

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15190

研究課題名（和文）FUS相転移を制御するアルギニンメチル化の解明

研究課題名（英文）Investigating the factors regulating FUS phase transition

研究代表者

森原 隆太（Moriyama, Ryuta）

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：40895257

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：FUSは生理的な相分離が破綻すると異常凝集して封入体を形成する。本研究ではFUS相分離を制御する要因の1つとしてFUSのアルギニンメチル化に着目した。FUS変異のある家族性ALS（ALS-FUS）、FUS蓄積を伴うFTLD（FTLD-FUS）、孤発性ALS、正常対照の計4群の脳検体を用いて質量分析法を行って疾患ごとのメチル化状態のマッピングを行ったところ、正常対照に比べてFTLD-FUSでは全体的にアルギニン残基が脱メチル化する傾向にあり、さらに特定のアルギニン残基では有意に脱メチル化していた。これら特定のアルギニン残基の脱メチル化がFUSの相分離亢進を引き起こしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA結合蛋白の一種であるFUSは、相分離という現象によって可逆的に「分散状」「滴状」「ゲル状」に形態を変化させるが、相分離が破綻すると異常凝集して神経障害を引き起こす。本研究はこの異常凝集の原因として、FUSの特定のアルギニン残基の脱メチル化が関係することを明らかにした。FUS凝集が原因となる筋萎縮性側索硬化症及び前頭側頭型認知症の病因解明と治療法開発に向けての端緒になる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：When physiological phase separation of FUS is disrupted, FUS abnormally aggregates to form inclusion bodies. In this study, we focused on arginine methylation of FUS as one of the factors regulating FUS phase separation, and performed mass spectrometry on brain samples from four groups: familial ALS with FUS mutation (ALS-FUS), FTLD with FUS accumulation (FTLD-FUS), sporadic ALS, and normal controls. The results showed that arginine residues tended to be demethylated in FTLD-FUS compared to normal controls, and that specific arginine residues were significantly demethylated, suggesting that demethylation of these specific arginine residues may cause increased phase separation of FUS. This suggests that demethylation of these specific arginine residues may be responsible for the increased phase separation of FUS.

研究分野：認知症

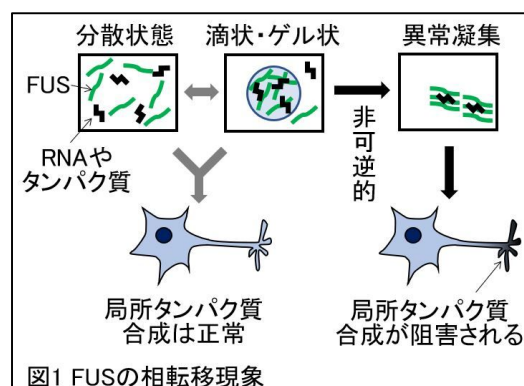
キーワード：fused in sarcoma 液-液相分離 前頭側頭型認知症 筋萎縮性側索硬化症 アルギニンメチル化

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は運動神経の障害により重篤な筋肉の萎縮と筋力低下を来す疾患で、発症して約 2~4 年で呼吸不全を呈する。一方前頭側頭型認知症 (FTLD) は人格変化や行動障害をともなう認知症であり、従来この 2 つの疾患は別のものと考えられていた。

一方 fused in sarcoma (FUS) 遺伝子は家族性 ALS の 1 つである ALS6 型 (以下 ALS-FUS) の原因遺伝子である。FUS 遺伝子から産生される FUS タンパク質は RNA 結合タンパク質の一種であるが、ALS-FUS (全 ALS の 1%)、および FTLD の約 10% (以下 FTLD-FUS) の神経細胞内に FUS 陽性の異常凝集物 (封入体) が観察されることが分かり、FUS は ALS と FTLD とを結びつけるタンパク質として注目されている。

この FUS は近年脚光を浴びている天然変性タンパク質の一種であり、特定の三次元構造をもたないために可逆的に凝集度を変化させて「分散状態」「滴状」「ゲル状」に形態を変えるという相分離現象を示す。「分散状態」にある FUS は、その濃度が上昇すると相分離によって「滴状」、さらには「ゲル状」となって RNA とタンパク質の巨大複合体からなる無膜性の細胞内オルガネラ (RNP 顆粒) を形成する。RNP 顆粒にはタンパク質合成に必要な因子が積み荷のようにして含まれており、FUS は RNP 顆粒と共に軸索をたどって軸索終末にまで輸送される。そして滴状・ゲル状の FUS の凝集度が低下して分散状態に戻ると積み荷がリリースされ、局所タンパク質合成が開始される。一方 FUS 相分離が障害を受けると FUS は不可逆的に凝集化してしまい、RNP 顆粒機能不全ひいては軸索終末における局所タンパク質の合成障害をきたすことで、神経障害をきたす (図 1)。



それではこの FUS 相分離を司るものは何なの

であろうか。どうして FUS の可逆的凝集性が失われて異常凝集物である封入体が形成されるのであろうか。その要因の 1 つが FUS 翻訳後修飾であり、中でもとくにアルギニン残基のメチル化・脱メチル化が FUS 相分離に大きく影響を及ぼすと言われている。既報によると、免疫染色上、FTLD-FUS における FUS 凝集体のアルギニン残基は著しく脱メチル化していたが、ALS-FUS における FUS 凝集体のアルギニン残基は高度にジメチル化していた。しかし全部で 37 残基ある FUS アルギニン残基のメチル化・脱メチル化の合計量が FUS 相分離に関与するのか、それともいくつか特定のアルギニン残基のメチル化・脱メチル化の組み合わせが主要な因子として決定的な影響を持つのかということまでは分かっていない。

2. 研究の目的

本研究は、FUS アルギニン残基のメチル化異常が FUS 異常凝集に関与するという仮説のもと、ALS-FUS と FTLD-FUS の剖検脳を質量分析に供することで、各疾患で特異的にメチル化しているアルギニン残基を同定し、それが FUS 相分離異常の原因になるのかを相分離アッセイで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) FUS のアルギニンメチル化は ALS-FUS と FTLD-FUS において異なるのか

FTLD-FUS (n=8)、孤発性 ALS (n=4、以下 sALS)、ALS-FUS (n=2) 及びコントロール (n=6) の大脳剖検検体を用いて、脳ライセートに対して抗 FUS 抗体による免疫沈降法を経て質量分析をかけて全アルギニンのメチル化のマッピングを行い、この 4 群におけるアルギニンメチル化の違いを調べる。

(2) FUS 相分離の key factor となるアルギニンメチル化は何か

上記(1)によって、疾患ごとにアルギニンのメチル化の違いが判明する。まずはそのようなアルギニン残基をアラニンへ変異させることでその部位のメチル化能力を喪失させた変異 FUS コンストラクトを作成する。そして蛍光タンパク質を融合させた変異 FUS コンストラクトを大腸菌に導入し、組み換えタンパク質を発現・精製し、FUS 滴状形成アッセイと光褪色後蛍光回復法 (FRAP 法) を用いて相分離を評価する。

4. 研究成果

(1) FTLD-FUS の特定のアルギニン残基はコントロールと比べて脱メチル化している

FUS は 526 個のアミノ酸から構成され、N 末端から順に tyrosine rich low-complexity ドメイン (LC ドメイン)、arginine-glycine-glycine ドメイン (RGG1)、RNA 認識モチーフ (RRM)、RGG2、Zinc-finger モチーフ、RGG3、核局在シグナル (NLS) をから成る。アルギニン残基数は、LC ドメインに 0 個、RGG1 に 9 個、RRM に 3 個、RGG2 に 9 個、Zinc-finger に 1 個、RGG3 に 10 個、NLS に 5 個、計 37 個存在する (図 2)。そして各アルギニン残基は unmethylated (非メチル化)、monomethylated (モノメチル化)、dimethylated (ジメチル化) の 3 種類のうちいずれかの状態にある。

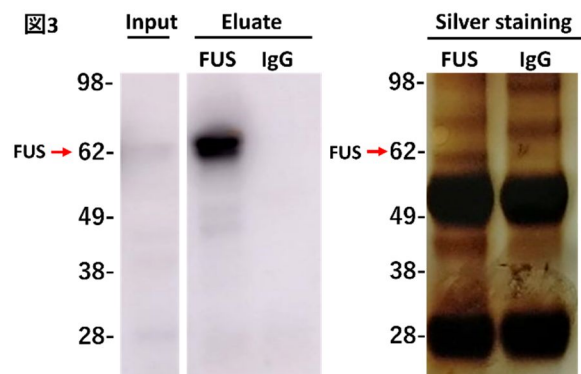


図2 FUS遺伝子の構造

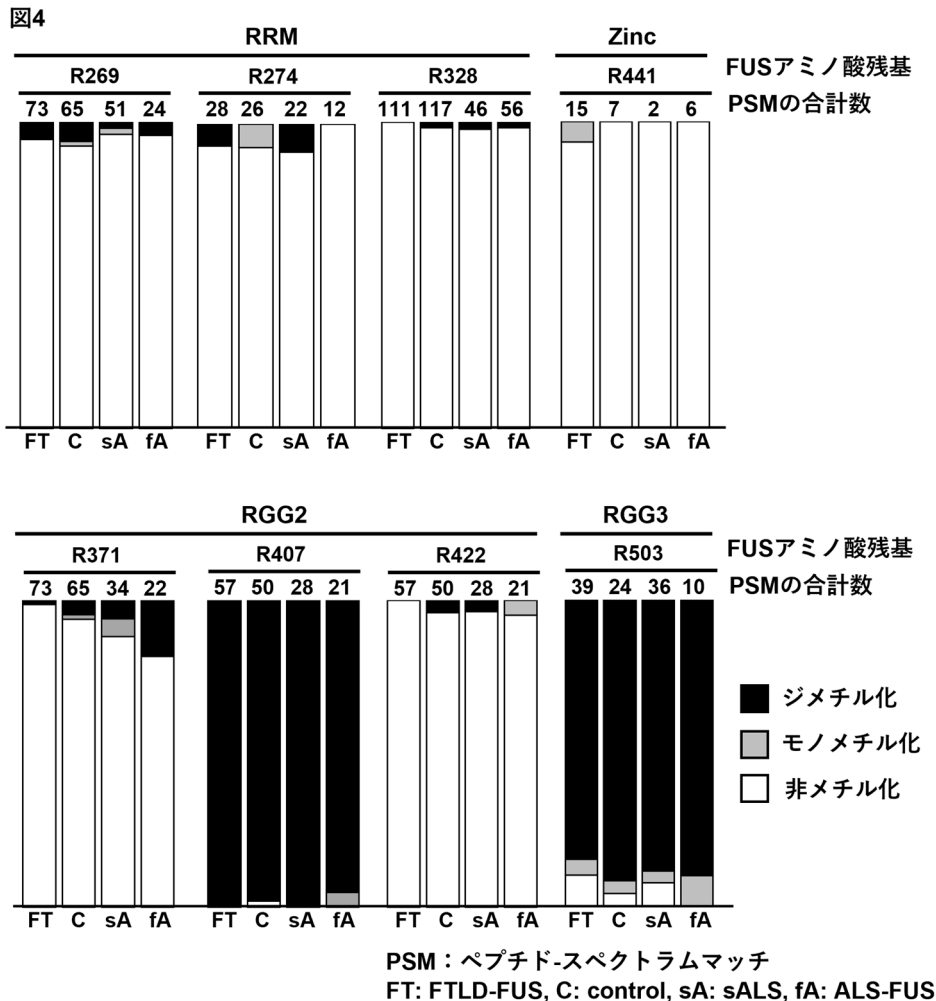
| がアルギニン残基を示す

脳ライセートを抗 FUS 抗体を用いた免疫沈降にて精製し、銀染色にて FUS によるバンドを同定後に同部位を切り出した (図 3)。

各サンプルはキモトリプシン消化及び Asp-N 消化の 2 通りのゲル内消化後に LC-MS/MS 測定を行った。計 20 サンプルにおいて、PY-NLS の 5 つのアルギニン残基については MS 解析における同定率が 15% ~ 45% と低いため以後の解析対象から除外した。残りの 32 個のアルギニン残基の同定率は平均 80% であった。RRM と



Zinc-finger のアルギニン残基は FTLD-FUS、sALS、ALS-FUS、コントロールのいずれの群においても高度に非メチル化していた (90.9% ~ 100%)。また RGG に属するアルギニン残基のうち R371 は 81.8% ~ 98.6% が非メチル化、R407 は 95.2% ~ 100% がジメチル化、R422 は 95.2% ~ 100% が非メチル化、R503 は 84.6% ~ 91.7% がジメチル化していた (図 4)。



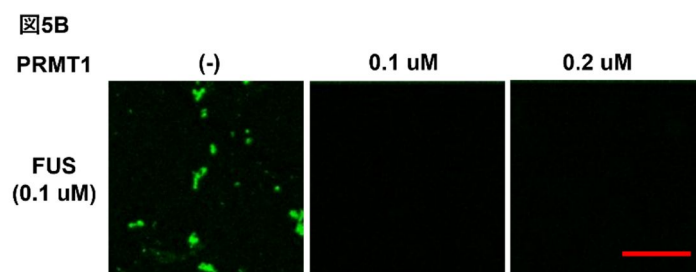
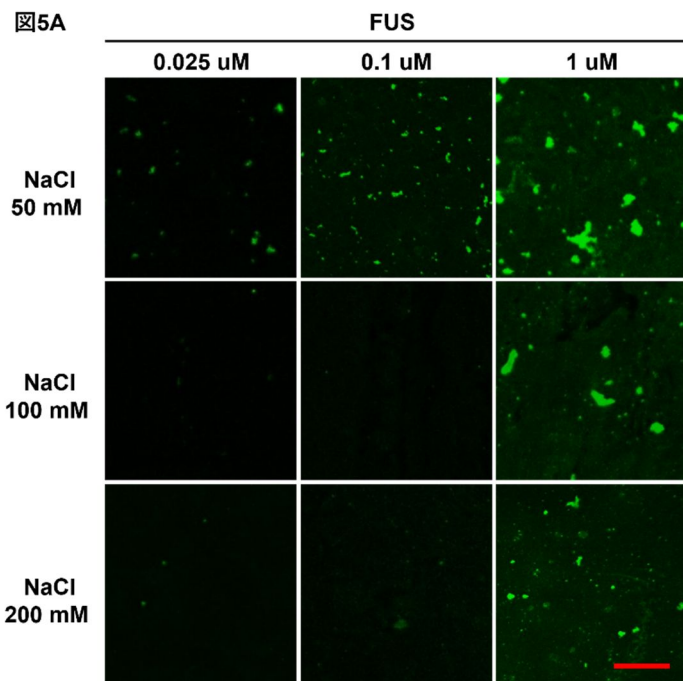
RGG の残りの 24 個のアミノ酸残基は、各群でメチル化の程度に違いを認めており、これを以後の解析対象とした。さらに ALS-FUS はサンプル数が少ないこと、sALS の病理は TDP43 であり FUS の凝集は起こらないと考えられることから今回の解析対象から除外し、FTLD-FUS (n=8) とコントロール (n=6) において、RGG に属する計 24 アルギニン残基のメチル化の違いについて比較検討した。統計解析法は、メチル化数につき、非メチル化 = 0、メチル化 = 1、ジメチル = 2 としてこの 2 群に Mann-Whitney 検定を用いた。

結果として、RGG1 (アルギニン残基は合計 9 個)、RGG2 (アルギニン残基は合計 6 個)、RGG3 (アルギニン残基は合計 9 個) はいずれも FTLD-FUS がコントロールより脱メチル化傾向にあったが、統計解析上はそれぞれ $p=0.207$ 、 $p<0.001$ 、 $p=0.078$ であり、RGG2 のみ有意であった。アルギニン残基を個別にみると、R218 ($p=0.044$)、R248 ($p=0.034$)、R218 ($p=0.044$)、R248 ($p=0.034$) の 4 つの残基で有意に FTLD-FUS で脱メチル化していた。これら 4 つのアルギニン残基の脱メチル化が高度になることで FUS の相分離が亢進して異常凝集をもたらしている可能性が示唆された。

(2)FUS リコンビナントタンパクの相分離アッセイの確立

FUS リコンビナントタンパクを単離精製した上で、その濃度を上昇させると相分離が亢進すること、及び NaCl 濃度が上昇すると相分離は低下することを確認した (図 5A)。さらに FUS にアルギニンメチル化酵素 1 (PRMT1) のリコンビナントタンパクを加えると相分離が低下することを確認した (図 5B)。今後は FTLD-FUS で有意に脱メチル化していた上記 4 つのアルギニン残基をアラニンやチロシンに変異させたコンストラクトを作成して変異 FUS リ

コンビナントタンパクを精製し、野生型と同様の相分離アッセイを行ってこれら変異により相分離がどのように変化するかを見ていく予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Tadokoro K, Yamashita T, Shang J, Ohta Y, Nomura E, Morihara R, Omote Y, Takemoto M, Abe K.	4. 巻 466
2. 論文標題 Switching the Proteolytic System from the Ubiquitin-Proteasome System to Autophagy in the Spinal Cord of an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience .	6. 最初と最後の頁 47-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2021.04.034.	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 Feng T, Hu X, Fukui Y, Tadokoro K, Bian Z, Morihara R, Yamashita T, Abe K.	4. 巻 1766
2. 論文標題 Neuroprotective effects of Scallop-derived plasmalogen in a mouse model of ischemic stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Res .	6. 最初と最後の頁 147516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2021.147516.	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 Tadokoro K, Yamashita T, Kimura S, Nomura E, Ohta Y, Omote Y, Takemoto M, Hishikawa N, Morihara R, Morizane Y, Abe K.	4. 巻 83
2. 論文標題 Retinal Amyloid Imaging for Screening Alzheimer's Disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Alzheimers Dis.	6. 最初と最後の頁 927-934
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-210327.	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 Morihara R, Yamashita T, Osakada Y, Feng T, Hu X, Fukui Y, Tadokoro K, Takemoto M, Abe K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Efficacy and safety of spot heating and ultrasound irradiation on in vitro and in vivo thrombolysis models.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Cereb Blood Flow Metab.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0271678X221079127.	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 Feng T, Hu X, Fukui Y, Bian Z, Bian Y, Sun H, Takemoto M, Yunoki T, Nakano Y, Morihara R, Abe K, Yamashita T	4. 巻 86
2. 論文標題 Clinical and Pathological Benefits of Scallop-Derived Plasmalogen in a Novel Mouse Model of Alzheimer's Disease with Chronic Cerebral Hypoperfusion.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Alzheimers Dis.	6. 最初と最後の頁 1973-1982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-215246.	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 Bian Z, Liu X, Feng T, Yu H, Hu X, Hu X, Bian Y, Sun H, Tadokoro K, Takemoto M, Yunoki T, Nakano Y, Fukui Y, Morihara R, Abe K, Yamashita T.	4. 巻 86
2. 論文標題 Protective Effect of Rivaroxaban Against Amyloid Pathology and Neuroinflammation Through Inhibiting PAR-1 and PAR-2 in Alzheimer's Disease Mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Alzheimers Dis.	6. 最初と最後の頁 111-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-215318.	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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森原隆太、山下徹、小坂田陽介、馮田、胡欣冉、福井裕介、田所功、武本麻美、阿部康二
2. 発表標題 脳血栓モデルにおける温熱照射と超音波照射の有効性と安全性の検討.
3. 学会等名 第47回日本脳卒中学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Morihara R, Kono S, Yamashita T, Manabe Y, Takao Y, Kashihara K, Deguchi K, Inoue S, Kiriya H, Abe K.
2. 発表標題 tPA thrombolysis within 4.5 h after onset in five hospital groups in Japan.
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------