Dissection of FUS domains involved in regulation of SnRNP70 gene expression.

(SnRNP70 遺伝子の発現制御を行う FUS 分子内領域の解明)

発表雑誌：FEBS Lett. (2020) **594** 3518-3529. doi: 10.1002/1873-3468.13924.

中矢　正（平成２６年度 ALS 基金研究奨励金）
国際医療福祉大学・福岡薬学部・講師
tadashi.nakaya@iuhw.ac.jp
〒831-8501 福岡県大川市大字榎津 137-1
TEL: 0944-32-6100

序：FUS(Fused in Sarcoma)は家族性 ALS の原因因子であり、その遺伝子変異によって生じる変異型 FUS タンパク質は神経細胞死を引き起こすことが知られている。通常型 FUS が細胞の核内に存在するのに対し、変異型 FUS は細胞質に存在し易くなることから、変異型 FUS 発現細胞では核内での正常な FUS の機能が失われる。このことが ALS 発症の一因と考えられているが、FUS の正常な核内機能は明らかでは無かった。

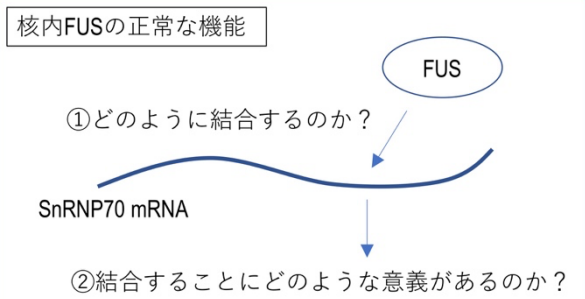

図1　本研究で明らかとすること
FUSによるSnRNP70遺伝子(mRNA)発現制御機構の解明。

私はこれまでに、FUS が核内の様々な RNA と結合することを見出していた。その中で最も強く結合する標的 RNA として SnRNP70(Small nuclear ribonucleoprotein70、核内低分子リボ核タンパク質 70)を同定しており、FUS の発現量が SnRNP70 の遺伝子発現量に影響を持つことを見出していた(Nakaya, 2013, *RNA* 19, 498–509)。SnRNP70 は正常な遺伝子発現に必須の因子であり、SnRNP70 の発現を人為的に低下させた場合、運動神経細胞で異常が認められる(Yu, 2015, *Nucleic Acids Res* 43, 3208–3218)。このことから、FUS と SnRNP70 の機能関係の破綻が ALS 発症に寄与する可能性が考えられた。そこで本研究では、SnRNP70 の発現調節分子機構における FUS の役割を解明することで、FUS の正常な核内機能を明らかにすることを目的とした（図 1）。

結果：**①FUS はどのようにして SnRNP70 遺伝子の発現調節を行うのか？**

FUS には 5 つの分子内領域があり、これらがどのように SnRNP70 発現調節機構へ寄与しているのかを明らかにすることを目的として、各分子内領域を欠損した欠損体もしくは人為的変異を導入した変異体 FUS（図 2）を用いて SnRNP70 の RNA 量及びタンパク質量への寄与を探索した。各欠損体・変異体をマウス神経細胞に発現させたところ、全て通常型 FUS と同じ核内局在を示した。このことは領域の欠損・変異があっても核内

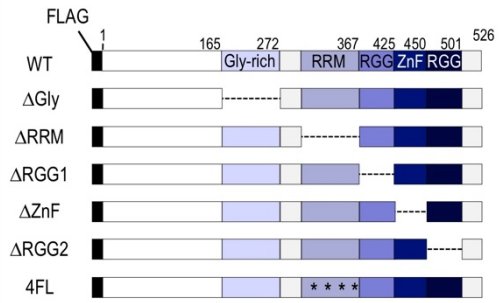

図2　本研究で使用した欠損・変異体の模式図
図上部の数字がFUSを構成するアミノ酸の番号を示す。WT: 通常型。ΔGly: 165～272番目のアミノ酸で構成されるGly-richと呼ばれる領域を欠損したもの。点線は欠損していることを意味する。ΔRRM, ΔRGG1, ΔZnF, ΔRGG2はそれぞれ相当する領域を欠損したもの。4FLはRRMという領域内の4つのフェニルアラニンをロイシンに変異させ、FUSとRNAの結合ができないようにした変異体。RRMの中のアスタリスクが変異を意味する。各タンパク質の頭にFLAGと呼ばれるアミノ酸配列を付加している。

での機能を探索することが可能であることを意味した。次に、これらの発現神経細胞での SnRNP70 の発現 RNA 量を定量的 PCR 法により測定した。その結果、欠損・変異している領域に依存して発現量が増減することが分かった。更に、同じ細胞における SnRNP70 タンパク質量をウェスタンブロッティングにより定量測定した。これらの結果を用いて、RNA 量とタンパク質量の相関関係を調べたところ、それらが逆相関していることが分かった（図 3）。このことから FUS が分子内の様々な領域を使って SnRNP70 の RNA に結合することで RNA 量及びタンパク質量を調節する、という核内機能を持つことが分かった。

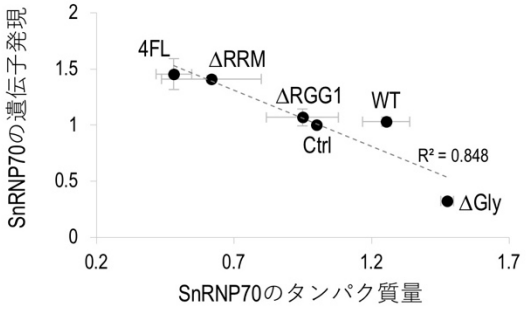

図3　FUS欠損・変異体を発現する細胞でのSnRNP70タンパク質量と遺伝子発現量の解析

図2で示したFUS欠損・変異体発現細胞でのSnRNP70タンパク質量を横軸に、遺伝子発現量を縦軸にして示したもの。近似直線によりこれらが逆相関していることが分かる。表記の領域を用いてSnRNP70の発現を制御していることが分かった。

②なぜ FUS は SnRNP70 遺伝子の発現量を調節するのか？

①で解明した機能がどのような役割を持つのか明らかとする為、SnRNP70 の発現を増やす FUS 変異体と SnRNP70 の発現を減少させた神経細胞を用いて網羅的遺伝子発現の解析(RNA-seq 解析)を行った。その結果、FUS 変異体の発現及び SnRNP70 発現の減少によって多くの遺伝子発現が変動することが分かった。それらの遺伝子発現の増減パターンの解析を行った結果、1. FUS と SnRNP70 が協調して制御する遺伝子群、2. FUS のみが制御する遺伝子群、3. FUS と SnRNP70 がそれぞれ独立して制御する遺伝子群が存在することが分かった（図 4）。2 及び 3 の遺伝子群が制御する分子経路を調べたところ、細胞接着に寄与する遺伝子群が多く含まれていたことから、FUS 及び SnRNP70 はそれぞれ独立して細胞接着に関わる可能性が示された。一方、1 の遺伝子群に共通した分子経路は見いだせなかった。1 に含まれる遺伝子群は FUS と SnRNP70 による協調した制御を受けることから、FUS はこの群に含まれる遺伝子の発現を制御する為に SnRNP70 の遺伝子発現量を制御していることが示唆された。その対象分子経路については、今後より詳細な研究を行うことで明らかにできると考えられた。

計35,975遺伝子の発現を解析

⬇

クラス1 (104遺伝子): FUSとSnRNP70が協調的に制御
クラス2 (43遺伝子): FUSが制御
クラス3 (111遺伝子): FUSとSnRNP70が別々に制御

図4 網羅的遺伝子発現解析の結果。

FUSはクラス1の遺伝子群を制御する為にSnRNP70の発現を制御していることが分かった。

考察：FUS は分子内の様々な領域を用いて SnRNP70 遺伝子の発現量を調節し、細胞内の特定の遺伝子発現を制御する、という正常な核内機能を持つことが分かった。変異型 FUS ではこの機能が破綻することで、SnRNP70 の発現量調節及びその標的遺伝子群の制御ができなくなり、細胞内異常を引き起こすことが考えられる。このことから、その標的遺伝子群が制御する分子内経路の解明が今後必要と考えられた。

終わりに：本研究をご支援いただきました日本 ALS 協会の皆様に心より御礼申し上げます。誠にありがとうございました。