



Title	FUS R495X 変異によるALS発症機構の解明
Author(s)	河原, 大貴
Citation	北海道大学. 博士(薬科学) 甲第13958号
Issue Date	2020-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13958
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/80625
Type	theses (doctoral)
File Information	Daiki_KAWAHARA.pdf



[Instructions for use](#)

博士学位論文

FUS R495X 変異による

ALS 発症機構の解明

2020 年 3 月

北海道大学大学院生命科学院

生命科学専攻 生命医薬科学コース

神経科学研究室

河原 大貴

目次

1. 略語一覧	p. 2
2. 序論	p. 4
2.1 筋萎縮性側索硬化症(ALS)	
2.2 Fused in Sarcoma (FUS)	
2.3 FUS R495X 変異	
2.4 相転移	
2.5 局所的翻訳機構	
本研究の目的	
3. 研究結果	p. 8
FUS R495X 構造体形成機構の解明	
構造体形成による細胞内変化の解明	
4. 考察	p. 15
5. 実験手法	p. 19
6. 参考文献	p. 28
7. 図表	p. 35
8. 謝辞	p. 69

1.略語一覽

a.a.: amino acid

ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis

b. p.: base pair

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

CDS: coding sequence

CLIP: UV-crosslink and immunoprecipitation

DMEM: Dulbecco modified Eagle medium

Dox: Doxycycline

ECL: enhanced chemiluminescence

EDTA: ethylene diamine N, N, N, N-tetraacetic acid

EGFP: enhanced green fluorescent protein

ES cell: Embryonic stem cell

EB: Embryonic body

FUS: Fused in Sarcoma

FBS: fetal bovine serum

FL: full length

GDNF: Glial cell-derived neurotrophic factor

HITS-CLIP: High throughput sequencing of RNA isolated by CLIP

HEPES: 2- [4- (2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid

HEK: Human Embryonic Kidney

IgG: immunoglobulin G

IP: immunoprecipitation

kDa: kilo Dalton

LC: Low-complexity

LB: Luria-Bertani

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

PBS: phosphate-buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PLA: Proximity Ligation Assay

RGG: Arginine-Glycine-Glycine

RRM: RNA recognition motif

RT: reverse transcription

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SQGY: Serine-Glutamine-Glycine- Tyrosine

TBS-T: Tris-buffered saline with tween 20

Tris: tris (hydroxymethyl) aminomethane

Triton X-100: polyoxyethylen (10) octylphenyl ether

Tween-20: polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate

UTR: untranslated region

WB: western blot

WT: wild type

ZnF: Zinc-Finger

2.序論

2.1 筋萎縮性側索硬化症

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS) は上位、下位の運動ニューロンが選択的かつ進行性に変性し、筋萎縮や筋力低下を生じる神経変性疾患である。症状の進行に伴い、構音障害、嚥下障害、寝たきりになり、発症後 3~5 年には呼吸筋の麻痺により死に至る重篤な疾患であり、厚生労働省指定難病の一つに登録されている。患者数は日本だけでも 8000 人を超え、加齢とともに頻度は増し、60 歳以降の罹患危険率は 300 人に一人とも言われおり、決して珍しい疾患でない。

ALS の発症者の 5~10%は遺伝性である (Figure 1A)。家族性 ALS の遺伝学的解析により、1993 年、第 21 番染色体にコードされている Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) が原因遺伝子として初めて発見された (Rosen DR *et al.*,1993)。その後も解析は行われ、現在では約 50 種類もの遺伝子に変異が同定されている (Boylan K,2015)。注目すべき点として家族性患者の約半数を占める割合で、TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43), Fused in Sarcoma (FUS), Senataxin, Angiogenin (ANG), hnRNPA2B1, hnRNPA1 などの RNA 結合タンパク質及び RNA 代謝に関わるタンパク質をコードする遺伝子に変異が同定されており (Figure 1B)、RNA 機能や代謝が ALS 発症に寄与する可能性が示唆されている。

また、神経病理学的特徴として、家族性、孤発性患者両者に共通して運動神経特異的にユビキチン免疫染色に陽性な異常構造体が形成される (Figure 2)。この異常構造体の構成タンパク質が TDP-43 や FUS 等であることが同定され、現在、原因解明の突破口となっている。

しかし、ALS 発症機構は未解明な点が多く残されており、有効な治療法を確立する上で、詳細な ALS 発症機構の解明が求められている。私はこれらの原因因子のうち FUS に着目し解析を行った。

2.2 Fused in Sarcoma (FUS)

FUS は、526 個のアミノ酸からなる RNA 結合タンパク質であり、粘液性脂肪肉腫の癌化を誘導する因子として同定された。EWS (Ewing's Sarcoma) や TAF15 (TATA-binding protein-associated factor 15) らと共に TET family に属し (Tan AY *et al.*, 2009)、N 末端から順に Serine-Glutamine-Glycine- Tyrosine (SQGY) rich ドメイン, Glycine-rich ドメイン, RNA recognition motif (RRM), Arginine -Glycine-Glycine (RGG) ドメイン, zinc-finger モチーフ,そして非古典的な核局在化シグナルである PY-NLSを C 末端に持つ (Figure 3A)。これらドメインのうち Gly-rich, RRM, RGG, ZnF ドメインは RNA 及び DNA と結合能を

有する (Law WJ *et al.*, 2006)。

FUS は全身で発現し、主に核内に局在する (Andersson *et al.*, 2008 ; Morohoshi F *et al.*, 1996)。しかしながら、核/細胞質間をシャトリングし、核内・細胞質内どちらにおいても RNA と結合することで様々な機能を担う。現在までに報告された FUS の機能としては、核内における DNA 修復、転写やスプライシングの制御 (Kuroda M *et al.*, 2000 ; Meissner M *et al.*, 2003 ; Wang X *et al.*, 2008)、細胞質内における翻訳過程やストレス負荷時の Stress Granule の形成 (Sama RR *et al.*, 2013) 等が挙げられ、多岐にわたる (Figure 3B)。

2.3 FUS R495X 変異

FUS の家族性 ALS 変異は現在までに多数報告があり、C 末の NLS やその周囲に存在することが知られている (Lagier-Tourenne C and Cleveland DW 2009 ; Figure 4)。FUS は、核内輸送体 Transportin が FUS の NLS を認識・結合することで、核内へと輸送される。C 末に変異がある場合、Transportin との結合が弱まり輸送が損なわれるため、細胞質局在が増加する (Dormann D *et al.*, 2010)。

家族性変異の一つである R495X 変異は 2010 年に家族性 ALS の遺伝子変異として同定された (Bosco DA *et al.*, 2010)。495 番目のアルギニンをコードするコドンがストップコドンに変異したミスセンス変異であり、C 末端の核移行シグナルを含む 32 アミノ酸が欠失している。他の変異 (R521G) を持つ患者群が平均 40 歳で発症し約 27 ヶ月後に死に至る (Kwiatkowski TJ Jr *et al.*, 2009) のに対して、R495X 変異を持つ患者群は、平均 35 歳に発症し、約 16 ヶ月後に死に至る。したがって、R495X 変異は ALS を発症する FUS の遺伝子変異の中でもきわめて重篤な変異だと考えられる。また、所属研究室では、N 末端に EGFP を付加した R495X 変異体をマウス ES 細胞由来神経細胞に発現させた場合、神経細胞の細胞質において局所的に集積し構造体を形成することを観察している。

従って、FUS R495X 変異による ALS 発症機構として、FUS の本来の核内での機能消失による Loss of function 説と、細胞質内での構造体形成による Toxic gain of function 説の二つの説が有力であった。しかし、FUS KO ゼブラフィッシュやマウスにおいて ALS 様の症状を示さないこと等 (Rogelj B *et al.*, 2012; Svetlana Lebedeva *et al.*, 2017) から、FUS の Loss of function による発症の可能性が低いことが示唆されている。従って、FUS R495X 変異による ALS 発症には、構造体形成による Gain of toxic function が寄与すると考えられる。

以上の経緯から FUS R495X 変異体による ALS の発症機構として次のような機構が考えられる (Figure 5)。

- ①R495X 変異による細胞質局在の増加
- ②細胞質における R495X 構造体の形成

③構造体形成により生じる gain of toxic function による神経細胞死の誘引

しかしながら、FUS R495X 変異体がどのように構造体を形成するのか、また構造体形成により細胞内でどのような変化が引き起こされるのか、は未解明である。

2.4 相転移

真核生物の細胞において観察される RNA 顆粒 (RNA granule) は、主に RNA、RNA 結合タンパク質から構成される膜を持たない構造体である。RNA 顆粒として、生殖細胞に見られる germ granule や polar granule、体細胞に見られる stress granule や Processing-body 等の存在が知られている (Anderson P *et al.*, 2006)。これらの RNA 顆粒はストレスなどの環境変化に応じ、mRNA の輸送、貯蔵、分解などを行い遺伝子発現を制御すると考えられている。しかしながら、RNA 顆粒は非常に動的な構造体であり、その形成の仕組み及び内部の構造等について検証がなされていなかった。RNA 顆粒の構成タンパク質である RNA 結合タンパク質の多くは RNA 結合ドメインと LC (Low-complexity) 配列と呼ばれる配列をもつ。LC 配列はアミノ酸の著しく偏った配列であり、決まった構造をもたずフレキシブルな状態を保っている。この LC 配列の本来の機能について長年未解明であった。

近年、LC 配列を有するタンパク質は濃度、温度依存的に相転移を引き起こし liquid droplet と呼ばれる流動性を保った構造体を形成する性質を持つことが相次いで報告され (Kato M *et al.*, 2012; Molliex A *et al.*, 2015)、RNA 顆粒の形成において重要な役割を担っていることが示唆されている。FUS もその他 RNA 結合タンパク質と同様 LC 配列を持ち、濃度、温度依存的に相転移し、liquid droplet を形成する (Murakami T *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2015)。

これらの経緯から、FUS の構造体の形成に相転移が関与する可能性が示唆されている。しかし、相転移に関する多くの報告は精製系を用いた実験により得られた結果であり、相転移と疾患との関連性については明らかでない。

2.5 局所的翻訳機構

神経細胞は長い軸索と複数の樹状突起を持つ、高度に発達した極性細胞であり、神経軸索と標的細胞の樹状突起間でシナプスを形成し、細胞間の情報伝達を行う。極性の形成や維持には、各々の部位に必要なタンパク質が局在する必要がある。神経細胞では、ほとんどのタンパク質は細胞体で合成されるため、モータータンパク質やカーゴ受容体を介した軸索輸送に焦点を当て解析が行われてきた (Hirokawa *et al.*, 2010)。

しかしながら、細胞体と切り離れた軸索においてもタンパク質翻訳が行われ、かつ軸索成長因子を添加した場合に軸索伸長が起こるという発見 (Campbell DS and Holt CE, 2001)

から、各々の部位で様々な刺激に応じてタンパク質合成が起こる局所的翻訳機構の存在が示唆されるようになった。以降の解析により、樹状突起や軸索等で機能するタンパク質をコードする一部の mRNA は、mRNA として細胞内輸送を受け、各々の機能部位に局在し、局所的に翻訳されることが明らかとなった。

また 2015 年、Puromycin incorporation 法と Proximity Ligation Assay (PLA) 法を組み合わせた手法である Puro-PLA 法が報告され (Susanne tom Dieck *et al.*, 2015)、着目遺伝子の翻訳部位を可視化することが可能になった。その結果、現在 14 遺伝子が局所的に翻訳される遺伝子として同定されている (Holt CE *et al.*, 2019)。

局所的翻訳を受ける RNA は RNA 結合タンパク質と RNA 顆粒を形成し、Kinesin 等のモータータンパク質により輸送される (Kanai Y *et al.*, 2004)。輸送される RNA は 3'UTR の長さ、配列、構造に特徴を持つ (Tushev G *et al.*, 2018)。これらを RNA 結合タンパク質が認識することで RNA 顆粒に取り込まれると考えられている。

ALS の原因因子である TDP-43 や FUS も mRNA の細胞内輸送に関わることが報告されている (Birsa N *et al.*, 2019) ことから、細胞質での異常な構造体の形成により mRNA の輸送が変化する可能性が示唆されている。実際、FUS の家族性変異の一つである P525L 変異体を発現させた場合に、構造体を形成した細胞では *Ddr2* と *Kif5b* mRNA の輸送障害が起こることが報告されている (Yasuda K *et al.*, 2017)。

しかしながら、FUS の構造体形成が、その他にどのような遺伝子の mRNA 輸送を変化させるのか、そして局所的翻訳機構の破綻が ALS 発症に寄与するかについては未解明である。

本研究の目的

以上の背景から ALS 発症機構解明及び新たな創薬ターゲットを探索する上で、現在未解明である FUS の構造体形成分子機構及び、構造体形成に伴う細胞内変化について明らかにすることは、極めて重要であると考えられる。

そこで私は、所属研究室での FUS R495X 変異体が神経細胞において構造体を形成するという発見を基に、FUS R495X の構造体形成分子機構、および R495X 構造体形成に伴う細胞内変化を明らかにすることを目的に解析を行った。

3.研究結果

FUS R495X 構造体形成機構の解明

1. FUS R495X は神経細胞の細胞質において構造体を形成する。

まず、FUS R495X 変異体が神経細胞において構造体を形成することを確認した。N 末端に EGFP を付加した EGFP-FUS WT 及び R495X 変異体を作製し (Figure 6A,B)、マウス ES 細胞由来神経細胞に発現させ細胞内局在を観察した。その結果、WT は主に核内に局在していたのに対し、R495X 変異体では細胞質において局所的な集積が観察された (Figure 6C)。この結果から R495X 変異体が神経細胞細胞質において構造体を形成することが確認できた。

2.R495X 構造体形成に必要な領域の同定

次に、R495X 構造体形成に必要な領域の同定を試みた。そこで、構造体形成に必要なドメインを明らかとするため、N 末に EGFP を付加した R495X 変異体を基に、各ドメインを欠損したコンストラクトを作製し (Figure 7A)、構造体形成能を検証した。各ドメインが欠損されていることを、ウエスタンブロットを用い確認した (Figure 7B)。その後、各欠損体をマウス ES 細胞由来神経細胞にウイルスを用い発現させたのち、細胞内局在を観察した。その結果、Gly-rich, RGG1 及び RGG2 の欠損体では構造体の形成は観察されなかった (Figure 7C)。また、各種欠損体を発現している細胞の内、構造体を形成した細胞の割合を算出した (Figure 7D)。その結果、ZnF ドメインの欠損体においても構造体形成が減少することが分かった。この結果より Gly-rich, RGG1, RGG2 各ドメインが構造体形成に必要なドメインであることが明らかとなった。また、ZnF ドメインも構造体形成に一部寄与することが明らかとなった。

3. R495X 変異体における各 RNA 結合ドメインの RNA 結合量への寄与

次に、各欠損変異体の RNA 結合能について検証を行った。マウス ES 細胞由来神経細胞に各欠損変異体を発現させ、UV-crosslink and immunoprecipitation (CLIP) 法を用い FUS-RNA 複合体を回収した。その後 RNA を γ -³²P-ATP を用い放射標識したのち、タンパク質をウエスタンブロット、放射標識された RNA を X 線フィルムへの感光を行い検出した (Figure 8A)。各欠損体の RNA との結合量は、IP サンプルにおける FUS 量に対する X 線フィルムで検出された intensity を求めることで評価した。その結果、構造体を形成しない Gly-rich, RGG1, RGG2 ドメインの欠損変異体では RNA との結合量が約 9 割近く減少する

ことが分かった。また、ZnF ドメインの欠損体においても RNA との結合量の減少が観察された (Figure 8B, 8C)。この結果は、各欠損体発現細胞での構造体形成細胞の割合を検証した結果 (Figure 7D) と高い相関を示したことから、これら RNA 結合ドメインの RNA との結合が構造体形成に強く寄与すると考えられた。

また、興味深いことに Gly-rich, RGG 1, RGG 2 ドメインの欠損変異体全てで、R495X 変異体と比較して RNA との結合量が 9 割近く減少していた。この結果から、R495X 変異体は Gly-rich, RGG1, RGG2 ドメイン一つごとに RNA を認識しているのではなく、3つのドメインが協調して構造的に RNA を認識すると考えられる。

4.FUS の相転移に RNA が寄与する。

これまでの解析から、R495X 構造体の形成には RNA との相互作用が寄与することが示唆されている。また、RNA 結合タンパク質の相転移に RNA が関与することが相次いで報告されている (Saha S *et al.*, 2016; Maharana S *et al.*, 2018)。以上の経緯から、RNA が FUS の相転移に寄与することで、R495X 構造体の形成に寄与する可能性を考えた。そこで RNA が FUS の相転移に寄与するか検証を行った。

まず、RNA が FUS と共に相転移するか検証をおこなった。具体的には、GST tag を用い精製した FUS protein (3.0 μ M) を TEV protease を用い GST 切断したのち、Cy5 標識した RNA を添加し、FUS が形成する Liquid droplet と Cy5 蛍光を観察した (Figure 9A)。用いた RNA は、当研究室の解析によりすでに FUS が結合することが示されている遺伝子である *Calm2* の FUS と結合する配列 (GAA AAU UGA UGA AGU AAC AUG UUG CAU GUG GCU UAC UCU GGC UAU) の 5'末端に Cy5 を付加し標識した RNA プローブを用いた。その結果、FUS が形成する liquid droplet 内に Cy5 の蛍光が観察された (Figure 9B)。この結果から、RNA は FUS 共に相転移すること、そして Liquid droplet 内に RNA が集積することが分かった。

実際に細胞内において R495X 構造体と RNA が共に集積するか検証を行った。EGFP-FUS R495X をマウス ES 細胞由来神経細胞に発現させたのち、mRNA の局在を Cy5 で標識した Oligo dT probe を用いた Fluorescence in situ hybridization (FISH) を行い観察した。その結果、構造体と Cy5-Oligo dT の共局在が観察された (Figure 9C)。この結果から、R495X 変異体は mRNA と共に集積すると考えられる。

次に FUS の相転移に RNA が寄与するか検証をおこなった。GST tag を用い精製した FUS protein (1.0 μ M) を TEV protease を用い GST 切断したのち、マウス ES 細胞由来神経細胞から抽出した total RNA (1.5 μ g) を加え、構造体が形成された場合に、遠心した際に Pellet 画分に検出される FUS の量を比較した。タンパク質の検出は、SDS-PAGE, CBB 染

色を用いた (Figure 10A) 。その結果、RNA の添加により、Pellet 画分に多くの FUS が検出された (Figure 10B) 。この結果から、FUS の相転移を RNA が促進することが示唆された。

以上の結果から FUS は RNA と共に相転移し、かつ RNA が FUS の相転移を促進することが示唆された。

5.R495X 変異による RNA との結合量の変化

これまでの結果から、R495X 変異体は RNA との結合を介して構造体を形成することが示唆されている。そこで、WT と R495X 変異体とで RNA との結合量に変化があるか検証を行った。具体的にはマウス ES 細胞由来神経細胞に EGFP-FUS WT および R495X 変異体を発現させ、Figure 8 と同様の手法を用い RNA 結合量を検証した。その結果、WT と R495X 変異体とでは RNA との結合量に有意な差は検出されなかった (Figure 11A, 11B) 。この結果から、R495X の構造体形成には、RNA との結合のみでなく、細胞質局在の増加が必須であると考えられる。

FUS R495X 構造体形成機構 小括

Fig1~24 までの結果から、FUS は RNA と相互作用することで相転移が促進される性質をもち、R495X 変異体は Gly-rich, RGG 1, RGG 2 ドメインを介して RNA と相互作用することにより相転移が促進された結果、構造体を形成すると考えられる。しかし、WT と R495X 変異体とでは RNA との結合量に変化は観察されなかったことから、R495X の構造体形成には①細胞質への局在の増加②細胞質での RNA との結合、の 2 つの要素が必要であることが示唆される。想定された分子機構を Figure 12 に示した。

R495X 構造体形成に伴う細胞内変化の解明

次に、R495X 構造体形成に伴う細胞内変化を明らかにするため検証を行った。これまでの解析から R495X 構造体内には R495X 変異体と RNA が共に集積すると考えられる。そこで、構造体内に特定の RNA 分子が取り込まれることで、取り込まれた RNA 分子の局在、翻訳、分解等を変化させることで神経毒性および神経細胞死を引き起こしている可能性を考えた (Figure 13)。この可能性を検証するため、本研究では FUS 分子内の RNA 結合ドメイン及び R495X 結合 RNA に着目し解析を行った

各 RNA 結合ドメインに着目した解析

1.神経細胞死に RRM ドメインが寄与する。

まず、各 RNA 結合ドメインに着目し細胞死への寄与について検証した。マウス ES 細胞由来神経細胞に各 RNA 結合ドメインの欠損 EGFP-R495X 変異体を発現させ、24 時間おきに同一細胞の EGFP の蛍光観察を行った。その結果、構造体を形成しない Gly-rich, RGG1, RGG2 の欠損体を発現させた細胞では蛍光の消失は観察されず、構造体を形成する ZnF の欠損体を発現させた細胞では蛍光の消失が観察された。しかし、予想に反して、RRM の欠損体では構造体を形成するにも関わらず、蛍光の消失は観察されなかった (Figure 14)。この結果より構造体が誘引する神経細胞死に RRM ドメインが関与していることが示唆された。

2.構造体が誘引する神経細胞死には RRM ドメインの RNA との結合が関与する。

RRM ドメインは、ドメイン内の 305, 341, 359, 368 番目のフェニルアラニンが RNA との結合に重要であることが知られている (Daigle JG *et al.*, 2013)。そこで、RRM ドメインの RNA との結合が神経細胞死に関与しているか検証するため、4 つのフェニルアラニンをロイシンに置換した EGFP-FUS R495X 4FL 変異体を作製し (Figure 15A)、マウス ES 細胞由来神経細胞に発現させ、構造体形成能及び神経細胞死への寄与について検証した。

まず、EGFP-FUS R495X 4FL の構造体形成能について検証した。マウス ES 細胞由来神経細胞に EGFP-FUS R495X 4FL を発現させ、EGFP の蛍光を観察した。その結果、RRM ドメインの欠損体同様、EGFP 蛍光の局所的な集積が観察され、細胞質において構造体の形成が観察された (Figure 15B)。

次に、4FL 変異による細胞死への寄与について検証した。EGFP-FUS R495X 4FL を神経細胞に発現させ 24 時間おきに同一細胞の観察を行った。その結果 RRM の欠損体同様、発現誘導後 120 時間以内に蛍光の消失は観察されなかった (Figure 15C)。

この結果より構造体が誘引する神経細胞死には RRM ドメインの RNA との結合が関与していることが示唆された。

R495X 変異体結合 RNA に着目した解析

次に、R495X 変異体の結合 RNA に着目し解析を行った。当研究室ではすでに FUS R495X 変異体が結合する RNA について CLIP-RNAseq 法 (Figure 16A) を用いて網羅的に明らかにしている (Nakaya T and Maragkakis M, 2018)。そこで、この網羅的解析データを用い R495X 構造体が引き起こす細胞内変化について解明を試みた。

3.FUS R495X は主に CDS, 3'UTR 領域に結合する。

まず、R495X 変異体が遺伝子のどの領域に結合するのか検証するため、R495XCLIP tag の遺伝子領域ごとの分布について検証した。具体的には遺伝子の各領域 5'UTR (untranslated region), CDS (coding sequence), 3'UTR, Intron の 1kb あたりの R495X CLIP tag の数を算出し比較した。その結果、R495X 変異体は最も 3'UTR に結合し、次いで CDS の遺伝子領域に結合することが分かった (Figure 16B)。

4.各領域の CLIP tag の抽出,

次に、R495X 変異体がどのような遺伝子の 3'UTR もしくは CDS に結合するか明らかにするため、各領域にマッピングされる R495X CLIP read の抽出を行った。具体的には、各領域ごとのリファレンスゲノムを作製し、その領域にマッピングされた read を BEDTools (Quinlan AR and Hall IM. 2010) を用いることで抽出した (Figure 17A)。各遺伝子領域のみを抽出できていることを UCSC の Genome browser にて確認した (Figure 17B)。その後、得られた各領域ごとの read をカウントし、 $\text{Number of tag/length of region} = \text{tag/nucleotide}$ 値を算出した。

5.各領域ごとの結合 RNA の Gene enrichment 解析

次に、各領域ごとの R495X 結合 RNA の Gene Ontology enrichment (GO) 解析をおこなった。具体的には 3'UTR、CDS ごとに tag/nucleotide 値の Top50 の遺伝子を抽出し (Figure 18A, 18B)、Gene Ontology enrichment 解析を行った。

その結果、R495X 変異体は細胞の形態形成及び軸索形成に関わる遺伝子群の 3'UTR に結合することが分かり、リボソームの構成に関わる遺伝子群の CDS 領域に結合することが分かった (Figure 18C)。

6.各領域ごとの R495X 変異体の結合モチーフ

次に、各領域ごとの R495X 変異体の結合モチーフについて検証を行った。各領域における R495X 変異体の結合モチーフは Figure 19A, 19B のようになった。興味深いことに、3'UTR での結合モチーフである UGUGUGUG モチーフは、FUS 同様 ALS の原因因子である TDP-43 (Figure 20) の結合モチーフであることが知られている (Tollervey JR *et al.*, 2011)。さらに、マウス脳を用いた結合 RNA 網羅的解析により、FUS と TDP-43 は 3'UTR で特に共通した結合領域を持つことが示されている (Lagier-Tourenne C *et al.*, 2012)。以上から、FUS と TDP-43 は 3'UTR を介した共通の機構により ALS 発症に寄与している可能性が考えられた。そこで、3'UTR に着目し解析を行うこととした。

7.R495X 変異体は局所的に翻訳される遺伝子の 3'UTR に強く結合する。

これまでの解析から、R495X 変異体は細胞の形態形成及び軸索形成に関わる遺伝子群の 3'UTR に結合することが示唆されている (Figure 18D)。

近年、樹状突起や軸索等で機能するタンパク質をコードする一部の mRNA は、mRNA として細胞内輸送を受け、各々の機能部位に局在し、局所的に翻訳されることが報告されている。局所的翻訳を受ける RNA は 3'UTR の長さや配列、構造に特徴を持ち、これらを RNA 結合タンパク質が認識することで RNA 顆粒に取り込まれ輸送される (Figure 21A)。

そこで、R495X 変異体が 3'UTR を介して結合する遺伝子群である、細胞の形態形成及び軸索形成に関わる遺伝子群について着目すると、軸索および軸索末端で局所的翻訳される遺伝子である *Actb*, *Mapt* (Holt CE *et al.*, 2019) の 2 遺伝子が含まれていた (Figure 21B)。現在、局所的翻訳が示された遺伝子が 14 遺伝子のみであることから考えると極めて高い割合だと考えられる。また、*APP*, *GAP43* の mRNA は神経細胞において細胞内輸送を受けることが知られており (Rivera D *et al.*, 2015 ; Fallini C *et al.*, 2016)、局所的翻訳を受ける可能性が考えられる。

さらに、その他局所翻訳されることが報告されている 12 遺伝子において 3'UTR と CDS での結合量 (tag/nucleotide 値) 比を底 2 で対数を取った値を算出した。この値は、値が 0 の場合、3'UTR と CDS に均等に結合することを指す。その結果、Figure 21C の様になり、*Rapgef* 以外の 11 遺伝子は正の値をとることが分かった。従って、R495X 変異体はこれら局所的翻訳される遺伝子の 3'UTR を認識しやすい性質をもつことが分かった。

以上の知見から、R495X 変異体は局所的翻訳を受ける RNA 分子の特徴的な 3'UTR 領域を、認識し結合することで、局所的翻訳機構の破綻を引き起こすという新規分子機構の存在が示唆された (Figure 21C)。また、軸索で機能する遺伝子である *Actb*, *Mapt* の 2 遺伝子と

特に結合していたことから、軸索での局所的翻訳機構を破綻させている可能性が考えられた。

8. *Actb*, *Mapt* mRNA との結合に RRM ドメインが寄与する。

次に、*Actb*, *Mapt* mRNA との結合に、構造体形成及び RRM ドメインが寄与するか明らかにするため、RNA-IP 法 (Figure 22A) を用い検証を行った。マウス ES 細胞由来神経細胞に EGFP-FUS WT, EGFP-FUS R495X, EGFP-FUS R495X Δ Gly-rich, EGFP-FUS R495X 4FL の 4 変異体を発現させ、RNA-IP 法を用い FUS-RNA 複合体を回収した。その後 RNA を抽出し RT-PCR を行うことで、各変異体と *Actb*, *Mapt* mRNA との結合量を検証した。

その結果、4FL 変異体では、R495X 変異体と比較して *Actb*, *Mapt* mRNA との結合量の減少が観察された。また、 Δ Gly-rich 変異体では、*Mapt* mRNA のみ結合量の減少が観察された (Figure 22B, 22C)。これら結果より、R495X 変異体は RRM ドメインを介して、局所的翻訳される RNA である *Actb*, *Mapt* と結合することが分かった。また、*Mapt* mRNA との結合には Gly-rich ドメインも一部寄与することが示唆された。

小括 構造体形成による細胞内変化の解明

Figure 13~22 の結果から、R495X 構造体は RRM ドメインを介した RNA との結合を介して神経細胞死を引き起こすこと、R495X 変異体は局所的翻訳される RNA の 3'UTR を認識しやすい傾向にあること、さらに軸索で局所的に翻訳される RNA 分子である *Mapt*, *Actb* mRNA との結合に RRM ドメインが寄与することが分かった。

以上の結果から、今後さらなる検証が必須であるが R495X 構造体は RRM ドメインを介して局所的翻訳機構を破綻させることで神経細胞死を引き起こす、新規分子機構の存在が示唆された (Figure 23)。

考察

本研究は FUS R495X 変異による ALS 発症機構の解明に向け、R495X 変異体の構造体形成分子機構の解明と R495X 構造体形成による細胞内変化について明らかにすることを目的に解析を行った。

R495X 構造体形成分子機構に関しては以下の点を明らかにした。

- 1) 各 RNA 結合ドメインの欠損変異体を用いた解析から、Gly-rich, RGG 1, RGG 2 ドメインが構造体形成に必須であることを示した。また、ZnF ドメインが構造体形成に一部寄与することを示した。さらに、CLIP 法を用いた解析から、構造体を形成しない欠損体である Δ Gly-rich, Δ RGG1, Δ RGG2 では R495X 変異体と比較して RNA との結合量が約 9 割減少することを示した。
- 2) 精製系を用いた解析から FUS は RNA と共に相転移し、さらに FUS の相転移を RNA が促進することを示した。この結果より、R495X 変異体は RNA との相互作用を介して相転移が促進された結果、構造体を形成することが示唆された。

以上の結果から、FUS は RNA と相互作用することで相転移する性質をもち、R495X 変異体は Gly-rich, RGG 1, RGG 2 ドメインを介して RNA と相互作用することにより相転移が促進された結果、構造体を形成すると考えられる。

本研究の解析から、FUS R495X 変異体の構造体形成に RNA との結合が寄与することを示した。しかし FUS WT と R495X 変異体とでは RNA との結合量には有意な変化は観察されなかった (Figure 11)。この結果から、R495X の構造体形成には、①変異による細胞質の局在増加、そして②細胞質における RNA との相互作用、の 2 点が重要であることが示唆される。細胞質への局在増加が R49X 構造体形成に寄与する機構として、いくつかの可能性が考えられる。

まず、結合する RNA の違いにより相転移への影響が異なる可能性が考えられる。これまで所属研究室では、WT は核内にて主に pre-mRNA のイントロン領域に結合し、R495X 変異体は細胞質にて mRNA の 3'UTR および CDS と結合することを示している (Nakaya T and Maragkakis M. 2018)。これら結合 RNA の違いにより FUS の相転移に与える影響が異なる可能性が考えられる。実際、Stress を受けた際に形成される Stress granule において、特異的に排除される RNA 分子が存在することも報告されており (Fay MM. and Anderson PJ.2018)、RNA の構造、配列によって相転移に与える影響が異なる可能性は十分に考えら

れる。今後、細胞分画法等を用い核、細胞質内ごとの RNA を抽出し FUS の相転移への影響について検証することで、明らかにすることができると予想される。

また、その他の可能性として、核内と細胞質において FUS の RNA との結合様式が異なる可能性も考えられる。CLIP 法を用いた結合 RNA 量解析の結果、興味深いことに Gly-rich, RGG1, RGG2 ドメインの欠損変異体全てで、R495X 変異体と比較して RNA との結合量が 9 割近く減少していた。この結果から、R495X 変異体は Gly, RGG1, RGG2 ドメイン一つごとに RNA を認識しているのではなく、3つのドメイン全てを介して構造的に RNA を認識すると考えられる。現時点ではこの RNA の結合様式が構造体形成にどのように寄与するのかは未知である。しかし、今後 FUS 全長を基にした各 RNA 結合ドメインの欠損変異体を用いた同様の解析を行い、核内と細胞質とで RNA との結合様式が大きく異なっていた場合、RNA の結合様式の違いが構造体形成に寄与する可能性も考えられる。

また、RNA 以外の因子により相転移が制御されている可能性も考えられる。相転移の制御に関する報告は近年盛んに研究が行われており、様々な因子の関与が示唆されている。例を挙げると、本研究で着目した RNA 以外にも ATP や塩濃度、温度等が寄与することが報告されており (Kang J *et al.*, 2018)、これら因子の差異により細胞質においては環境的に相転移が起りやすい場が構築されている可能性も考えられる。

また、反対に核内においては何等かの因子が相転移を抑制している可能性も考えられる。ALS の原因因子である TDP-43, FUS, hnRNPA 等の RNA 結合タンパク質は、共通して天然変性領域をもち、相転移する性質をもつ (Franzmann TM and Alberti S. 2019)。これら分子は、主に核内に存在するため、核内ではそれらタンパク質が密集して存在すると予想される。相転移は天然変性領域を持った分子が局所的に高密度に存在することで引き起こされることから (Patel A *et al.*, 2015)、核内は極めて相転移が起りやすい場が形成されていると考えられる。しかし、DNA 損傷時等を除き、これらタンパク質の構造体は通常観察されない。従って、核内においては何等かの因子が抑制的に相転移を制御する可能性が考えられる。実際、核内輸送受容体 Kap β 2 が相転移を抑制することが報告されており (Guo L *et al.*, 2018)、このような分子の存在により核内においては不必要な相転移を抑制する機構が存在する可能性も考えられる。

R495X 構造体形成による細胞内変化については以下を明らかにした。

R495X 構造体内には R495X 変異体と RNA が共に集積すると考えられることから、集積した mRNA の翻訳、分解、局在等に異常が起こる可能性を考えた。そこで本研究では FUS 分子内の RNA 結合ドメイン及び R495X 結合 RNA に着目し解析を行った。

- 1) 各 RNA 結合ドメインの欠損変異体および 4FL 変異体を用いた解析から、構造体を形成しない Gly-rich, RGG1, RGG2 の欠損変異体は神経細胞死を誘引しないこと、RRM の欠損変異体及び 4FL 変異体は形成するにも関わらず、神経細胞死を誘引しないことを示した。この結果より、R495X 構造体は RRM ドメインを介した RNA との結合を介して神経細胞死を引き起こすことが示唆された。
- 2) R495X 変異体が結合する RNA について CLIP-RNAseq 法を用い得られた網羅的データを用い解析を行った。その結果、R495X 変異体は、細胞の形態形成及び軸索形成に関わる遺伝子群の 3'UTR に結合することが分かり、リボソームの構成に関わる遺伝子群の CDS に結合することが分かった。その後、3'UTR に着目した解析から、神経細胞の軸索や樹状突起内で局所的に翻訳される遺伝子の 3'UTR を好んで結合することが分かった。さらに、RNA-IP 法を用い局所的翻訳される遺伝子である *Actb*, *Mapt* との結合に RRM ドメインが寄与することを明らかにした。以上の結果から、R495X 変異体は軸索で RRM ドメインを介して *Actb*, *Mapt* mRNA と結合することで、軸索における局所的翻訳機構の破綻を引き起こす可能性が考えられる。

各 RNA 結合ドメインの欠損変異体および 4FL 変異体を発現させた細胞の経時的な観察結果から、R495X 構造体は RRM ドメインを介した RNA との結合を介して神経細胞死を引き起こすことが示唆されている。また、構造体を形成しない欠損変異体 (Δ Gly-rich, Δ RGG1, Δ RGG2) を発現させた細胞では、RRM ドメインは存在するにも関わらず神経細胞死が誘引されなかった。この結果から、R495X 変異により神経細胞死を誘引する機構には、構造体形成と RRM ドメインを介した RNA との結合の 2 点が必要であることが示唆された。精製系を用いた解析から FUS は RNA と共に相転移することが示唆されていることから、R495X 変異体が RRM ドメインを介して結合する RNA と共に集積し構造体内に捕捉することで神経細胞死を引き起こすと推測される。

CLIP 法を用いた解析から、RRM ドメインの欠損変異体において、R495X 変異体と比較して RNA との結合量に有意な減少は観察されなかった (Figure7) ことから、神経細胞死に関わる RNA は極めて限局的であると予測される。しかし、RNA-IP 法を用いた解析の結果、軸索において局所的翻訳を受ける代表的な遺伝子である *Mapt* と *Actb* との結合には

RRM ドメインが強く寄与することが示唆された (Figure 22)。この結果から、RRM ドメインは局所的翻訳される RNA に特徴的な 3'UTR を認識しやすい性質をもつ可能性が考えられる。今後、他の遺伝子についても検証を行いたいと考えている。

局所的翻訳機構が ALS 発症に寄与するかは現時点では不明である。しかし、ALS 病態での主要な変性部位である脊髄の運動神経は極めて長い神経細胞であることが知られている。そのため、細胞体から遠く離れた軸索中および末端部での局所的翻訳機構が担う役割は他の細胞と比較して大きいと予想される。よって、局所的翻訳機構の破綻が神経細胞死、ALS 発症に寄与する可能性は考えられるが、今後より詳細に解析を行う必要がある。

また、現在報告されている局所的に翻訳される遺伝子は 14 種類である。軸索や樹状突起に存在する RNA は、細胞分画法と RNA-seq 法を用いた解析により、2550 遺伝子も同定されている (I.J. Cajigas *et al.*, 2012)。この数から考えると、現在までに同定された 14 遺伝子という数字はあまりにも少ない。

本研究の結果、R495X 変異体は局所的翻訳される RNA の 3'UTR を好んで結合することが示唆された。この結果から、R495X 変異体の 3'UTR への結合量が多い遺伝子群の中には、現時点では未同定の局所的翻訳される遺伝子が含まれている可能性が示唆される。

今後 Puro-PLA 法等を用い R495X 変異体が 3'UTR を好んで結合する遺伝子について順に検証を行うことで、新規局所的翻訳遺伝子の発見、そして局所的翻訳機構の破綻による ALS 発症機構のより詳細な機構を明らかできると期待できる。

R495X 変異体の 3'UTR における結合モチーフである UGUGUGUG モチーフは、TDP-43 の結合モチーフであることが知られている (Tollervey JR *et al.*, 2011)。TDP-43 は ALS 患者のうち約 9 割の患者で凝集体が観察され、最大の原因因子であると考えられている。TDP-43 と FUS の構成ドメインは類似しているが、RNA との結合様式は FUS とは異なると考えられる。CLIP 法の結果より、FUS は Gly-rich, RGG1, RGG2 ドメインを介して大部分の RNA と結合していたのに対して、TDP-43 は主として RRM1 と RRM2 の 2 領域が RNA との結合に寄与すると考えられている (Buratti E *et al.*, 2001)。しかし、本解析の結果、興味深いことに 3'UTR 領域においては R495X 変異体の結合モチーフは TDP-43 のモチーフと同様の UGUGUGUG モチーフが検出された。この結果から、FUS と TDP-43 は 3'UTR 領域においては共通の RNA を認識する可能性が考えられる。従って、本研究での 3'UTR に着目した解析により示唆された、局所的翻訳機構の異常を介した ALS 発症機構は、FUS と TDP-43 に共通したより普遍的な ALS 発症機構の解明につながる可能性が考えられる。

5.実験手法

Plasmid

以下の plasmid は当研究室保有のものを使用した。

EGFP/pSLIK

EGFP-FUS /pSLIK

EGFP-FUS R495X/pSLIK

なお plasmid の精製には FastGene Plasmid mini kit (日本ジェネティクス) を使用した。配列の確認には BigDye Terminator Cycle Sequencing に基づきサンプル調製を行い、3100 Data Collection (Applied Biosystem) を使用した。

作製した各 construct について以下に手法を示す。

pSLIK vector の作製

Entry vector である pEN vector に目的配列を組み込み、LR recombination (Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix, Life Technologies) を用い pSLIK vector に目的配列を導入した。以下 pEN vector への目的配列の挿入は Mega primer 法を用いて行った。

各鑄型 plasmid を用いて AccuprimePfx により PCR 反応をおこなった。その後、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動によって分離した後、目的産物に相当する断片をゲルから切り出し、FastGene ゲル/PCR 抽出キット (日本ジェネティクス) を用いて DNA を抽出した。得られた 1st PCR products を megaprimer としてもちい、それに対応する primer を加え、2 回目の PCR 反応をおこなった。1 回目と同様に DNA 抽出をおこない、次いで、insert, vevtor にたいしてそれぞれ制限酵素による切断をおこなった。反応液は各制限酵素 1 µL、推奨 buffer 4 µl、DNA 溶液を加え、DDW で total 40 µl になるように調整した。37°C、1hr incubate することで制限酵素による切断をおこなった後、先述の通りにアガロースゲル電気泳動による分離、目的 DNA の抽出をおこなった。

ついで、vector 0.5 µl、insert 3.0 µl、2x ligation mix (ニッポンジーン) を 3.5 µl を混合し、16°C、30 min、incubate することで ligation 反応をおこなった。本反応液に 50µl の competent E. coli (DH5α) を加え、on ice で 5 min incubate し、42°C で 30 秒間 incubate したあと、on ice で 2 分間 incubate した。LB (Geneticin) plate に播種し、37°C で 16hr 培養した。Single colony から plasmid を精製し、配列を確認した。

以下に上記手法で作製した各 construct、制限酵素 (5'側/3'側)、使用した鑄型 plasmid、megaprimer の作製に用いた primer の塩基配列、2 回目の PCR 反応に用いた primer の塩基配列を記す

EGFP-FUS R495XΔ Gly-rich /pEN (Spe1/ Not1)

1st PCR (megaprimer)

1. 鑄型 plasmid EGFP /pEN
Primer for : cccgggactagtcaccatggtgagca
rev : atcgtttgaggccatctgtacagctc
2. 鑄型 plasmid FLAG- FUS Δ RGG1/pEN
Primer for : gagctgtacaagatggcctcaaacga
rev : tacgcgccgctcagaagcctccacgggtccc

2nd PCR

- Primer for : cccgggactagtcaccatggtgagca
rev : tacgcgccgctcagaagcctccacgggtccc

EGFP-FUS R495X Δ RRM /pEN (Spe1/ Not1)

1st PCR (megaprimer)

1. 鑄型 plasmid EGFP /pEN
Primer for : cccgggactagtcaccatggtgagca
rev : atcgtttgaggccatctgtacagctc
2. 鑄型 plasmid FLAG- FUS Δ RRM/pEN
Primer for : gagctgtacaagatggcctcaaacga
rev : tacgcgccgctcagaagcctccacgggtccc

2nd PCR

- Primer for : cccgggactagtcaccatggtgagca
rev : tacgcgccgctcagaagcctccacgggtccc

EGFP-FUS R495X Δ RGG1 /pEN (Spe1/ Not1)

1st PCR (megaprimer)

1. 鑄型 plasmid EGFP /pEN
Primer for : cccgggactagtcaccatggtgagca
rev : atcgtttgaggccatctgtacagctc
2. 鑄型 plasmid FLAG- FUS Δ RGG1/pEN
Primer for : gagctgtacaagatggcctcaaacga
rev : tacgcgccgctcagaagcctccacgggtccc

2nd PCR

- Primer for : cccgggactagtcaccatggtgagca
rev : tacgcgccgctcagaagcctccacgggtccc

EGFP-FUS R495X Δ ZnF /pEN (Spe1/ Not1)

1st PCR (megaprimer)

1. 鑄型 plasmid EGFP /pEN
Primer for : cccgggactagtcaccatggtgagca
rev : atcgtttgaggccatctgtacagctc
2. 鑄型 plasmid FLAG- FUS Δ ZnF/pEN
Primer for : gagctgtacaagatggcctcaaacga
rev : tacgcgccgctcagaagcctccacgggtccc

2nd PCR

- Primer for : cccgggactagtcaccatggtgagca
rev : tacgcgccgctcagaagcctccacgggtccc

EGFP-FUS R495X Δ RGG2 /pEN (Spe1/ Not1)

1st PCR (megaprimer)

1. 鑄型 plasmid EGFP /pEN
Primer for : cccgggactagtcaccatggtgagca
rev : atcgtttgaggccatctgtacagctc
2. 鑄型 plasmid FLAG- FUS Δ RGG3/pEN
Primer for : gagctgtacaagatggcctcaaacga
rev : tacgcgccgctcagaagcctccacgggtccc

2nd PCR

- Primer for : cccgggactagtcaccatggtgagca
rev : tacgcgccgctcagaagcctccacgggtccc

EGFP-FUS R495X 4FL /pEN (Spe1/ Not1)

1st PCR (megaprimer)

1. 鑄型 plasmid EGFP /pEN
Primer for : cccgggactagtcaccatggtgagca
rev : atcgtttgaggccatctgtacagctc
2. 鑄型 plasmid FLAG- FUS 4FL/pEN
Primer for : gagctgtacaagatggcctcaaacga
rev : tacgcgccgctcagaagcctccacgggtccc

2nd PCR

- Primer for : cccgggactagtcaccatggtgagca
rev : tacgcgccgctcagaagcctccacgggtccc

細胞培養

1.HEK293T 細胞

HEK293T 細胞は 56°C で 30 分間処理し非動化した FBS (MP) を 10% (v/v) 、含む DMEM (Wako) 中で 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

2.マウス ES 細胞

マウス ES 細胞は Feederless の状態で、ES 培地(200 mL MEM, 37.5 mL ES cell tested fetal bovine serum (FBS, SH30070.03,Hyclone) , 2.5 mL of 200 mM L-glutamine (25030-081,Invitrogen) ,180 µL of diluted 2-mercaptoethanol (diluted 1/100 in PBS , M-7522 ,Sigma) , and 25 µL of LIF/ESGRO (ESG1107, Chemicon)) 中で 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。プレートは Gelatin でコートしたものをを用いた。

3.神経細胞への分化

1 日目、ES 細胞を ADFNK 培地 (250 mL of Advanced DMEM/F12 (12634-010, Invitrogen) . 250 mL of Neurobasal Medium (21103-049, Invitrogen) , 57 mL of knockout-SR(10828-028, Invitrogen), 5.7 mL of Pen/Strep,5.7 mL of 200 mM L-glutamine, and 400µL of diluted 2-mercaptoethanol (diluted 1/100 in PBS)) に播種し 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。2 日目、浮遊している Embryonic body (EB) を再度 ADFNK 培地に播種した。3 日目、EB をレチノイン酸含有 (5 µM) ADFNK 培地に播種し 3 日間培養した。6 日目、培地を神経細胞用 (ADFNB+GDNF) 培地 (24 mL of Advanced DMEM/F12 ,24 mL of Neurobasal medium , 0.5 mL of Pen/Strep , 0.5 mL of L-glutamine, 1 mL of B27 50x supplement (17504-044, Invitrogen) , 0.5 µL of GDNF (5 ng/mL final concentration)) に置換し、7 日目に EB を分散して、神経細胞を得た。EB の分散は以下にして行った。EB を回収し、PBS で wash 後、0.05% Trypsine/EDTA で 6 min incubate し、100 µL FBS を添加させることで反応を停止した。培地を DNase/L-15 に置換後、ピペットを用いて分散させ、5min incubate し、上清に含まれる分散した細胞を回収し、神経細胞用培地に置換して poly-L-lysine/Laminin コートしたプレートに播種した。

Lentivirus を用いた発現方法

1.LentiVirus の作製

6 well dish (Corning) に HEK293T 細胞を 1.25 cells/well の濃度で播種した。翌日、作製した pSLIK plasmid (2.0 µg) 、 packaging vector である psPAX2 (1.5 µg) , pMD2G (0.5 µg) plasmid を 60 µl の OPTI-MEM で希釈した溶液と、6 µl の Lipofecamine 2000 (Invitrogen) を 100 µl の OPTI-MEM に希釈し室温で 5 min incubate した溶液を混和し、20 min 室温で

incubate した。これを 1.8 mL の DMEM / 10% FBS 培地に添加し transfection した。翌日培地を交換し、24 時間後、48 時間後に培地を回収した。得られた培地を filtrate 後、100,000 ×g で 90 分遠心し濃縮した。沈殿したウイルスパーティクルを ADFNB 培地で懸濁し、-80°C で保存した。

LentiVirus を用いた遺伝子導入及び発現誘導

pSLIK vector を用い作製した LentiVirus の目的配列の発現調節は、Tet-on system を利用しており、Doxycycline の添加により発現が誘導される。播種した神経細胞に LentiVirus を加え、翌日 4 µg/mL の Doxycycline を含む神経細胞用培地に置換して発現誘導した。この置換を 24 時間おきに行い、目的タンパク質を発現させた神経細胞を得た。

各種実験手法

Western blotting (WB)

5x Tris-Glycine Sample buffer (final conc. 1x) を加え 熱処理 (100°C、5 min) したサンプルを Tris-Glycine gel にアプライし、電気泳動によりタンパク質を分離し、Pure Nitrocellulose Blotting Membrane (Pall corporation) へ転写した。Membrane を 5% skim milk / TBS-T で 1 hr, R.T. で incubate することで blocking をおこなった。TBS-T で洗浄後、各種一次抗体と一晩、4°C で incubate した。Membrane を TBS-T で洗浄後、各種二次抗体と 1 hr, R.T. で incubate した。TBS-T で洗浄後、ECL™ Western blotting detection reagent (GE Healthcare) または Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad) を用いて化学発光させ、LAS-4000 mini (富士フイルム株式会社) または Hyperfilm (GE Healthcare) で検出をおこなった。定量は LAS-4000 mini で取得した画像にたいし multi gage (富士フイルム株式会社) によっておこなった。

WB に用いた一次抗体とその希釈率

rabbit anti-GFP polyclonal antibody (MBL) : 希釈率 1/5000

mouse anti-Tubulin β -III (TuJ1) monoclonal antibody (R&D systems) : 希釈率 1/500

WB に用いた二次抗体とその希釈率

anti-mouse IgG HRP-linked species-specific whole antibody (GE Healthcare)

: 希釈率 1/5000

anti-rabbit IgG HRP-linked species-specific whole antibody (GE Healthcare)

: 希釈率 1/5000

免疫染色

poly-L-lysine/Laminin コートしたプレートカバーガラス (Nalge Nunc International) に神経細胞を播種して transfection し 24 時間後、PBS で wash し、3.7% (w/v) PFA/PBS で室温、30 min incubate して細胞を固定した。PBS で wash して、0.1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) BSA /PBS で室温、10 分間 incubate する事で脱脂した。PBS で wash 後、3% (w/v) BSA/PBS で 10 分間 blocking を行った。PBS で wash し、以下に示す 1 次抗体を 1% (w/v) BSA/PBS で希釈した溶液を加え、4°Cで一晩 incubate した。PBS で 3 回 wash した後、1% (w/v) BSA/PBS に 1/500 希釈した 2 次抗体および 1/1000 希釈した DAPI の溶液を加えて、室温で 1 hr、incubate した。PBS で wash 後、immunomount (Thermo)を用いて包埋した。サンプルは蛍光顕微鏡 (Keyence) で観察した。

免疫染色に用いた 1 次抗体とその希釈率

mouse anti-Tubulin β -III (TuJ1) monoclonal antibody (R&D systems) : 希釈率 1/1000

免疫染色に用いた 2 次抗体(希釈率 1/1000)

anti-mouse Alexa Fluoro 488 antibody (invitrogen)

anti-rabbit Alexa Fluoro 633 antibody (invitrogen)

100 μ M DAPI

Fluorescence in situ hybridization(FISH)

EGFP 発現細胞における FISH 法は Oliva AA Jr and Swann JW. 2001 を元に少し改変し行った。EGFP 発現細胞を PBS で wash し、3.7% (w/v) PFA/PBS で室温、30 min incubate して細胞を固定した。PBS で wash して、0.5% (v/v) Triton X-100 /PBS で室温、10 分間 incubate する事で脱脂した。PBS で wash 後、Urea-Hybridization buffer を加え 55°C、1 時間 incubate した。その後、Cy5-Oligo (dT) 30mer もしくは Cy5-Oligo (dA) 30mer probe を添加し 55°C,O/N した。2 x ssc buffer を加え 55°Cで 30 分 incubate、0.1 x ssc buffer を加え 55°C、で 30 分 incubate することで wash した。さらに、PBS で wash したのち、細胞観察および免疫染色を行った。

RT-PCR

得られた RNA 1 μ g を用い、終濃度 5 μ M の Random hexamer primer および終濃度 2.5 mM の dNTP mix を混和して heat shock を行い、等量の 2x cDNA synthesis buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 100 U Superscript III, 2 U RNAaseOUT (Invitrogen))を加えて 50°Cで 50 min 逆転写反応を行った。

作製した cDNA を用いて PCR 反応を行い、1 μ g/ml の EtBr を含む 1.0% agarose gel にて電気泳動後 UV 下で観察を行った。使用した primer を以下に示す。

Gapdh fwd: CAATGTGTCCGTCGTGGATCT
 Rev: GTCCTCAGTGTAGCCCAAGATG

Actb fwd: CGGACTGTTACTGAGCTGCG
 Rev: TGTTTGCTCCAACCAACTGC

Mapt fwd: AAAGGTTCTAGCCCACCACG
 Rev: CTTGGAGGAACCAGGCCAAT

In vitro phase separation assay

GST-TEV-FUS WT を大腸菌 (BL-21) を用い発現させ、その後 MagneGST™ Glutathione Particles(Promega)を用い精製した。Beads からの溶出は Assembly buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM trehalose, 0.5 mM EDTA, 20 mM glutathione and PI)を用いた。その後、TEV protease により GST の部分を切断した。FUS タンパク質のみでは Assembly buffer に可溶化されないため、遠心により pellet に回収される。FUS は塩濃度の高い buffer には可溶化されるため、High Salt buffer (50 mM Tris-HCl, 750 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.4 and PI) を加えたのち、sonication し可溶化した。その後、マウス ES 細胞由来神経細胞から抽出した RNA(1.5 μg)を加え遠心した。得られた Sup を Diffuse fraction, Pellet を Phase separated fraction とした。

免疫沈降法

Doxycycline を加え発現誘導後、48hr 後、PBS で wash し、細胞を回収した。3,000 rpm, 5 min 遠心することで細胞を ppt に集め 50 μL の RIPA buffer (PI+) を加えたのち、sonication し細胞を可溶化した。3,000 rpm, 5 min 遠心し上清を cell lysate とした。1 sample あたり 10μL の ProteinG-Dynabeads と 1 μL の抗 GFP 抗体 (MBL) を 300μL の RIPA buffer (PI+) 中で混和し、4°C、1hr 攪拌した。RIPA buffer (PI+) で wash 後、cell lysate 40 μL に加え、4°C、30 min 攪拌した。Magnetic rack で回収し、RIPA buffer (PI+) で 2 回洗浄した。Beads からの Elute の仕方は免疫沈降後行う解析により異なるが、western blot により解析する場合、20 μL の S.B. mix を加え、5 分間煮沸し sample とした。

Crosslinking immunoprecipitation(CLIP 法)

発現誘導後 72hr 後に、培養上清を除去し、PBS で wash し、250 μL の PBS を加えた。その後、UV stratalinker 1800 (STRATAGENE)を用い 4000 mJ/m² で UV 照射し、RNA と RNA 結合分子を共有結合させた。直ちに細胞を回収し、3,000 rpm, 5 min 遠心することで細胞を ppt に集め 50μL の PXL buffer(RNase inhibitor ,DNase, PI+)を加え可溶化した。抗 GFP 抗体(MBL)を用い免疫沈降し、RNA-FUS 複合体を得た。得られた複合体中の RNA のうち、FUS と結合していない領域を RNaseT1 を加え分解し、FUS と結合している領域を

T4PNK を用い γ -³²P ATP の ³²P を付加することで標識した。SDS-PAGE、メンブレンへの転写を行い、³²P 標識した RNA-FUS 複合体をメンブレンへ吸着させた。その後、X線フィルムへ感光させ検出した。定量は ImageJ を用い行った。

RNA immunoprecipitation (RNA-IP 法)

発現誘導後 72hr 後に、細胞を回収した。RSB200 buffer (RNase inhibitor ,DNase, PI+) を加え可溶化した。抗 GFP 抗体(MBL)を用い免疫沈降し、RNA-FUS 複合体を得た。得られた複合体中の RNA を Trizol reagent を用い抽出したのち、RT-PCR を行った。

Bioinformatics 解析

・ゲノムへのマッピング

TopHat2 (Kim D *et al.*, 2013)を用い行った。得られた BAM ファイルを BigWig ファイルに置換したのち、UCSC genome browser にて可視化した。

・Read のカウント

R package “featureCount” (Liao Y *et al.*, 2014)を用い行った。

・Read-distribution の解析

RSeQC (Wang L *et al.*, 2012)ソフトウェアを用い行った。

・Gene ontology enrichment 解析

PANTHER (<http://pantherdb.org/>) を用い 3'UTR, CDS における結合量の多い Top50 遺伝子について行った。

・結合モチーフの探索

MACS2 ソフトウェアを用い Peak call を行ったのち、 R package “r GADeM” (Droit A *et al.*, 2019)を用いた。

・リファレンスゲノム

各領域のリファレンスゲノムは、UCSC table browser を用い入手した。

・read の抽出

各領域のリファレンスゲノムと重複する CLIP-read の抽出は BEDTools (Quinlan AR and Hall IM. 2010)を用い行った。

実験に用いた buffer の 組成

- TBS-T : 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.05% Tween20
- PBS : 10 mM sodium phosphate buffer [pH 7.4], 150 mM NaCl
- 5x Sample buffer : 15% SDS, 40% Glycerol, 0.2 M Tris-HCl pH6.8, 5mM EDTA [pH8.0], 10% 2-Mercaptoethanol, 64 ng/ml Bromophenol blue
- RIPA buffer : 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 0.5% DOC, 0.5% NP-40, 0.5% SDS, PI mix
- LB medium: 1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 170 mM NaCl
- PI mix : 5 µg/ml Leupeptin, 5 µg/ml Pepstatin A, 5 µg/ml Chymostatin
- PXL buffer : 0.1% SDS 0.5% deoxycholate 0.5% NP-40
- RSB200: 10 mM Tris-Cl, pH 7.4 ,10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂
- SSC buffer: 15 mM Sodium citrate ,150mM NaCl
- Urea-Hybridization buffer: 1.0 M urea, 5× standard saline citrate (SSC), 1× Denhardt's reagent, 25 mM EDTA, 50 mM TrisHCl, pH 7.5, 0.05% glycine, 0.5% Tween-20

6.参考文献

Anderson P, Kedersha N.(2006)RNA granules.
J Cell Biol. 172(6):803-8.

Andersson MK, Ståhlberg A, Arvidsson Y, Olofsson A, Semb H, Stenman G, Nilsson O, Aman P. (2008)The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response.
BMC Cell Biol.,9,37

Birsa N, Bentham MP, Fratta P.(2019) Cytoplasmic functions of TDP-43 and FUS and their role in ALS.
Semin Cell Dev Biol. S1084-9521(18)30197-6.

Boke E, Ruer M, Wühr M, Coughlin M, Lemaitre R, Gygi SP, Alberti S, Drechsel D, Hyman AA, Mitchison TJ(2016) Amyloid-like Self-Assembly of a Cellular Compartment.
Cell. 166(3):637-50.

Bosco DA, Lemay N, Ko HK, Zhou H, Burke C, Kwiatkowski TJ Jr, Sapp P, McKenna-Yasek D, Brown RH Jr, Hayward LJ.(2010) Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules.
Hum Mol Genet. 19(21):4160-75.

Boylan K.(2015)Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis.
Neurol Clin. 33(4):807-30.

Buratti E, Baralle FE.(2001) Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9.
J Biol Chem. 276(39):36337-43.

Campbell DS, Holt CE.(2001) Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation.
Neuron. 32(6):1013-26.

Daigle JG, Lanson NA Jr, Smith RB, Casci I, Maltare A, Monaghan J, Nichols CD,

Kryndushkin D, Shewmaker F, Pandey UB.(2013) RNA-binding ability of FUS regulates neurodegeneration, cytoplasmic mislocalization and incorporation into stress granules associated with FUS carrying ALS-linked mutations.

Hum Mol Genet. 22(6):1193-205.

Dormann D, Rodde R, Edbauer D, Bentmann E, Fischer I, Hruscha A, Than ME, Mackenzie IR, Capell A, Schmid B, Neumann M, Haass C.(2010) ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import.

EMBO J. 29(16):2841-57.

Droit A, Gottardo R, Robertson G, Li L (2019). rGADEM: de novo motif discovery. R package version 2.34.1.

Fay MM, Anderson PJ.(2018)The Role of RNA in Biological Phase Separations.

J Mol Biol. 430(23):4685-4701.

Fallini C, Donlin-Asp PG, Rouanet JP, Bassell GJ, Rossoll W.(2016)Deficiency of the Survival of Motor Neuron Protein Impairs mRNA Localization and Local Translation in the Growth Cone of Motor Neurons.

J Neurosci. 36(13):3811-20.

Franzmann TM, Alberti S.(2019) Prion-like low-complexity sequences: Key regulators of protein solubility and phase behavior.

J Biol Chem.294(18):7128-7136.

Guo L, Kim HJ, Wang H, Monaghan J, Freyermuth F, Sung JC, O'Donovan K, Fare CM, Diaz Z, Singh N, Zhang ZC, Coughlin M, Sweeny EA, DeSantis ME, Jackrel ME, Rodell CB, Burdick JA, King OD, Gitler AD, Lagier-Tourenne C, Pandey UB, Chook YM, Taylor JP, Shorter J(2018) Nuclear-Import Receptors Reverse Aberrant Phase Transitions of RNA-Binding Proteins with Prion-like Domains.

Cell.173(3):677-692.e20.

Holt CE, Martin KC, Schuman EM.(2019)Local translation in neurons: visualization and function.

Nat Struct Mol Biol. 26(7):557-566.

Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y.(2010)Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease.

Neuron.;68(4):610-38

I.J. Cajigas, G. Tushev, T.J. Will, S. Tom Dieck, N. Fuerst, E.M. Schuman

The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging

Neuron, 74 (2012), pp. 453-466

Kato M, Han TW, Xie S, Shi K, Du X, Wu LC, Mirzaei H, Goldsmith EJ, Longgood J, Pei J, Grishin NV, Frantz DE, Schneider JW, Chen S, Li L, Sawaya MR, Eisenberg D, Tycko R, McKnight SL.(2012) Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels.

Cell.149(4):753-67.

Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule.

Neuron.;43(4):513-25.

Kang J, Lim L, Song J.(2018) ATP enhances at low concentrations but dissolves at high concentrations liquid-liquid phase separation (LLPS) of ALS/FTD-causing FUS.

Biochem Biophys Res Commun. 504(2):545-551.

Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. (2013)TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions.

Genome Biol. 14(4):R36.

Kousaka A, Mori Y, Koyama Y, Taneda T, Miyata S, Tohyama M.(2009) The distribution and characterization of endogenous protein arginine N-methyltransferase 8 in mouse CNS.

Neuroscience. 163(4):1146-57.

Kuroda M, Sok J, Webb L, Baechtold H, Urano F, Yin Y, Chung P, de Rooij DG, Akhmedov A, Ashley T, Ron D.(2000) Male sterility and enhanced radiation sensitivity in TLS(-/-) mice.

EMBO J. 19(3):453-62.

Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A,

Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH Jr.(2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 323(5918):1205-8

Lagier-Tourenne C, Cleveland DW.(2009) Rethinking ALS: the FUS about TDP-43. *Cell*. 36(6):1001-4.

Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Hutt KR, Vu AQ, Baughn M, Huelga SC, Clutario KM, Ling SC, Liang TY, Mazur C, Wancewicz E, Kim AS, Watt A, Freier S, Hicks GG, Donohue JP, Shiue L, Bennett CF, Ravits J, Cleveland DW, Yeo GW.(2012) Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nat Neurosci*. 15(11):1488-97.

Law WJ, Cann KL, Hicks GG.(2006) TLS, EWS and TAF15: a model for transcriptional integration of gene expression. *Brief Funct Genomic Proteomic*.5(1):8-14

Lebedeva S, de Jesus Domingues AM, Butter F, Ketting RF.(2017). Characterization of genetic loss-of-function of Fus in zebrafish. *RNA Biol*. 14(1):29-35

Liao Y, Smyth GK and Shi W (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7):923-30.

Patel A, Lee HO, Jawerth L, Maharana S, Jahnel M, Hein MY, Stoyanov S, Mahamid J, Saha S, Franzmann TM, Pozniakovski A, Poser I, Maghelli N, Royer LA, Weigert M, Myers EW, Grill S, Drechsel D, Hyman AA, Alberti S.(2015) A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell*. 162(5):1066-77.

Maharana S, Wang J, Papadopoulos DK, Richter D, Pozniakovsky A, Poser I, Bickle M, Rizk S, Guillén-Boixet J, Franzmann TM, Jahnel M, Marrone L, Chang YT, Sternecker J, Tomancak P, Hyman AA, Alberti S.(2018) RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins.

Science. 360(6391):918-921.

Meissner M, Lopato S, Gotzmann J, Sauermann G, Barta A.(2003) Proto-oncoprotein TLS/FUS is associated to the nuclear matrix and complexed with splicing factors PTB, SRm160, and SR proteins.
Exp Cell Res. 283(2):184-95.

Molliex A, Temirov J, Lee J, Coughlin M, Kanagaraj AP, Kim HJ, Mittag T, Taylor JP.(2015) Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization.
Cell.163(1):123-33.

Morohoshi F, Arai K, Takahashi EI, Tanigami A, Ohki M.(1996) Cloning and mapping of a human RBP56 gene encoding a putative RNA binding protein similar to FUS/TLS and EWS proteins.
Genomics.38(1):51-7.

Murakami T, Qamar S, Lin JQ, Schierle GS, Rees E, Miyashita A, Costa AR, Dodd RB, Chan FT, Michel CH, Kronenberg-Versteeg D, Li Y, Yang SP, Wakutani Y, Meadows W, Ferry RR, Dong L, Tartaglia GG, Favrin G, Lin WL, Dickson DW, Zhen M, Ron D, Schmitt-Ulms G, Fraser PE, Shneider NA, Holt C, Vendruscolo M, Kaminski CF, St George-Hyslop P.(2015) ALS/FTD Mutation-Induced Phase Transition of FUS Liquid Droplets and Reversible Hydrogels into Irreversible Hydrogels Impairs RNP Granule Function.
Neuron. 88(4):678-90.

Oliva AA Jr, Swann JW.(2001) Fluorescence in situ hybridization method for co-localization of mRNA and GEP.
Biotechniques. 31(1):74-6, 78-81.

Quinlan AR, Hall IM.(2010) BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features.
Bioinformatics.26(6):841-2.

Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH Jr, Scott RW, Snider WD(1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after

axonal injury.

Nat Genet. 13(1):43-7.

Rogelj B, Easton LE, Bogu GK, Stanton LW, Rot G, Curk T, Zupan B, Sugimoto Y, Modic M, Haberman N, Tollervey J, Fujii R, Takumi T, Shaw CE, Ule J.(2012) Widespread binding of FUS along nascent RNA regulates alternative splicing in the brain.

Sci Rep. 2:603.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX(1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis.

Nature. 362(6415):59-62.

Rivera D, Fedele E, Marinari UM, Pronzato MA, Ricciarelli R.(2015) Evaluating the role of hnRNP-C and FMRP in the cAMP-induced APP metabolism.

Biofactors. 41(2):121-6.

Sama RR, Ward CL, Kaushansky LJ, Lemay N, Ishigaki S, Urano F, Bosco DA.(2013) FUS/TLS assembles into stress granules and is a prosurvival factor during hyperosmolar stress. J Cell Physiol. 228(11):2222-31.

Saha S, Weber CA, Nusch M, Adame-Arana O, Hoegge C, Hein MY, Osborne-Nishimura E, Mahamid J, Jahnel M, Jawerth L, Pozniakovski A, Eckmann CR, Jülicher F, Hyman AA.

Polar Positioning of Phase-Separated Liquid Compartments in Cells Regulated by an mRNA Competition Mechanism.

Cell. 166(6):1572-1584.e16.

Susanne tom Dieck, Lisa Kochen, Cyril Hanus, Ina Bartnik, Belquis Nassim-Assir, Katrin Merk, Thorsten Mosler, Sakshi Garg, Stefanie Bunse, David A. Tirrell, Erin M. Schuman(2015) Direct visualization of identified and newly synthesized proteins in situ.

Nat Methods. 12(5): 411–414

Tan AY, Manley JL.(2009) The TET family of proteins: functions and roles in disease.

J Mol Cell Biol. 1(2):82-92

Tollervey JR, Curk T, Rogelj B, Briese M, Cereda M, Kayikci M, König J, Hortobágyi T,

Nishimura AL, Zupunski V, Patani R, Chandran S, Rot G, Zupan B, Shaw CE, Ule J.(2011) Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci.* 14(4):452-8.

Tushev G, Glock C, Heumüller M, Biever A, Jovanovic M, Schuman EM.(2018) Alternative 3' UTRs Modify the Localization, Regulatory Potential, Stability, and Plasticity of mRNAs in Neuronal Compartments. *Neuron.* 98(3):495-511.e6.

Wang X, Arai S, Song X, Reichart D, Du K, Pascual G, Tempst P, Rosenfeld MG, Glass CK, Kurokawa R.(2008) Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature.* 454(7200):126-30.

Wang L, Wang, S, Li, W. (2012). RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(16), 2184–2185.

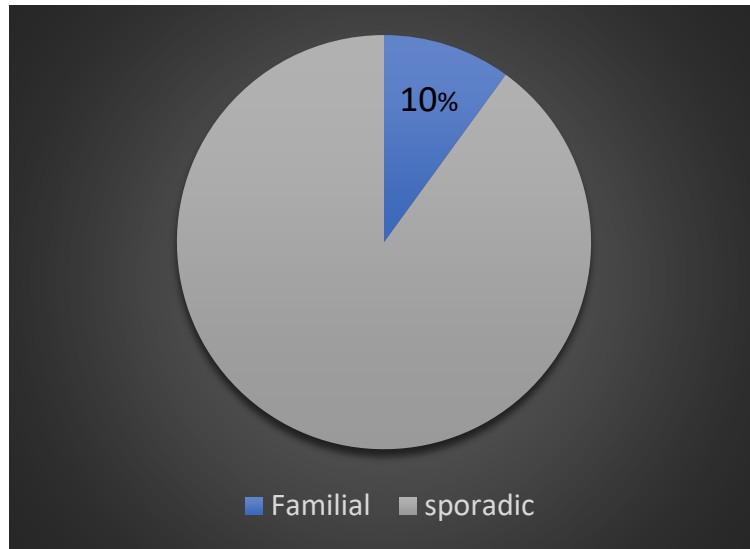
Yasuda K, Clatterbuck-Soper SF, Jackrel ME, Shorter J, Mili S.(2017) FUS inclusions disrupt RNA localization by sequestering kinesin-1 and inhibiting microtubule detyrosination. *J Cell Biol.* 216(4):1015-1034.

Zinszner H, Albalat R, Ron D. (1994) A novel effector domain from the RNA-binding protein TLS or EWS is required for oncogenic transformation by CHOP. *Genes Dev.* 8(21):2513-26

Zinszner H, Sok J, Immanuel D, Yin Y, Ron D.(1997) TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling. *J Cell Sci.* 110 (Pt 15):1741-50.

7. 図表

A



B

家族性ALS遺伝子変異

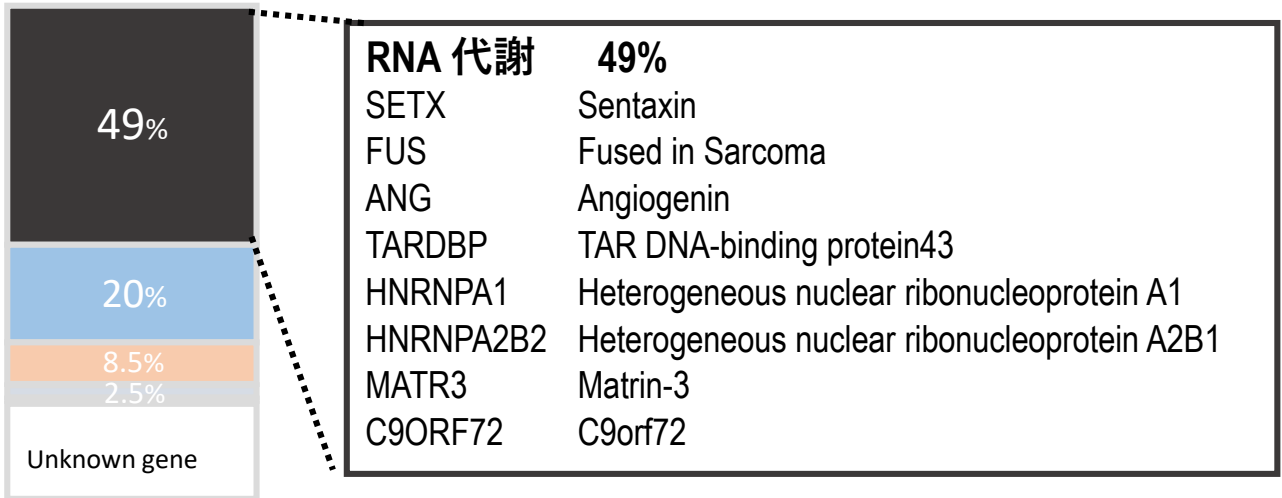


Figure 1 ALS 原因因子

- (A) ALS患者の内約10%は家族性患者が占める。
- (B) 家族性患者のうち約半数の患者がRNA代謝に寄与する遺伝子の変異が同定されている。

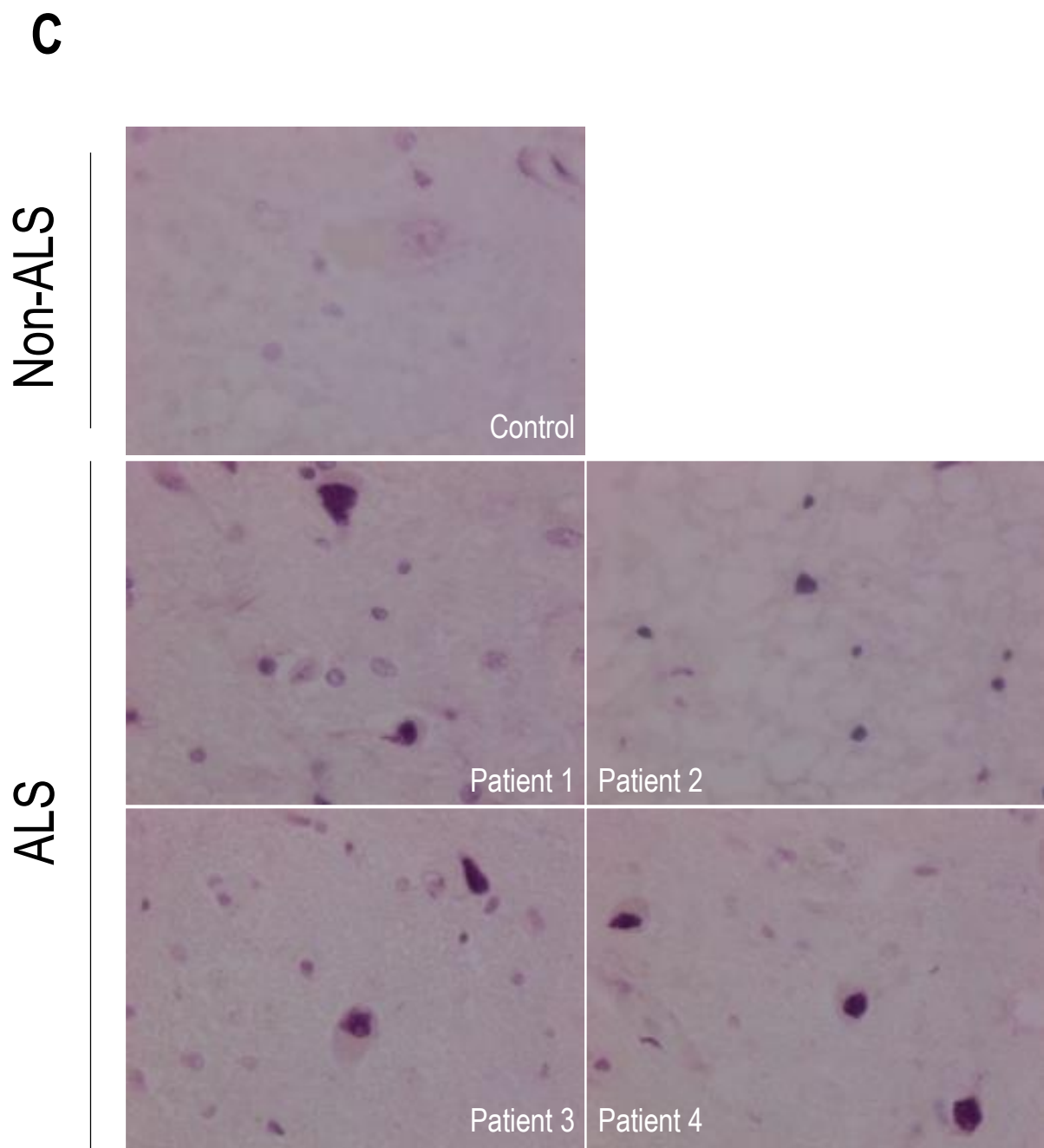


Figure 2 孤発性ALS患者脊髄におけるFUSの沈着

孤発性ALS患者の脊髄を抗FUS抗体で免疫染色した。健常者では観察されないFUSの沈着がALS患者脊髄において観察された。

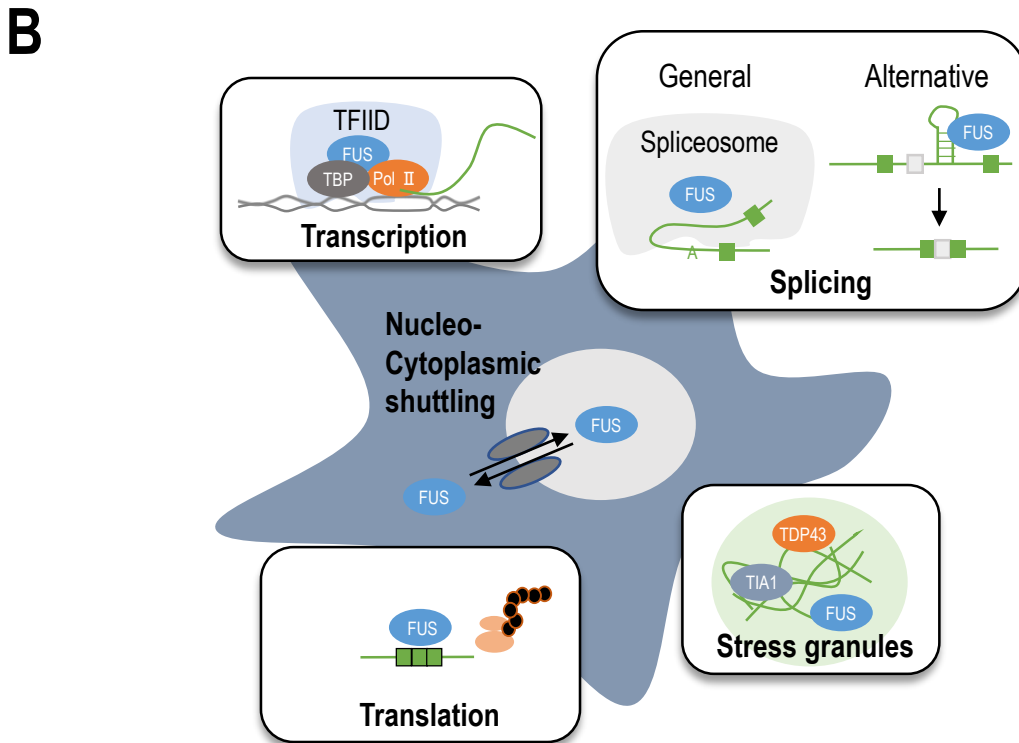
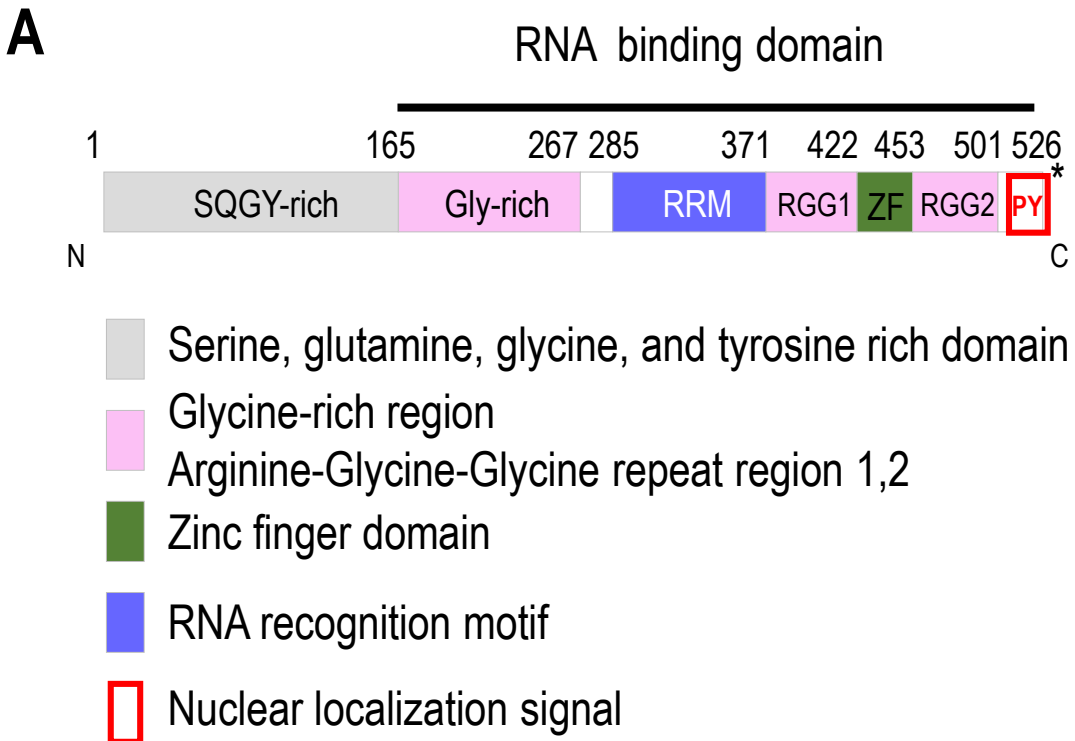


Figure 3 Fused in Sarcoma (FUS)

- (A) FUSのドメイン構造を示した。
- (B) FUSは核内、細胞質内において様々な役割を担う。

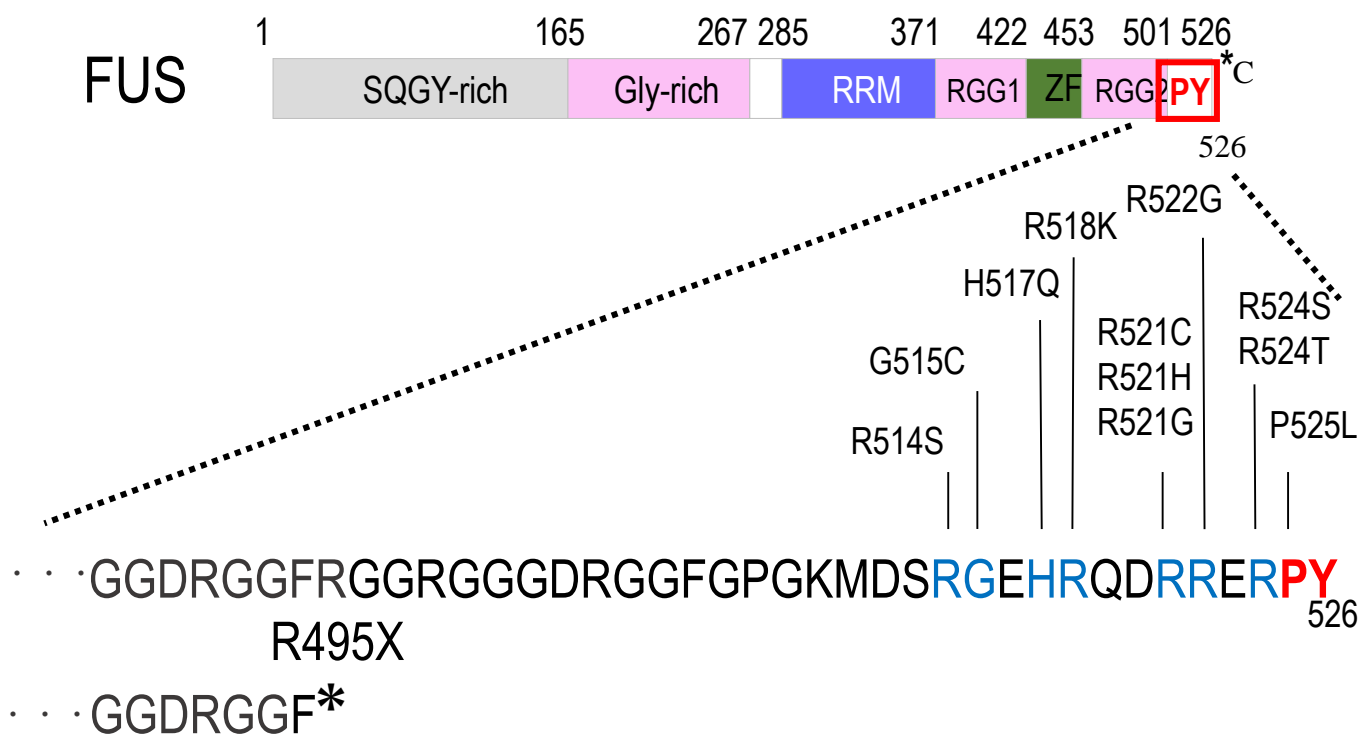


Figure 4 FUS 内のALS関連遺伝子変異箇所

FUS 内のALS関連遺伝子変異箇所を示した。FUS内の家族性ALSの遺伝子変異の多くはC末端に存在するPY-NLSやその周囲に存在し,同変異体群は細胞質への局在が増加する。

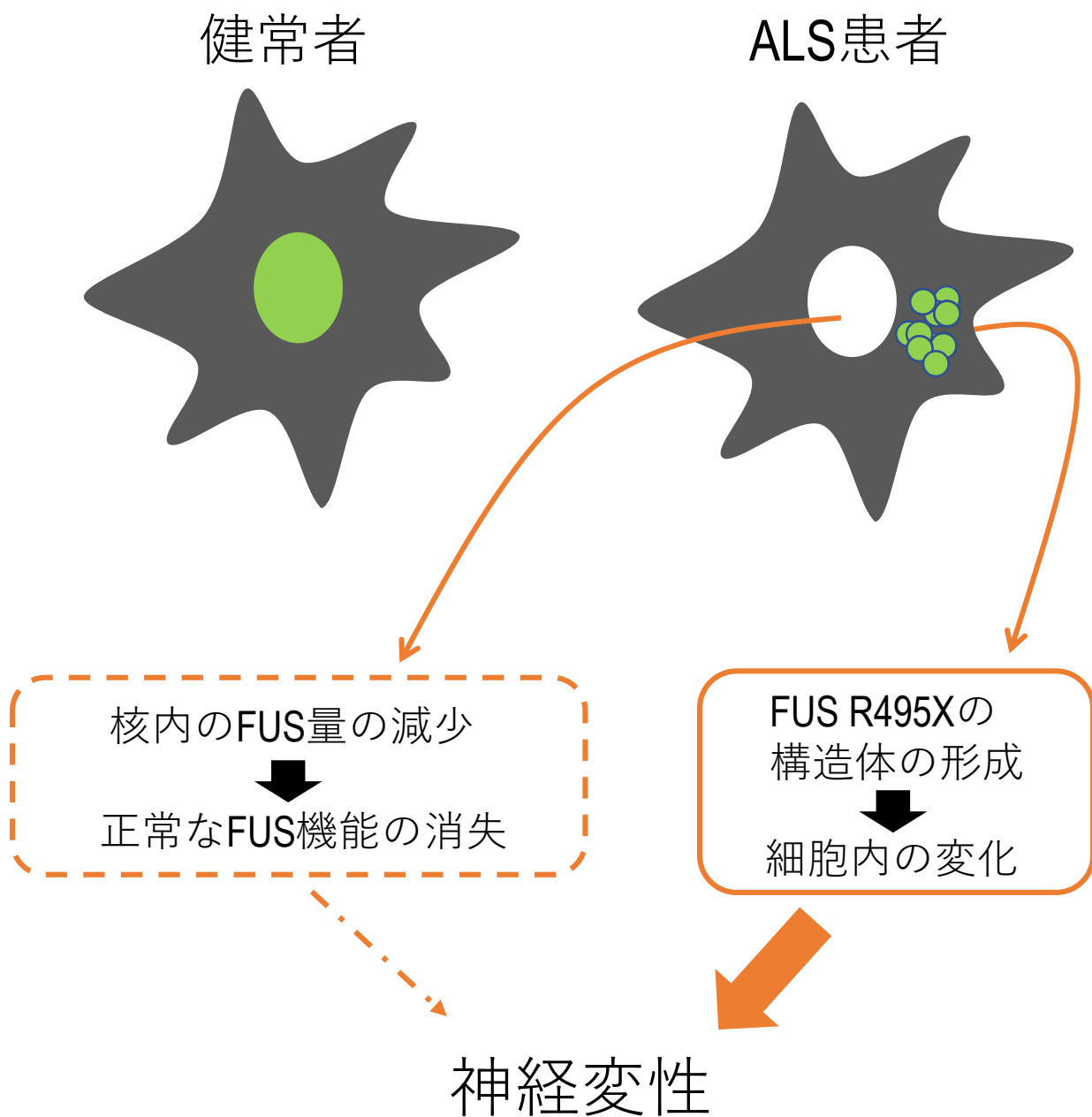


Figure 5 想定されるFUS R495X変異によるALS発症機構

想定されるFUS R495X変異によるALS発症機構を示した。

- ①C末端の変異により核内輸送が阻害され、細胞質への局在が増加する。
- ②細胞質において構造体が形成される。
- ③構造体形成により生じるgain of toxic functionにより神経細胞死が誘引される。

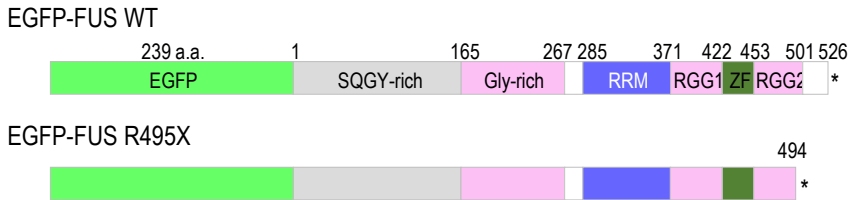
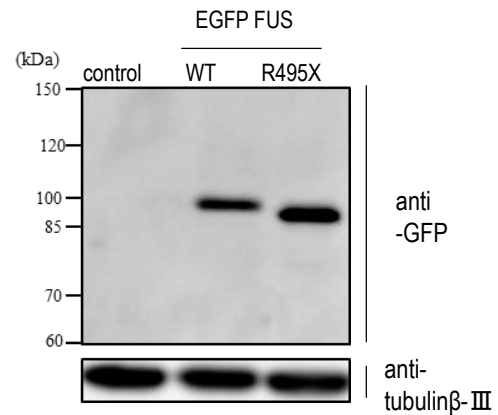
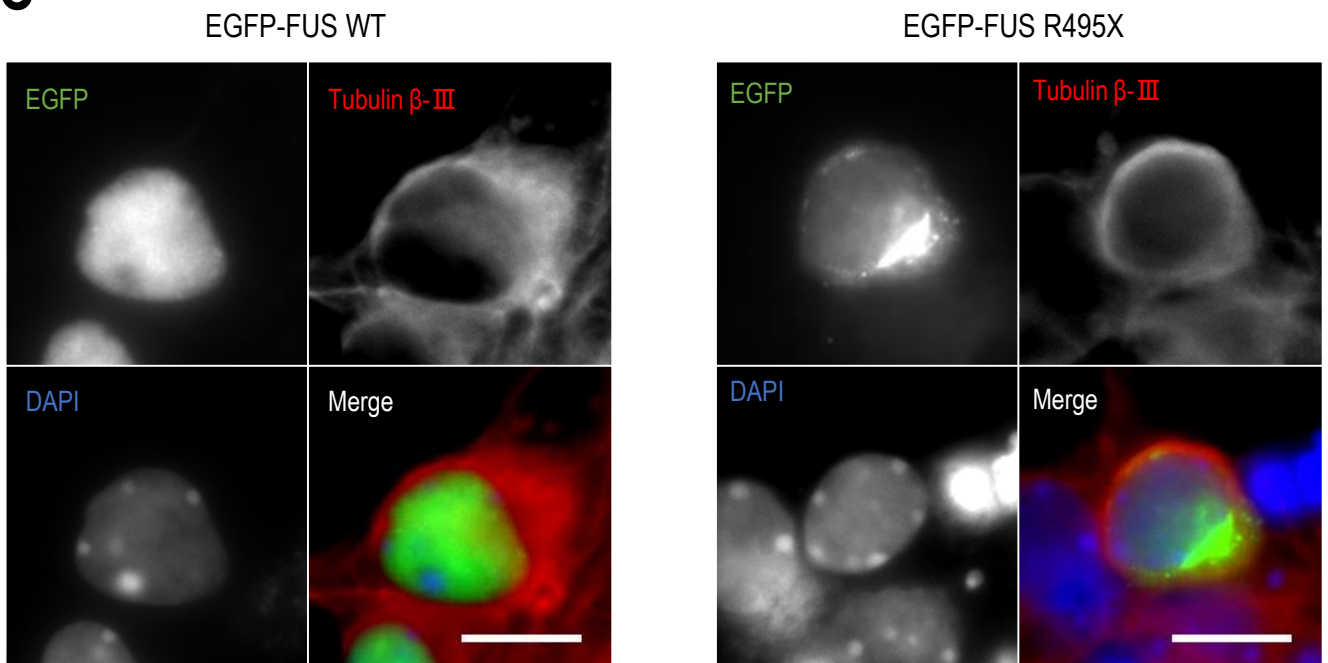
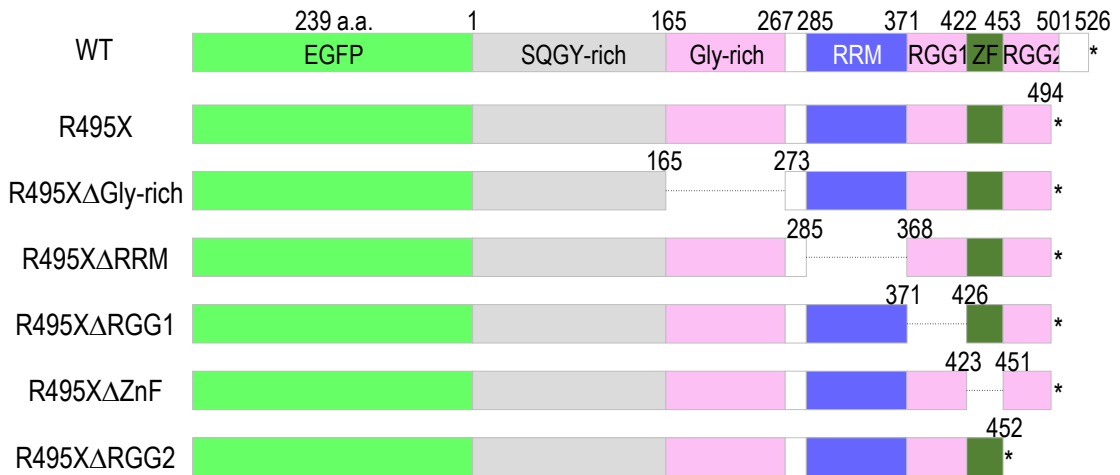
A**B****C**

Figure 6 FUS R495Xは細胞質において構造体を形成する。

- (A) 作製したEGFP-FUS WT及びR495Xのドメイン構造を示した。
- (B) 作製したEGFP-FUS WT及びR495Xの発現を、抗GFP抗体を用いたWestern blotにより確認した。R495X変異体はC末端の32アミノ酸が欠失しているため、WTと比較して分子量の低い位置にバンドが検出される。
- (C) 家族性変異体の一つであるFUS R495X変異体の細胞内局在について検証した。マウスES細胞由来神経細胞にEGFP-FUS WT,R495Xを発現させ、DAPIによるDNAの染色、神経特異的細胞質マーカーとしてtubulin β -IIIを免疫染色した。その後、蛍光顕微鏡を用い観察した。WTは核内に局在するのに対して、R495X変異体は細胞質において局所的な集積が観察された。

A



B

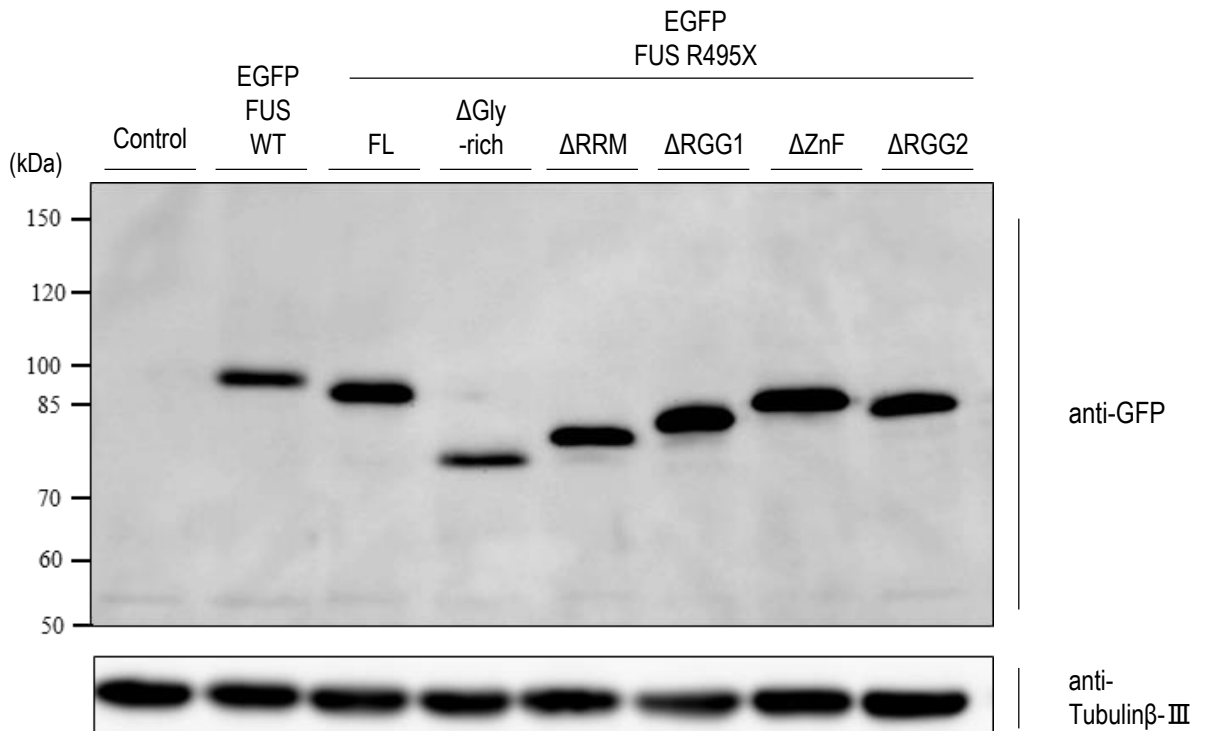


Figure 7 FUSの構造体形成に必要な分子内領域の同定

- (A) 作成した欠損変異体のドメイン構造を示した。
- (B) 作成した欠損変異体の発現を確認した。マウスES細胞由来神経細胞に作成した欠損変異体を発現させ、抗GFP抗体を用いwestern blotを行った。

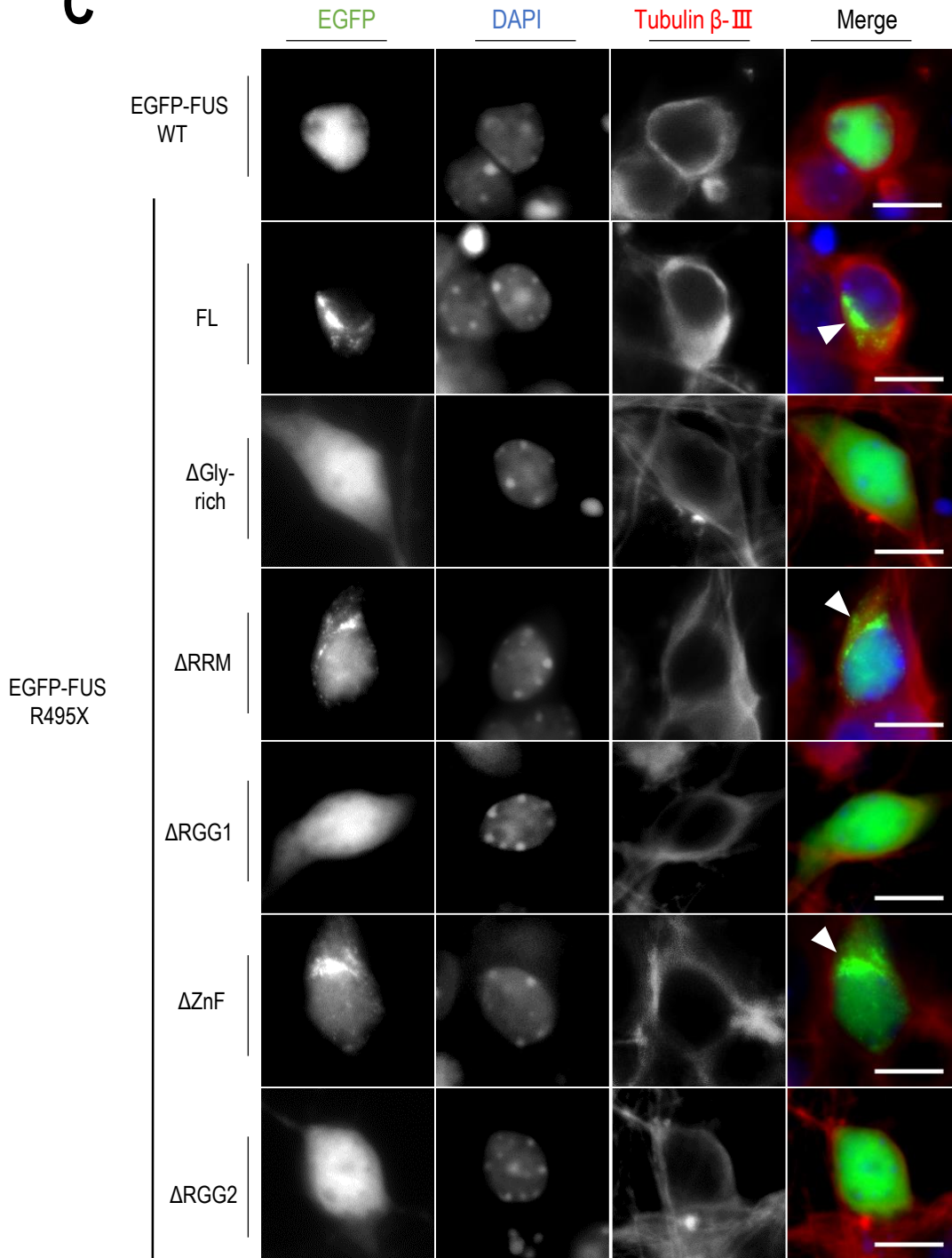
C

Figure 7 FUSの構造体形成に必要な分子内領域の同定

(C) 各欠損変異体の細胞内局在について検証した。マウスES細胞由来神経細胞に各欠損変異体を発現させ、神経細胞細胞質マーカーとしてTubulin β -IIIを免疫染色し、蛍光観察を行った。三角形は形成された構造体の位置を示した。Scale bar= 10 μ m

D

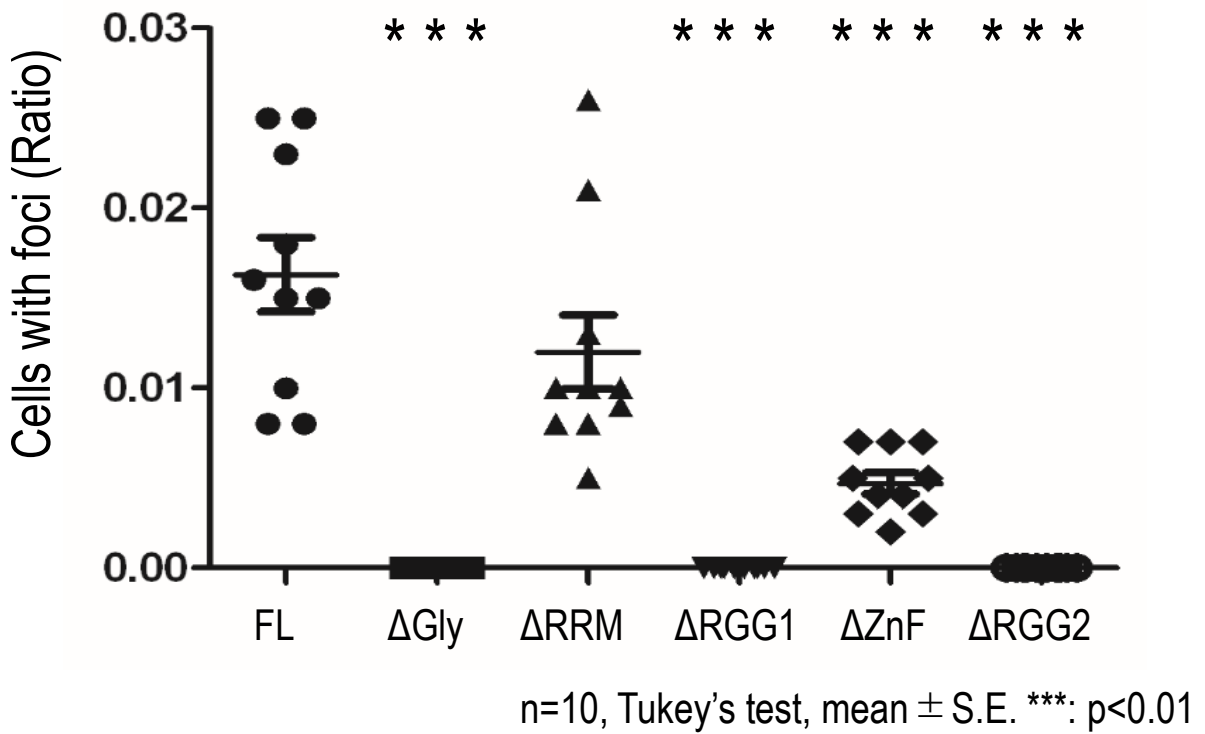


Figure 7 FUSの構造体形成に必要な分子内領域の同定

(D)各種欠損体を発現している細胞の内、構造体を形成した細胞の割合を算出した。(n=10, Tukey's test, mean ± S.E. ***: p<0.01)

A

Neurons expressing EGFP-FUS

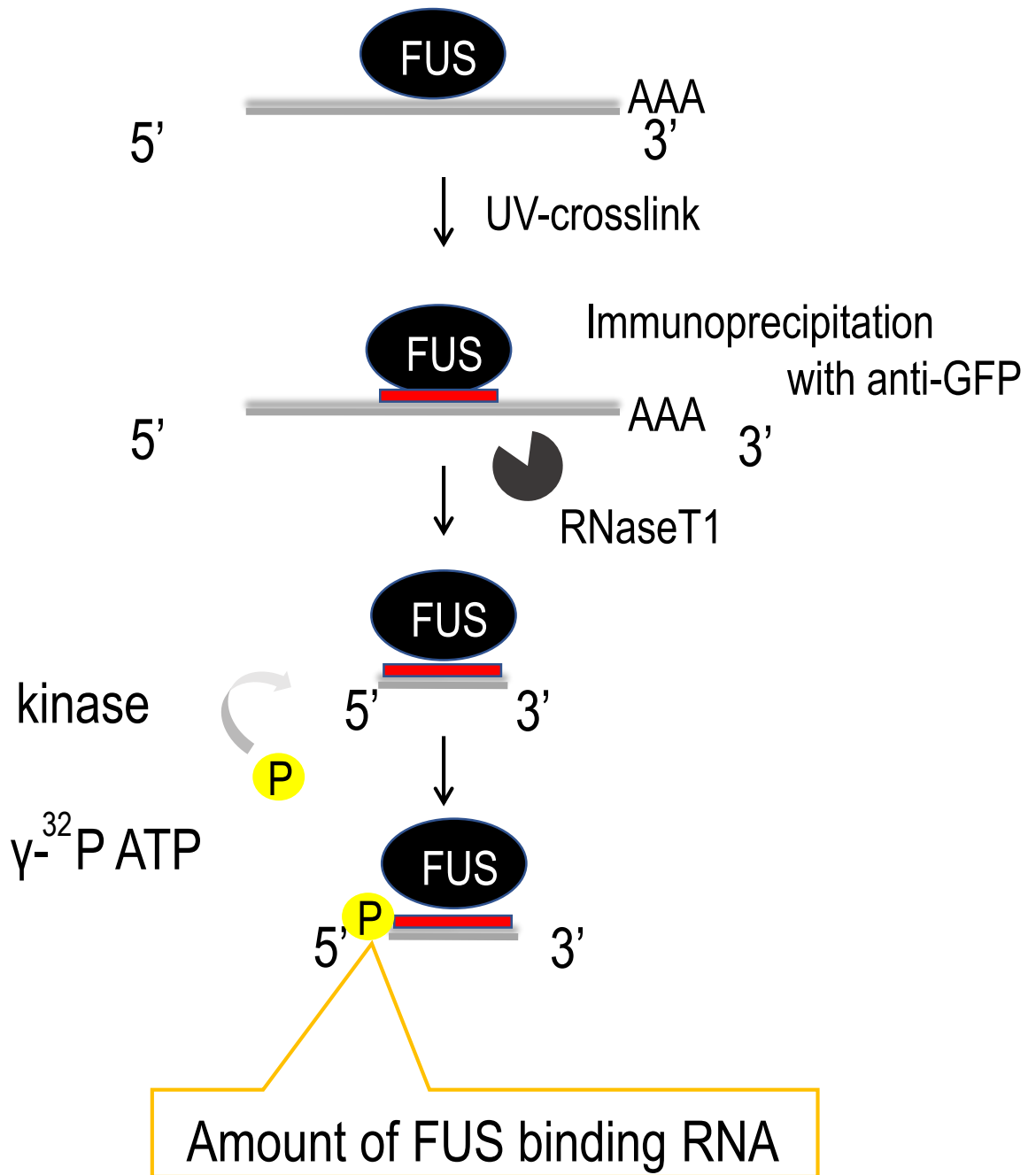


Figure 8 各ドメインの欠損による結合RNA量の変化

(A) UV crosslinking and immunoprecipitation (CLIP法) について示した。UV照射により RNA-FUS を共有結合させた後、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降することで RNA-FUS 複合体を得た。得られた複合体中の RNA のうち、FUS と結合していない領域を RNaseT1 を加え分解し、FUS と結合している RNA を放射標識した。SDS-PAGE 後、タンパク質を western blot、RNA を X 線フィルムへの感光により検出した。

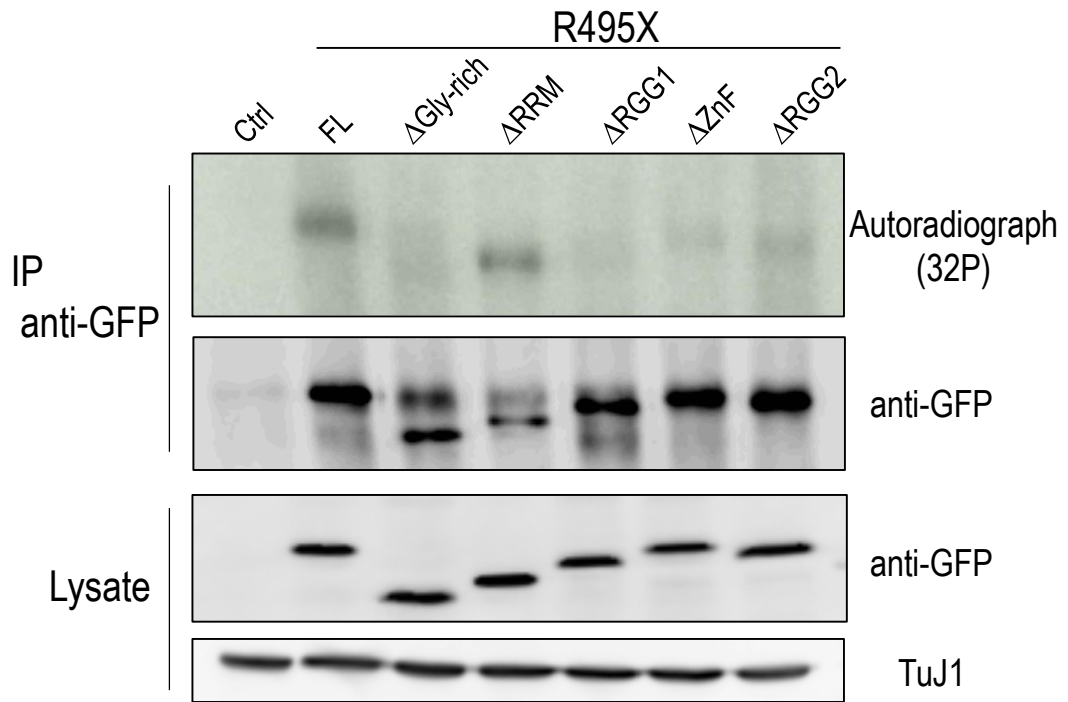
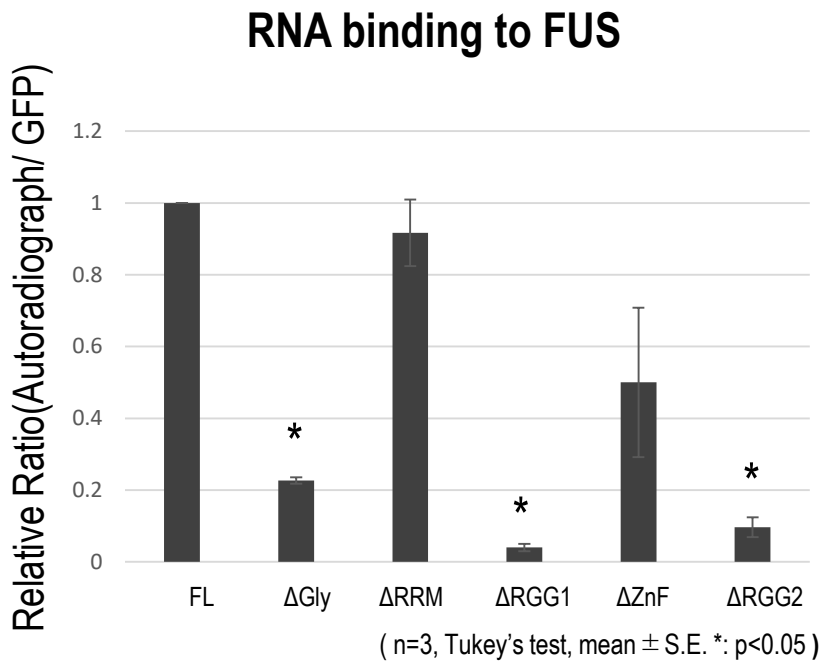
B**C**

Figure 8 各ドメインの欠損による結合RNA量の変化

- (B) 各欠損変異体をマウスES細胞由来神経細胞に発現させ、CLIP法を行った。その後、Western blotとX線フィルムへの感光の結果を示した。
- (C) (B) の定量結果を示した。(n=3, Tukey's test, mean \pm S.E. *: p<0.05)

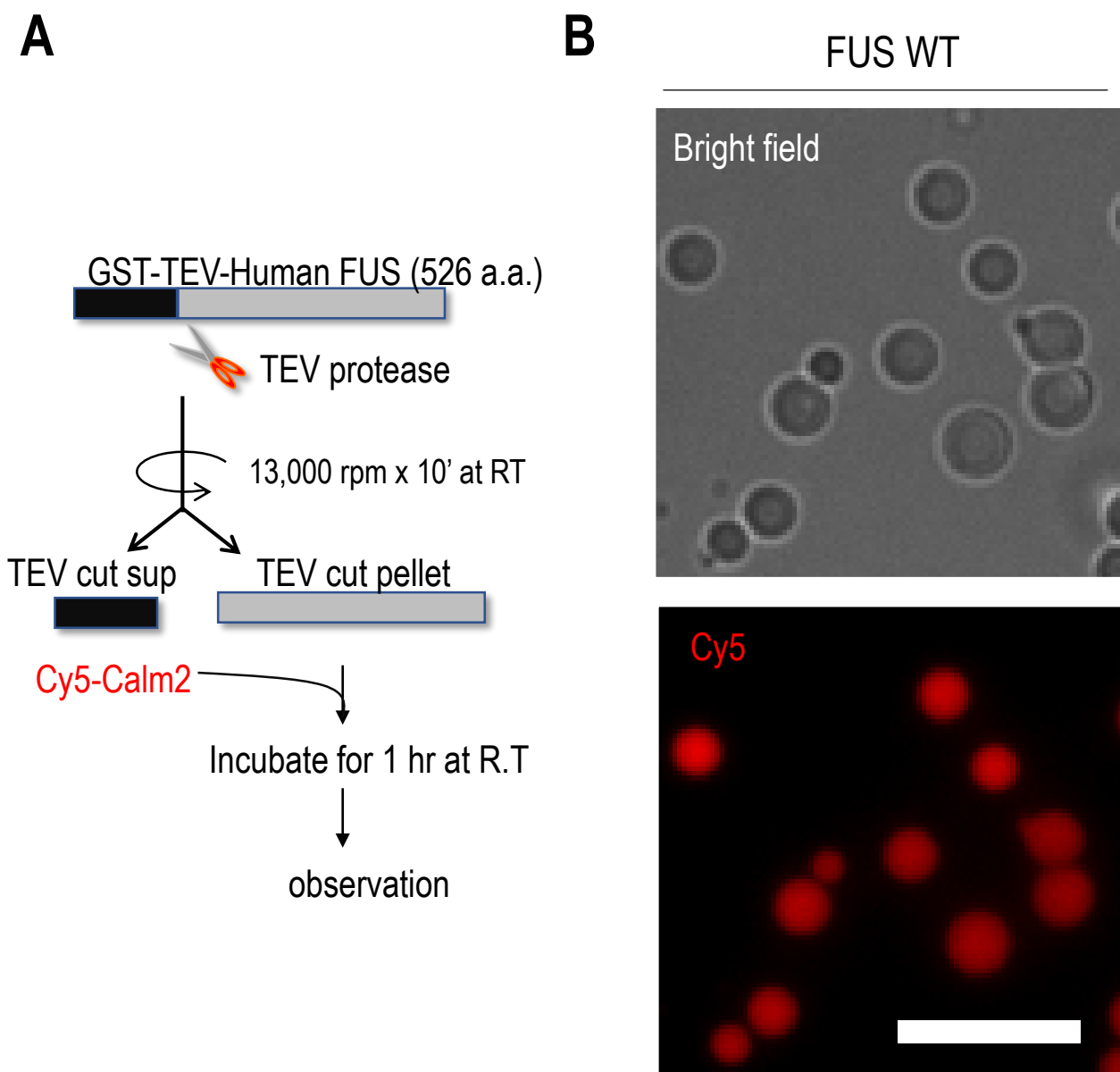


Figure 9 FUSはRNAと共に相転移する

- (A) 実験手法の模式図を示した。GST tagを用い精製したFUS protein ($3.0 \mu\text{M}$) をTEV protease を用いGSTを切断したのち、Cy5標識したRNAを添加し室温で1時間静置した。その後、明視野およびCy5蛍光を観察した。
- (B) 明視野およびCy5の蛍光観察を行った。FUSの形成するLiquid droplet内にCy5の蛍光が観察された。Scale bar= $10 \mu\text{m}$

C

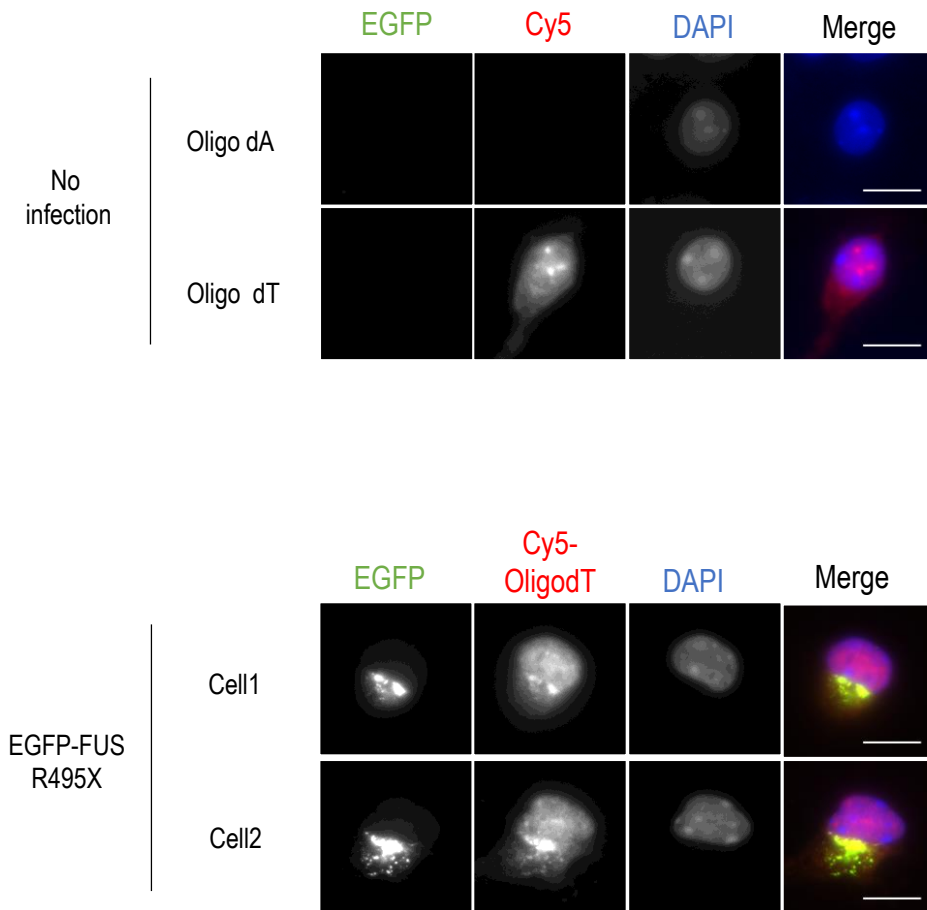


Figure 9 FUSはRNAと共に相転移する

(C) EGFP-FUS R495X変異体をマウスES細胞由来神経細胞に発現させCy5-Oligo(dT)30mer、Cy5-Oligo(dA) 30 merを用いFISH法を行った。 Scale bar=10 μ m

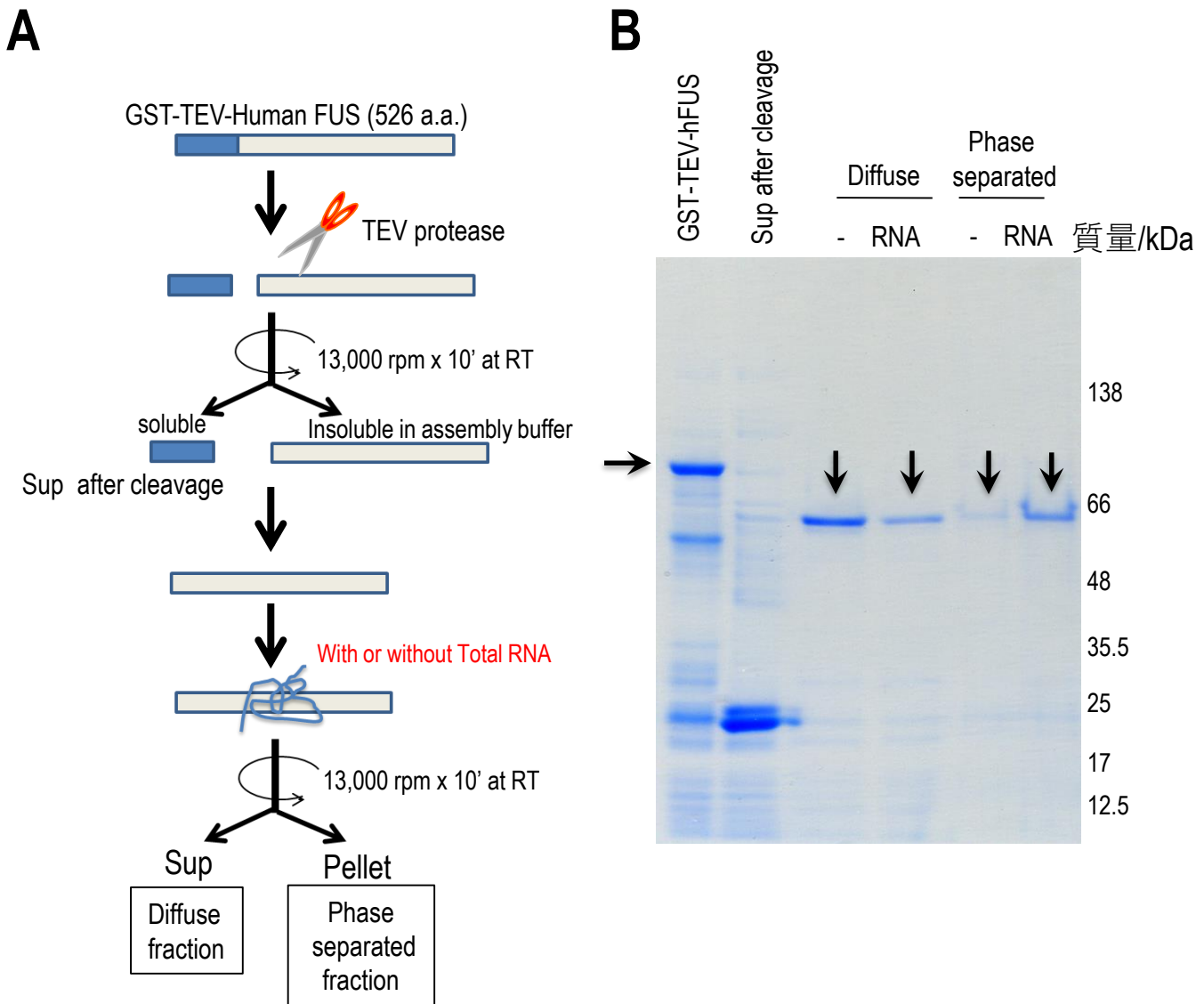
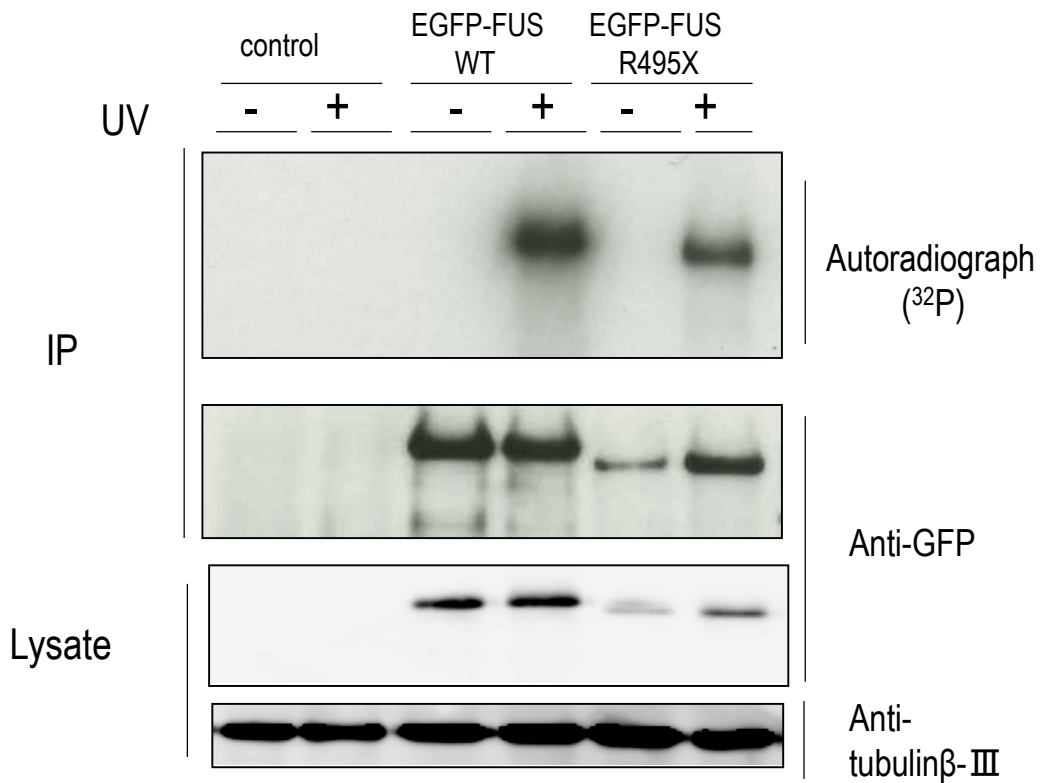
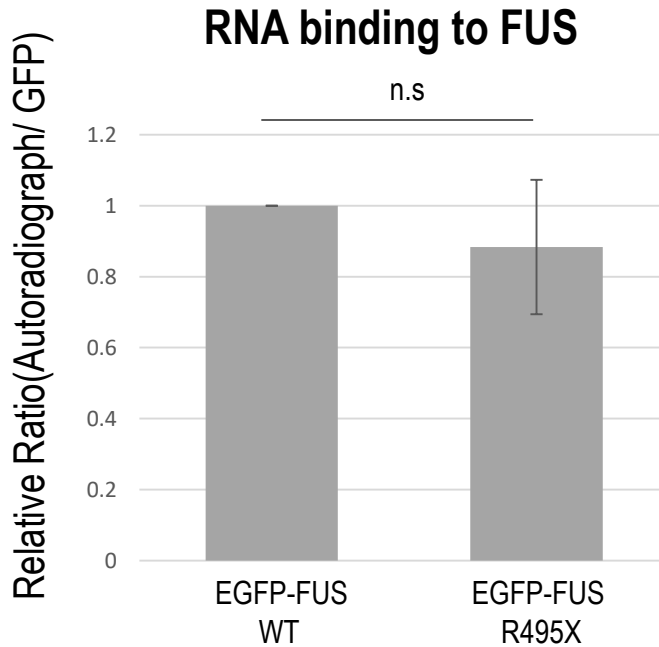


Figure 10 RNAはFUSの相転移を促進する

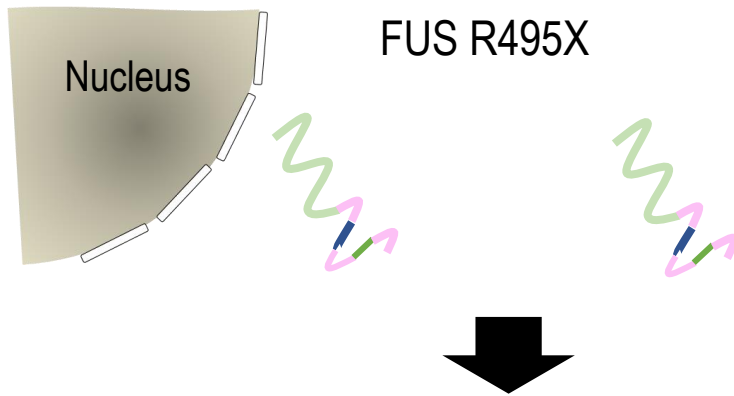
(A) 実験手法の模式図を示した。GST-TEV-FUS WTを大腸菌を用い発現させ、その後GSTタグを用い精製した。その後、TEV proteaseによりGSTの部分切断した。FUSタンパク質のみではAssembly bufferで可溶化されないため、遠心によりpellet画分に回収される。その後、High Salt bufferに可溶化した後、マウスES細胞由来神経細胞から抽出したtotalRNA(1.5 μ g)を加え遠心した。得られたSupをDiffuse fraction, PelletをPhase separated fractionとした。その後、SDS-PAGE, CBB染色を行った。

(B) SDS-PAGEの結果を示した。矢印はFUSのバンドを示した。

A**B****Figure 11 R495X変異による結合RNA量の変化**

- (A) EGFP-WT及びR495X変異体をマウスES細胞由来神経細胞に発現させ、CLIP法を行った。その後Western blotとX線フィルムへの感光を行った。
- (B) (A)の定量結果を示した。(n=3, mean ± S.E., T-test)

① R495X変異による細胞質への局在の増加



② Gly-rich, RGG1, RGG2ドメインを介したRNAとの結合

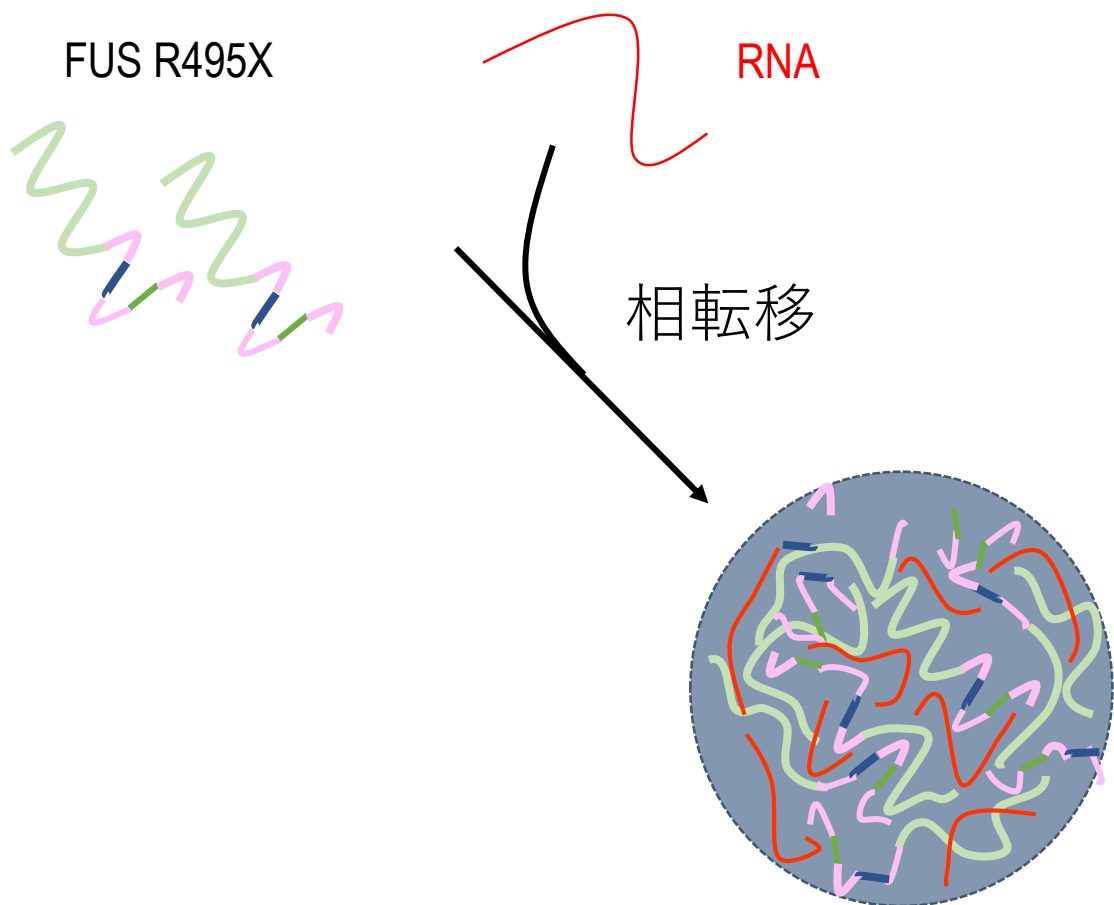


Figure 12 想定されるFUS R495X 構造体形成機構

R495Xの構造体形成には

①細胞質への局在の増加

②細胞質でのRNAとの結合 の2つの要素が必要であることが示唆される。

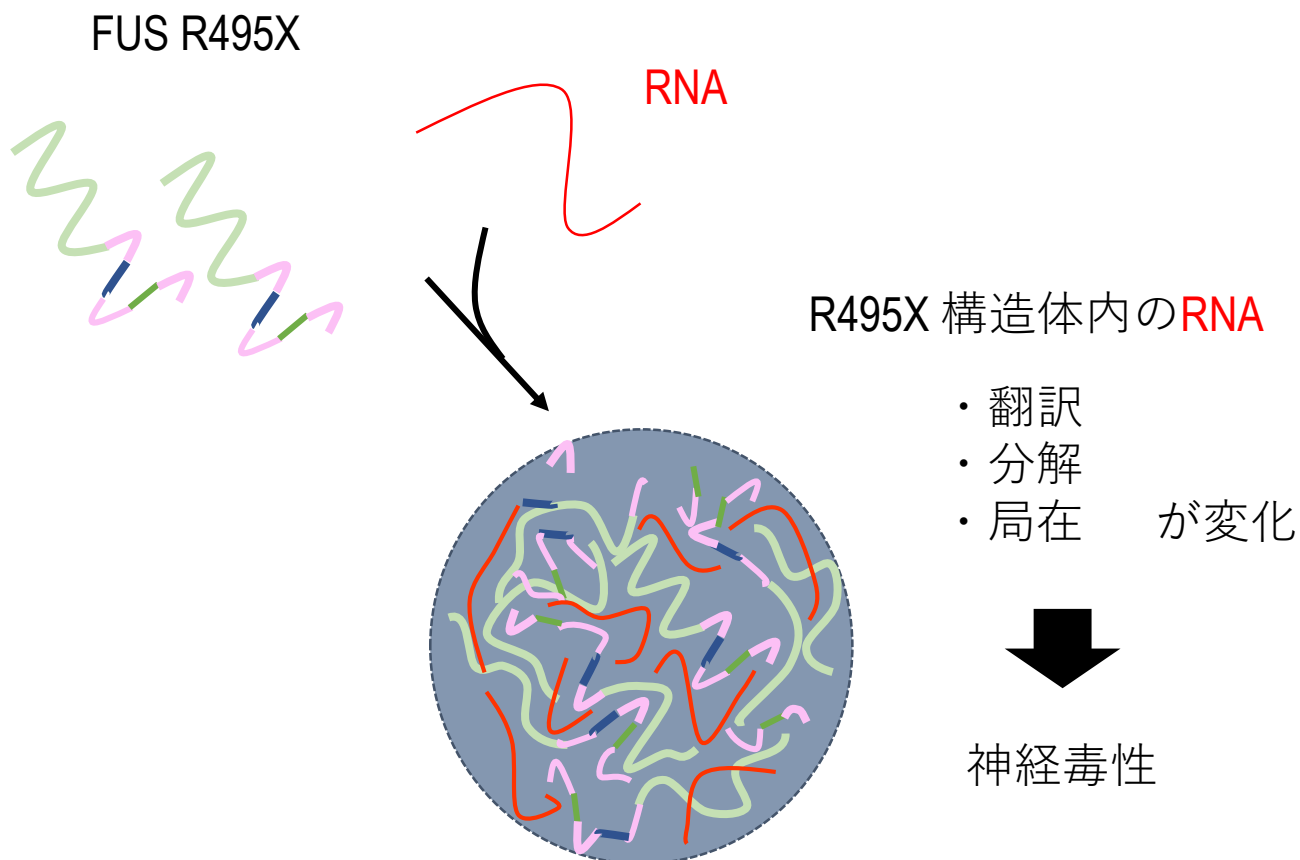


Figure 13 想定されるFUS R495X 構造体の神経毒性誘因機構

構造体内に特定のRNA分子が取り込まれることで、取り込まれたRNA分子の翻訳、分解、局在等を変化させ、その結果、神経毒性および神経細胞死を引き起こす可能性を考えた。

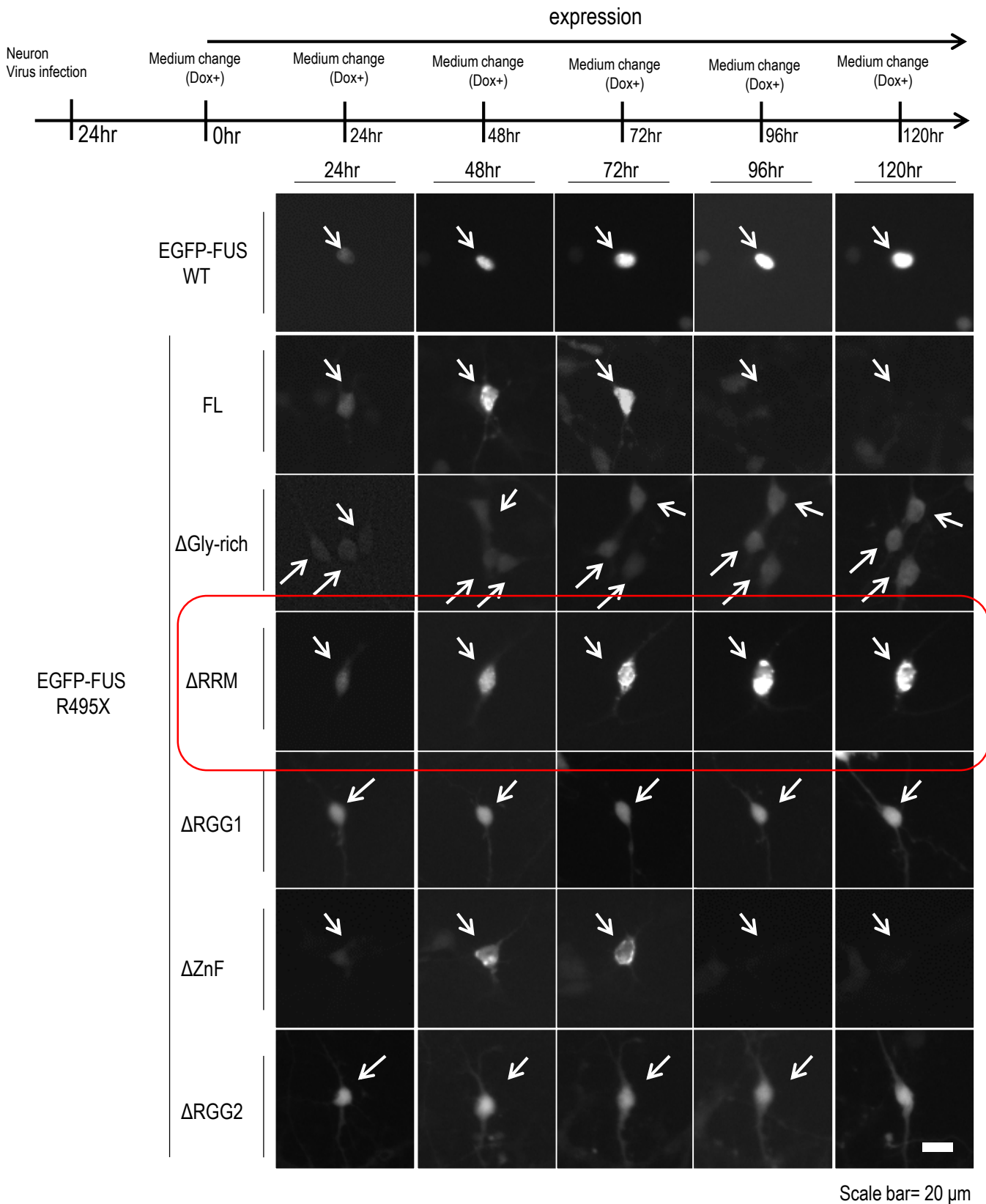
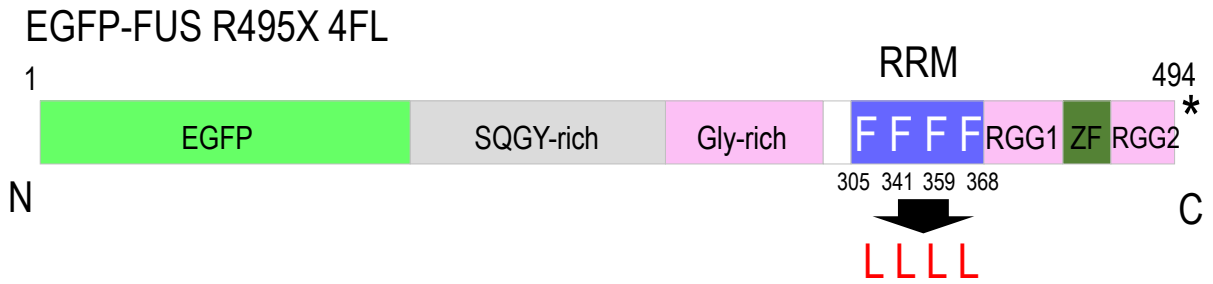


Figure 14 各欠損体の細胞死への寄与

各RNA結合ドメインの細胞死への寄与について検証した。マウスES細胞由来神経細胞に各欠損変異体を発現させ、24時間おきに同一細胞の蛍光を観察した。

A**B**

EGFP-FUS R495X 4FL

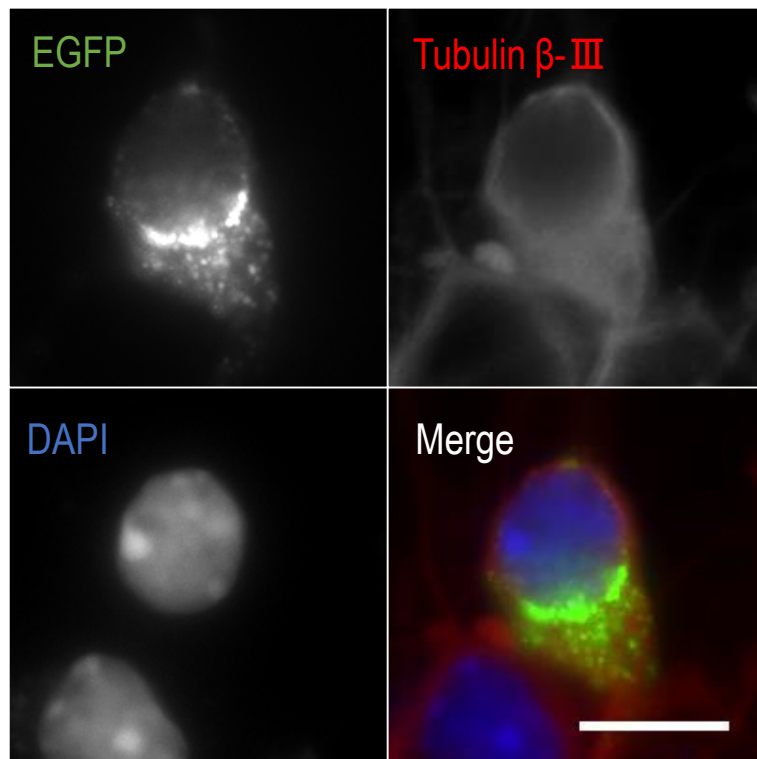


Figure 15 4FL変異による構造体形成能、神経毒性への寄与

- (A) RRMドメイン内のRNAとの結合に重要な役割を担う4つのフェニルアラニンをロイシンに置換した変異体を作製した。
- (B) FUS R495X 4FL変異体の細胞内局在を観察した。マウスES細胞由来神経細胞にEGFP-FUS R495X 4FL変異体を発現させ、核内マーカーとしてDAPI、神経細胞の細胞質マーカーとしてtubulin β -IIIを免疫染色し、蛍光顕微鏡を用い観察を行った。Scale bar= 10 μ m

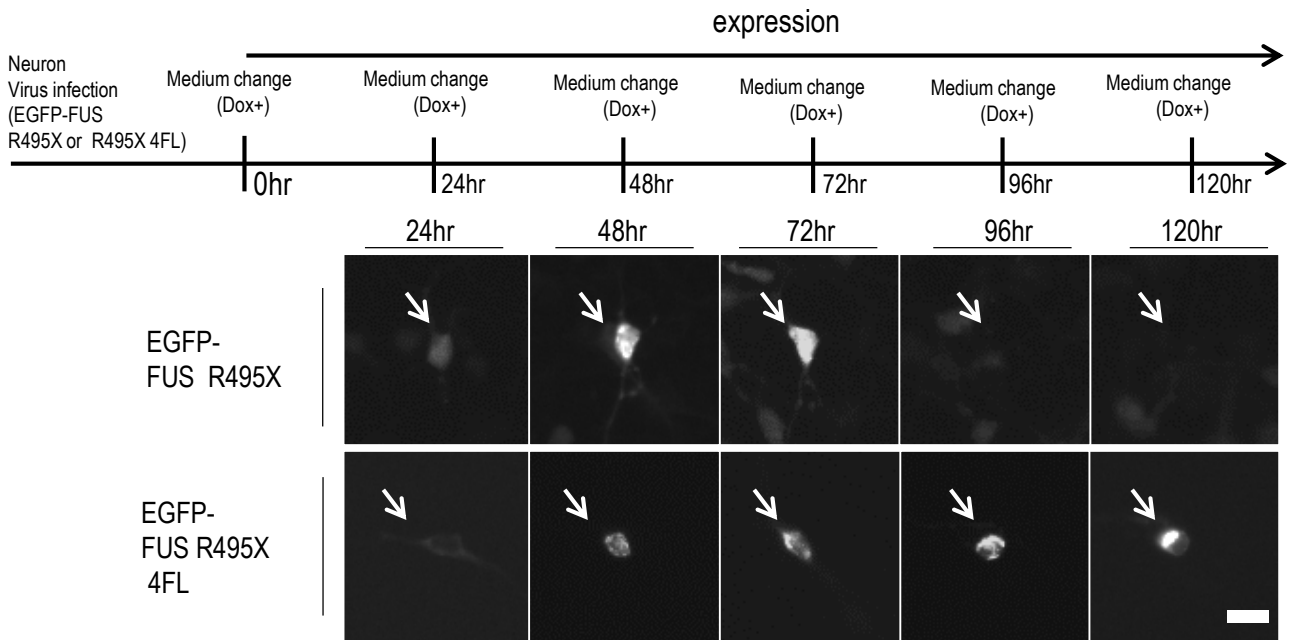
C

Figure 15 4FL変異による構造体形成能、神経毒性への寄与

(C) 4FL変異による神経毒性への寄与について検証した。マウスES細胞由来神経細胞にEGFP-FUS R495X変異体およびEGFP-FUS R495X 4FL変異体を発現させ、24時間おきに同一細胞の蛍光を観察した。Scale bar= 20 μ m

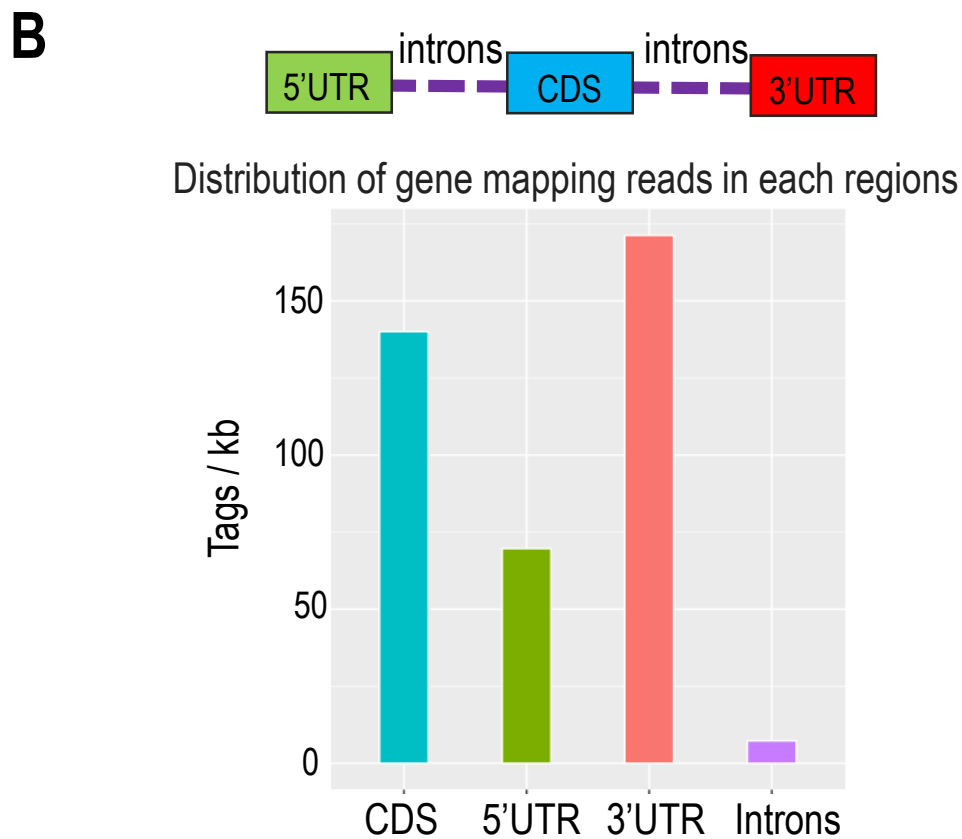
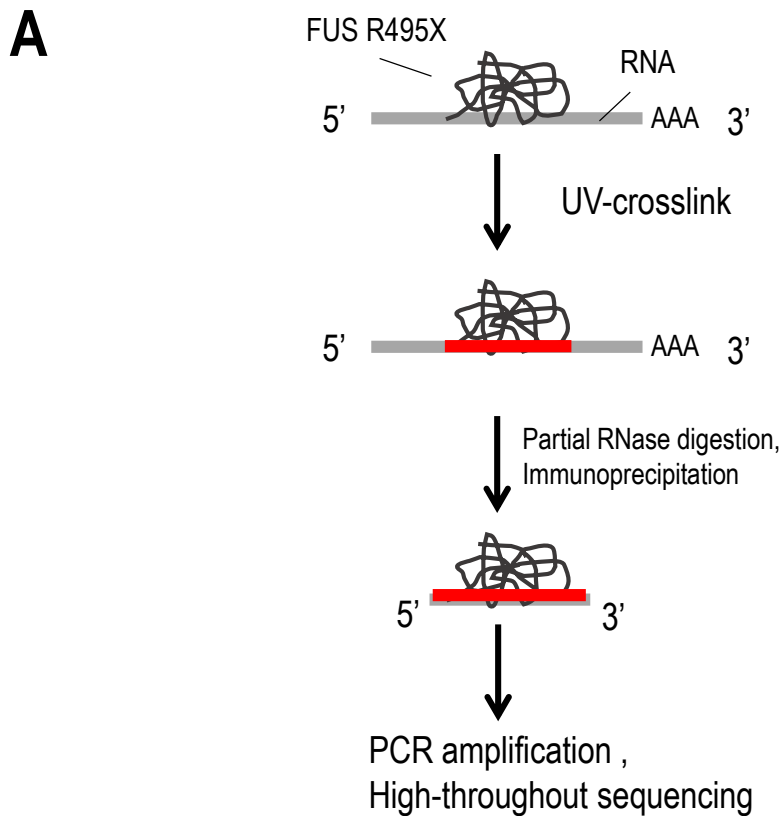


Figure 16 FUS R495X変異体が結合する遺伝子領域

- (A) 所属研究室ではR495X変異体結合RNAをCLIP-RNAseq法を用いて網羅的に明らかにしている。(Nakaya T and Maragkakis M. 2018)
- (B) 遺伝子の各領域における1kbあたりのCLIP-tag数を示した。

A

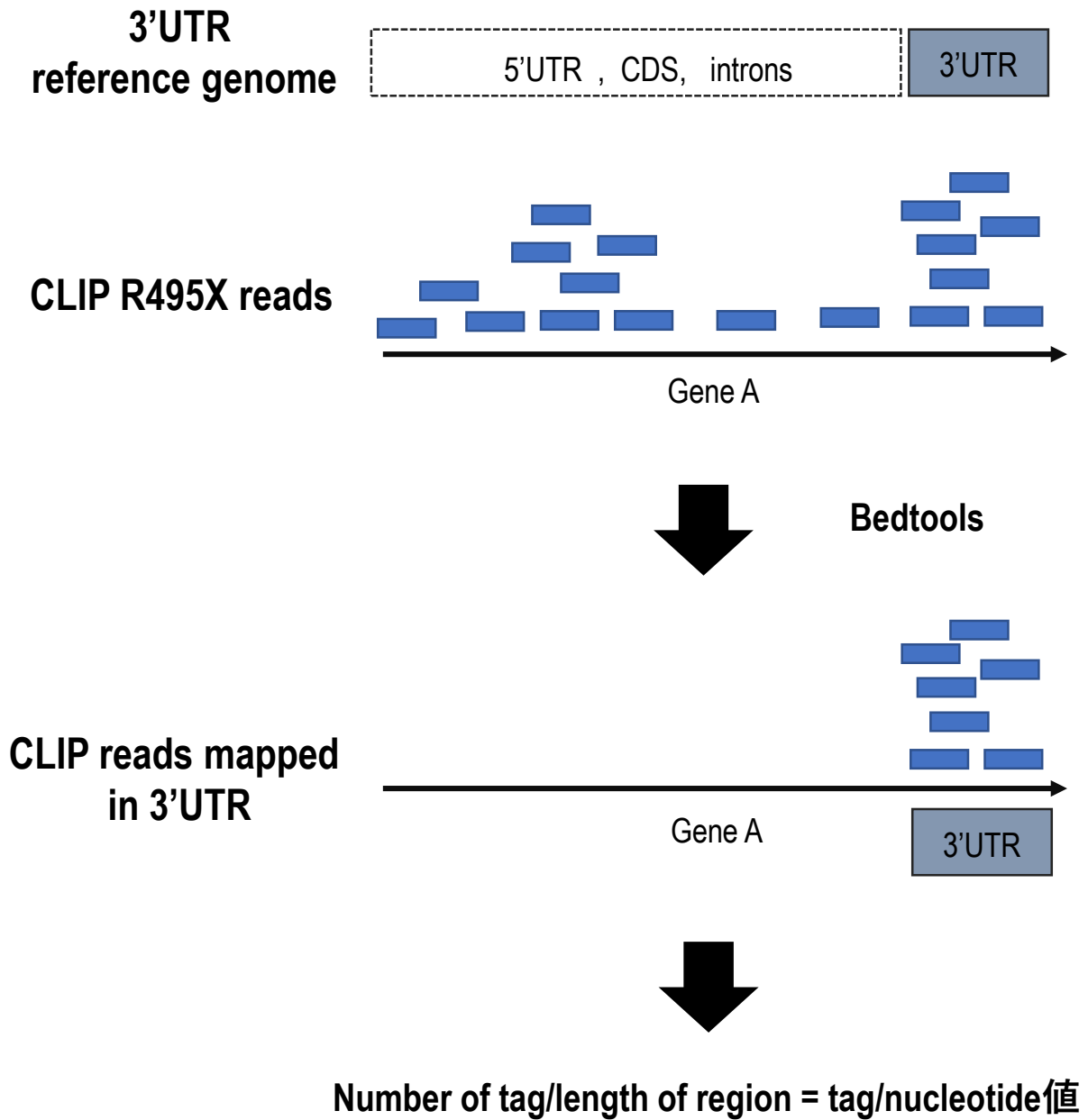


Figure 17 各領域のCLIP read の抽出

(A) 3'UTRにおけるCLIP-R495X readの抽出の模式図を示した。3'UTRのみのリファレンスゲノムを作製し、その領域にマッピングされたreadをbedtoolsを用いることで抽出した。同様の解析をCDSについても行った。

B

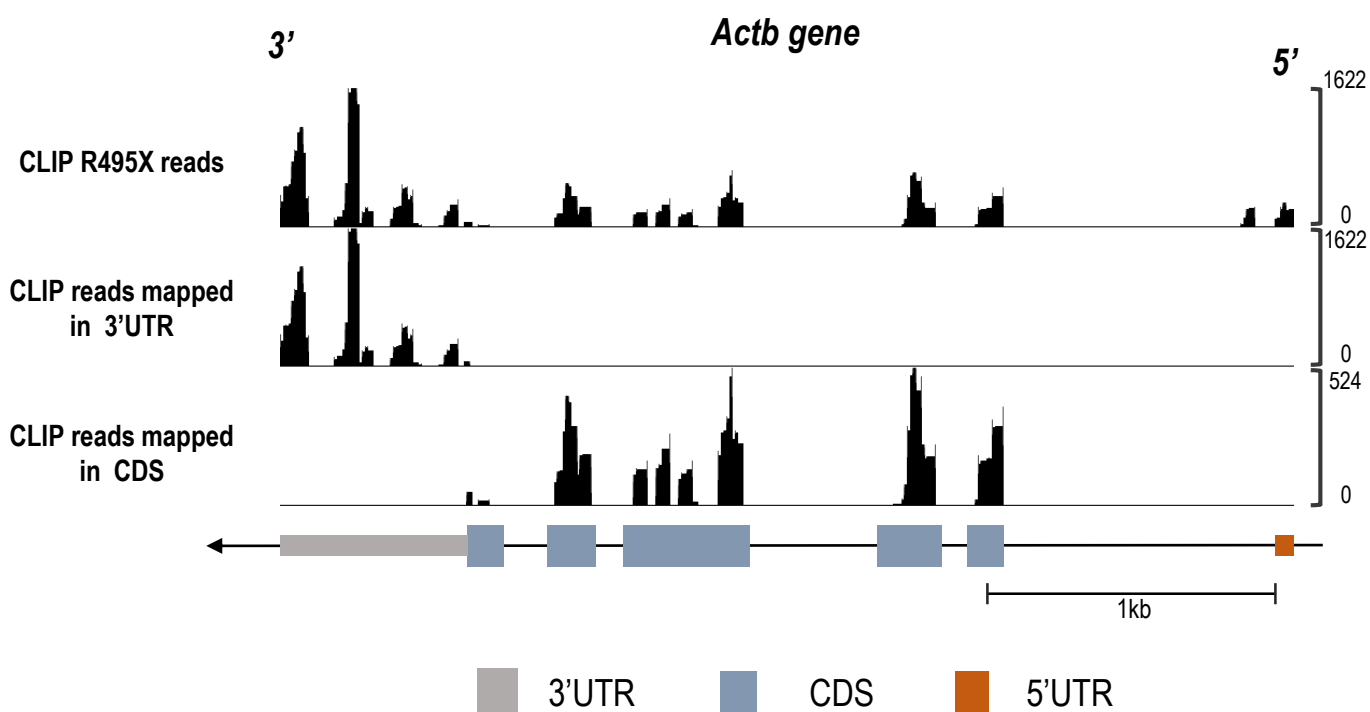


Figure 17 各領域のCLIP readの抽出

(B) 各領域のみのreadが抽出されていることをUCSC genome browserにて確認した。例として*Actb*遺伝子領域を示した。上段に抽出前のCLIP R495X read,中段に3'UTR抽出後read,下段にCDS抽出後readをゲノムにマッピングした結果を示した。

A

Gene symbol	3'UTR tag/nucleotide値	CDS tag/nucleotide値
<i>Lars2</i>	34.4	0
<i>Meg3</i>	23.2	2.9
<i>Tuba1a</i>	23.1	6.7
<i>Mrpl52</i>	22.4	0.7
<i>Cpeb4</i>	17.6	1.2
<i>Gtpbp6</i>	17	0.4
<i>D430019H16Rik</i>	14.6	0.8
<i>Gm4302</i>	11.1	1
<i>Gm4307</i>	11.1	1
<i>Rps5</i>	10.5	3.7
<i>Pou2f1</i>	10	0.2
<i>Rhbdd3</i>	9.9	0.2
<i>Rtn1</i>	9.6	1.8
<i>Tmem102</i>	8.7	0.1
<i>Acadvl</i>	8.4	0
<i>Exosc10</i>	8.2	0.3
<i>Sfi1</i>	8.1	0.6
<i>Crmp1</i>	8	2.6
<i>Sema6c</i>	7.8	0.8
<i>Rpl32</i>	7.7	2.8
<i>Pisd-ps1</i>	7.5	5.4
<i>Fth1</i>	7.1	12.6
<i>Actb</i>	6.7	3.2
<i>Zdhhc4</i>	6.3	0.3
<i>Chchd2</i>	6.3	0.8

Figure 18 領域ごとの結合RNA Gene Ontology enrichment解析

(A) R495X変異体が3'UTRを介して結合するTop1~25の遺伝子名と領域ごとのtag/nucleotide値を示した。

A

Gene symbol	3'UTR tag/nucleotide値	CDS tag/nucleotide値
<i>Rpl19</i>	6.2	4.3
<i>Fkbp3</i>	6.2	0.3
<i>Chchd7</i>	6.2	0.8
<i>Ftl1</i>	6.2	4
<i>Gap43</i>	6	2
<i>Gm4303</i>	5.8	1.2
<i>Dynll2</i>	5.8	5.4
<i>Kif1a</i>	5.8	3.3
<i>App</i>	5.8	2.9
<i>Evl</i>	5.8	0.8
<i>Ddrgk1</i>	5.7	0.4
<i>Ogfr</i>	5.7	0.3
<i>Ndufa5</i>	5.7	1.1
<i>Scd2</i>	5.7	2.3
<i>Arpc1a</i>	5.6	0.6
<i>Mapt</i>	5.5	3.2
<i>Rpsa</i>	5.4	4.2
<i>Ywhae</i>	5.3	3.8
<i>Atp5d</i>	5.3	0.6
<i>Rbfox2</i>	5.2	1.3
<i>Chd4</i>	5.2	0.3
<i>Stk11</i>	5.2	0.1
<i>Cog1</i>	5.1	0.1
<i>Snrpn</i>	5	5
<i>Ywhag</i>	4.9	1.9
<i>Sox4</i>	4.9	0.4

Figure 18 領域ごとの結合RNA Gene Ontology enrichment解析

(A) R495X変異体が3'UTRを介して結合するTop26~50の遺伝子名と領域ごとのtag/nucleotide値を示した。

B

Gene symbol	3'UTR tag/nucleotide値	CDS tag/nucleotide値
<i>Rps29</i>	4	16.9
<i>Snurf</i>	2.2	16.9
<i>Eef1a1</i>	3.1	15.4
<i>Fth1</i>	7.1	12.6
<i>6820431F20Rik</i>	1.4	10.7
<i>Nnat</i>	2.2	10.1
<i>Rps12</i>	0.4	9.1
<i>Fus</i>	0.7	9
<i>Rpl11</i>	0.4	8.7
<i>Rps2</i>	1.7	8.6
<i>Rpl37a</i>	0.3	8.5
<i>Rps21</i>	0.4	8.1
<i>Sepw1</i>	0.2	7.6
<i>Rplp1</i>	0	7.6
<i>Rps3</i>	0.9	7.4
<i>Rps18</i>	0	7.1
<i>Hspa8</i>	1.3	7
<i>Rps28</i>	1.5	7
<i>Fat3</i>	2.4	6.9
<i>Tuba1a</i>	23.1	6.7
<i>Rpl39</i>	0.8	6.1
<i>Ndufa1</i>	0	6
<i>Rpl38</i>	3.5	5.9
<i>Rps24</i>	0.3	5.7
<i>Parp8</i>	0	5.6
<i>Pisd-ps1</i>	7.5	5.4

Figure 18 領域ごとの結合RNA Gene Ontology enrichment解析

(B) R495X変異体がCDSを介して結合するTop1~25の遺伝子名と領域ごとのtag/nucleotide値を示した。

B

Gene symbol	3'UTR tag/nucleotide値	CDS tag/nucleotide値
<i>Dynll2</i>	5.8	5.4
<i>Eef2</i>	2.9	5.2
<i>Aplp1</i>	0.7	5.1
<i>Slc25a3</i>	0.1	5.1
<i>Snrpn</i>	5	5
<i>Tmem57</i>	0.6	5
<i>Rnf130</i>	1	5
<i>Pbx3</i>	0.6	4.8
<i>Ebf1</i>	0	4.7
<i>Rpl9</i>	4.3	4.7
<i>Stmn2</i>	0.5	4.6
<i>Nsg2</i>	4.2	4.6
<i>Cox5a</i>	3.7	4.6
<i>2010107E04Rik</i>	0.3	4.5
<i>Fxyd6</i>	0.8	4.4
<i>Rps16</i>	1.9	4.4
<i>Rpl19</i>	6.2	4.3
<i>Rpsa</i>	5.4	4.2
<i>Bptf</i>	0.5	4.2
<i>Rps13</i>	1	4.2
<i>Meis2</i>	0.6	4.1
<i>Coro1c</i>	0.4	4.1
<i>Prdx4</i>	0	4.1
<i>Tuba1c</i>	0	4
<i>Tubb2b</i>	3.4	4

Figure 18 領域ごとの結合RNA Gene Ontology enrichment解析

(B) R495X変異体がCDSを介して結合するTop26~50の遺伝子名と領域ごとのtag/nucleotide値を示した。

D

Enriched for top50 genes targeted in 3'UTR

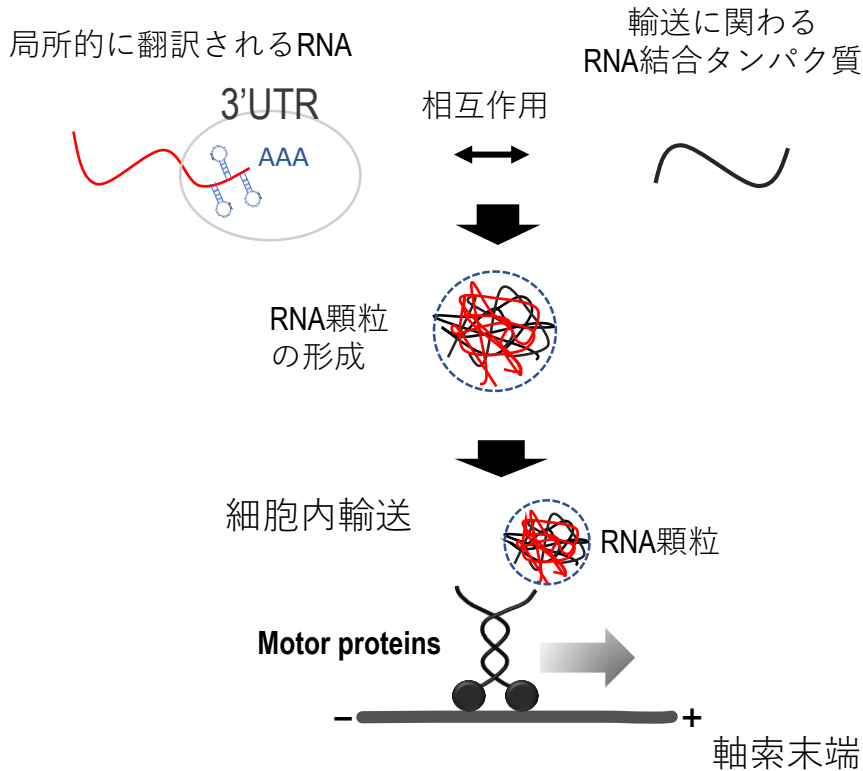
GO terms	q.value
cell morphogenesis involved in neuron differentiation (GO:0048667)	2.28E-07
neuron projection morphogenesis (GO:0048812)	4.59E-07
plasma membrane bounded cell projection morphogenesis (GO:0120039)	5.01E-07
axonogenesis (GO:0007409)	5.09E-07
cell projection morphogenesis (GO:0048858)	5.55E-07
axon development (GO:0061564)	9.28E-07

Enriched for top50 genes targeted in CDS

GO terms	q.value
translation (GO:0006412)	9.38E-24
cytoplasmic translation (GO:0002181)	2.33E-18
ribosomal small subunit biogenesis (GO:0042274)	9.33E-11
ribosomal small subunit assembly (GO:0000028)	9.33E-08
ribosome assembly (GO:0042255)	2.58E-07
translational elongation (GO:0006414)	3.73E-05
maturation of SSU-rRNA (GO:0030490)	1.09E-04

Figure 18 領域ごとの結合RNA Gene Ontology enrichment解析

(D) GO解析の結果を示した。上段に3'UTR、下段がCDSでの結果を示した。

A**B**

cell morphogenesis involved
in neuron differentiation (GO:0048667)

APP
GAP43
Evl
Crmp1
Sema6c
Mapt
Rbfox2
Actb

C

Gene symbol	$\text{Log}_2 \left(\frac{\text{tag/nucleotide of 3'UTR}}{\text{tag/nucleotide of CDS}} \right)$
<i>Camk2a</i>	5.5
<i>Nrgn</i>	0.1
<i>Mtap</i>	2.1
<i>Rapgef1</i>	-0.5
<i>Calm1</i>	1.5
<i>Vdac2</i>	2.3
<i>Limk1</i>	2.5
<i>Lmnb1</i>	8.5
<i>Bsn</i>	0.5
<i>Rcan1</i>	1.6
<i>Cdc42se1</i>	0.2
<i>Snap25</i>	2.6

Figure 21 R495Xは局所的翻訳されるRNAの3'UTRを好んで結合する。

- (A) 神経細胞でのmRNA輸送の模式図を示した。
 (B) R495X変異体が3'UTRを介して結合するTop50の遺伝子のうち、細胞の形態形成関連の遺伝子群に属す遺伝子を示した。赤字は局所的に翻訳される遺伝子、紫字はRNA輸送されることが報告されている遺伝子を示した。
 (C) 局所的翻訳を受けることが報告されている、その他12遺伝子の $\text{Log}_2(\text{tag per nucleotide of 3'UTR} / \text{tag per nucleotide of CDS})$ を算出した。

A

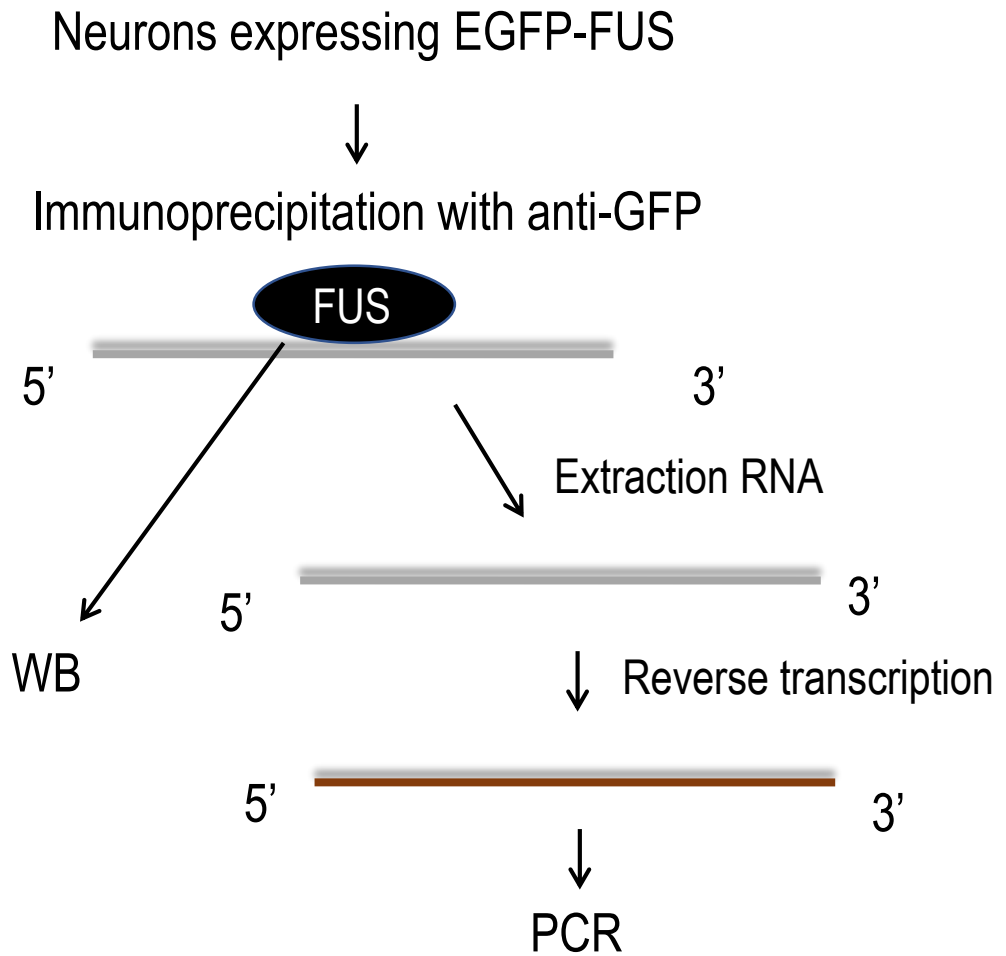


Figure 22 *Actb*, *Mapt* mRNAとの結合にRRMドメインが寄与する

(A) RNA-IP法の実験手法の模式図を示した。EGFP-FUSの発現誘導後72hr後に、細胞を回収した。RSB200 bufferを加え可溶化したのち、抗GFP抗体を用い免疫沈降し、RNA-FUS複合体を得た。得られた複合体中のRNAをTrizol reagentを用い抽出したのち、RT-PCRを行った。また複合体中のFUSの量をWBにより検出した。

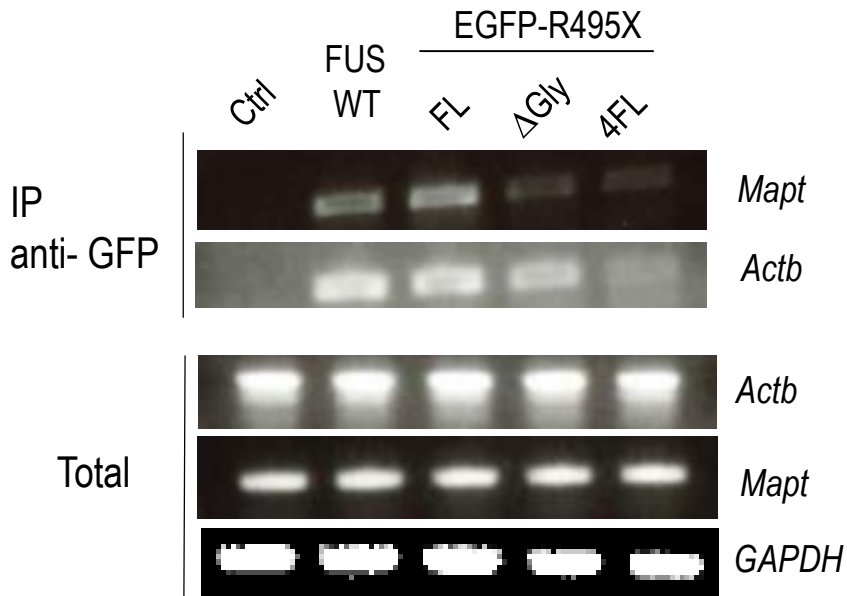
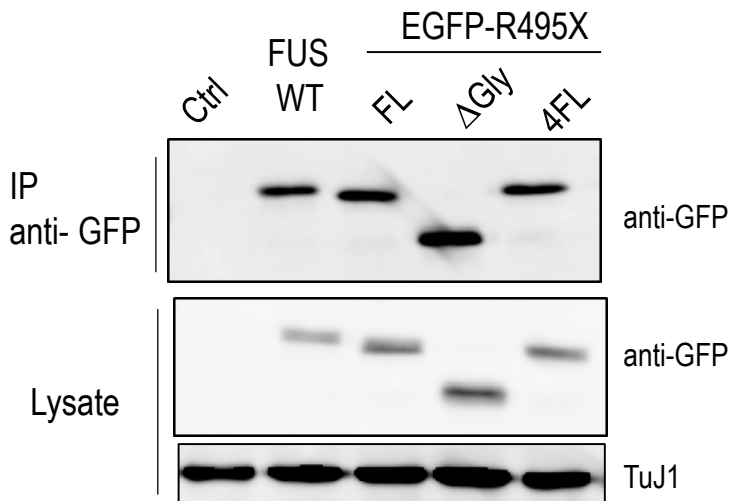
B**C**

Figure 22 *Actb*, *Mapt* mRNAとの結合にRRMドメインが寄与する

- (B) マウスES細胞由来神経細胞にEGFP-FUS WT, EGFP-FUS R495X、EGFP-FUS R495X ΔGly-rich, EGFP-FUS R495X 4FL の4変異体を発現させ、RNA-IP法を行った。RT-PCRの結果を示した。
- (C) ウェスタンブロットの結果を示した。

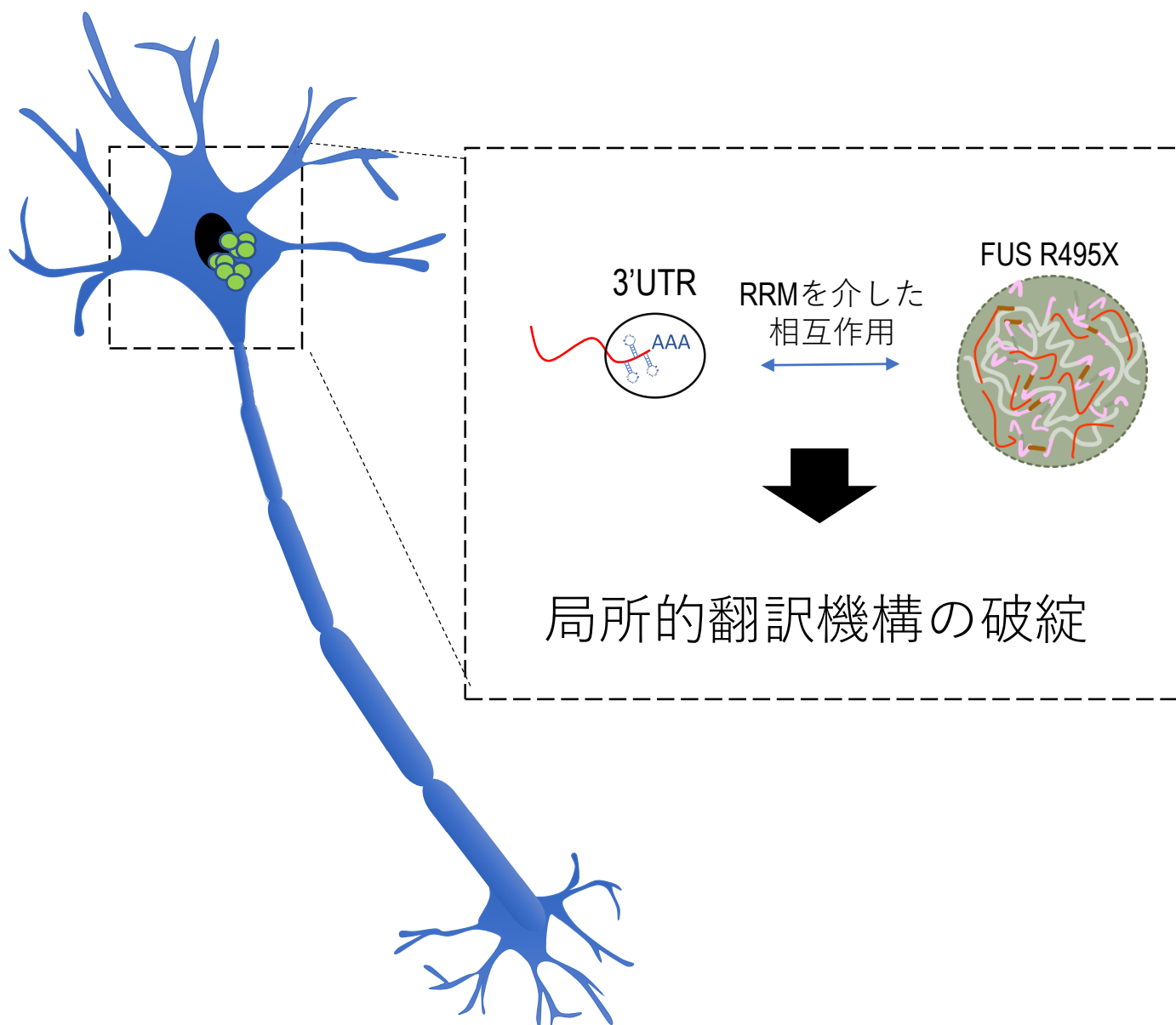


Figure 23 想定されるR495X構造体を引き起こす細胞内変化

R495X構造体はRRMドメインを介して局所的翻訳機構を破綻させることで神経細胞死を引き起こす、新規分子機構の存在が示唆された。

謝辞

北海道大学 大学院薬学研究院 神経科学研究室 鈴木利治教授には本研究を行うにあたり的確な御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝申し上げます。また、本論文の審査を頂いたことにも重ねて御礼申し上げます。

御多忙の中、本論文を審査・御指導頂きました北海道大学 大学院薬学研究院 RNA 生物学研究室 中川真一教授、米田宏先生、同神経科学研究室 多留偉功先生に深く感謝申し上げます。

北海道大学 大学院薬学研究院 神経科学研究室 多留偉功先生、中矢正先生、羽田沙緒里先生には、平素より御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝申し上げます。特に、数多くの御指導・御助言をいただき日頃から多くの議論をさせていただきました中矢正助教に心より感謝いたします。また北海道大学薬学研究科神経科学研究室 西田祥江秘書には常に適切な御支援をいただきましたことを厚く御礼申し上げます。

北海道大学 大学院薬学研究院 神経科学研究室内の皆様には、長くに渡り、技術的・精神的に支えて頂きましたことを心から感謝いたします。

最後に、私の研究を不断の経済的、精神的支援により支えて下さいました両親、兄に深く感謝いたします。

2020 年 3 月 河原 大貴