

＜シンポジウム 13—4＞筋萎縮性側索硬化症の病因 TDP-43 および FUS/TLS 研究の最前線

ポリグルタミン封入体結合タンパク質としての FUS/TLS

貫名 信行

(臨床神経 2010;50:945-947)

Key words : ポリグルタミン, 凝集体, FUS/TLS, ALS6

はじめに

ポリグルタミン病はその病因遺伝子に CAG のリピートをふくみ、リピートの伸長をみとめる一群の神経疾患である。CAG リピートが病因遺伝子の翻訳領域に存在するため CAG リピートから翻訳されたポリグルタミンが病態に強くかかわっていると想定される。ポリグルタミン病の神経細胞の核にはポリグルタミンからなる封入体が存在することが確認され、これらの封入体と神経細胞変性の関連が注目されている。われわれは伸長したポリグルタミンの挿入による構造異常を認識する因子 aggregate interacting proteins (AIPs) を網羅的に探索することにより細胞内に出現するミスフォールドしたタンパク質の構造状態を認識するシステムとその抑制機構を解明しようとしてきた。

ポリグルタミン凝集体結合タンパク質としての FUS/TLS

伸長したポリグルタミン鎖をもつ Htt の N 端 (tNHtt) と EGFP の融合タンパク質、さらに核移行シグナルを付加したタンパク質を発現し、細胞質および核内に凝集体を形成する HD モデル細胞を Neuro2a で作成した。われわれは、これらの細胞から凝集体を部分精製し、その構成成分を、質量分析法をもちいて解析した¹⁾。

この方法によってシャペロン、ユビキチン・プロテアソーム系の構成タンパク質など、既知の凝集体結合タンパク質 AIPs に加えて、Ubiquilin1, 2, Tollip などのユビキチン結合タンパク質を同定した²⁾。さらにこの系ではこれまで転写異常に関連すると提唱されていた CBP などはみいだせず、中枢神経系ではあまり検討されていなかった NF-YA をみいだした。NF-YA はポリグルタミン病における HSP70 の発現異常に関与していると考えられた³⁾ (Fig. 1)。このようにわれわれの直接ポリグルタミン凝集体結合タンパク質を同定する戦略は病態に意義を持つと思われる分子を結果的にみいだしてきたと考えているが、興味深い点はこれらの結合タンパク質にくわえ RNA 結合タンパク質である TLS を同定した点である⁴⁾。TLS はポリグルタミン凝集体結合タンパク質の中では

比較的多く存在するタンパク質であり、*in vitro* (細胞レベル)、*in vivo* (ハンチントン病モデルマウス R6/2) においてポリグルタミン封入体と共局在を示した。*In vitro* で GST-tNHtt (18, 42, 62Q) とは結合せず、凝集体を形成すると結合することが示された。さらに Thioflavin T assay によって TLS 存在下でポリグルタミン凝集をみると、その凝集形成速度が遅くなり、siRNA によって細胞における TLS の発現を抑制すると凝集体が増大した。この結果から TLS は核内封入体の形成に抑制的に関与していることが示唆された。TLS はその後ハンチントン病のみならず SCA1, SCA3, DRPLA の核内封入体とも共局在することが確認され、ポリグルタミン凝集体一般に結合することが確認された⁵⁾。われわれはこれらの結果から TLS が核内封入体に結合することにより、その機能低下がポリグルタミン病の病態に関与していることを想定した。TLS は腫瘍タンパク質として同定された TLS-CHOP 融合タンパク質の N 端側を構成するタンパク質である。EMS, TAF15 などともに TET family と呼ばれるタンパク質群のひとつであり、DNA, RNA 結合タンパク質である。TLS に関しては日本において主に研究されており、RNA 輸送にかかわるタンパク質であること⁶⁾、樹状突起棘形成にかかわること⁷⁾、CBP, P300 HAT activity を阻害すること⁸⁾などが報告されており、ポリグルタミン病においてもこれらの一部が障害されることが想定された。

ところがわれわれが本報告をした1年後に FUS/TLS が家族性筋萎縮性側索硬化症の一型である ALS6 の原因遺伝子であることが報告された⁹⁾¹⁰⁾ (Fig. 2)。TLS は RNA 結合タンパク質であり、同様に RNA 結合タンパク質であり、ALS において蓄積している TDP43 と類似の機序によって神経変性に関与している可能性がある。とくに TDP43 と同様にその病理において細胞質に沈着して核内から除外されてしまっている像がみとめられ、核内での機能異常が病態に強く関与している可能性が示唆されている。われわれは TLS の C 末端に核内移行シグナルとなりうるモチーフをみだし、この部分に ALS6 の突然変異が多いことから、この領域の変異タンパク質を細胞に発現すると細胞質に分布する変異が存在することをみいだした。分子の中程 (RGG-rich region) にある突然変異ではこのようなことがみられないことから、核移行の障害が単純に病態に関与している訳ではない可能性もあるが、病

凝集体結合蛋白質が示唆する病態

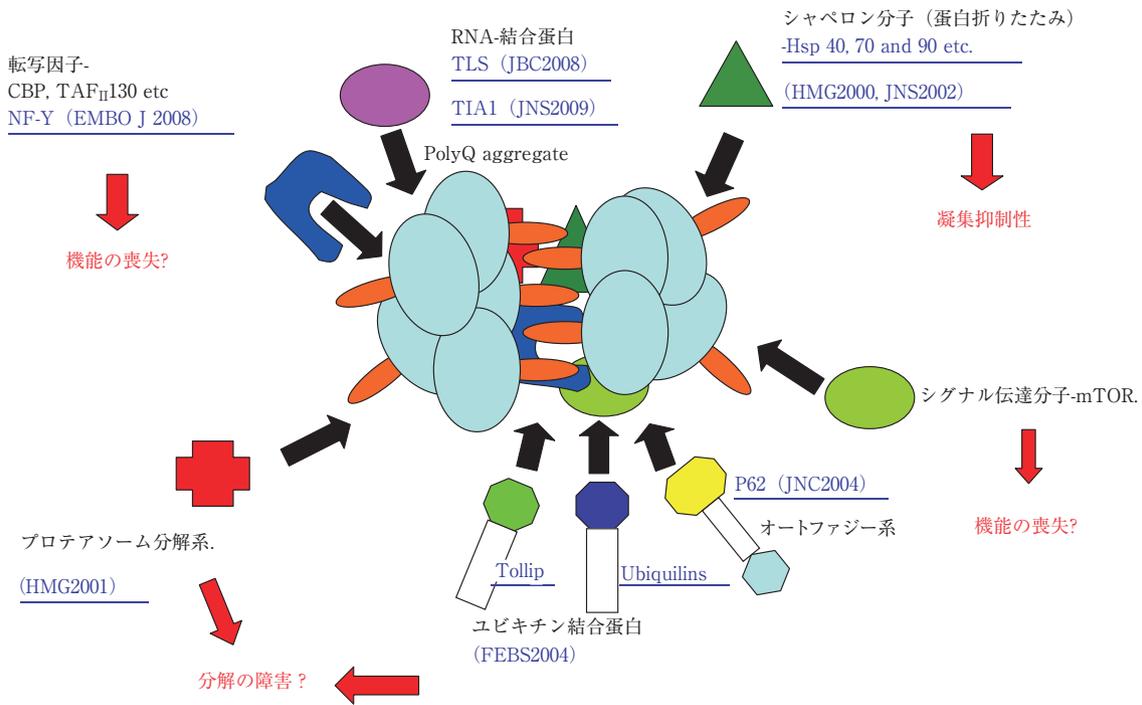


Fig. 1 ポリグルタミン病結合タンパク質として確認した分子と病態への関与.

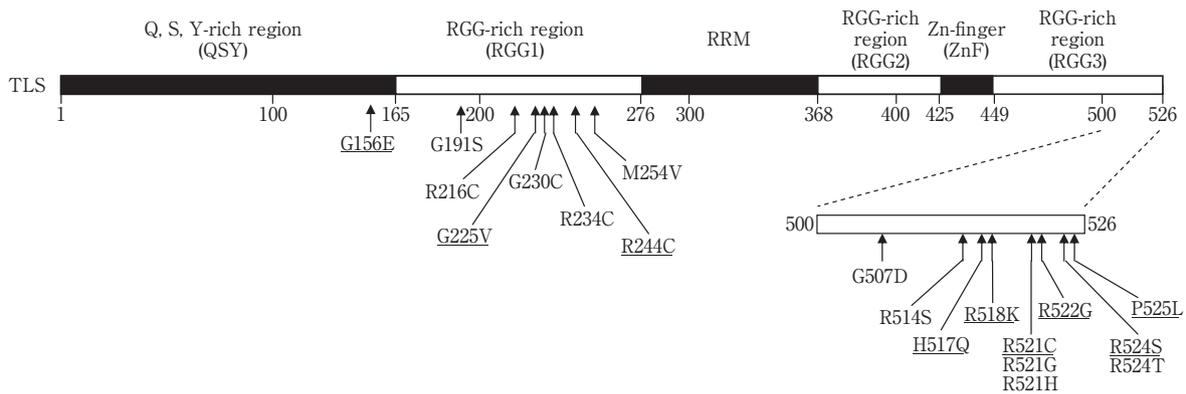


Fig. 2 ALS6の突然変異と TLS のドメイン.

態の促進因子である可能性もあり、今後の検討が必要であると考えている。

まとめ

RNA 結合タンパク質の神経変性への関与は今後重要な展開をみせると予想される。興味深いのはアルツハイマー病の不溶性タンパク質分画に non-amyloidogenic component (NAC) として α -synuclein が報告され、その後 α -synuclein はパーキンソン病の主要な病態因子であることがわかった点である。 α -synuclein はその後アルツハイマー病においてタウタンパクと共凝集するという報告もある。このような凝集傾

向のあるタンパク質どうしの作用が神経変性過程にどのような影響を与えるのかも今後の重要なテーマであろう。

文献

- 1) Mitsui K, Nakayama H, Akagi T, et al. Purification of polyglutamine aggregates and identification of elongation factor-1alpha and heat shock protein 84 as aggregate-interacting proteins. J. Neurosci 2002;22:9267-9277.
- 2) Doi H, Mitsui K, Kurosawa M, et al. Identification of ubiquitin-interacting proteins in purified polyglutamine aggregates. FEBS Lett 2004;571:171-176.
- 3) Yamanaka T, Miyazaki H, Oyama F, et al. Mutant Hunt-

- ingtin reduces HSP70 expression through the sequestration of NF-Y transcription factor. *EMBO J* 2008;27:827-839.
- 4) Doi H, Okamura K, Bauer PO, et al. RNA-binding protein TLS is a major nuclear aggregate-interacting protein in huntingtin exon 1 with expanded polyglutamine-expressing cells. *J Biol Chem* 2008;283:6489-6500.
 - 5) Doi H, Koyano S, Suzuki Y, et al. The RNA-binding protein FUS/TLS is a common aggregate-interacting protein in polyglutamine diseases. *Neurosci Res* 2010;66:131-133.
 - 6) Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. Kinesin transports RNA : isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 2004;43:513-525.
 - 7) Fujii R, Okabe S, Urushido T, et al. The RNA binding protein TLS is translocated to dendritic spines by mGluR5 activation and regulates spine morphology. *Curr Biol* 2005;15:587-593.
 - 8) Wang X, Arai S, Song X, et al. Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature* 2008;454:126-130.
 - 9) Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2009;323:1205-1208.
 - 10) Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 2009;323:1208-1211.

Abstract

FUS/TLS as a polyglutamine aggregate interacting protein

Nobuyuki Nukina, M.D.

RIKEN Brain Science Institute Lab for Structural Neuropathology

Formation of intracellular aggregates is the hallmark of polyglutamine (polyQ) diseases. We analyzed the components of purified nuclear polyQ aggregates by mass spectrometry. As a result, we found that the RNA-binding protein translocated in liposarcoma (TLS) was one of the major components of nuclear polyQ aggregate-interacting proteins in a Huntington disease cell model and was also associated with neuronal intranuclear inclusions of polyQ diseases. In vitro study revealed that TLS could directly bind to truncated N-terminal huntingtin (tNhtt) aggregates but could not bind to monomer, indicating that the tNhtt protein acquired the ability to sequester TLS after forming aggregates. Immunohistochemistry showed that TLS was associated with neuronal intranuclear inclusions of Huntington disease and other poly Q disease brains. After this report, FUS/TLS was reported as a responsible gene for ALS6. Because TLS has a variety of functional roles, the sequestration of TLS to polyQ aggregates may play a role in diverse pathological changes in the brains of patients with polyQ diseases and ALS6.

(*Clin Neurol* 2010;50:945-947)

Key words: polyglutamine, aggregate, FUS/TLS, ALS6
