

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860708

研究課題名(和文) TDP-43・FUSによる翻訳・シナプス機能調節異常とALS・FTLD病態機序

研究課題名(英文) Involvement of TDP-43 and FUS on translational and synaptic control and its relevance to ALS/FTLD

研究代表者

宇田川 剛 (Udagawa, Tsuyoshi)

東北大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20644199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患ALS/FTLDの原因遺伝子であるFUSおよびTDP-43の解析を行った。FUSノックダウン神経細胞はシナプス伝達の低下や成熟型シナプスの減少を示し、海馬特異的ノックダウンマウスは脱抑制、社会性行動といったFTLDに類似した異常を示した。一方、TDP-43ノックダウンマウスはシナプス可塑性の異常を示した。さらに、FUSはシナプス機能に重要なグルタミン酸受容体GluA1のmRNAを安定化させる働きを持つことを明らかにし、上記の行動異常がGluA1発現により改善されることが示された。

研究成果の概要(英文)：TDP-43 and FUS are RNA-binding proteins that are involved in neurodegenerative diseases, ALS/FTLD. We demonstrated that FUS knockdown neurons exhibited decreased number of mature synaptic spines and reduced synaptic transmission and that knockdown mice displayed disinhibition and social interaction deficits, reminiscent of FTLD symptoms. On the other hand, TDP-43 knockdown in the mouse hippocampus resulted in long-term memory deficits. Our results indicated that FUS controls the expression of GluA1, a subunit of one of the major glutamate receptors at synapses, by maintaining its mRNA stability. Moreover, behavioral abnormalities of FUS knockdown mice were ameliorated by exogenous expression of GluA1 subunit.

研究分野：分子神経科学

キーワード：ALS/FTLD シナプス RNA結合タンパク質 mRNA代謝

1. 研究開始当初の背景

RNA 結合タンパク質 FUS、及び TDP-43 は ALS (筋萎縮性側索硬化症)・FTLD (前頭側頭葉変性症)の原因遺伝子であるが、これらの因子の異常に起因する病態発症の分子機構は未だ十分明らかにされていない。一部の家族性 ALS/FTLD 患者では、核内 TDP-43 または FUS 量が減少し、細胞質において封入体が形成されることから、発症のメカニズムとしては細胞質における毒性の獲得、あるいは核内における機能喪失の二通りの経路がこれまで考えられてきた。しかしながら、TDP-43 や FUS が細胞質封入体を形成する分子機構や封入体形成が毒性を発揮するメカニズムは不明である。また、核内での機能解析から、TDP-43 や FUS が一群の mRNA のスプライシングを直接的或いは間接的に制御することが示されてきた。しかしながら、特定の mRNA のスプライシング異常を病態説明に直結させた例はなく、治療介入に至った例もない。また、ALS/FTLD の病態は一様ではなく、TDP-43・FUS の機能を介するより多様な治療標的の同定が望まれる。

2. 研究の目的

本研究では RNA 結合タンパク質 TDP-43・FUS による細胞質における翻訳調節の分子機構の解明と、これを介するシナプス機能への影響を調べ、ALS/FTLD の病態発現機序解明につなげることを目的とした。TDP-43 と FUS は ALS や FTD の発症に深く関与し、封入体の形成による毒性獲得、核内におけるスプライシング異常の観点から主に研究が行われてきた。一方、TDP-43 と FUS の神経細胞細胞質における機能の研究は立ち遅れている。本研究では TDP-43・FUS の細胞質における翻訳調節の分子機構やシナプス機能制御におけるこれらの RNA 結合タンパク質の機能を明らかにすることにより、神経変性の発症機構の解明につなげることを目的とした。また、FUS・TDP-43 ノックダウン神経細胞やマウス、ALS/FTLD 患者剖検サンプル等を用いてシナプス機能を介する治療介入のための新たな標的分子の同定を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TDP-43 と FUS の標的 mRNA 発現制御機構の解析

TDP-43、FUS ノックダウン神経細胞において制御されるシナプス関連因子の同定

TDP-43、及び FUS の複合体タンパク質の同定と相互作用の解析

標的 mRNA の転写後発現制御機構の解析

(2) シナプス機能における TDP-43 と FUS の影響

TDP-43 及び FUS のノックダウン海馬培養神経細胞における細胞形態やシナプス形態、密度の解析

TDP-43 及び FUS のノックダウン海馬培養

神経細胞及びマウスにおけるシナプス機能の電気生理学的解析。

(3) 患者剖検サンプルを用いたシナプス機能解析とレスキュー実験

ヒト剖検脳における FUS、TDP-43 標的遺伝子の発現解析。

同定された FUS、TDP-43 標的遺伝子を介したシナプス機能のレスキュー実験

4. 研究成果

本研究では FUS と TDP-43 に関して同様の解析を試み、以下のような知見を得た。

(1) FUS に制御されるシナプス因子の同定

FTLD に見られる情動、学習、社会性行動などの異常はシナプス機能の異常によって引き起される可能性が考えられる。そこで、シナプス伝達や可塑性に関わる既知のシナプス関連因子の発現を、コントロールと FUS ノックダウンの培養神経細胞を用いてウェスタンブロットにより解析した。その結果、FUS ノックダウンによりシナプス機能に重要な興奮性グルタミン酸受容体の一つである AMPA 受容体の GluA1 サブユニットの発現が特異的に著しく低下することが明らかになった。GluA1 サブユニットのノックアウトマウスは多動、脱抑制、社会性行動の異常、学習の障害など、FTLD 患者とも共通する行動異常を示すことがすでに報告されていることから、以下で FUS による GluA1 制御の詳細な分子機構の解析を行った。

(2) FUS による GluA1 発現制御機構

FUS ノックダウンにより GluA1 タンパク質レベルが低下することが明らかとなったので、さらに、FUS が遺伝子発現のどの段階で GluA1 を制御するのかを解析した。その結果、FUS は GluA1 mRNA に直接結合し、その安定性を正に制御することが明らかとなった。さらに、FUS を含むタンパク質複合体の解析から、FUS が mRNA の 3' 末端を制御する複数の因子と相互作用することが明らかとなり、FUS はそのうちの一つである PAN2 deadenylase との相互作用を介して、GluA1 mRNA の poly(A) 鎖の維持に関わることが示された。

FUS が mRNA の安定性を細胞質において制御するという知見はこれまで無く、本研究により、FUS は核内におけるスプライシングの制御だけでなく、細胞質においても標的 mRNA の発現に重要な役割を果たすことが明らかになった。

(3) FUS 機能喪失のシナプス機能への影響

FUS がシナプスの構造を制御することはすでに報告されていたが、本研究でも FUS ノックダウンにより成熟型シナプスの数が減少することが海馬特異的 FUS ノックダウンマウスの解析により示された。さらに、シナプス伝達効率の電気生理学的解析により、微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) の振幅が、ノッ

クダウン培養神経細胞および海馬スライスにおいて減少することが示され、FUS が正常なシナプス伝達の維持に必要とされることが明らかになった。

(4) GluA1 を標的としたレスキュー実験

FUS ノックダウンにより惹起される上記のようなシナプス機能異常は、既報の GluA1 ノックアウトマウスに認められる異常と非常によく類似している。そこで FUS は GluA1 の制御を介してこれらのシナプス機能を制御していると考え、ノックダウン神経細胞に見られる異常が、GluA1 の発現により改善されるか検証を行った。その結果、FUS ノックダウン神経細胞における成熟型シナプスの減少、mEPSC 振幅の減少が GluA1 の強制発現により実際にレスキューされることが示され、FUS による GluA1 発現制御が正常なシナプス機能の維持に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、ALS 患者剖検脳の解析から、現段階では例数が少なく今後の更なる解析が必要ではあるが、ALS 患者においても GluA1 タンパク質の発現が低下している可能性が示された。

以上の結果から、ALS/FTLD の発症において凝集体形成による FUS の機能喪失がシナプス機能異常を介した病態発現に関与する可能性が示唆された。

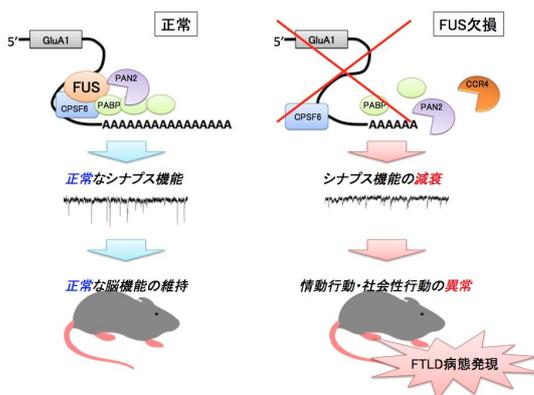


図 . FUS 欠損による FTLD 発症のモデル

(5) TDP-43 による標的制御機構

TDP-43 に関して上述の FUS の解析と同様に、ノックダウン培養神経細胞を用いたシナプス関連因子の発現解析を行った。その結果、TDP-43 がシナプス後部において Post-synaptic density(PSD)を構成する重要なタンパク質である PSD-95 を負に制御することが明らかになった。さらに、TDP-43 は PSD-95 をコードする mRNA に直接結合することが明らかとなった。しかしながら、TDP-43 ノックダウンによる PSD-95 mRNA の安定性への影響は限定的とあることが示唆され、その詳細な制御機構の解明は今後の課題である。

(6) TDP-43 によるシナプス機能制御

TDP-43 ノックダウンマウスの海馬スライスを用いた電気生理学的解析により、TDP-43

はシナプス可塑性の一つであるシタバースト刺激誘導の長期増強の維持に必要とされることが明らかとなった。一方、PSD-95 の発現増加は LTP を亢進することが報告されており、TDP-43 のノックダウンによる PSD-95 の発現増加により長期増強の阻害を説明することは難しいと思われる。おそらく、TDP-43 により制御されるシナプス可塑性に関わる重要な因子が他にも存在すると思われる。

シナプスにおける特異的 mRNA の翻訳制御はシナプス可塑性や学習と記憶に非常に重要であり、TDP-43 が長期増強の制御に関わることは非常に興味深い。TDP-43 は翻訳制御にも関わることが報告されており、また本研究では、TDP-43 が核内だけでなく、細胞質画分や生化学的に調製したシナプス画分においても検出されることが明らかになった。したがって、TDP-43 が核からシナプスに特定の mRNA を輸送し、シナプスにおける局所的翻訳制御に関わる可能性も考えられる。その詳細な分子機能の解明には今後の更なる解析が必要である。

一方、これまでの報告では ALS/FTLD 患者において長期記憶は比較的正常に保たれるとされており、TDP-43 欠失によるシナプス可塑性の異常が実際にどの程度 ALS/FTLD の病態に関わっているのかは現時点では不明であり、臨床レベルでの病態のより詳細な解析が期待される。

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 3 件)

DOI:10.1016/j.fob.2013.11.001 宇田川剛、FUS の最近の話題、最新医学 3 月増刊号 特集 認知症、2016、71 巻、538-541、査読無

Udagawa T, Fujioka Y, Tanaka M, Honda D, Yokoi S, Riku Y, Ibi D, Nagai T, Yamada K, Watanabe H, Katsuno M, Inada T, Ohno K, Sokabe M, Okado H, Ishigaki S, Sobue G. (2015) FUS regulates AMPA receptor function and FTLD/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization. Nat. Commun. 13(6) 7098 査読有
DOI:10.1038/ncomms8098

Honda D, Ishigaki S, Iguchi Y, Fujioka Y, Udagawa T, Masuda A, Ohno K, Katsuno M, Sobue G. (2014) The ALS/FTLD-related RNA-binding proteins TDP-43 and FUS have common downstream RNA targets in cortical neurons. FEBS Open Bio. 20;4:1-10 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

宇田川剛、FUS は GluR1 mRNA の安定化の調節を介してシナプス機能及びALS/FTLD 様行動を制御する、第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会合同大会(招待講演)、2015 年 12 月 1 日～2015 年 12 月 4 日、神戸国際会議場(神戸市)

Tsuyoshi Udagawa, Yusuke Fujioka, Motoki Tanaka, Daiyu Honda, Satoshi Yokoi, Taku Nagai, Kiyofumi Yamada, Masahisa Katsuno, Masahiro Sokabe, Haruo Okado, Shinsuke Ishigaki, Gen Sobue, FUS regulates AMPA receptor function and ALS/FTLD-associated behaviors via GluR1 mRNA stabilization.、CSHL meeting 'Translational Control'、2014 年 9 月 2 日～2014 年 9 月 6 日、Cold Spring Harbor (米国)

宇田川剛、藤岡祐介、田中基樹、本田大祐、横井聡、衣斐大祐、永井拓、山田清文、勝野雅央、曾我部正博、岡戸晴生、石垣診佑、祖父江元、FUS は GluR1 mRNA の安定化を介して AMPA 受容体機能、及びALS/FTLD 関連行動を制御する、第 16 回日本 RNA 学会年会、2014 年 7 月 23 日～2014 年 7 月 25 日、ウインクあいち(名古屋市)

Tsuyoshi Udagawa, Yusuke Fujioka, Daiyu Honda, Daisuke Ibi, Taku Nagai, Satoshi Yokoi, Masahisa Katsuno, Haruo Okado, Shinsuke Ishigaki, Gen Sobue, FUS depletion in adult causes behavioral abnormalities that mimic FTLD through post-transcriptional regulation of synaptic protein expression.、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日～2013 年 12 月 6 日、神戸ポートアイランド(神戸市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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
<http://www.protein-dementia.jp/blog/2015/07/17/post-296/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇田川 剛 (Udagawa, Tsuyoshi)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：20644199

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：