

令和 3 年 4 月 22 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07361

研究課題名(和文) FUSR495X変異体による結合RNAを介したALS発症分子機構の解明

研究課題名(英文) Identification of a pathological mechanism induced by FUSR495X, an ALS linked FUS mutant

研究代表者

中矢 正 (Nakaya, Tadashi)

国際医療福祉大学・福岡薬学部・講師

研究者番号：50374559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症の原因因子FUSによる疾患発症分子機構を明らかにすることを目的として、家族性変異の1つであるR495Xによる凝集体形成分子機構の解明を行った。FUS分子内の5つの機能領域をそれぞれ欠失したR495X体を用いて神経細胞における凝集体形成を検証したところ、Gly-rich、RGG1及びRGG2いずれもが凝集体形成に必要であり、且つ、これら3つの領域のメチル化量の増加依存的に凝集体量が増加することを見出した。これらのことから、FUSによる凝集体形成に上記領域のメチル化が関与することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋萎縮性側索硬化症の原因タンパク質の一部は、患者の神経細胞で異常な凝集体を形成することから、凝集体の形成機構が疾患発症と深く関わると考えられたが、その機構の詳細は不明であった。本研究では、原因因子の一つFUSにおいて、分子内のメチル化が凝集に必要であることを見出した。このことはFUSが原因となる神経疾患においてメチル化の阻害が治療標的となりうることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：FUS is one of causative factors of Amyotrophic lateral sclerosis (ALS). To gain insight into the molecular mechanism underlying its ability to form aggregates in neuron, an ALS associated FUS mutant, R495X, was employed and subject for analyses in this study. Focusing on five intramolecular protein domains in FUS, R495X deleted each domain with EGFP tag was prepared and expressed in mouse ES cell derived neurons. EGFP-R495X formed intracellular aggregates as expected, while deletion of any of Gly-rich, RGG1 or RGG2 showed no aggregates in neurons. Furthermore, facilitation of arginine methylation on EGFP-R495X significantly increased the number of cells with intracellular aggregates, while reduction of methylation significantly decreased them. These results indicate that methylation in the domains regulates the aggregate formation ability of FUS in neuron.

研究分野：神経科学

キーワード：ALS FUS R495X メチル化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (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、運動神経が選択的に障害を受ける重篤な疾患であり、急速に進行することが知られる。発症分子機構は未解明であり、根治的治療法は存在しない。発症危険因子の一つが高齢化であることから、高齢化社会において患者数の増大が懸念されている。

家族性 ALS 患者の遺伝子連鎖解析から明らかとされた、原因因子の一つ *FUS* 遺伝子は 526 アミノ酸からなる核内 RNA 結合タンパク質 *FUS* をコードする。*FUS* が原因となる家族性 ALS 患者及び一部の孤発性 ALS 患者の病理学的所見として、障害を受けた神経細胞内に *FUS* の凝集体を認める(Huang, *Brain Pathol* 2010 20:1069)。これらから、*FUS* の凝集体形成が疾患発症に寄与すると考えられている。実際に、ALS 原因変異を持つ多くの *FUS* 変異体は細胞質において凝集体を形成し易いことが明らかとなっている(Bäumer, *Neurology* 2010 75:611; Verbeeck, *Mol Neurodegener* 2012 7:53)。特に、495 番目のアルギニンが終止コドンに変異した R495X 変異体は細胞質において強い凝集塊を形成し易く(Bosco, *Hum Mol Genet* 2010 19:4160)、同変異を持つ患者は急速な疾患進行を示すことが知られている(Waibel, *Neurology* 2010 75:815)。近年、*FUS* が *in vitro* で liquid droplet と呼ばれる凝集体を形成する性質を持つことが明らかとなり、ALS 発症と深く関わると考えられている(Murakami, *Neuron* 2015 88:678; Patel, *Cell* 2015 162:1066)。しかしながら、細胞内での *FUS* 凝集体形成機構、並びに神経細胞死誘引分子機構は明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、FUSR495X による細胞内凝集体形成に関わる分子機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) R495X の凝集に関わる分子内領域の同定

FUS 分子内に存在する 5 つの機能領域をそれぞれ欠損した R495X 変異体を発現させるため、それぞれの欠損体をコードするレンチウイルス用プラスミドを作成した後、HEK293 細胞に形質導入し、レンチウイルスを含んだ培養上清を遠心により濃縮することで、同変異体発現用ウイルス溶液を調整した。マウス ES 細胞を常法により神経細胞に分化させた後、上記ウイルス溶液を感染させた。上記のウイルスはドキシサイクリン(DOX)誘導型の発現様式であったことから、ウイルス感染後に 1 µg/mL DOX を 4 日間作用させ、目的分子を神経細胞内に発現させた。発現タンパク質は EGFP との融合タンパク質であることから、蛍光顕微鏡下で発現タンパク質の動態を解析した。

(2) R495X のメチル化と凝集能の相関解明

R495X 及びその欠損変異体を上記のように発現させた神経細胞を用いて、メチル基転移酵素阻害剤である Adenosine dialdehyde(AdOx)を終濃度 100 nM で作用させ、メチル化を阻害した場合の凝集体形成を後述の通り検証した。また、タンパク質アルギニン N-メチルトランスフェラーゼ 1(PRMT1)及び PRMT8 をクローニングした後、発現用レンチウイルス溶液を上記のように作成し、細胞に感染させることで同タンパク質を R495X と共に発現させ、メチル化を促進した場合の凝集体形成を検証した。

(2)-①メチル化の生化学的解析

上記細胞を回収し、溶解後 SDS-PAGE により分離し、ウエスタンブロット法により生化学的解析を行った。メチル化されたタンパク質は ASYM24 抗体(メルクミリポア)を用いて検出した。

(2)-②凝集体形成の細胞生物学的解析

(1)で記載の通り、目的タンパク質発現細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。

(2)-③凝集体の生化学的解析

連続的な遠心によって、可溶性 *FUS* と凝集性 *FUS* に分離することが可能であること(Shelkownikova, et al. *Human Molecular Genetics*, 23, 5211-5226.) から、同法によって分

画した後、得られた各画分をウェスタンブロットにより検出することで凝集体形成を定量した。

4. 研究成果

(1) R495X の凝集体形成能は Gly-rich、RGG1 もしくは RGG2 の各領域に依存する。

本研究で用いたコンストラクトの模式図を図1に示す。これらをマウス ES 細胞由来神経細胞に発現させ、細胞内局在を蛍光顕微鏡下で観察したところ、R495X では細胞質に強い輝度を示す顆粒状の局在が観測され(図2、1段目)同様の局在は RRM の欠損体

(Δ RRM、図2、3段目)及び ZnF の欠損体 (Δ ZnF、図2、5段目)で認められた。しかし、Gly-rich、RGG1、RGG2 それぞれの欠損体(図2、2段目及び4段目に Δ Gly 及び Δ RRG1 の結果を示す。)では顆粒状の局在が全く検出されなかった。このことから、Gly-rich、RGG1、RGG2 それぞれが R495X の凝集体形成に必要であることが明らかとなった。

(2) Gly-rich、RGG1、RGG2 各領域の欠損体ではメチル化修飾量が減弱する。

Gly-rich、RGG1、RGG2 各領域にはメチル化修飾を受けるアルギニンが豊富に含まれることから、これら欠損体ではメチル化が減弱していることが考えられた。そこで、非対称ジメチルアルギニンを特異的に検出する ASYM24 抗体を用いて各コンストラクトのメチル化量を生化学的に解析した。その結果、いずれの欠損体でも R495X に比較して有意にメチル化量が減弱していることが分かった(図3)。

(3) R495X のメチル化が凝集体形成能を制御する。

上記(2)の結果から、メチル化量を人為的に増減させることで R495X の凝集体形成能を制御できることが示唆された。そこで、まず細胞全体のメチル化量を減少させるメチル基転移酵素阻害剤(AdOx)を作用させた場合の凝集体型性能を検証した。

(3)-①メチル化の阻害により凝集体形成能は減弱する。

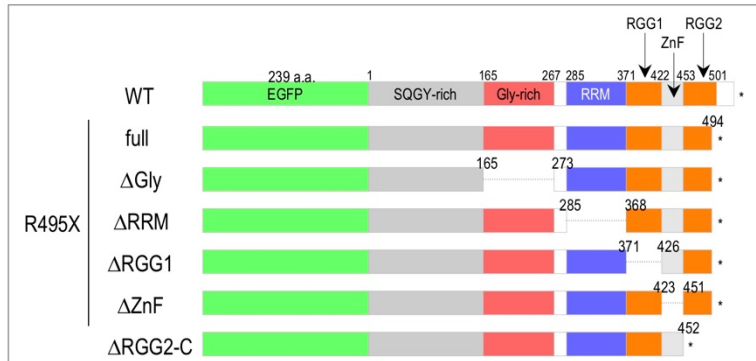


図1 本研究で用いたコンストラクトの模式図

N末端にEGFPを付加している。野生型(WT)、R495X(full)、Gly-rich、RRM、RGG1、ZnF、RGG2の各領域を欠損した(Δ で表記)、及びC末端のRGG2以降を欠損した Δ RGG2-CをそれぞれマウスES細胞由来神経細胞に発現させた。

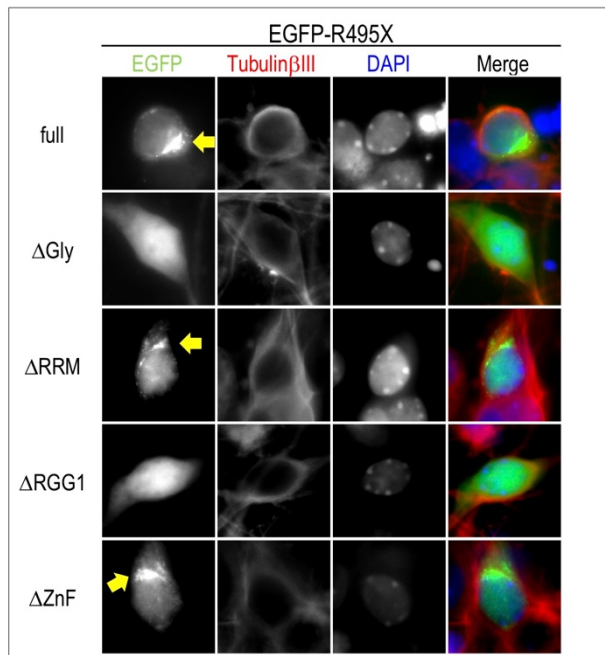


図2 各コンストラクト(抜粋)の細胞内局在

左に示す各コンストラクトの細胞内局在(緑)を検証した。細胞は培養後、固定し、抗tubulin β III抗体(赤)で染色した後、核をDAPPI(青)で染色した。右端は各色の合成図を示す。黄色矢印は細胞内の凝集体を示す。

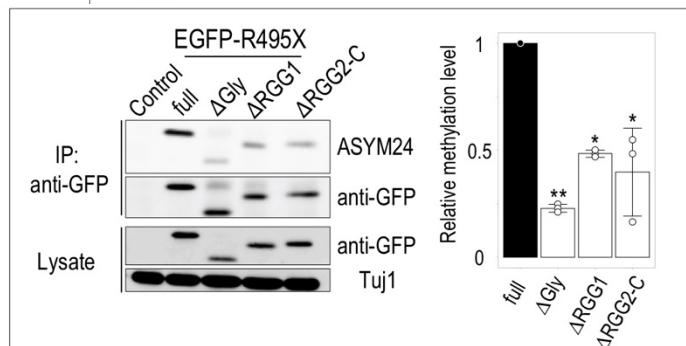


図3 各コンストラクトのメチル化の検証

左パネル：細胞溶解液を用いて抗GFP抗体で免疫沈降したものをASYM24抗体、抗GFP抗体で検出した。また、細胞溶解液については抗GFP抗体及びtubulin β III特異的抗体であるTuj1で検出した。右グラフ：左パネルを定量したもの。fullを1とした時の値を示している。n = 3。

EGFP-R495X を発現する神経細胞を AdOx 処理し、その凝集体形成を蛍光顕微鏡を用いて観測した。その結果、AdOx 処理によって凝集体を形成する細胞数が減少することが分かった (図 4)。

(3)-②メチル化の促進は凝集体形成を促進する。

次に、メチル化を促進するため、FLAG タグを付加した PRMT1 もしくは PRMT8 を EGFP-R495X と共発現させ、その局在を観測した。その結果、凝集体形成を示す細胞数は、R495X 単独発現に比較して、PRMT1、PRMT8 どちらかの共発現により有意に増加することが分かった (図 5)。Gly-rich 領域を欠損した R495X ではこのような凝集体形成の増加が認められなかったことから、少なくとも Gly-rich 領域のメチル化の増加が R495X の凝集体形成能を制御していることが分かった。

(4)まとめと考察

上記の結果から、R495X 体が細胞質において凝集体を形成する為には、Gly-rich、RGG1 もしくは RGG2 のアルギニンがメチル化修飾を受けることが必須であることが明らかとなった。これまでの報告にお

いて R495X の細胞毒性は分子内 RRM に依存していることを明らかとしている (Nakaya and Maragkakis, Sci Rep, 2018)。RRM 欠損体でも凝集体を形成したこと (図 2) から、凝集体の形成と細胞毒性は関連しないことが考えられた。

Gly-rich、RGG1 及び RGG2 いずれかの領域欠損体が全て凝集体形成能を喪失したことから、凝集体形成が単一の分子内領域によって担われているのではないことが示唆された。また、その分子機構として、以下の可能性が示唆された。①3つの領域全てが凝集体形成に関わる可能性：これらの内一つでも欠失すると、例えば凝集体形成に必要な結合因子等が結合できない、といった可能性。②凝集体形成に必要なアルギニンメチル化量が存在する可能性。3つの領域それぞれの欠損体では有意に全体のアルギニンメチル化量が減弱していた (図 3)。このことから、アルギニンメチル化の総量が凝集体形成に深く関わる可能性。今後これらの未解明な分子機構を明らかにすることによって、疾患発症分子機構の解明、及び疾患治療法の開発に結びつくことが期待される。

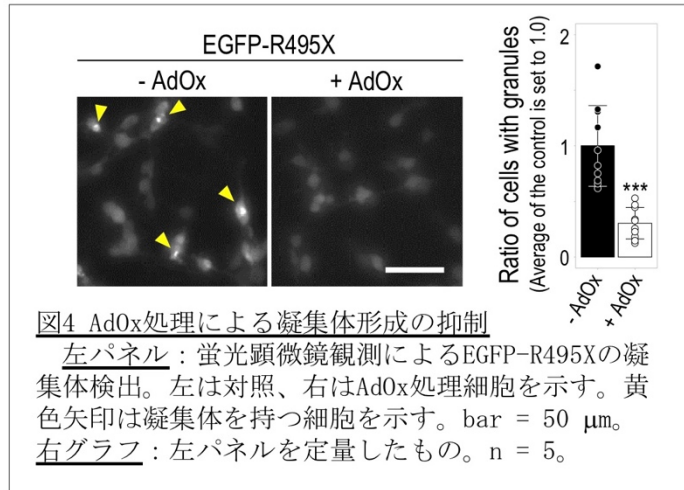


図4 AdOx処理による凝集体形成の抑制

左パネル：蛍光顕微鏡観測によるEGFP-R495Xの凝集体検出。左は対照、右はAdOx処理細胞を示す。黄色矢印は凝集体を持つ細胞を示す。bar = 50 μ m。右グラフ：左パネルを定量したもの。n = 5。

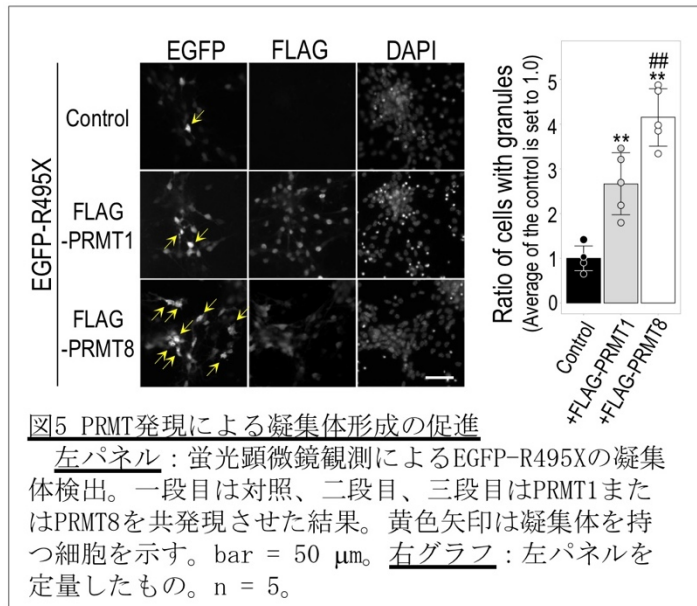


図5 PRMT発現による凝集体形成の促進

左パネル：蛍光顕微鏡観測によるEGFP-R495Xの凝集体検出。一段目は対照、二段目、三段目はPRMT1またはPRMT8を共発現させた結果。黄色矢印は凝集体を持つ細胞を示す。bar = 50 μ m。右グラフ：左パネルを定量したもの。n = 5。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawahara Daiki, Suzuki Toshiharu, Nakaya Tadashi	4. 巻 26
2. 論文標題 Cytoplasmic granule formation by FUS R495X is attributable to arginine methylation in all Gly rich, RGG1 and RGG2 domains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 190 ~ 197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12827	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 -

1. 著者名 Nakaya Tadashi	4. 巻 594
2. 論文標題 Dissection of FUS domains involved in regulation of SnRNP70 gene expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3518 ~ 3529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13924	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------