

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461299

研究課題名(和文) 神経疾患関連RNA結合タンパク質FUS/TLSの機能欠損の影響

研究課題名(英文) Loss of function of FUS/TLS in normal and pathological conditions

研究代表者

紀 嘉浩 (Kino, Yoshihiro)

明治薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80415140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：FUS/TLSは神経変性疾患に関わるRNA結合タンパク質である。FUS/TLSの遺伝子変異は筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因となる。一方FUS/TLSタンパク質は前頭側頭型認知症の一部やハンチントン病で細胞内封入体に検出される。FUS/TLSの生体での役割を調べるためにFUS/TLS欠損マウスを作製したところ、一部の行動異常を示したが、ALS様の表現型は示さなかった。また、FUS/TLSヘテロ欠損マウスをハンチントン病(HD)モデルマウスと交配した結果、FUS/TLSのヘテロ欠損がHDの症状を促進することが分かった。以上より、FUS/TLS機能低下と神経疾患の関わり的一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：FUS/TLS is an RNA-binding protein associated with neurodegenerative diseases. Mutations of FUS/TLS are causative of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), while FUS/TLS protein is accumulated in the inclusion bodies of a subset of frontotemporal lobar degeneration and polyglutamine diseases. However, pathological roles of FUS/TLS in these diseases have been elusive. We made homozygous FUS/TLS knockout mice, which showed some behavioral alterations but did not manifest ALS-like phenotypes. We then crossed TLS heterozygous mice with Huntington's disease model mice and found that FUS/TLS heterozygosity worsened the HD phenotypes. In conclusion, our results indicate that loss of FUS/TLS function is not sufficient for causing ALS, while reduced function of FUS/TLS can modify the disease severity of HD.

研究分野：分子生物学

キーワード：FUS/TLS ALS FTD ノックアウトマウス 神経変性疾患 ポリグルタミン病 RNA結合タンパク質 ハンチントン病

1. 研究開始当初の背景

FUS/TLS は RNA/DNA 結合タンパク質であり、転写制御、スプライシング、mRNA 輸送など種々の RNA プロセシングに関与する。初代培養神経細胞においては、FUS/TLS の欠損が樹状突起形態の異常をもたらし、神経機能への関与が示唆されている(Fujii et al. 2005 Curr. Biol.)。また、申請者の所属研究室では、FUS/TLS がポリグルタミン病の封入体に蓄積することを発見した(Doi et al. 2008 J. Biol. Chem.)。ハンチントン病は原因タンパク質ハンチンチンに含まれるポリグルタミン領域の異常伸長変異を原因とする遺伝性疾患で、線条体および大脳皮質の萎縮と神経変性により、不随意運動、認知機能異常、情動異常を呈する。ハンチントン病の病変部位では変異型ハンチンチンを主成分とする核内封入体が確認される。この封入体に、FUS/TLS タンパク質の異常蓄積が見られる。

その後、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の一部の家族例(ALS6)で FUS/TLS 遺伝子の変異が同定され、大きな注目を集めている。ALS6 では、FUS/TLS タンパク質の細胞内封入体が見られる。また、前頭側頭葉変性症(FTLD)の一部では、FUS/TLS 自体の変異が無いにも関わらず、このタンパク質が封入体の構成要素として含まれる(FTLD-FUS)。さらに、FUS/TLS の相同遺伝子である EWS および TAF15 の変異も ALS で見つかっているが、一方でこれらのタンパク質の封入体への局在が FTLD の一部で見られる。このことは、FUS/TLS とそのファミリーの遺伝子が ALS/FTLD の病態に深く関わることを示している。

さらに最近、FUS/TLS の変異が家族性の本態性振戦(ET)の原因として同定された(Merner et al. 2012 Am J Hum Genet)。ET での変異は TLS の発現量低下をもたらす、主として局在変化をもたらす ALS での変異とは異なる特徴を示す。以上の背景において、FUS/TLS に関する本質的な疑問は次の通りである。

FUS/TLS の異常を伴う ALS、ET や FTLD は、このタンパク質の機能獲得によるものか、機能低下によるものか、あるいはその両者か？

生体内での FUS/TLS の標的 RNA・標的分子経路は何か？

FUS/TLS の病理学異常は、疾患においてどのような意義を持つのか？

これらの疑問に答える単純かつ不可欠な方法はノックアウトマウスの解析である。しかし、これまで2系統のノックアウトマウスが作製されたものの、作製ときに神経系での関心が薄かったこと、近交系での周産期致死性の問題があり、成体マウスの神経系の表現系は解析されず、研究開始当時も不明なままであった。

2. 研究の目的

上記の疑問に答えるため、本研究では FUS/TLS ノックアウト(TLS^{-/-})マウスを作製し、その解析により下記の点を明らかにする。

(1) TLS^{-/-}マウスが ALS、ET、もしくは FTLD 様の異常を示すか否かを明らかにする。

(2) TLS^{-/-}マウスおよび正常対照マウスの網羅的遺伝子発現解析を行い、FUS/TLS 欠損によって変動する遺伝子発現および RNA プロセシング(選択的スプライシングなど)を明らかにする。

(3) ポリグルタミン病を題材に、神経変性疾患における FUS/TLS の病理学的異常の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) TLS^{-/-}マウスの行動解析と病理学的解析

C57BL/6J の遺伝的背景では離乳期まで生存する TLS^{-/-}マウスは得られなかった。そこで、ICR マウスと交配し、非近交系での TLS^{-/-}マウスを作製した。このマウスは離乳期を越えて生存したため、行動実験に用いた。また、継続的に病理標本用、RNA 抽出用、生化学用にマウス組織のサンプリングを行った。病理学的解析では、ヘマトキシリン・エオジン染色など一般的染色法その他、神経細胞、グリア細胞、神経突起やシナプス関連タンパク質などのマーカータンパク質や、ユビキチン、FUS/TLS ファミリーや TDP-43、tau などの ALS・FTLD 関連タンパク質などの抗体染色を行った。

(2) TLS^{-/-}マウスの網羅的遺伝子発現解析

TLS^{-/-}マウスと対照マウスから抽出した RNA を用いて、Affymetrix 社の ExonArray によって遺伝子発現および RNA プロセシングの変化を網羅的に検出した。得られた結果を定量的リアルタイム PCR およびスプライシングアッセイで確認した。変化した遺伝子を多く含む分子経路を推定するため、遺伝子オントロジー解析などの情報学的解析を行った。

(3) ポリグルタミン病における FUS/TLS ヘテロ欠損の影響

2 つのポリグルタミン病、ハンチントン病(HD)と球脊髄性筋萎縮症(SBMA)のモデルマウスを TLS^{+/-}マウスと交配し、それぞれの疾患モデルマウスで FUS/TLS をヘテロ欠損させた個体を得た。これらのマウスの寿命や運動機能、遺伝子発現変化を TLS^{+/-}の疾患モデルマウスと比べ、FUS/TLS のヘテロ欠損の影響を調べた。

4. 研究成果

(1) FUS/TLS の生体における存在意義を明らかにするため、FUS/TLS を欠損したノックアウト (TLS^{-/-}) マウスを作製し、その表現型を解析した。TLS^{-/-}マウスは 2 年程度まで生存し、その間、ALS 様あるいは ET 様の症状や病理学的異常は見られなかった。即ち、FUS/TLS の機能欠損は ALS や ET の発症に十分ではないことがわかった。一方、行動解析の結果、TLS^{-/-}マウスの運動機能には異常が見られなかったが、活動性の亢進と不安様行動の低下が確認された。また、一部の週齢の TLS^{-/-}マウスでは、海馬で空胞状の構造が認められた。これらの結果は、FUS/TLS が正常な脳の発達または維持に必要であることを示唆している。また、FUS/TLS の機能低下が FTLD の病態に寄与している可能性も考えられる。

(2) TLS^{-/-}マウスの脳および脊髄から抽出した RNA を用いて、遺伝子発現状況をマイクロアレイによって網羅的に解析した。その結果、FUS/TLS 欠損による遺伝子発現量の変化とスプライシングなどの RNA プロセシングの変化の両者を検出できた。これらは FUS/TLS の標的遺伝子の候補である。特に、FUS/TLS のパラログである EWS, TAF15 の発現量が FUS/TLS の欠損により上昇しており、機能的な代償機構の存在が考えられる。ただし、TLS^{-/-}マウスで表現型の変化が見られたことから、TAF15 と EWS では FUS/TLS の欠損を完全には代償できないことが示唆された。

(3) FUS/TLS はポリグルタミン病の一つであるハンチントン病 (HD) の核内封入体中に集積する。FUS/TLS がポリグルタミン病の病態修飾因子として働くかを検討するために、FUS/TLS ヘテロ欠損マウスを HD および球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) のモデルマウスと交配し、遺伝学的影響を調べた。FUS/TLS のヘテロ欠損は、HD の症状を促進した一方で、SBMA には変化をもたらさなかった。HD マウス線条体および大脳皮質においては FUS/TLS がハンチンチンと共凝集することで、SDS-PAGE においてモノマーとして観察される FUS/TLS タンパク質が減少していた。一方、SBMA マウスの脊髄では FUS/TLS と変異型アンドロゲン受容体の共凝集はほとんど見られなかった。上記(2)のように、TLS^{-/-}マウスでは、EWS および TAF15 が発現上昇する。HD マウスおよび FUS/TLS ヘテロ欠損マウスでも EWS・TAF15 の増加は確認され、HD; TLS^{-/-}二重変異マウスにおいてはさらに増加が見られた。この結果は、HD マウスで FUS/TLS の機能が低下しており、FUS/TLS のヘテロ欠損がそれをさらに促進したことを反映したと考えられる。以上の結果は、タンパク質共凝集による FUS/TLS の機能低下が HD の病態の律速因子の一つであることを示唆する。

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 10 件)

1. Maheshwari M, Bhutani S, Das A, Mukherjee R, Sharma A, Kino Y, Nukina N, Jana NR.
Dexamethasone induces heat shock response and slows down disease progression in mouse and fly models of Huntington's disease.
Human Molecular Genetics, 23, 2737-2751 (2014) 査読有り doi: 10.1093/hmg/ddt667
2. Asada A, Yamazaki R, Kino Y, Saito T, Kimura T, Miyake M, Hasegawa M, Nukina N, Hisanaga S.
Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates and induces the degradation of ataxin-2.
Neuroscience Letters, 563:112-117 (2014) 査読有り doi: 10.1016/j.neulet.2014.01.046.
3. 紀 嘉浩、貫名 信行
FUS/TLS
医学のあゆみ 医学・医療のいまがわかる
キーワード 2014, 249, 438 (2014) 査読無し
4. Miyazaki H, Oyama F, Inoue R, Aosaki T, Abe T, Kiyonari H, Kino Y, Kurosawa M, Shimizu J, Ogiwara I, Yamakawa K, Koshimizu Y, Fujiyama F, Kaneko T, Shimizu H, Nagatomo K, Yamada K, Shimogori T, Hattori N, Miura M, Nukina N.
Singular localization of sodium channel $\beta 4$ subunit in unmyelinated fibers and its role in striatum.
Nature Communications, 5:5525 (2014) 査読有り doi: 10.1038/ncomms6525.
5. Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Oma Y, Hattori N, Ishiura S, Nukina N.
Nuclear localization of MBNL1: splicing-mediated autoregulation and repression of repeat-derived aberrant proteins.
Human Molecular Genetics. 24:740-756 (2015) 査読有り doi: 10.1093/hmg/ddu492.
6. Kurosawa M, Matsumoto G, Kino Y, Okuno M, Kurosawa-Yamada M, Washizu C, Taniguchi H, Nakaso K, Yanagawa T, Warabi E, Shimogori T, Sakurai T, Hattori N, Nukina N.
Depletion of p62 reduces nuclear inclusions and paradoxically ameliorates disease phenotypes in Huntington's model mice.

Human Molecular Genetics. 24:1092-1105 (2015) 査読有り doi: 10.1093/hmg/ddu522.

7. Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Yamada M, Miyazaki H, Akagi T, Hashikawa T, Doi H, Takumi T, Hicks GG, Hattori N, Shimogori T, Nukina N. FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathologica Communications, 3:24 (2015) 査読有り doi: 10.1186/s40478-015-0202-6.

8. Satoh J, Kino Y, Motohashi N, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Arai N, Nakamagoe K, Tamaoka A, Saito Y, Arima K. Immunohistochemical characterization of CD33 expression on microglia in Nasu-Hakola disease brains. Neuropathology, 35:529-537 (2015) 査読有り doi: 10.1111/neup.12222.

9. Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Yamada M, Doi H, Takumi T, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Geoffrey G. Hicks GG, Hattori N, Shimogori T, and Nukina N. FUS/TLS acts as an aggregation-dependent modifier of polyglutamine disease model mice. Scientific Reports, 6:35236 (2016) 査読有り doi: 10.1038/srep35236.

10. Satoh J, Kino Y, Asahina N, Takitani M, Miyoshi J, Ishida T, Saito Y. TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. Neuropathology, 36:39-49 (2016) 査読有り doi: 10.1111/neup.12235.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Kino Y, Nukina N. Aggregate-associated proteins as potential modifiers of polyglutamine diseases. Neuroscience2014 (第 37 回日本神経科学大会)、横浜、2014 年 9 月 11 日

2. Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Yamada M, Doi H, Takumi T, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Geoffrey G. Hicks GG, Hattori N, Shimogori T, and Nukina N. Genetic effects of FUS/TLS heterozygous deletion on polyglutamine disease model mice. 第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 12 月 2 日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

紀 嘉浩 (KINO, Yoshihiro)
明治薬科大学・薬学部・講師
研究者番号 : 80415140