

平成 30 年 4 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07918

研究課題名(和文)大規模シーケンシングを用いたALS原因因子FUSによる疾患発症機構の解明

研究課題名(英文) Identification of ALS linked FUS mutant induced pathological mechanism by genome-wide gene expression analyses

研究代表者

中矢 正 (NAKAYA, Tadashi)

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：50374559

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)：筋萎縮性側索硬化症の原因因子FUSによる疾患発症機構解明の為、家族性変異R495X体の機能を探索した。マウスES細胞由来神経細胞にR495X及び野生型を発現させた後、結合RNA及び、発現RNAの転写量、翻訳量を網羅的に解析する、CLIP-seq、RNA-seq、Ribo-seqを行い、R495X特異的な機能を探索した。その結果、R495Xは細胞質内のmRNAに非特異的に結合し、ミトコンドリア機能に寄与する遺伝子の翻訳を変化させ、ミトコンドリアの縮小化及び、細胞死を誘発することが分かった。これらのことから、R495Xはミトコンドリアを標的とした疾患発症分子機構に寄与していることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：FUS has been identified as one of causative factors of Amyotrophic lateral sclerosis, however, its pathogenic mechanism is still unclear. To uncover it, I focused on R495X, a familial mutant of FUS, and tried to identify its targets using CLIP-seq and its effects on transcriptome and translome by RNA-seq and Ribo-seq in genome-wide. I identified that R495X preferentially bound to mRNA in the cytoplasm by CLIP-seq. RNA-seq revealed that R495X had a moderate effect on RNA expression. By Ribo-seq, I found that R495X significantly altered the translation of genes related to mitochondria functions resulted in shortening of mitochondria and neurotoxicity. Importantly, a mutant of R495X, R495X4FL, which reduced an RNA binding ability, partially abrogated the phenotypes of R495X. These results indicate that R495X primarily impairs mitochondria by binding to mRNAs related to its functions. Moreover, my results highlight the importance of its RNA binding property of FUS on neurotoxicity.

研究分野：神経科学

キーワード：FUS R495X ALS RNA-seq CLIP-seq Ribo-seq

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は進行性の神経変性疾患であり、主に運動神経が選択的に障害を受ける。高齢化社会において、患者数の増大が懸念されている疾患である。家族性 ALS 患者の遺伝子連鎖解析等から、ALS の原因となる様々な遺伝子変異が見出されてきた。特に、その半数近くが RNA の機能・代謝に深く関与することが知られるタンパク質をコードする遺伝子であったことから、RNA 機能の異常が疾患発症に結びつくと考えられてきた。しかしながら、その発症分子機構は全く明らかではなかった。

私はこれまでに ALS 原因因子である RNA 結合タンパク質 FUS に着目し、その生理機能及び疾患発症に関わる機能の研究を続けてきた。FUS を原因とする ALS 患者の神経細胞では、通常核内に存在する FUS が、細胞質において凝集体を形成していることが明らかとなっていた。このことから、核内の FUS の機能の減弱が疾患発症に結びつくと考えられた。しかしながら、当時 FUS の生理機能は明らかではなかったことから、その解明の為、HITS-CLIP (high throughput sequencing of RNA isolated by UV crosslink and immunoprecipitation) 法及び、FUS を siRNA によりノックダウンしたマウス ES 細胞由来神経細胞を用いた RNA-seq 法による網羅的遺伝子発現解析を行った結果、FUS は、種間で保存されたイントロンに強く結合すること、その発現を制御しうることを明らかとした。しかしながら、FUS のノックダウンでは神経細胞死に結びつくような表現型が認められなかった。一方、それまでの報告において、FUS 野生型の過発現と FUS 変異体過発現で引き起こされる遺伝子発現変化が似ていること、FUS 変異体の表現型は FUS 野生型の発現ではレスキューできないこと等から、変異型 FUS が細胞質において機能を獲得する gain-of-function が疾患発症に結びつく

考えられた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、強い表現型を引き起こすことが知られる家族性 ALS 変異体 R495X に着目し、HITS-CLIP (CLIP-seq)、RNA-seq 及び、タンパク質合成レベルを網羅的に解析する Ribosome profiling (Ribo-seq) 法を用いて、その機能と疾患発症への寄与について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) R495X 発現神経細胞の作成

マウス ES 細胞由来神経細胞に FLAG タグを付加した FUS 野生型 (FLAG-WT) 及び R495X 変異体 (FLAG-R495X) をレンチウイルスにより発現させ、培養 5 日後、細胞を回収した。

### (2) シーケンスライブラリの作成

①CLIP-seq: 細胞を UV 照射することにより RNA 結合タンパク質と結合 RNA を crosslink し、細胞を可溶化、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った後、放射標識した RNA リンカーを結合 RNA の 3'側に ligation した。これを SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜に転写、X 線フィルムに感光、得られたシグナル部位を切り出し、タンパク質を分解して、RNA を回収した。更に 5'側に RNA リンカーを ligation し、得られた産物を PCR により増幅してシーケンスサンプルを調製した。

②RNA-seq: 得られた細胞から、total RNA を抽出した後、Ribo-zero kit により ribosomal RNA を取り除きサンプルを得た。

③Ribo-seq: 細胞を可溶化後、RNaseI 処理し、遠心後、1M sucrose クッションを用いた超遠心により細胞可溶画分から monosome を単離した。Trizol により monosome から RNA を抽出、Ribo-zero により ribosomal RNA を取り除いた後、CLIP-seq と同様のリンカー ligation、PCR を行ってシーケンスサンプルを調製した。

得られたシーケンスサンプルは Illumina 社 HiSeq により single end もしくは paired end によるシーケンス解析を行った。得られたデータはリンカー配列を取り除いた後、tophat2 を用いてマウスゲノムにマッピング、更に DESeq2 を用いて発現解析を行った。CLIP-seq については、CLIPseqtools を用いて解析を行った。

### (3) 生化学、分子生物学、及び細胞生物学的解析

得られたデータ検証の為、FLAG-WT 及び FLAG-R495X を発現する細胞を調製後、RT-qPCR 及び western blot 法を行った。CLIP-seq の結果検証には RNA-IP を行った。

ミトコンドリア解析の為、MitoTracker による染色及び ImageJ を用いた画像解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 発現タンパク質の局在解析

FLAG-WT 及び FLAG-R495X を発現させた細胞を免疫染色することにより、これまでの報告通り、FLAG-WT は核内に限局して存在するのに対し、FLAG-R495X は細胞質でドット様の局在を示すことを明らかとした (図 1)。

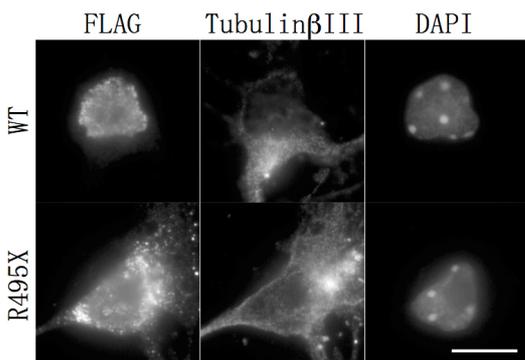


図1. WT及びR495Xの神経細胞における局在。抗FLAG抗体及び抗TubulinβIII抗体を用いて免疫染色を行った後、核をDAPIにより染色した。WTは核に局在したのに対し、R495Xは細胞質にドット様に局在することが分かった。Scale bar = 10 μm

### (2) シーケンス結果

CLIP-seq、RNA-seq、Ribo-seq のシーケン

ス、及びマッピングを行った結果、表 1 に示すリード数が得られた。更に解析を進めた結果、以下のことを明らかとした。

		Mapped reads
CLIP-seq	WT	27,086,891
	R495X	18,696,870
RNA-seq	Control1	32,603,732
	Control2	32,511,938
	WT1	32,068,042
	WT2	35,897,470
	R495X1	33,757,194
	R495X2	32,990,924
Ribo-seq	Control	3,638,455
	WT	4,213,597
	R495X	3,520,537

表1. 各ライブラリのシーケンス結果。ゲノムにマッピングされたリード数を右カラムに示す。

### ① CLIP-seq のマッピング結果

野生型 FUS は 70%以上のリードがイントロンにマップされたのに対し、R495X は 70%程のリードがエクソンにマップされた。このことから、これら分子は異なる RNA 結合様式を持つことが分かった (図 2)。

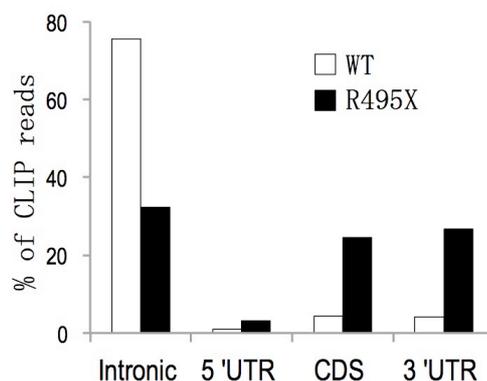


図2. 各遺伝子領域におけるマップされたCLIP-seqのリード数の割合を示す。

### ② RNA-seq 及び Ribo-seq のマッピング結果

RNA-seq のリードは 5' UTR、CDS、3' UTR に偏りがほぼない状態でマッピングされた。このことから、発現 RNA 全長をシーケンスできていることが明らかとなった。これに対し、Ribo-seq では約 90%のリードが CDS にマッピ

ングされた (図 3)。このことから、作成したライブラリは ribosome に結合した RNA のみから得られたものであることが明らかとなった。

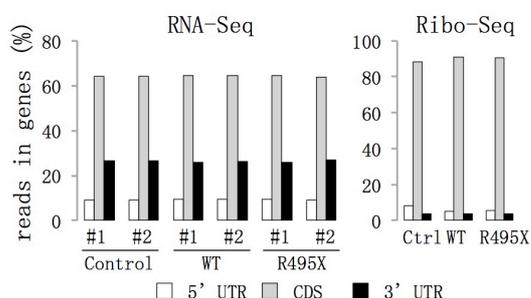


図3. 各遺伝子領域におけるマップされた RNA-seq (左) 及び Ribo-seq (右) のリード数の割合を示す。

### (3) シーケンスデータの解析

① CLIP-seq の結果から、R495X 変異体と野生型 FUS の RNA 結合様式の違いを解明した。

野生型 FUS の RNA への結合はエクソン、イントロンへの嗜好性を示さなかったのに対し、R495X 変異体はエクソンに対して高い嗜好性を示した。また、野生型、R495X 共に非常に多くの標的 RNA を持ち、且つその結合量は発現量と正の相関を示した。これらのことから、野生型 FUS は核内において主に pre-mRNA にランダムに結合しているのに対し、R495X は細胞質において成熟 mRNA にランダムに結合していることが明らかとなった。

② WT、R495X 共に RNA 発現に対する影響は限定的であることが分かった。

RNA-seq による遺伝子発現解析の結果、WT、R495X それぞれに特異的な発現変化を示す RNA 及び共通して変化を示すもの等、1,000 種近い RNA 種の発現変化が認められた。しかしながら、2 倍以上の発現変化が認められたものは極わずかであり、且つ、発現変化量と結合強度に相関が全く認められなかった。このこと及び①の結果から、野生型、R495X 共に標的 RNA の発現量を変化させるような機能は殆ど無く、間接的に様々な RNA 種の発現を変化させていることが明らかとなった。

③ R495X はミトコンドリア機能に関連した遺伝子の翻訳を変化させる。

Ribo-seq の結果を用いた発現解析から、野生型、R495X それぞれに特異的に翻訳量変動する遺伝子群が認められた。Gene Ontology 解析から、特に R495X 発現細胞においてミトコンドリア機能に関する遺伝子群の翻訳量が増加していることが明らかとなった。また、生化学的手法により、得られたシーケンスデータの妥当性を明らかとした。

### (4) R495X によるミトコンドリア異常誘引分子機構の解明

① R495X はミトコンドリアを縮小する。

上述の解析結果から、R495X 発現細胞ではミトコンドリアに異常が生じることが考えられた。その為、同細胞におけるミトコンドリアを観測することとした。その結果、コントロール細胞及び野生型 FUS を発現させた細胞に比較して、有意にそのサイズが縮小していることが分かった (図 4)。

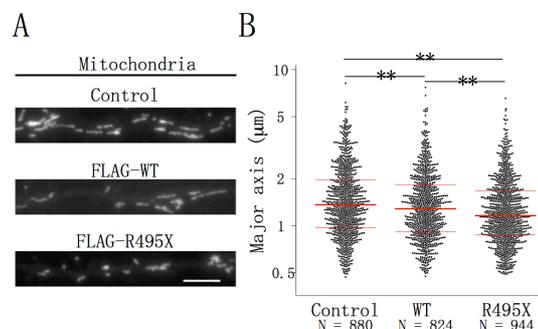


図4. A. Control、WT及びR495Xを発現する細胞のミトコンドリアを染色した像を示す。Scale bar = 5 µm  
B. ミトコンドリアの長径を測定し、有意差検定を行った結果。用いたミトコンドリア数は下部に記載。赤棒は25%位、median、75%位を示す。\*\* < 0.01, p値。

② R495X が誘引するミトコンドリア異常は R495X の RNA 認識配列を必要とする。

CLIP-seq と Ribo-seq の解析を行った結果、翻訳異常が生じている RNA に R495X がより強く結合していることが分かった。この RNA 結合の意義を明らかとするため、FUS の RNA 認識配列に変異を導入した変異体 (R495X4FL) を作成し、R495X が示す表現型との関連について検証を行った。その結果、R495X に比較

して、R495X4FL では標的 RNA との結合が有意に減弱していた (図 5)。この時、R495X 発現により発現減弱が認められた分子のタンパク質発現が有意に回復していた。

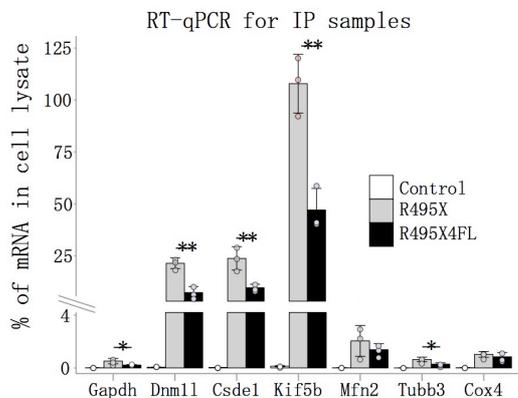


図5. RNA-IPを行い、qPCRにより定量した結果を示す。N=3。下部に示す遺伝子に特異的なprimerを用い、FLAG抗体で免疫沈降したサンプルをinputとした。Dnm11, Csd1, Kif5b, Tubb3において、R495Xに比較してR495X4FLで有意に結合量の減少が認められた。\*, \*\*  $p < 0.05, 0.01$ 。縦軸は細胞に発現しているものを100%とした、結合mRNAの割合を示す。

③R495X によるミトコンドリア異常は RNA 認識配列に依存する。

R495X4FL 変異体を発現する細胞のミトコンドリアサイズを検証したところ、R495X 発現細胞に比較して、有意にそのサイズが長くなっていることが分かった (図 6)。

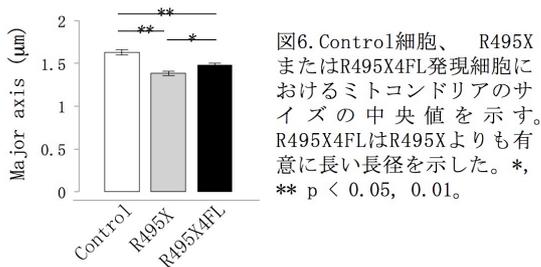


図6. Control細胞、R495X またはR495X4FL発現細胞におけるミトコンドリアのサイズの中央値を示す。R495X4FLはR495Xよりも有意に長い長径を示した。\*, \*\*  $p < 0.05, 0.01$ 。

④R495X による神経細胞死は R495X4FL 発現細胞では認められない。

R495X を長期間発現させると神経細胞死が誘発される。ところが、R495X4FL を発現する細胞では有意な神経細胞死は認められなかった。

以上の結果から、本研究により、FUSR495X 変異体が結合 RNA の翻訳過程を乱すことで、

ミトコンドリア異常を引き起こし、神経細胞死を誘引することが明らかとなった。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

①中矢 正、FUS regulates the expression of snRNP70 by binding to its conserved intron in neuron、北米神経科学会 Sfn2017、2017 年

②中矢 正、The relationship between cytotoxicity and function of FUS in neurons、2015 年度日本生化学会北海道支部・日本生物物理学会北海道支部合同シンポジウム、2016 年

③中矢 正、Identification of domains of FUS required for the regulation of genes with conserved introns、第 58 回日本神経化学会大会、2015 年

④中矢 正、Panagiotis Alexiou, Manolis Maragkakis, Alexandra Chang, Zissimos Mourelatos、In vivo における ALS 原因因子 FUS の標的 RNA の同定、第 17 回日本 RNA 学会年会、2015 年

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

中矢 正 (NAKAYA, Tadashi)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：50374559