

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

トランスジェニックショウジョウバエを用いた  
筋萎縮性側索硬化症病因遺伝子 FUS による神経変性機構の解明

氏名 功刀 隼人

### 背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、上位および下位運動神経細胞が選択的に変性・脱落する進行性の神経変性疾患である。家族性 ALS (FALS) の一つである ALS6 の病因遺伝子として同定された *fused in sarcoma (FUS)* は 526 アミノ酸からなるタンパク質であり、RNA 認識モチーフ (RRM) を有し、RNA の転写や輸送、RNA 編集に関わることが示唆されている。FUS は C 末端に核移行シグナル (NLS) を持ち、主に核に局在するタンパク質であるが、ALS6 患者、さらに一部の前頭側頭葉変性症 (FTLD-FUS) 患者において、FUS タンパク質は神経細胞に細胞質内封入体として蓄積することが報告されている。しかしこれまでに FUS が神経変性を生じる機序、さらに FALS 変異型 FUS が及ぼす変異効果の詳細は明らかになっていない。

本研究において私は、FUS による神経変性モデルとして、ヒト FUS を過剰発現するトランスジェニックショウジョウバエ (FUS tg fly) を樹立し、神経変性の分子機構の解明を試みた。

### 方法と結果

#### 1. 野生型 FUS の過剰発現は RNA 結合依存的に複眼の変性を引き起こす

GAL4-UAS システムを用いて、GMR ドライバーによりショウジョウバエ複眼特異的にヒト FUS を過剰発現する tg fly を作出し、FUS による複眼網膜視神経細胞の変性を形態学的、組織学的に評価した。その結果、コントロールの lacZ tg fly に比べて、野生型 FUS tg fly では個眼の配列が乱れ、網膜光受容

細胞層の厚さが約 30%減少するなどの複眼の変性所見が認められた。

次に FUS tg fly における複眼変性に、FUS の RNA 結合能が関与するか否かを調べるため、RRM を欠失した FUS  $\Delta$ RRM を過剰発現する tg fly を作出したところ、FUS  $\Delta$ RRM tg fly では野生型 FUS tg fly で見られた複眼変性は生じなかった。FUS の RNA 結合能を electrophoresis mobility shift assay (EMSA) により検討したところ、野生型 FUS では RNA との結合が見られたのに対し、FUS  $\Delta$ RRM では RNA との結合がほぼ消失することが確認された。

これらの結果から、FUS は RNA 結合依存的に複眼変性を引き起こすことが判明した。

## 2. FUS は核外に局在するときにより強い神経変性効果を発揮する

FTLD-FUS 患者において野生型 FUS が神経細胞の細胞質内に蓄積していることから、FUS の細胞質への局在の変化が神経変性に関与する可能性が考えられた。そこで、作出した FUS tg fly を用いて、FUS の局在と複眼変性の関係について検討した。

まず、FUS の核への移行を担うタンパク質である transportin のノックダウンにより、FUS を核外に局在させることを試みた。FUS tg fly 光受容細胞における FUS の細胞内局在を検討したところ、野生型 FUS は主に核内に局在が見られた。一方でショウジョウバエにおける transportin のオルソログである Trn のノックダウン時に、野生型 FUS は核外に顆粒状に局在した。複眼変性について検討したところ、Trn のノックダウンによって野生型 FUS tg fly の複眼変性は増悪した。一方で複眼特異的な Trn のノックダウンのみでは、複眼変性は観察されなかった。これらの結果から、Trn のノックダウンは、FUS による変性効果を増強することがわかった。

次に、FUS tg fly において、FUS を核内に局在させたときの複眼変性について検討した。FUS は主に核に存在するが、核と核外とを行き来することが知られている。そこで、FUS のアミノ末端に SV40 の T 抗原由来の核移行シグナル (NLS) を付加することで、FUS を核内のみに局在させることを試みた。NLS-野生型 FUS tg fly では、野生型 FUS tg fly に比して複眼変性が減弱した。

以上の結果から、FUS は核内に局在するときと比べて、核外に局在するときにより強い変性効果を発揮することが示唆された。

## 3. 野生型 FUS は最 C 末端を介して変性効果を発揮する

FUS の最 C 末端は transportin との相互作用部位を形成することが知られている。そこで最 C 末端 13 アミノ酸の欠失 ( $\Delta$ 514-526 変異) が、Trn のノックダウンと同様に変性増悪効果を有するか否か検討するため、 $\Delta$ 514-526 変異型 FUS tg fly の複眼変性の解析を行った。

$\Delta$ 514-526 変異型 FUS tg fly では、FUS は核外に顆粒状に局在したが、複眼変性は見られなかった。この結果から、 $\Delta$ 514-526 変異型 FUS は核外に局在するものの複眼変性を引き起こさないことがわかり、核外の FUS による複眼変性の発揮には最 C 末端が必要であることが示唆された。

## 4. FALS 変異は FUS による複眼変性を増悪させる

FUS の FALS 変異が複眼変性にもたらす効果について検討するため、FALS 変異 (R514G および R521C) を導入した FUS を過剰発現する tg fly を作出し、組織学的に検討した。FALS 変異型 FUS tg fly では、

野生型 FUS tg fly に比して光受容細胞層の厚さが有意に減少し、複眼変性が増悪した。この結果から、FALS 変異が複眼変性を増悪させる効果を有することが確認された。

#### 5. FALS 変異は RNA 結合を介さずに複眼変性増悪効果を発揮する

FALS 変異による複眼変性の増悪に FUS の RNA 結合能が関与するか否かを検討するため、RRM を欠失し、かつ FALS 変異を有する FUS を過剰発現する tg fly を作出した。R514G 変異型 FUS では、RRM の欠失によっても複眼変性は部分的にしか回復しなかった。この結果から、FALS 変異型 FUS は RNA 結合能が低下しても複眼変性効果を発揮することが示唆された。

#### 6. FALS 変異は FUS の核外の移行を増加させ、核外型 FUS の変性効果を増強させる

FALS 患者において、FUS が運動神経細胞の細胞質に蓄積していることから、FALS 変異による複眼変性の増悪効果が FUS の核外移行の増加によるものである可能性が考えられた。FALS 変異型 FUS tg fly 光受容細胞における FUS の細胞内局在を検討したところ、核外に顆粒状に局在する様子が観察された。

FUS の細胞内局在の変化と FALS 変異による変性増悪効果の関係についてさらに検討するため、まず FALS 変異型 FUS tg fly において Trn をノックダウンし、複眼変性の解析を行った。Trn ノックダウン時の複眼変性の程度の変化を比較すると、野生型に比べ R514G 変異型 FUS tg fly で複眼変性がより顕著に見られた。この結果から、FALS 変異による変性増悪効果は、FUS が核外に局在するときに発揮されることが示唆された。

次に、NLS-野生型 FUS tg fly と NLS-FALS 変異型 FUS tg fly の複眼変性の程度について比較した。Tg fly 光受容細胞において、R514G 変異型 FUS が核外に顆粒状に局在したのに対し、NLS-R514G 変異型 FUS は主に核内に局在した。NLS-R514G 変異型 FUS tg fly では、R514G 変異型 FUS tg fly に比して複眼変性が減弱した。NLS-野生型 FUS tg fly と NLS-R514G 変異型 FUS tg fly との間に複眼変性の程度の差が見られなかったことから、FALS 変異による変性増悪効果は FUS が核内に局在するときには発揮されないことが示唆された。

### **考察**

本研究において私は、FUS による神経変性機構に関して、(1) RNA 結合を介した変性経路、(2)核外における、最 C 末端を介した変性経路があることを示唆する知見を得た。また FALS 変異による変性増悪効果に関して、(1) より変性効果の高い核外型 FUS を増加させる効果、(2) 核外で発揮される FUS による変性効果を増強させる効果の存在を示唆する知見を得た。

野生型 FUS が RNA 結合を介して神経変性を発揮したことは、過剰発現した FUS が RNA の適切なプロセッシングに障害を引き起こしたことに起因すると解釈できる。また FUS の最 C 末端は、FUS の凝集能あるいは他の因子との相互作用に関与することにより、核外の FUS による神経変性に寄与することが予想される。そして最 C 末端に位置する FALS 変異は、最 C 末端が有する変性効果を強めることにより、核外での FUS による神経変性効果を増強させると考えられる。今後は FUS によりプロセッシングの影響を受け、神経変性につながる RNA の詳細、また核外において FUS により引き起こされる神経変性機構の詳細について解析し、ALS6 および FTLD-FUS 発症の分子機構に迫りたい。