNA 代謝異常を基盤とした脊髄運動ニューロン変性疾患である可能性が示されたといえる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

R. Fujii, Identification of novel responsible genes and therapeutic targets for ALS. *Journal of the Society for Food Nutrition* 32:2-6, 2013.

R. Araki, Y. Tsukimori and R. Fujii: High D-serine content by increased serine racemase activity in TLS/FUS knockout mice. *J. Neurochem* 134(S1):336, 2015

N. Shigematsu and R. Fujii: Neuronal depolarization induces tyrosine phosphorylation of TLS/FUS and translocation of TLS/FUS to the nucleus. *J. Neurochem* 134(S1):169, 2015

[学会発表] (計 2 件)

R. Araki, Y. Tsukimori and R. Fujii: High D-serine content by increased serine racemase activity in TLS/FUS knockout mice. 25th Meeting of the International Society of Neurochemistry, 23-27 August, 2015 (Cairns, Australia)

N. Shigematsu and R. Fujii: Neuronal depolarization induces tyrosine phosphorylation of TLS/FUS and translocation of TLS/FUS to the nucleus. 25th Meeting of the International Society of Neurochemistry, 23-27 August, 2015 (Cairns, Australia)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：
〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井律子 (Fujii, Ritsuko)

広島文教女子大学・人間科学部・教授

研究者番号：90342716

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：