

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25年6月10日現在

機関番号：35407

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500335

研究課題名（和文） 家族性筋萎縮性側索硬化症タイプ6の発症分子機構

研究課題名（英文） Molecular Pathogenesis of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6

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

研究成果の概要（和文）：200字

家族性筋萎縮性側索硬化症タイプ6の患者のRNA結合タンパク質 TLS の遺伝子上には特異的な点変異が存在する。これらの点変異体は、正常 TLS とも凝集しやすく、また、TLS のノックアウト胎児脳ではいくつかの RNA のスプライシング阻害が起こる。今回 TLS 蛋白質の会合体のプロテオミクス解析や TLS ノックアウトマウス脳の iCLIP 解析の結果などから、TLS の機能欠損がミトコンドリアのストレス応答と RNA 代謝異常を誘導する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Recently, specific point mutations in C-terminus region of TLS have been identified as a cause of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS) type6. TLS with ALS-related point mutations are prone to aggregate and TLS-deficiency is correlated with defective RNA splicing of specific sets of RNAs. Our iCLIP analysis of TLS-deficient mouse brain and mass spectrometry analysis of TLS-protein complex have indicated that TLS-deficiency may induce mitochondrial stress responses and aberrant RNA metabolism in neurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：精神・神経疾患の病態と治療

## 1. 研究開始当初の背景

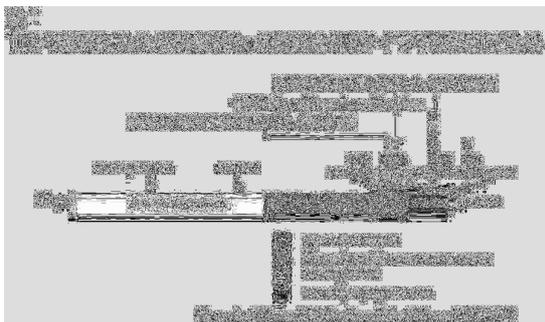
(1) 申請者は、これまで中枢系神経細胞における RNA 結合蛋白 TLS (Translocated in liposarcoma /FUS (以下 TLS) の機能解析を進めてきた (Fujii et al. Curr Biol 2005 他)。しかし TLS 遺伝子のノックアウトマウスは生後直後に死亡するため、TLS 欠損マウスの in vivo 表現型、お

よび TLS と神経疾患との関連については長らく不明のままであった。2009年2月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タイプ6”（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（図1）、FALS タイプ6の発症要因として、「軸索輸

送障害による不要タンパクの蓄積」や「グルタミン酸毒性」などが提唱されて久しい。しかし、未だにその実体は解明されていない。

(2) 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) と会合して神経樹状突起内を移動する (藤井ら 2005)。また TLS は逆行性微小管モーター蛋白であるダイニンとも会合する。申請者らは、脊髄運動ニューロン由来培養細胞株 (NSC-34 細胞) においても、TLS がこれらのモーター蛋白と会合すること、さらに FALS にみられる TLS 点変異体を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を確認している (藤井ら 未発表データ)。

本研究では、これまでに申請者が得た知見をもとに、TLS がこれまでに明らかとされた GGUG 結合コンセンサス配列の他に、どのような結合特異性をもって標的 RNA と結合するのかを明らかにし、FALS タイプ 6 の発症分子機序を検討することにした。



## 2. 研究の目的

RNA 結合タンパク TLS は、家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) タイプ 6 の原因遺伝子である。FALS は脊髄運動ニューロンに特異的な変性が起こる遺伝性の難病である。本研究は、TLS が関与する「RNA 代謝の異常」によって脊髄運動ニューロンの変性が誘発されるという新しい FALS 発症の分子機序モデルを検証するものである。TLS は、細胞内 mRNA 輸送、および RNA プロセッシングに関与しており、FALS タイプ 6 にみられる細胞内蛋白凝集体形成は、RNA 代謝と密接に結びついている。申請者は“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 (Ca<sup>2+</sup>) 透過性の高い NMDAR を形成する NR1 サブユニットのスプライスバリエント 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 Ca<sup>2+</sup>透過性を呈す

る NR1 スプライスバリエントの発現量が上昇すること”を見出しており (藤井ら、2012)、この結果は“TLS が神経活動依存的に NR1 スプライスバリエント mRNA の発現を制御することによって NMDAR からの Ca<sup>2+</sup>透過量を調節して神経細胞の Ca<sup>2+</sup>恒常性を維持している”ことを示唆している。したがって、FALS タイプ 6 では、TLS による RNA 代謝制御が異常をきたす場合に、TLS の凝集体が形成される可能性が高いといえる。

本研究では、FALS タイプ 6 に特異的に見られる TLS 点変異体の脊髄運動ニューロン細胞内局在と点変異体発現によるオートファジー機構の活性化の有無をまず明らかにし、さらに TLS の「RNA スプライシング調節機能」と「核-細胞質間 mRNA 輸送機能」に着目しつつ、TLS ノックアウトマウス脳の iCLIP 解析により、TLS の標的 RNA の詳細なプロファイルと結合コンセンサスを同定することにした。

## 3. 研究の方法

### (1) TLS 点変異体の作製

N 末を FLAG タグ、または GFP タグで標識した正常 TLS および、FALS タイプ 6 特異的な点変異体 (H517Q、R518K、R526G 等) の cDNA は、CMV プロモーターを有する動物細胞発現用ベクターを用いて作製した。

### (2) TLS 点変異体の細胞内局在

GFP 標識した正常 TLS および、FALS タイプ 6 特異的な点変異体 (H517Q、R518K、R526G 等) は、脊髄運動ニューロンモデル細胞 NSC-34 (マウス運動ニューロン様ハイブリッド細胞株) に、X-tremeGENE HP DNA トランスフェクション試薬 (Roche) を用いて、強制発現させた後、蛍光顕微鏡観察によりその細胞内局在を確認した。

### (3) ウェスタンブロットと免疫沈降

FLAG タグ標識 TLS 点変異体を発現させた NSC-34 細胞、および TLS ノックアウトマウスの脳は、RIPA バッファーで処理し、蛋白抽出液を調製した。蛋白抽出液は、抗 TLS モノクローナル抗体 (BD Sciences) 等を用いて、免疫沈降を行い、共沈降した蛋白質は SDS-PAGE サンプルバッファーで溶出した後、SDS-PAGE で展開した。なお、SDS-PAGE には 10-20% グラジエントゲルまたは、10% 均一ゲルを使用した。

機能的 TLS 欠損および正常マウス (8 週齢のヘテロ、またはノックアウト胎児) は、安楽死させたのち、全脳を剖出し、プロテアーゼ阻害剤を含む 50mM Tris-HCl (p

H7.6)/150mM NaCl 中で氷冷下ホモジナイズして遠心し (500g, 4°C, 10 分間)、核画分 (ポストミトコンドリア画分) と細胞質画分を分離した。上清 (細胞質画分) を新しいチューブにとり、終濃度が 1% となるよう TritonX-100 を加え、ホモジナイズしたあと、氷冷下で 30 分間蛋白を可溶化した後、遠心し (12000g, 4°C, 10 分間)、その上清を細胞質画分として用いた。核画分は、終濃度が 0.1% SDS、50mM KC1 となるように各濃縮溶液を加え、氷冷下で 30 分間置き、核内蛋白を溶出させた。得られた各画分から均一総蛋白質質量を取り、SDS-PAGE およびウエスタンブロット解析に使用した。

#### (4) TLS のユビキチン化

TLS 点変異体を発現させた NSC-34 細胞の蛋白抽出液を抗 TLS 抗体およびタグ抗体で免疫沈降した後、10-20% グラジエントゲルで展開して、ユビキチン化抗体 FK1 を用いてウエスタンブロットを行い、ユビキチン化を定量化し、検討した。

#### (5) オートファゴソームの活性化

TLS 点変異体を発現させた NSC-34 細胞の蛋白抽出液を抗 TLS 抗体およびタグ抗体で免疫沈降した後、オートファゴソーム蛋白である p62 の特異的抗体と同活性化マーカー LC3 の特異的抗体によるウエスタンブロットを行い、点変異体発現によるオートファゴソームの活性化について検討した。

#### (6) ショットガンプロテオミクス解析

FLAG タグ標識した TLS の点変異体領域を含む C 末変異体を NSC-34 細胞に強制発現し、Triton-可溶化蛋白質を抗 FLAG 抗体ビーズ (M2 affinity gel) を用いて pull-down した後、FLAG ペプチドで溶出した。溶出した蛋白を ナノフロー 2D-LC-MS/WS (Nozumi et al., PNAS 2009) により解析した。

#### (7) マウス脳からの RNA 抽出

機能的 TLS 欠損ヘテロマウス、ノックアウトマウス、および正常マウスは安楽死させた後、全脳を剖出し、セパゾール RNA I を用いて抽出した。DNase 処理済みの total RNA をテンプレートとして SuperScript II™ RT (Gibco) と Oligo (dT) で逆転写酵素反応を行い cDNA を調製した。得られた cDNA は、セミ定量的 RT-PCR による NR1 および NR2 のプライミングバリエーションの検出に使用した。

#### (8) TLS ノックアウトマウス脳の iCLIP

胎生 18 日の正常および TLS ノックアウトマウスの脳は、ホモジナイズ後 UV で crosslink し、ウサギ抗 FUS/TLS 抗体 (Novus

Biologicals, NB100-565) をコンジュゲートした Protein-A Dynabeads (Invitrogen) で iCLIP 免疫沈降し、RNA-蛋白質複合体を分子量別に分離した。共沈降させた RNA より iCLIPcDNA を調製し、これらのサンプルをハイスループット DNA シークエンシングにかけ、RNA-TLS 蛋白質複合体に含まれる RNA のプロファイルを得た。

## 4. 研究成果

### (1) 点変異体 TLS 蛋白と TLS 結合パートナーとの会合体形成の検討

NSC-34 細胞においては、正常な TLS 蛋白のコンストラクトを強制発現した場合、点変異体 TLS と同様の細胞内凝集体が観察され、また正常 TLS 蛋白を共発現させた場合でも、点変異体 TLS の凝集体形成がレスキューされることはなく、むしろ凝集体形成が増強された。今回の実験は、トランジェントな強制発現実験系ではあるものの、TLS 点変異体と正常 TLS の間でユビキチン化の顕著な差は観察されず、TLS 点変異体を過剰発現した細胞におけるオートファジーの活性化も検出されなかった (藤井ら 未発表データ)。一方、TLS ノックアウト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 の発現が無い状態で正常 TLS や点変異体 TLS を発現させた場合、正常 TLS は TLS に特徴的な核内局在や均一な細胞内分布を示すが、点変異体 TLS は顕著な細胞内凝集体を形成し細胞毒性を示した。このことは、機能的な TLS が発現せず、TLS 点変異体が過剰発現した場合に、細胞内凝集体を形成することを示唆している。実際、TLS の RNA 結合領域 (285-526 アミノ酸残基) のみで構成される C 末蛋白は、細胞質や神経樹状突起内で RNA を結合することができ、核へ移行しないにも拘わらず、FALS タイプ 6 に見られるような凝集体は形成しない (藤井ら、2005)。Gitler のグループが行った酵母による TLS 凝集体形成実験においても、TLS の RNA 結合領域自体は、凝集体を形成せず、細胞毒性を誘導しないことが報告されており (Sun et al., PLoSBiol, 2011)、今回の我々の結果とよく合致する。

### (2) TLS 会合体のプロテオミクス解析

ナノフロー 2D-LC-MS/WS を用いたプロテオミクスの結果より、細胞内タンパク異常凝集を起こしやすく、また FALS タイプ 6 の発症と相関性のある変異 TLS 蛋白 (R521G) に、特異的かつ選択的に会合している蛋白分子をいくつか同定することができた。TLS の RNA 結合領域は、TLS の凝集体形成を抑制することで知られる Nucleolin (Nup107) と会合する

(藤井ら、2012; 投稿準備中)。したがって、FALS タイプ6では、TLSによるRNA代謝制御が異常をきたす場合に、TLSの凝集体形成が促進されることは十分に考えられる。今回、RNAの核-細胞質シャトリングに関与する因子やRNAスプライシングに関与する因子などがTLSの標的たんぱく質として同定されたことは、FALS type6の発症段階初期において、RNA代謝異常やRNA輸送阻害に関与することを示唆しており、さらに詳細な検討を進めている。

### (3) TLS-RNA複合体のiCLIP解析

TLSノックアウトマウス脳のiCLIPにより、TLSに特異的に結合するRNAの詳細なプロファイルを得た(Rogeljら、2012)。TLSの特異的標的RNAには、ミトコンドリアの機能活性に関わるものもあり、TLSがストレス応答によるたんぱく質分解経路に関与している可能性が示唆された。ただし、今回のiCLIPのプロファイルには、申請者がPC12細胞と脳のRNA試料からTLS会合体の構成蛋白として同定したMeCP2で制御され、またNMDARを介するカルシウム流入の調節に関与すると考えられるNR1のRNAスプライシングバリエントは含まれていなかった。また、標的RNAのTLSとの結合コンセンサス配列については、GGUに強い親和性があるものの、特定の結合モチーフは同定できなかった。

## 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4件)

①R.Fujii, N. Nishimura and C. Yamamoto: Expression of NR1 and NR2 splice variants in TLS-deficient mice. *J. Neurochem.* 123 (S1):120, 2012.

② B. Rogelj, L.E. Easton, G.K. Bogu, L.W. Stanton, G. Rot, T. Curk, B. Zupan, Y. Sugimoto, M. Modic, N. Haberman, J. Tollervey, R.Fujii, T. Takumi, C.E. Shaw and J. Ule: Widespread binding of FUS along nascent RNA regulates alternative splicing in the brain. *Sci. Rep.* 2 doi:10.1038/srep00603, 2012.

③ R.Fujii and T. Takumi: RNA binding region of TLS interacts with nucleoporin. *J. Neurochem.* 123 (S1):60, 2012.

④R.Fujii: RNA binding protein TLS and neuronal disorders. *Journal of the Society for Food Nutrition* 27/28:2-5, 2010 (ISSN:0289-5137)

[学会発表] (計2件)

①R.Fujii, N. Nishimura and C. Yamamoto: Expression of NR1 and NR2 splice variants in TLS-deficient mice. 日本神経化学会 2012年

② R.Fujii and T. Takumi: RNA binding region of TLS interacts with nucleoporin. 日本神経化学会 2012年

[図書] (計1件)

①R.Fujii and T. Takumi:

Chapter 9 Animal Models of ALS. *Animal models for neurodegenerative disease*; p 177-213, 2011 (J. Avila, J.J. Lucas and F. Hernandez ed.) ISBN 978-1-84973-275-8

RSC Publishing, Cambridge, UK

[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  
特記なし

## 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: