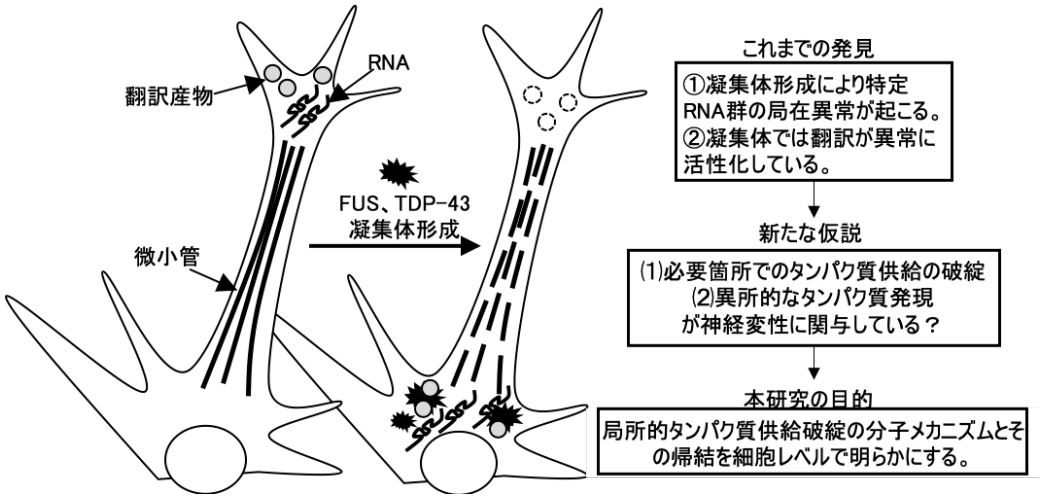
158　ALS関連タンパク質凝集体によるRNA動態制御異常の解明	安田　恭大

【目的】筋萎縮性側索硬化症（ALS）や前頭側頭葉変性症などの複数の神経変性疾患で、複数の RNA 結合タンパク質の細胞質での凝集が病理的所見として報告されている。これは疾患発症に深く関わることが示唆されているが、その機構については未解明な部分が多い。我々はこれまでに、そのような凝集タンパク質に注目して研究を行ってきた。そして、異なる RNA 結合タンパク質を中核とする凝集体が、共通して特定の RNA の細胞内局在を撹乱すること、また凝集体形成により異所的な翻訳活性化が起こることを見出している。これらの事実は、凝集体形成による RNA 動態の変容が神経変性疾患の病態形成の要因となることを示唆している。本研究はこれを発展させ、ALS 関連凝集体の一つである FUS タンパク質凝集体を対象とし、その形成下で RNA 動態を変化させる因子の探索とその機能解析を通して、RNA 動態変化メカニズムの解明を目指した。将来的な目標は、凝集体形成による神経変性疾患発症機構の理解である。

【方法】本研究ではまず光反応性 Halo タグ基質を用いて、野生型と変異により凝集体形成が促進された FUS タンパク質で、相互作用が変化する因子の探索を行った。この基質は光刺激により近傍分子に化学架橋を施すものであり、これと質量分析を組み合わせることで、標的分子とその近傍分子の相互作用探索が可能となる。次に、上記実験で相互作用変化の見られたタンパク質の一つである VCP タンパク質を対象とした解析を行った。具体的には、FUS 凝集体の性質と VCP 発現レベルの関係性の解析や、局在 RNA のライブイメージング、および細胞内の翻訳活性の可視化を用いた RNA 動態の解析を行った。上記実験は、これまでに我々が、当該分野の研究で使用しており、かつ神経細胞と類似した RNA 局在を示す NIH/3T3 細胞を用いて遂行した。

【結果】光反応性 Halo タグ基質と質量分析を用いた解析の結果、FUS タンパク質変異の有無に際して FUS との相互作用が変化するいくつかのタンパク質の同定に成功した。その一つであり、ALS 原因遺伝子としても報告されている VCP タンパク質は、ALS 関連変異により凝集体形成する FUS タンパク質とは相互作用が減少していた。そして興味深いことに、VCP の過剰発現により、FUS 凝集体形成によって引き起こされる異所的な翻訳活性化や RNA 局在の異常が緩和されることを示唆する結果が得られた。このことは、VCP は本来、上記のような RNA 動態に何らかの形で関わる制御機構（の一部）であり、FUS 変異による相互作用の減少がその制御を逸脱する一因になっている可能性を示唆している。また、VCP はプロテアソーム経路での活性が報告されているが、上記の結果はプロテアソーム経路とは別に、VCP が根本に持つ ATP 分解酵素としての側面が非常に重要であることも明らかとなった。これまで VCP は、プロテアソーム経路に着目して、ALS との関わりが議論されてきた。本研究結果はそれら先行研究とはまた別の、新たな病態形成経路の解明につながる結果である。

本研究の経緯と目的の概略図



158. ALS 関連タンパク質凝集体による RNA 動態制御異常の解明

安田　恭大

広島大学 大学院理学研究科 数理分子生命理学専攻

Key words：神経変性疾患，RNA 局在，タンパク質凝集，イメージング

緒　言

神経変性疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、先行研究にて遺伝的あるいは非遺伝的な発症要因が多数報告されている。しかしながら、その要因の多様性故に、病態形成メカニズムの包括的な理解が困難であり、根本的な治療法の確立は、現在でもなされていない。

近年の発見として、家族性患者の変異遺伝子に Fused in Sarcoma（FUS）や Tar DNA binding protein 43kDa（TDP-43）といった RNA 結合タンパク質が発見され、それぞれが疾患細胞の細胞質内で異常凝集していることが報告された。そして現在、この細胞内での RNA 結合タンパク質の凝集は ALS の病理的所見として認知されている。興味深いことに、これらのタンパク質凝集は、FUS や TDP-43 への直接の遺伝子変異を持たない患者の発症組織でも認められ、検査されたうちの実に 97%の ALS 患者の発病組織で観察されている［1］。このことは一部の家族性疾患だけでなく幅広い神経変性疾患患者に共通した疾患発症機序に、これらのタンパク質凝集が関与していることを示唆している。言い換えれば、このタンパク質凝集の原因から帰結までの、共通したメカニズムを解明することが、ALS 研究の進展において重要な意味を持つのである。

我々はこれまでに、FUS および TDP-43 凝集体の形成が特定の RNA の細胞内局在を撹乱すること、またそれら凝集体では細胞内の翻訳活性部位が変化している（異所的な翻訳活性化）ことを見出している［2，3］。このことは RNA 局在や局所的翻訳制御機構の変容が神経変性の原因である可能性を示唆しているが、1. 細胞内 RNA 局在の異常による当該 RNA の翻訳活性への影響、2. 翻訳活性に影響を与える分子基盤・機構、3. それらの帰結として神経細胞が受ける形態的影響、といった点が未解明である。

本研究では、上記の問いに答えるべく、RNA 結合タンパク質凝集によってもたらされる RNA の局在・翻訳制御異常の分子基盤・機構解明を、細胞生物学的に明らかにすることを目指した。具体的には今回、FUS 凝集体形成に際して相互作用が変化する因子の探索を、光反応性 Halo タグ基質を利用した新規実験系を用いて行い、またその因子が RNA の局在・翻訳制御に関わるか否かの解析を生化学・細胞生物学的アプローチを用いて行った。その結果をここに報告する。

方法および結果

1. ALS 関連 FUS 凝集体形成に特異的な相互作用因子変化の探索

本研究ではまず、ALS 関連 FUS 凝集体によりもたらされる RNA の異所的な翻訳活性化の責任因子を探索することを試みた。戦略として、ALS 関連遺伝子変異の有無による、凝集体の形成しやすさを利用し、野生型あるいは変異型 FUS を過剰発現させた細胞群で、FUS との相互作用が変化する分子からその候補因子を探索した。ここで我々は、光刺激により近傍分子と化学架橋を形成する新規の Halo タグリガンド（未発表）を使用した。具体的には、Halo タグを融合した野生型・変異型それぞれの FUS タンパク質を過剰発現し、リガンドを培養液中に添加・反応させ、その後 UV-crosslinker を用いた光照射により化学架橋を行った。この方法により形成される FUS-相互作用因子の架橋は不可逆であり、一般的な共免疫沈降による相互作用因子解析と違って試料処理途中での相互作用変化が非常に低い。したがって、相互作用因子の微妙な変化を捉えることができると考えられる。

本方法により準備したタンパク質資料を LC-MS/MS による質量分析にかけた結果、FUS 変異の有無によって明らかな相互作用変化を起こしている分子がいくつか明らかとなった。そのうちの一つとして、Valosin-containing protein（VCP）を同定した。共免疫沈降により確認した結果、VCP は野生型 FUS と変異型 FUS で相互作用効率が変化していることが確認された（図 1a)。また免疫染色にて内在性の VCP 発現分布を確認した結果、FUS 凝集体のうち VCP を含有するものはわずか 15%程度であることが確認できた（図 1b)。

ここで我々は、VCP がその本来の役割として、「FUS 凝集そのものを制御する、あるいはその後の RNA 動態の正常な制御に関わる」ものであり、「VCP は変異型 FUS と相互作用が減少することでその正常な制御機構が破綻している」のではないかという仮説を立て、以下の実験を遂行した。

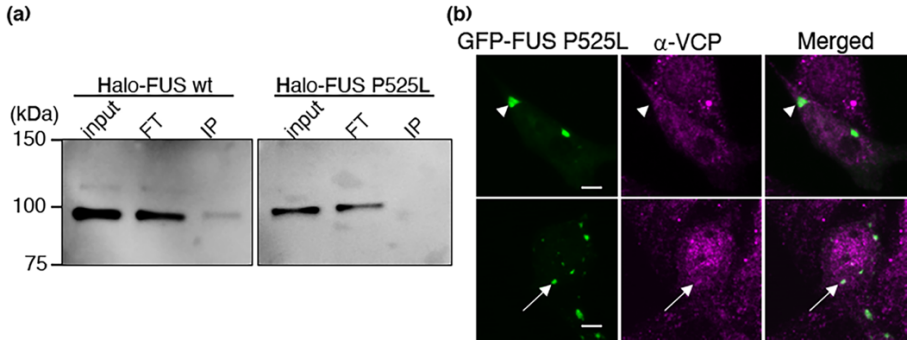


図 1. FUS 凝集体形成に際して相互作用の変化する因子、VCP

a) FUS タンパク質と共免疫沈降する VCP をウェスタンブロットにより検出したもの。左が野生型 FUS、右が ALS 関連変異（P525L）を持つ FUS を過剰発現した細胞を用いた結果。沈降には Halo タグ抗体を用い、VCP 抗体にて VCP を検出した。Input は細胞抽出液そのもの、FT は沈降後の上清、IP は沈降したタンパク質試料を流したレーンである。野生型の FUS と沈降したレーンでは VCP シグナルが見られるが、変異型 FUS と沈降したレーンではそのようなシグナルは見られなかった。

b) 内在性の VCP を免疫染色により検出した像（共焦点顕微鏡像)。左から、FUS、VCP およびそれらのシグナルの重ね合わせ画像。多くの VCP は FUS 凝集体（矢印および矢頭）と共局在しない（上段）が、約 15%ほどの凝集体で、VCP シグナルが共局在するものが見られた（下段)。 スケールバーは 10 μ m。

2. VCP 過剰発現による FUS 凝集体のダイナミクス変化の解析

図 1c に示したように、FUS 凝集体の中には、少数ながら VCP を含有するものが含まれている。このような VCP の有無によって FUS 凝集体の性質はどのように変化しうるかの解析を行うべく、GFP 融合 FUS タンパク質と、RFP 融合 VCP を強制発現した細胞を用いて、それぞれの動態をライブイメージングした。

まず、それぞれの FUS 凝集体を標的として、FRAP 測定による内部分子のダイナミクス解析を行った結果、VCP を含有した凝集体は、より低い拡散係数を示す。すなわち、より「硬い」傾向があることが明らかとなった（図 2a、b)。ダイナミクスは、その凝集体の性質にとって重要な要因であり、これを変化させる VCP の機能を解明することで、FUS 凝集体の形成機序や機能の理解につながる。

これらの影響を引き起こす要因を解明すべく、まず VCP のプロテアソーム経路への関与に着目した。VCP のプロテアソーム系に関わる機能の阻害剤として知られる Eeyarestatin I にて細胞を処理した結果、FUS 凝集体のダ

イナミクスは Eeyarestatin I 処理の影響をほとんど受けないことが明らかとなった（図 2b)。これらの結果は、少なくとも本実験において観察された FUS 凝集体への影響は、VCP の持つプロテアソーム機能そのものとは別の機構により引き起こされていることが示された。

VCP は ATP 加水分解酵素であり、その機能をもってプロテアソーム経路へ関与することがわかっている［4］。そこで次に、この VCP の ATP 加水分解酵素そのものとしての側面に焦点を当てるため、細胞への ATP 枯渇処理を行い、その影響を観察した。ATP 枯渇には、2DG と CCCP を細胞に添加し、ATP 生合成系を停止させる手法を採用した。結果として、ATP 枯渇処理でも FUS 凝集体を構成する FUS 分子の拡散係数が減少する傾向にあることが確認された（図 2b）。ただし、統計的な観点から見て、VCP の凝集体への局在ほどは効果が見られなかった。これは、ATP 枯渇処理が ATP 生合成阻害系であったため、完全な枯渇ができていないことに起因している可能性を考えている。

上記の結果は、1. VCP のノックダウンによりむしろ FUS 凝集体内部の FUS の拡散係数が増加する傾向にある（図 2b）こと、2. ATP 加水分解能が向上することが知られている VCP ドミナントネガティブ変異体の過剰発現で、凝集体内部の FUS の拡散係数が有意に低下する（図 2b）こと、さらに 3. VCP のプロテアソーム経路への機能を阻害する VCP ドミナントネガティブ変異体の過剰発現で凝集体ダイナミクスは変化しない（図 2b）こと、からもサポートされた。

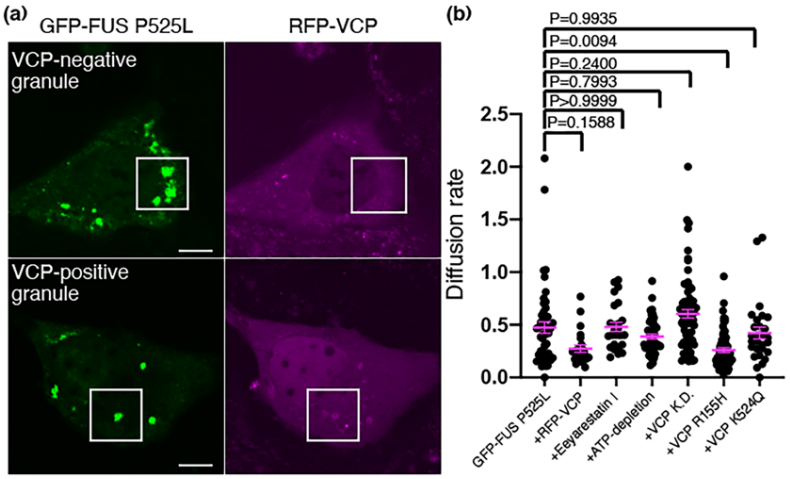


図 2. FRAP 測定を利用した FUS 凝集体ダイナミクス計測

a) FRAP 測定を行った FUS 凝集体の例（共焦点顕微鏡像）。GFP 融合 FUS（左）と RFP 融合 VCP（右）を発現させた細胞を顕微観察し、VCP ネガティブな凝集体（上段）と VCP ポジティブな凝集体（下段）を弁別した。この例では白い四角で囲った領域内の凝集体について FRAP 測定を行った。スケールバーは、10 μ m。

b) FRAP 測定の結果から、拡散係数を算出したもの。左から、GFP 融合 FUS 変異体を発現させた細胞、GFP 融合 FUS 変異体と RFP 融合 VCP を発現させた細胞、GFP 融合 FUS 変異体を発現させた細胞に Eeyarestatin I 処理したもの、GFP 融合 FUS 変異体を発現させた細胞に ATP 枯渇処理したもの、VCP を siRNA によりノックダウンした細胞に GFP 融合 FUS 変異体を発現させた細胞、GFP 融合 FUS 変異体を発現させた細胞、GFP 融合 FUS 変異体と RFP 融合 VCP 変異体（R155H、ATP 加水分解能を促進する変異）を発現させた細胞、そして GFP 融合 FUS 変異体と RFP 融合 VCP 変異体（K524Q、プロテアソーム経路に関わる機能を阻害する変異）を発現させた細胞。それぞれの拡散係数について、GFP 融合 FUS 変異体を発現させたのみのサンプルに対して Dunnett の検定を行い、その P 値をグラフ上部に記載した。

3. FUS 凝集体形成時の RNA 動態変化への VCP の関与・影響解析

上記実験結果から、VCP は FUS 凝集体のダイナミクスに影響を与えるものであり、それには VCP の ATPase としての側面が深く関与していることが示された。すなわち、VCP が本来、ATP 濃度を介して FUS 凝集体ダイナミクス

を制御しており、FUS 遺伝子変異による相互作用減少によりその制御が破綻している可能性が示された。これが正しい場合、我々がこれまで報告してきた、FUS 凝集体によって変容する RNA 動態も、VCP の過剰発現により回復できる可能性がある。したがって次に、VCP 過剰発現の有無での RNA 動態変化を観察した。

まず、FUS 凝集体形成による異所的な翻訳活性化が回復するか否かを、Puromycin を用いた細胞内翻訳活性化部位の染色技術により明らかにした［3］。その結果、VCP 過剰発現細胞では、その異所的な翻訳活性化が低減し、全体の翻訳活性についても、FUS 凝集体を形成していない細胞と同レベルまで回復することが明らかとなった（図 3）。

次に、RNA 局在に対する影響を観察するため、RNA そのものとその翻訳活性を蛍光標識にて観察する SUN-tag 法を用いたライブイメージングを行った［5］。1 分子蛍光顕微鏡を用いたライブイメージング結果から、RNA の動きを追跡し、平均二乗誤差によりその能動性を判定した結果、FUS 凝集体を形成した細胞がそうでない細胞に比べて、RNA の能動的な動きが減少しているのに対して、FUS 凝集体を形成し、かつ VCP を過剰発現した細胞では、FUS 凝集体を形成していない細胞と同レベルで、RNA が能動的に動いているという結果が得られた。これはすなわち、VCP の過剰発現により、RNA が局在する動きが回復したことを示している。

以上の結果から、VCP による FUS 凝集体への影響は、単にダイナミクスへの副次的な影響というわけではなく、本研究で対象とした RNA 動態にも達することが明らかとなった。

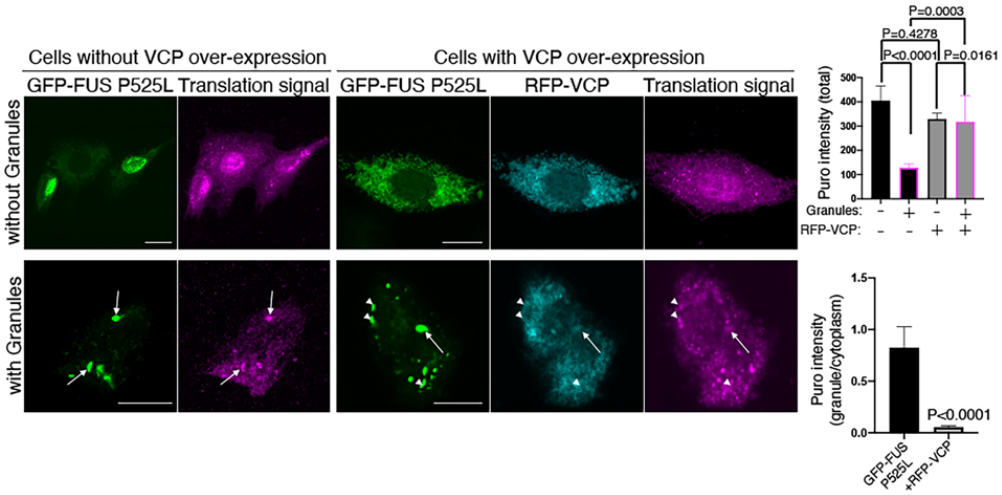


図 3. Puromycin を用いた細胞内翻訳活性の可視化

Puromycin を利用した新規合成ペプチドのラベルおよび染色技術を用いて、FUS 凝集体形成していない細胞（細胞画像上段）と凝集体形成した細胞（細胞画像下段）を染色した像（共焦点顕微鏡像）。左二列は VCP 過剰発現なし、右三列は VCP 過剰発現ありの細胞。矢印で示した FUS 顆粒（緑）の部分で、VCP 過剰発現なしの細胞では、翻訳活性が見られる（マゼンタ）のに対して、VCP 過剰発現ありの細胞では、それがほとんど見られない（矢頭で指示）。スケールバーは、10μm。

右上グラフは、細胞全体の翻訳活性を蛍光強度から算出したもの。VCP 過剰発現により、細胞全体の翻訳活性が、凝集体形成のない細胞のレベルまで回復していた。

右下グラフは、FUS 凝集体内部の翻訳活性を周辺細胞質と蛍光強度にて比較し算出したもの。VCP 過剰発現により、FUS 凝集体内での異常な翻訳活性化が見られなくなっている。

統計処理には Mann-Whitney test を用い、P 値をグラフ内に記載した。

考　察

本研究の主たる成果は、VCP による、ATP 濃度を介した FUS 凝集体形成・消滅制御機構の存在を示唆するデータを得たことである。FUS 凝集体を含む膜を持たない細胞内構造体は、現在、メンブレンレスオルガネラと総称され、

特に生物物理学／タンパク質科学の分野で、その形成機序に関しての *in vitro* 実験結果が積み上げられている。その中で、FUS を含むいくつかのタンパク質で、ATP 濃度によって凝集性が変化することが報告されている。本研究結果は、VCP による ATP 濃度調節が FUS 凝集体形成を制御している可能性を示した。このことは、上記 *in vitro* 実験結果と整合性があるとともに、少なくとも FUS 凝集体に関しては *in vivo* で示した初の結果である。

本実験で使用している、RFP 融合 VCP を強制発現した細胞内では、当然 VCP の発現が過剰であり、通常細胞に比べて細胞内全体の ATP 濃度が減少している可能性が考えられる。また、その中で VCP を含有した凝集体ではさらに局所的な ATP 濃度の低下が起こっている可能性がある。VCP が野生型 FUS とは相互作用していることや、ATP 枯渇実験および変異 VCP を用いた実験結果も踏まえると、本来 FUS は VCP（を含む制御因子）によって FUS 分子周囲の局所的な ATP 濃度を調整され、異常な凝集を抑制されている可能性があると我々は考えている。今後、ATP の細胞内局所の濃度をセンサータンパク質などで計測し、凝集体のダイナミクスと深く関係する、凝集体の形態（サイズや細胞内個数）への影響も含め、VCP と FUS 凝集体ダイナミクスの関係性について明らかにしていきたい。

FUS 凝集体と類似したメンブレンレスオルガネラとして、ストレス顆粒がある。このストレス顆粒は、細胞にストレスを与えることで形成を制御できることから、その形成・消滅の様子がよく観察されている。そこから得られた知見として、流動性の少ない「核」ができ、その周りにダイナミックな「殻」が形成されることで形成され、消滅はその逆方向で起こることが報告されている［6］。VCP 過剰発現や、ATP 枯渇実験は、すでに凝集体を形成している細胞群について行っているため、これらの操作による流動性の低下は、消滅前の「核」のみになった状態、あるいはそれに近づいた状態を示しているのではないかと考えられる。これについても、生細胞への膜透過処理による細胞内分子の流出を観察し、凝集体が流動性の低い「核」なのか、ダイナミックな「殻」を持つのかを確かめることで、さらなる検証を行う予定である。

本研究ではさらに、VCP 過剰発現によって RNA 動態が回復することも明らかにした。翻訳制御の回復に関しては、リボソーム複合体の凝集体へのリクルートが鍵となっていると考えられる。我々は、FUS 凝集体が、例えば上記のストレス顆粒と異なり、リボソームのラージサブユニットをリクルートしていることを確認済みである（未発表）。ストレス顆粒が翻訳を抑制する構造体なのに対して FUS 凝集体が翻訳の異所的活性化を引き起こす要因がここにあると仮定すると、VCP による ATP 局所濃度の低下が FUS 凝集体の「核」化を引き起こしているという仮説とあわせて、VCP 過剰発現によるダイナミックな「殻」の損失が、ラージサブユニットのリクルート機能を逸失させたのではないかと考えている。RNA 局在の回復についても、同様の機構なのではないかと推測される。我々は過去に、FUS 凝集体による RNA 局在異常のメカニズムについて、Kinesin-1 タンパク質の凝集体へのリクルートと、それによる微小管翻訳後修飾の異常が原因であると報告した［2］。すなわちここでも、VCP 過剰発現によるダイナミックな「殻」の損失が Kinesin-1 のリクルートを阻害し、その結果、微小管翻訳後修飾の回復と、それに依存した RNA 局在メカニズムの復調があったのではないかと考えている。これらのことについても、リボソームサブユニットや Kinesin-1 あるいは翻訳後修飾を受けた微小管の染色により、その真偽を確かめる予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたり、ソウル大学の Hyun-Woo Rhee 教授に光反応性 Halo タグリガンドを分与いただいた。また、1 分子顕微鏡等の顕微鏡については、大阪理研（BDR）先端バイオイメージングチームの渡邊朋信チームリーダーにご協力いただいた。

文　献

1） Ling S-H, Polymenidou M, Cleveland D. Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. Neuron. 2013 Aug 7; 79(3):416-438.PMID: 23931993 DOI: 10.1016/J.NEURON .2013.07.033

2) Yasuda K, Clatterbuck-Soper S, Jackrel M, Shorter J, Mili S. FUS Inclusion Disrupts RRNA Localization by Sequestering kinesin-1 and Inhibiting Microtubule Detyrosination. J. Cell Biol. 2017 Apr 3; 216(4):1015-1034. PMID 28298410 PMCID: PMC5379945 DOI: 10.1083/jcb.201608022

3) Yasuda K, Zhang H, Loiselle D, Haysted T, Macara I, Mili S. The RNA-binding Protein Fus Directs Translation of Localized mRNAs in APC-RNP Granules. J. Cell Biol. 2013 Dec 9; 203(5):737-46. PMID 24297750 PMCID: PMC3857475 DOI: 10.1083/jcb.201306058

4) Meyer H, Bug M, Bremer S. Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. Nat. Cell Biol. 2012 Feb 2; 14(2):117-23. PMID: 22298039 DOI: 10.1038/ncb2407

5) Moissoglu K, Yasuda K, Wang T, Chrisafis G, Mili S. Translational regulation of protrusion-localized RNAs involves silencing and clustering after transport. eLife. 2019 Jul 10; PMID: 31290739 PMCID: PMC6639073 DOI: 10.7554/eLife.44752

6) Jain S, Wheeler J.R, Walters R.W, Agrawal A, Barsic A, Parker R. ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure. Cell. 2016 Jan 28; 164(3):487-98. PMID: 26777405 PMCID: PMC4733397 DOI: 10.1016/j.cell.2015.12.038