

令和元年6月20日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07700

研究課題名(和文) FETタンパク質の翻訳後修飾によるマルチ機能制御に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the regulatory mechanism of the FET protein's multi-function by post-translational modifications

研究代表者

亀村 和生 (Kamemura, Kazuo)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号：00399437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： FETタンパク質(FUS, EWS, TAF15と呼ばれる相同性の高い3つのタンパク質の総称)は、多面的に遺伝子発現調節に関与する一群のタンパク質であるが、それらの機能や性質を調節する機構には不明な点が多い。本研究において、FETタンパク質のうちEWSのみが選択的にグリコシル化されており、しかもEWS分子の大半はグリコシル化分子種として存在することを明らかにした。そして、EWSはグリコシル化されることによって、他のFETタンパク質よりも分子安定性が高まっており、これによりストレス耐性を獲得している可能性を突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

三大神経変性疾患の1つに前頭側頭葉変性症(FTLD)がある。FTLDは、病状を呈する神経細胞において異常凝集体を形成するタンパク質の種類に応じてサブタイプに分類されており、その1つにFTLD-FUSがある。FTLD-FUSでは、EWS以外のFETタンパク質(FUSとTAF15)が異常封入体を形成することが報告されているが、FETタンパク質間で凝集特性に差異を生じる原因は不明であった。よって、本研究の成果は、FTLD-FUSの病因解明に資する新たな知見である。

研究成果の概要(英文)： The FET protein family includes fused in sarcoma (FUS), Ewing sarcoma protein (EWS), and TATA binding protein-associated factor 15 (TAF15). Of the FET protein family, FUS and TAF15 are consistently and EWS variably found in inclusion bodies in neurodegenerative diseases such as frontotemporal lobar degeneration associated with FUS. It is speculated that dysregulation of FET proteins at the post-translational level is involved in their cytoplasmic deposition. In this study, the glycosylation stoichiometry of the FET proteins was chemoenzymatically analyzed, and it was found that EWS, but not FUS and TAF15, is glycosylated with a high stoichiometry in the neural cell lines tested and in mouse brain. These results indicate that glycosylation imparts a physicochemical property on EWS that is distinct from that of the other FET proteins and may help to prevent EWS from forming uncontrolled aggregates and accumulating in pathological inclusion bodies in the neurodegenerative diseases.

研究分野：細胞生物学

キーワード：FETタンパク質 FUS EWS TAF15 前頭側頭葉変性症 翻訳後修飾 O-GlcNAc グリコシル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) FET タンパク質ファミリーは、図 1 に示すような相同性の高いドメイン構造を有している。N 末端側の low complexity (LC) ドメインは、RNA ポリメラーゼや転写因子などと結合する転写活性化領域であると考えられている。一方の C 末端側は RNA や DNA に結合する領域として働くと考えられている。個々の FET タンパク質に関するこれまでの知見を総括すると、FET タンパク質は、RNA ポリメラーゼ 転写複合体、スプライソソーム、リボ核タンパク質複合体、マイクロプロセッサー複合体、リボソーム、あるいは細胞質ストレス顆粒中に見出されている。よって、FET タンパク質は、転写、選択的スプライシング、mRNA 核外輸送、翻訳、ならびにマイクロ RNA 生合成等の遺伝子発現調節に関わる複数の機能的複合体の構成因子であり、マルチ機能を担うタンパク質ファミリーであると考えられる。しかしながら、どのようなメカニズムによって FET タンパク質が複数の機能的複合体の構成因子に成り得るかは不明であり、その解明は国際的に重要な生命科学研究課題であった。

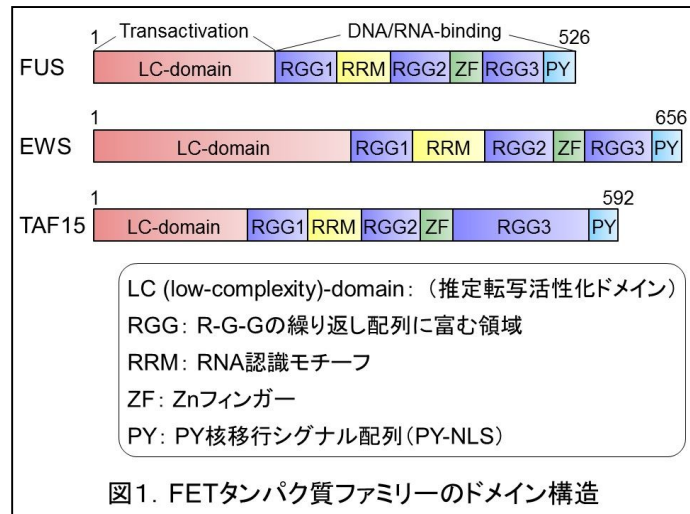


図1. FETタンパク質ファミリーのドメイン構造

(2) FET タンパク質は広範な組織で普遍的に発現しており、核および細胞質に分布する。図 1 に示したように FET タンパク質は C 末端に核移行シグナル配列 (PY-NLS) を有しており、これまでに細胞周期依存的、または熱ショックなどのストレス依存的に FET タンパク質の局在が変化する現象が捉えられているが、FET タンパク質の局在制御メカニズムは不明であった (引用文献)。FET タンパク質には Arg メチル化や Ser/Thr リン酸化等、複数の翻訳後修飾が起こることが報告されているものの、それら修飾の生理的働きについては殆ど解析されていなかった。研究代表者は、最近の研究において脂肪成熟分化に伴う EWS の細胞内動態と修飾の変動を解析し、分化依存的に EWS が核近傍に集積すること、そして、この核近傍への集積と相関して EWS に O-グリコシド型 N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) 修飾が起こることを見出していた (引用文献)。EWS の細胞内動態の変化は、それ以前とは異なる機能的複合体への移動を反映しているものと考えられるが、この点については推測の域を出ない。また、同様のことが FUS および TAF15 についても当てはまるかは不明であった。研究代表者はこれらの成果および学術的背景を踏まえて、翻訳後修飾の違いによって FET タンパク質と相互作用するパートナー分子 (タンパク質または核酸) が切り替わり、異なる機能的複合体の構成因子に変換されるという作業仮説を着想した (図 2)。図中、異なる修飾を仮の記号 A~F で示した。図はあくまでも単純化したものであり、複数の修飾の組合せが必要である可能性や、FUS, EWS, TAF15 の修飾に共通性はなく、個々に特有である可能性なども仮説の範疇である。

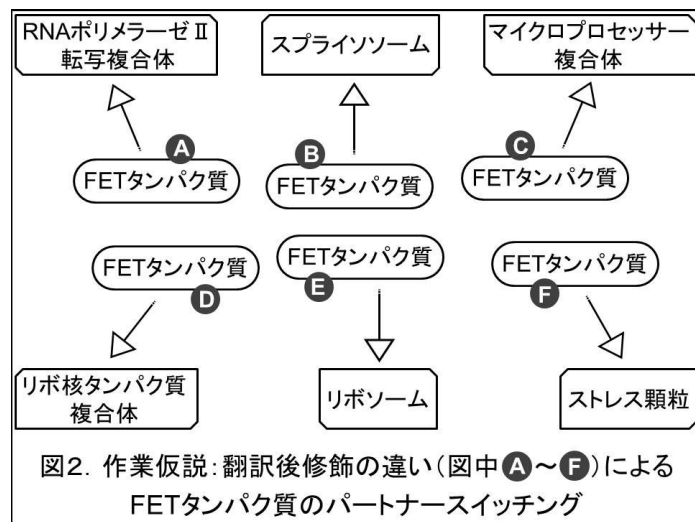


図2. 作業仮説: 翻訳後修飾の違い(図中 A~F)による FETタンパク質のパートナースイッチング

2. 研究の目的

本研究の目的は、FET タンパク質の生理機能スイッチングに關与する翻訳後修飾を同定することにより、そのマルチ機能制御メカニズムに迫ることである。これにより、核での転写やプロセシングから、細胞質での mRNA 代謝や翻訳に至るネットワークによって制御される遺伝子発現の全容解明への貢献が期待できる。本研究により、これまで不明であった FET タンパク質のパートナースイッチングの分子基盤とその生理意義を初めて示すことができる。FET タンパク質は、65 歳未満の初老期認知症者の約 20% を占める神経変性疾患である前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration, FTLD) において、病変した神経組織に細胞質封入体を形成していることから、FTLD を引き起こす病因タンパク質の一群であると考えられている。FET タンパク質が蓄積した細胞質封入体をもつ FTLD 患者において、FET タンパク質の遺伝子に変異

は生じていないので、FET タンパク質による封入体形成は翻訳後の何らかの異常に起因すると考えられている（引用文献）。故に、本研究の成果は、これまでにない観点から FTLD の原因究明に貢献できる可能性があり、今後ますます超高齢化する日本社会の重要課題である FTLD の原因究明と新しい予防・治療法開発のために有益であると考えられる。また、FUS, EWS はそれぞれ Fused in sarcoma, Ewing sarcoma に因んだ名称であり、TAF15 も含め、FET タンパク質は原がん遺伝子産物である。いずれも染色体相互転座により融合遺伝子産物を生じた場合、がん遺伝子産物として働くと考えられている。それ故、FET タンパク質由来のがん遺伝子産物が細胞がん化を引き起こすメカニズムの解明、ならびにその細胞がん化を抑制する方法の開発は重要課題である。FET タンパク質の翻訳後修飾に注目した本研究は、これまでにない着眼点から、この重要課題に資する新しい知見となる可能性も併せ持つ。

3. 研究の方法

翻訳後修飾によるFETタンパク質のマルチ機能制御メカニズムを解明するに当たり、まず各FETタンパク質に起こる修飾を同定することが最優先事項である。注目する修飾は、リン酸化、O-GlcNAc修飾、アセチル化およびメチル化である。3つのFETタンパク質に起こる修飾の比較解析を行い、その共通性あるいは特異性を精査する。これらの修飾の存否や増減変動を検出するための一段階目の検出プローブとして、各翻訳後修飾に特異的な抗体を用いる。そして、リン酸化についてはPhos-tag電気泳動、O-GlcNAc修飾についてはポリエチレングリコールタグ標識法を二段階目の解析手法とする。それらの解析結果を踏まえ、FETタンパク質が特定の細胞内分布を示すときに増減変動する修飾を同定するとともに、FETタンパク質の修飾状態に依存して特異的に相互作用するパートナー分子を同定する。これにより、FETタンパク質の生理機能スイッチングに關与する修飾の特性を精査し、FETタンパク質が特定の機能的複合体の構成因子に変換されるステップを制御する翻訳後修飾を同定する。

4. 研究成果

FETタンパク質ファミリーのうちでEWSについてはO-GlcNAc修飾されることが既に報告されていたので、まずEWSに注目し、マウス胚性腫瘍細胞株p19を用いて神経分化誘導に伴う神経細胞の出現に伴うO-GlcNAc修飾の増減変動を解析し、EWSのO-GlcNAc修飾（グリコシル化）分子種が増加することを見出した。EWS以外のFETタンパク質についてはグリコシル化に関する報告例はなかったため、FETタンパク質ファミリーに起こるグリコシル化分子種の化学量論を検討し、神経芽腫細胞株Neuro-2a, SH-SY5Y、およびグリア芽腫細胞株A172におけるEWSのグリコシル化は動的に制御されていること、CD1マウス脳抽出液におけるEWSの大半がグリコシル化分子種であることを見出した。また、非神経系の培養細胞株であるHeLa, HEK293T細胞においてもEWSの大半がグリコシル化分子種であった。一方、これら全ての解析において、FUSならびにTAF15のグリコシル化分子種は検出限界以下であった。これらの解析により、FETタンパク質ファミリーのうちでEWSのみが選択的にグリコシル化されており、1分子のEWSにつき2-3サイトのO-GlcNAc修飾を有するグリコシル化分子種が大半を占めることを明らかにした（図3）。なお、リン酸化、メチル化、アセチル化についても、それぞれの翻訳後修飾に特異的な抗体を用いて検出を試みたが、化学量論的に高い修飾は検出されず、また、FETタンパク質間で顕著な相違は認められなかった。それゆえ、以降はグリコシル化に特化して解析を進めた。

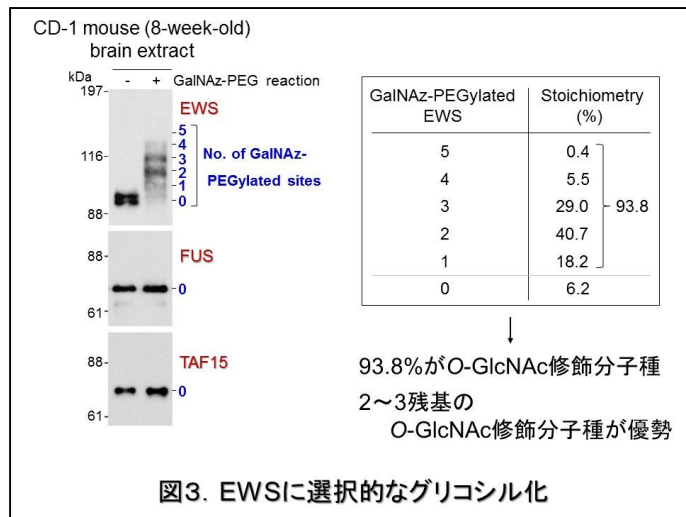


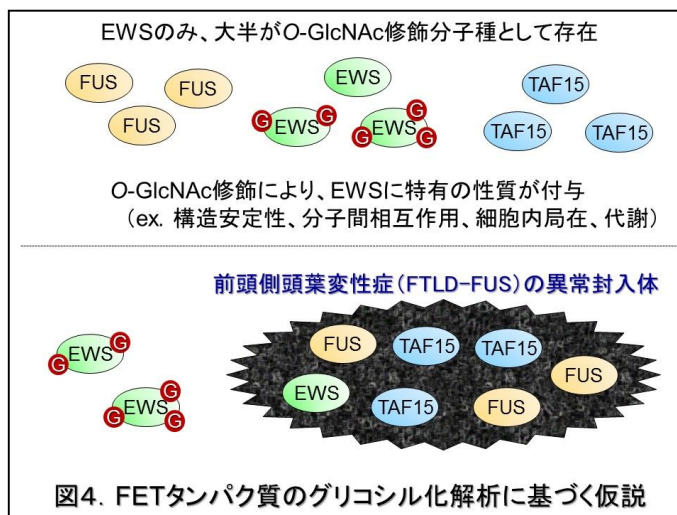
図3. EWSに選択的なグリコシル化

また、非神経系の培養細胞株であるHeLa, HEK293T細胞においてもEWSの大半がグリコシル化分子種であった。一方、これら全ての解析において、FUSならびにTAF15のグリコシル化分子種は検出限界以下であった。これらの解析により、FETタンパク質ファミリーのうちでEWSのみが選択的にグリコシル化されており、1分子のEWSにつき2-3サイトのO-GlcNAc修飾を有するグリコシル化分子種が大半を占めることを明らかにした（図3）。なお、リン酸化、メチル化、アセチル化についても、それぞれの翻訳後修飾に特異的な抗体を用いて検出を試みたが、化学量論的に高い修飾は検出されず、また、FETタンパク質間で顕著な相違は認められなかった。それゆえ、以降はグリコシル化に特化して解析を進めた。

FETタンパク質のうちでEWSに選択的なグリコシル化に注目し、EWSのグリコシル化サイト、あるいはモチーフを絞り込んだ。この際、野生型EWS、およびFUS、ならびにそれぞれの変異体を発現するコンストラクトを作成し、過剰発現系を用いてグリコシル化の有無を解析した。その結果、グリコシル化サイトはEWSのLCドメイン内にあることがわかった。そして、FETタンパク質のLCドメイン間のマルチプルアライメント解析から見出された、EWSのLCドメインに特有の領域を欠損する変異体を発現するコンストラクトを作成した。そして、同様に過剰発現系を用いたグリコシル化解析を行ったところ、EWSのLCドメインに特有の領域に主要なグリコシル化サイトが存在することが明らかになった。グリコシル化サイトを絞り込む際、他のタンパク質に関する既知のO-GlcNAc修飾サイト周辺配列をもとに、EWSのグリコシル化サイトを予測した。そして、予測したセリン、スレオニン残基をアラニン置換したEWS変異体を作成し、グリコシル化の有無を解析した。その結果、101, 106, 107, 108番目のスレオニン残基、および149番目のセリンをアラニン残基に置換した変異体EWSにおいては、野生型に比べ格段にグリコシル化分子種の割合が低下

した。よって、これらの残基には、FETタンパク質のうちでEWSに選択的なO-GlcNAc修飾が起こることを突き止めた。

前頭側頭葉変性症において、EWS 以外の FET タンパク質が異常封入体を形成する原因タンパク質になっていることが報告されている。そこで、前頭側頭葉変性症の病態解明に資するため、EWS のグリコシル化の解析と並行して、高浸透圧や高熱などの細胞ストレスに対する FET タンパク質の感受性を解析したところ、FUS と TAF15 は EWS よりもストレス感受性が高いことを見出した。このことから、EWS はグリコシル化されることによって、他の FET タンパク質よりも分子安定性が高まっており、これによりストレス耐性を獲得している可能性が示唆された。これを裏付けるため、EWS の LC ドメインに特有の領域を欠損する変異体のストレス感受性を解析したところ、ストレス耐性が有意に低下しており、グリコシル化は EWS にストレス耐性を付与している可能性が高いことを突き止めた(図 4)。



< 引用文献 >

- MK. Andersson, A. Stahlberg, Y. Arvidsson, A. Olofsson, H. Semb, et al. The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response. BMC Cell Biol. 9巻, 2008, 37
- K. Ishihara, I. Takahashi, Y. Tsuchiya, M. Hasegawa, and K. Kamemura. Characteristic increase in nucleocytoplasmic protein glycosylation by O-GlcNAc in 3T3-L1 adipocyte differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 398巻, 2010, 489-494
- Q. Li and K. Kamemura. Adipogenesis stimulates the nuclear localization of EWS with an increase in its O-GlcNAc glycosylation in 3T3-L1 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 450巻, 2014, 588-592
- M. Neumann, E. Bentmann, D. Dormann, A. Jawaid, M. Dejesus-Hernandez, et al. FET proteins TAF15 and EWS are selective markers that distinguish FTLD with FUS pathology from amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations. Brain 134巻, 2011, 2595-2609

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- K. Kamemura. O-GlcNAc glycosylation stoichiometry of the FET protein family: only EWS is glycosylated with a high stoichiometry. Biosci. Biotechnol. Biochem. 査読有、81巻、2017、pp. 541-546. <http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2016.1263148>
- K. Kamemura and H. Abe. The glycosylation stoichiometry of EWS species in neuronal cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. 査読有、81巻、2017、pp. 165-167. <http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2016.1230004>

[学会発表] (計 6 件)

- 亀村和生、角尾愛美、相和真里奈、福田真幸 . 神経変性疾患関連タンパク質のストレス応答性と O-GlcNAc 修飾 . 第 92 回日本生化学会大会 (横浜) 2019
- 亀山貴裕、中川海人、亀村和生、林誠、今村綾 . シロイヌナズナの脱分化およびシュート再分化過程における糖転移酵素 SEC の機能解析 . 第 60 回日本植物生理学会年会 (名古屋) 2019
- 大洲明奈、森田真希、塚本動斗、狩野竜一、濱口翔、水上民夫、亀村和生、和田修一 . カタユウレイボヤにおけるヒストン修飾因子の解析 . 第 41 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2018
- 福田真幸、亀村和生 . EWS のプリオン様ドメインに潜在する O-GlcNAc グリコシル化モチーフ . 第 64 回日本生化学会近畿支部例会 (大阪) 2017
- 亀村和生 . 神経系におけるグリコシル化 FET タンパク質分子種の化学量論的解析 . 第 89 回日本生化学会大会 (仙台) 2016
- 亀村和生 . グリコシル化 EWS の化学量論的解析 . 第 63 回日本生化学会近畿支部例会 (神戸) 2016