

## 主論文の要旨

### **FUS-regulated region- and cell-type-specific transcriptome is associated with cell selectivity in ALS/FTLD**

FUSに制御される部位・細胞特異的トランスクリプトームは  
ALS/FTLDの病変選択性に関連する

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻  
脳神経病態制御学講座 神経内科学分野

(指導：祖父江 元 教授)

藤岡 祐介

## 【諸言】

運動神経が選択的に障害される筋萎縮性側索硬化症(ALS; amyotrophic lateral sclerosis)と認知症である前頭側頭葉変性症(FTLD; frontotemporal lobar degeneration)の両病理像に特徴的な細胞質封入体に、FUSやTDP-43等のRNA代謝に関わるとされるRNA結合蛋白が異常局在すること、*FUS*、*TDP-43*が家族性ALSおよび家族性FTLDの原因遺伝子であることなどが明らかとなり、近年RNA代謝障害を背景とした臨床病理学的スペクトラムの存在が推定されている。FUS関連ALS/FTLDにおいて、FUSの特にRNA代謝における機能障害が各中枢神経系細胞の変性に関わる可能性を検討するため、運動神経細胞(MN)、大脳皮質神経細胞(CbrN)、小脳神経細胞(CblN)および大脳皮質グリア細胞(GC)においてFUSが制御するトランスクリプトームを解析し比較検討した。

## 【対象および方法】

マウス胎児(C57BL/6)を用いMN(胎生13日)、CbrN、CblNおよびGC(各胎生15日)の初代培養を作成した(Fig1.A)。マウス*FUS*遺伝子に対するshRNAを発現するレンチウイルスを2種類(shFUS1,2)作成し、control shRNA(shCont)発現レンチウイルスとともに各細胞に感染後、それぞれの細胞でRNAを回収しsplicing sensitive microarray(Affymetrix Mouse Exon 1.0 ST Array)を用いて遺伝子発現と選択的スプライシングのプロファイルを作成し比較することで、各細胞でFUSのノックダウンにより発現量、選択的スプライシングが変化した遺伝子を網羅的に解析した。

## 【結果】

各細胞の初代培養はそれぞれ95%以上の純度を持って確立し(Fig1.B)、各細胞においてRNAレベル、蛋白レベルでFUSの発現抑制を確認した。FUS非ノックダウン細胞の遺伝子発現プロファイルを各細胞で比較し、主成分解析(PCA)を行ったところ神経細胞(MN, CbrN, CblN)は互いに近似していたが、GCとは大きく異なった(Fig1.C)。次にFUS制御下で有意に発現量が変化した遺伝子に着目すると、FUSノックダウン時に1.3倍以上発現量の変化した遺伝子数はMN、CbrN、GCではいずれも2000以上であったがCblNでは494であった(Fig2.A)。各細胞間でFUSノックダウン時に同方向に変化した遺伝子、エクソンをVenn図で表すと、MN、CbrN間では共通した遺伝子、エクソンの変化を多く認めたが、CblNとの共通性はいずれも低かった(Fig2.B)。エクソン変化量から散布図を作成し相関を検討したところMN、CbrN間でのみ有意な相関( $R^2=0.7094$ )を認めた(Fig2.C)。病態修飾因子と考えられるGCとMN、CbrNとの間では遺伝子発現量の変化は比較的類似していたが、エクソン変化量に相関は認めなかった(Fig2.D,E)。

各細胞においてFUS制御下に発現量および選択的スプライシングの変化した遺伝子のGene Ontology(GO) termsをTable1に示す。MN、CbrNにおいて選択的スプライシングの変化した遺伝子のGO termsは主に神経機能に関わるものであったが、

CblN ではみられなかった。GC の GO terms はいずれも免疫系に關与していた (Table1)。

次に shFUS1,shFUS2 に共通し 1.3 倍以上有意に変化したエクソンを求め、各細胞における選択的スプライシング変化をもとにカテゴリー化し (Table2)、それぞれ RT-PCR で確認した。代表分子を Fig3.A,B,C に示す。

また FUS 制御下に遺伝子発現量、選択的スプライシングの変化した遺伝子には神経変性疾患に關わる分子が多く含まれていた (Table3)。

代表的な遺伝子発現量、選択的スプライシングの蛋白レベルでの変化を全細胞において immunoblot で確認した (Fig4)。

FUS の RNA への結合性について中枢神経組織間で差があるかを評価するため、マウス胎児中枢神経組織 (脊髄;胎生 13 日目、大脳および小脳;胎生 15 日目)を用いて RNA 免疫沈降 (RIP)を行い、既知の FUS 結合 mRNA について結合度合いを組織間で比較した (Fig5.A)。FUS とそれぞれの既知の mRNA の結合度合は各組織間での相違は乏しかった (Fig5.B)。次に FUS のスプライシングターゲットへの結合部位とスプライシングへの影響を細胞種間で比較するため、GC と CbrN のプロファイルとマウス脳による HITS-CLIP の結果を統合し complexity map を作成したところ、CbrN と GC における FUS 結合パターンはどちらも「櫛の歯状」であり大きな相違はなかった。

## 【考察】

4 種の中枢神経系初代培養細胞において、FUS 制御下に発現量、選択的スプライシングの変化した遺伝子プロファイルを得た。遺伝子発現量の変化した分子は ALS/FTLD に關連しない CblN で少なく、ALS/FTLD に關連する MN, CbrN, GC で遺伝子発現量の変化が大きかったという事実は FUS ノックダウンの各細胞に対する影響の程度を遺伝子発現量が反映しており、ALS/FTLD の病態に關係する細胞で影響が大きいのではないかと考えられた。一方、選択的スプライシングに変化を認めた遺伝子プロファイルは MN と CbrN 間でのみ類似しており、選択的スプライシングは細胞特異的に精巧に調節されている可能性がある。FUS の調節を受ける選択的スプライシングは、遺伝子発現量調節と比較し、部位、細胞種特異的であり、FUS ノックダウンの直接的な影響を反映していると考えられた。実際、HITS-CLIP で FUS-tag の結合量を見てみると、発現量の変化した分子と比較し選択的スプライシングの変化した分子に、より高頻度に FUS が結合していた。この点から FUS 制御下の選択的スプライシング変化は FUS 關連 ALS/FTLD の細胞脆弱性を規定し、遺伝子発現の変化は細胞の被るインパクトの大きさを表していると推察できる。

FUS は細胞種依存的に選択的スプライシングを調節しているが、RIP や complexity map での検討では、FUS の mRNA への直接の結合は細胞/組織特異的ではないことが示唆された。スプライソゾームにおいて FUS と協働する他分子が細胞種ごとの選択的スプライシングの特異性を規定している可能性もあり、今後の FUS 蛋白相互作用の検討により、細胞特異的な選択的スプライシングのより詳細な機序の解明が得られ