

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461267

研究課題名(和文) FUS/TLSのメチル化による核-細胞質シャトリング制御と凝集体形成機序の解明

研究課題名(英文) Arginine methylation-mediated regulation on the nucleo-cytoplasmic shuttling and the aggregates of FUS/TLS

研究代表者

山口 淳 (Yamaguchi, Atsushi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00314336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：当該研究は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の発症機序解明のため、家族性ALS原因遺伝子FUS/TLSの機能解析を行った。FUS/TLSは通常は核内に局在するが、FUSのC端の核移行シグナル(NLS)に遺伝子変異を有するFUS/TLS変異体は細胞質に偏倚し凝集体を形成する。当該研究では、「メチル化によるFUS/TLSの核-細胞質シャトリングの制御機構」と、「FUS/TLSによる凝集体の形成機序と意義」の解明の2点を中心に解析を行った。その結果、アルギニンメチル化がFUS/TLSと核内輸送体との結合を制御することや、凝集体が他のRNA結合タンパク質を係留(sequester)することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：FUS/TLS (Fused in Sarcoma/Translocated in liposarcoma) encodes a multifunctional DNA/RNA binding protein with non-classical carboxy (C)-terminal nuclear localization signal (NLS). A variety of ALS-linked mutations are clustered in the C-terminal NLS, resulting in the cytoplasmic mislocalization and aggregation. We here examined effects of methylation on the cytoplasmic mislocalization and aggregates of FUS mutant in a cell culture system. We also examined the effects of FUS-derived aggregates on ALS-associated RNA binding proteins and RNA granules. Treatment with global methyltransferase inhibitor remarkably mitigated the cytoplasmic mislocalization and aggregation of FUS mutant. In addition, the aggregates of FUS C-terminal mutants sequestered hnRNP A1, hnRNP A2, and SMN1 as well as FUS wild type into the FUS mutant-derived spontaneous aggregates in the cytoplasm.

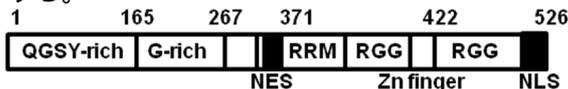
研究分野：神経生物学

キーワード：ALS

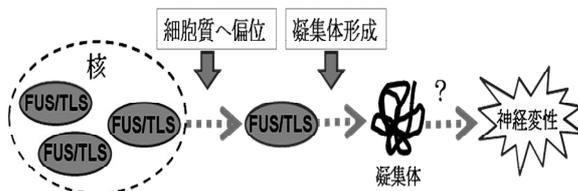
1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS; Amyotrophic lateral sclerosis) は、運動ニューロンが進行性に変性し、わずか3-5年で呼吸筋の麻痺へと進む重篤な神経変性疾患であり、発症機序の解明が切望される。2009年、家族性ALSの原因遺伝子として、多様な機能を有するDNA/RNA結合タンパク質であるFUS/TLS (Fused In Sarcoma/Translocated In Sarcoma) が報告された。FUS/TLSの遺伝子変異は、孤発性ALS患者にも報告され、FUS/TLSは孤発性ALS患者の運動ニューロンにも凝集体を形成する (Ann Neurol. 67(6):739-48)。従ってFUS/TLS異常による運動ニューロンの変性機序の解明は、孤発性ALSの発症機序の解明にも貢献する。

FUS/TLS野生型は、下図のようにRNA結合部位、C端に核移行シグナル(NLS)を有し、通常は核内に局在し核-細胞質をシャットリングする。



家族性ALS患者の遺伝子変異はC端のNLSに集中し、その変異体は細胞質に偏位し、細胞質に凝集体を形成することから、この細胞質の凝集体による神経変性への関与が示唆され、FUS変異体の細胞質への偏倚と、細胞質の凝集体による”Gain of toxic functions”の2段階の神経変性機序の仮説が考えられる。



2. 研究の目的

上述したように、FUS/TLS変異体による運動ニューロンの神経変性機序の解明には、通常は核内に局在するFUS/TLSが細胞質に偏位し、細胞質で凝集体を形成するメカニズムの解明が重要である。研究代表者は、2012年、メ

チル化酵素PRMT1(Protein Arginine Methyltransferase 1)によるFUS/TLSのメチル化が、FUS/TLSの核-細胞質のシャットリングを制御する事を報告した(Yamaguchi *et al.*, PLOS ONE, 2012, in press)。

当該研究では、これまでの研究結果を踏まえ、(1)メチル化によるFUS/TLSの核-細胞質シャットリングの制御機構、(2)FUS/TLSによる凝集体の形成機序と意義の2点を中心に研究解析を行う。

3. 研究の方法

(1) メチル化によるFUS/TLSの核-細胞質シャットリングの制御機構の解明

核-細胞質シャットリング制御に関するメチル化部位の同定

FUS/TLSのC端のNLSは、non-classical NLSに属し、Transportinが核輸送に関わる(EMBO J.2010 29(16):2841-57)。メチル化による核-細胞質シャットリングの制御機構のメカニズム仮説として、FUS/TLSの特定部位のメチル化により、FUS/TLSとTransportinとの相互作用が変化し、FUS/TLSの核内輸送障害が起きる可能性が考えられる。FUS/TLSには約20箇所のPRMT1によるメチル化コンセンサス部位(RGG or RXR)が存在する。TransportinとFUS/TLSの結合部位を同定し、核-細胞質シャットリング制御に関わるメチル化部位を同定する。

FUS/TLSのメチルによる核-細胞質シャットリング制御

Global methylation inhibitorであるadenosine dialdehyde (AdOx)処理により、FUS/TLSのメチル化を阻害し、FUS/TLS変異体の細胞質への偏倚および凝集体形成への影響を解析する。

(2) FUS/TLS変異体による凝集体の形成機序と意義の解明(FUS/TLSの凝集体を形成するストレスの同定と”Gain of toxic functions”の

解明)

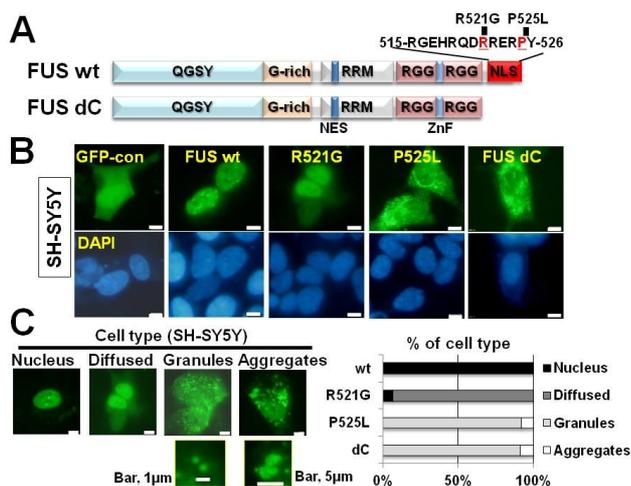
FUS/TLS の N 端の QGSY-rich domain、G-rich domain が細胞質での凝集体形成に関与する。QGSY-rich domain は、“Prion-like domain”であり、凝集体形成を起こし易い構造である(Cell 2012,149(4):768-79)。FUS/TLS の QGSY-rich domain の生理的意義は、ストレス状態においてストレス顆粒を形成し、RNA メタボリズムを制御する事と考えられ、「可逆的な凝集体」であるストレス顆粒が、何らかの要因で「病的な凝集体」へと変性する可能性が示唆される。当該研究では、凝集体形成を惹起するストレスの同定と、この「病的な凝集体」による”Gain of toxic functions”を解明する。

4. 研究成果

(1) FUS 変異体の形態学的解析

C 端 NLS に遺伝子変異を有する種々の FUS/TLS 変異体(FUS R521G, P525L, dC)を作成した。これらの FUS 変異体は、下図 A, B のように細胞質に偏倚した。

特に、FUS P525L は、下図 C のように、SH-SY5Y 細胞の細胞質に凝集体を形成した。Arsenite (ヒ素)のストレスで凝集体形成は顕著であったが、ストレス無しでも約 10%で、自然に凝集体形成が惹起されることを確認した。

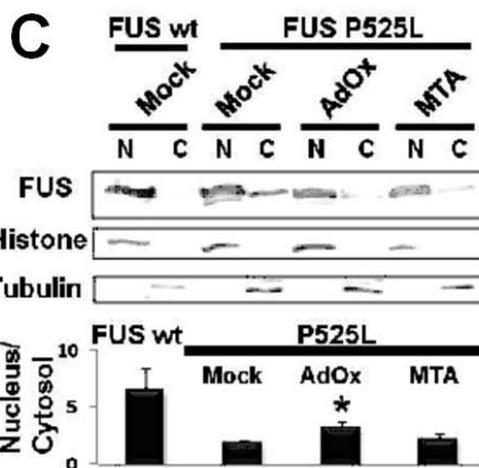
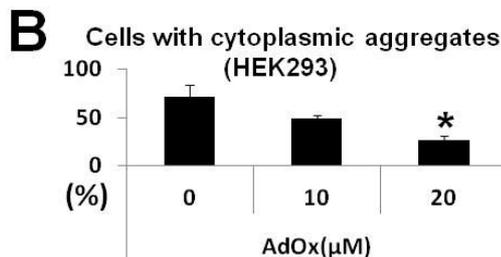
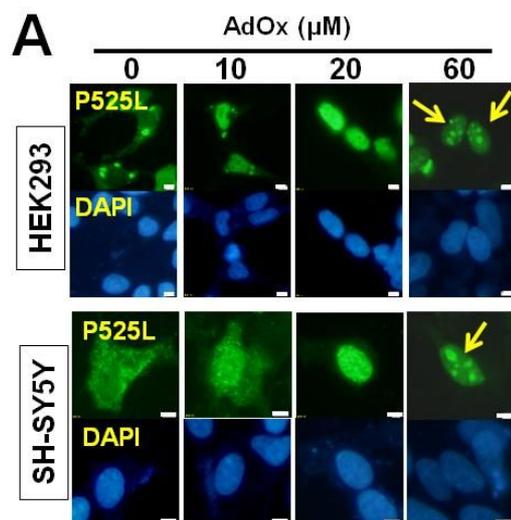


(2) メチル化阻害薬 AdOx 処理による FUS 変異体の細胞質偏倚と凝集体の改善

AdOx 処理により FUS P525L の細胞質の凝集体形成が形態的に改善した(下図 A, B)。AdOx

の至適濃度を検討したところ 20μM が毒性もなく効果も顕著に認められた。

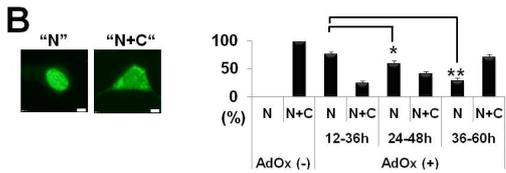
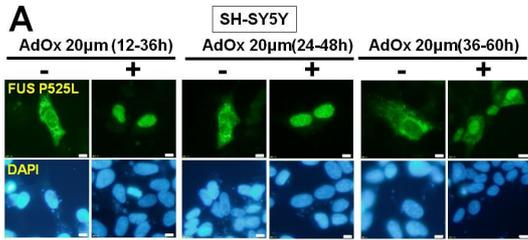
更に、AdOx 処理により FUS P525L の細胞質への偏倚の改善を認めた(下図 C)。



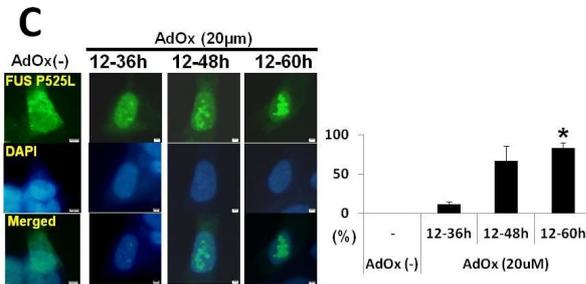
(3) メチル化阻害薬 AdOx の至適投与時間の検討

FUS P525L の細胞質偏倚と凝集体形成を評価基準として、メチル化阻害薬の至適投与時間の検討を行った。

その結果、下図 A, B に示すように、遺伝子導入後 12-24 時間後に AdOx20μM を投与することが最適であると考えられた。

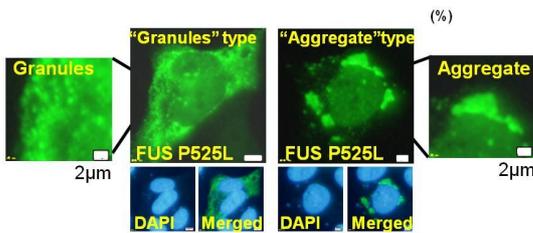


しかし、下図 C のように、24 時間以上の AdOx 投与は、核内凝集体の形成を惹起する結果を得た。

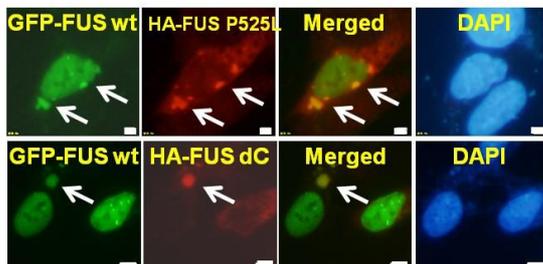


(4) FUS P525L の「病的凝集体」が他の RNA 結合たんぱく質に及ぼす影響

FUS P525L は前述したように、下図に示すように遺伝子導入後 48 時間後に約 10% に凝集体を形成する。

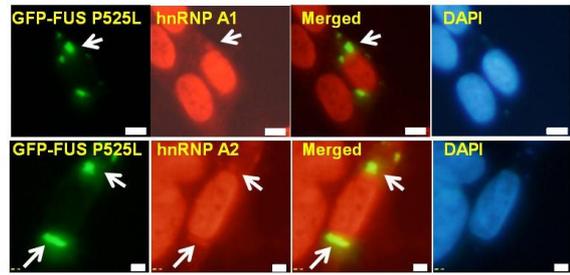


研究代表者は、下図に示すように、この凝集体が野生型 FUS を細胞質に係留 (Sequester) することを確認した。

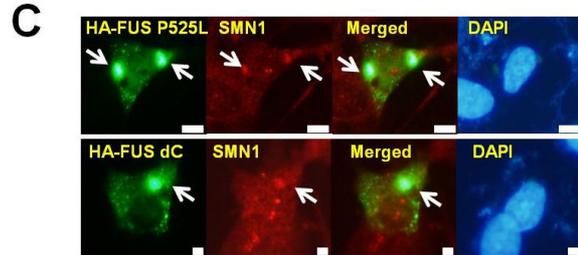
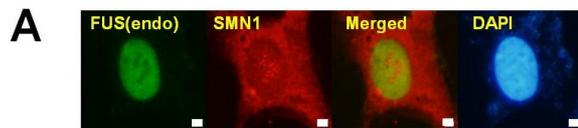


更に、他の家族性 ALS 原因遺伝子である RNA 結合たんぱく質 hnRNP A1, A2 を係留

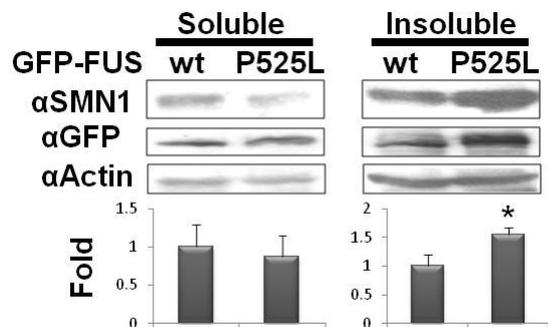
(Sequester) することを確認した(下図)。



更に、小児運動ニューロン病の原因遺伝子である SMN1 を係留 (Sequester) することを確認した(下図 A, B, C)。

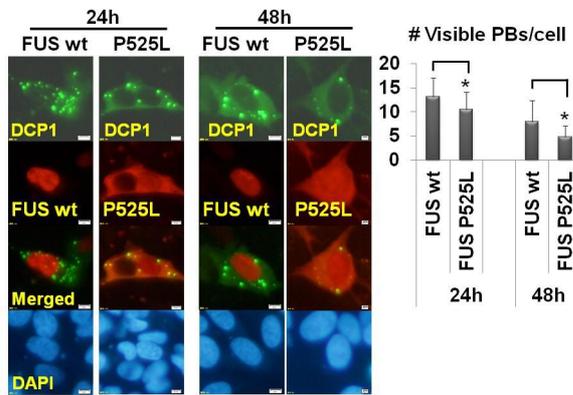


このとき、SMN1 は FUS P525L の強制発現により不要分画で増加することを確認した(下図)。



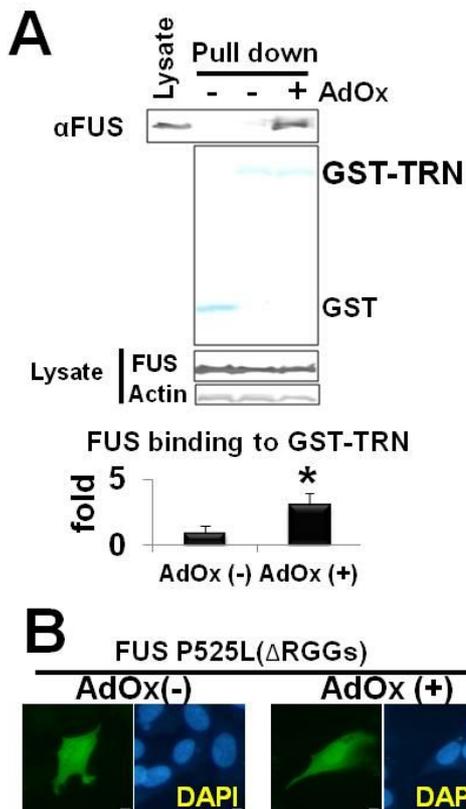
(5) FUS P525L の「病的凝集体」が RNA 顆粒に及ぼす影響

FUS P525L の凝集体が、RNA メタボリズムに重要な働きをする RNA 顆粒 (P bodies、Speckles) に及ぼす影響を解析した。下図のように、FUS P525L の凝集体により P bodies の形成が阻害されていることを確認した。



(6) FUS/TLS のアルギニンメチル化部位と核内輸送体 Transportin との関係

上述したように、FUS のアルギニンメチル化を阻害すると核内輸送が亢進する。その理由として、下図 A に示すようにメチル化阻害薬 AdOx により FUS と Transportin との結合が促進することを確認した。また、Transportin との結合に重要な部位として、FUS の RGG 部位を欠損した変異体では AdOx の効果が消失することから、メチル化コンセンサス部位である RGG が重要であることを確認した(下図 B)。



5 . 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 3 件)

Fujii S, Takanashi K, Kitajo K, Yamaguchi A. (2015) Treatment with a Global Methyltransferase Inhibitor Induces the Intracellular Aggregation of ALS-Linked FUS Mutant In Vitro. Neurochemical Research, 41(4), 826-835 査読有

Sakamoto M, Miyazaki Y, Kitajo K, Yamaguchi A. (2015) VGF, Which Is Induced Transcriptionally in Stroke Brain, Enhances Neurite Extension and Confers Protection Against Ischemia In Vitro. Transl Stroke Res. 6(4):301-308. 査読有

Takanashi K, Yamaguchi A. (2014) Aggregation of ALS-linked FUS mutant sequesters RNA binding proteins and impairs RNA granules formation. Biochem Biophys Res Commun. 452(3):600-607. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

山口 淳, 高梨 啓介, 北城 敬子 「メチル化阻害薬の家族性 ALS 関連 FUS/TLS 変異体の細胞内局在への影響」 Neuroscience 2014-第 37 回日本神経科学大会 2014 年 9 月 11 日パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

藤井早紀子, 高梨啓介, 坂本宗樹, 北城敬子, 山口淳 「家族性 ALS 関連遺伝子 FUS/TLS のアルギニン・メチル化の核-細胞質シャトリング機構への関与 The effect of arginine methylation on the nuclear-cytoplasmic shuttling of FUS/TLS」 Neuro2013, 2013 年 6 月 21 日 京都国際会館(京都府・京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

山口 淳（YAMAGUCHI, Atsushi）

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：00314336