

主論文の要旨

**The ALS/FTLD-related RNA-binding proteins
TDP-43 and FUS have common downstream RNA
targets in cortical neurons**

ALS/FTLD に関連する RNA 結合蛋白である TDP-43 と FUS は
大脳皮質神経細胞において標的 RNA を共有する

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)

本田 大祐

【緒言】

近年、筋萎縮性側索硬化症 (ALS; amyotrophic lateral sclerosis) 及び前頭側頭葉変性症 (FTLD; frontotemporal lobar degeneration) の両病理像に特徴的な細胞質封入体に、TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) や fused in sarcoma (FUS) 等の RNA 結合蛋白が異常局在すること、及び *TDP-43* 及び *FUS* が家族性 ALS および家族性 FTLD の原因遺伝子であることが明らかとなった。TDP-43、FUS 共に正常状態では核内に存在するが、ALS/FTLD の病的神経細胞においては核外で封入体を形成することから、TDP-43 及び FUS の機能喪失による RNA 代謝障害が ALS/FTLD の病態形成に関与すると考えられる。我々のグループでは既に FUS 発現抑制モデル神経細胞における、トランスクリプトーム (遺伝子発現および選択的スプライシング) のプロファイルを網羅的に解析し報告した。本研究では、大脳皮質神経細胞を用いた TDP-43 発現抑制モデルにおけるトランスクリプトームを解析し、FUS 発現抑制モデルでの結果との比較検討を行い、TDP-43 及び FUS の共通する標的遺伝子群を検索した。

【対象及び方法】

マウス *TARDBP* (*TDP-43*) 及び *FUS* 遺伝子に対する shRNA を発現するレンチウイルスを 2 種類ずつ (shTDP-1, 2、shFUS1, 2)、及び control shRNA (shCont) を発現するレンチウイルスを作成した。C57BL/6 マウス胎仔 (胎齢 15 日) から初代培養大脳皮質神経細胞を作成し、培養第 5 日に各レンチウイルスを感染し、培養第 11 日に回収した。RNA を抽出後、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、TDP-43 及び FUS の発現抑制により、遺伝子発現量、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】

TDP-43 及び FUS 発現抑制モデル神経細胞の確立

大脳皮質初代培養神経細胞は 95%以上の純度をもって確立された。Real-time qPCR により TDP-43 において 60-90%、FUS において 80-90%の mRNA レベルの発現抑制を確認し、immunoblot により TDP-43 及び FUS 両者について蛋白レベルでの発現抑制を確認した。

TDP-43 及び FUS 発現抑制モデルにおけるトランスクリプトームの比較検討

shTDP 群と shFUS 群において control に対して遺伝子発現、もしくは選択的スプライシングが 0.67 倍以下もしくは 1.5 倍以上の変化を認めた遺伝子を Venn 図に表した (Fig1. A)。遺伝子発現については shTDP 群で 204 個、shFUS 群で 183 個の遺伝子に変化し、51 個の遺伝子が共通していた。選択的スプライシングについては、shTDP 群で 674 個、shFUS 群で 428 個のエクソンに変化がみられ、61 個が共通であった。遺伝子発現及びエクソンの変化量を用いて散布図を作成し、shTDP 群と shFUS 群の相関関係を検討すると、遺伝子発現において $R^2=0.78$ 、選択的スプライシングについて $R^2=0.64$

と有意な相関がみられた (Fig1. B)。

Gene Ontology (GO) 解析

shTDP 群及び shFUS 群で遺伝子発現、選択的スプライシングに変化のみられた遺伝子につき、Gene Ontology (GO) terms を解析し、上位 20 term を Table1 に示した。遺伝子発現については shTDP 群と shFUS 群で 8 term が共通しており、signaling cascade に関連する GO term が多くみられた。選択的スプライシングにおいては両群に共通する GO term はみられなかったが、両群に神経機能に関する GO term が多く含まれていた。

共通して発現量が変化した遺伝子群の解析

shTDP 群及び shFUS 群で共通して発現量が変化した遺伝子のうち、変化量大きいものとして 12 個のリストが得られた (Table2)。共通して減少したのものとして *Tgfb β 1* (transforming growth factor- β receptor I; Fig. 2A) 等の 5 遺伝子があり、共通して増加したのものとして *Stx1a* (syntaxin 1A; Fig. 2B) 等の 7 遺伝子があった。Real-time qPCR 法を用いて遺伝子発現量を評価した結果を Fig. 2 に示した。

共通して選択的スプライシングが変化したエクソンの解析

shTDP 群及び shFUS 群で共通して選択的スプライシングが変化したエクソンにつき、変化量大きいものを RT-PCR 法を用いて評価した。選択的スプライシングの変化を確認できたものとして *Camk2a* の Exon4 等、8 個のエクソンのリストが得られた (Table3 及び Fig. 3)。

【考察】

TDP-43 及び FUS は RNA 代謝調節の様々な段階に関与し、その遺伝子変異はともに家族性 ALS/FLTD の原因となる。その分子構造的・機能的な相似性から、TDP-43 及び FUS は神経変性を引き起こす標的分子を共有している可能性が考えられた。本研究の結果、TDP-43 及び FUS の発現抑制によって共通して遺伝子発現や選択的スプライシングが変化する分子群が存在し、それらの一部は神経機能に関与していることが明らかとなった。これは TDP-43 や FUS の機能喪失が ALS/FLTD における神経変性の原因となる可能性を支持する結果であった。

既報によれば TDP-43 のコンセンサス配列は (UG) リピートであり、一方 FUS は非特異的に広範な結合パターンを示すとされる。また、NSC-34 細胞を用いた網羅的解析では TDP-43 と FUS の標的分子群は異なっていると報告されている。本研究の結果では、マウス大脳皮質神経細胞において、TDP-43 及び FUS の標的遺伝子群は一部共通しているが、TDP-43 と FUS が共通の標的分子を制御する分子メカニズムについては今後の検討が必要である。TDP-43 及び FUS に共通する標的分子の中で、発現抑制による遺伝子発現の増加量が最も大きかったものが Syntaxin 1A である。Syntaxin 1A は SNARE 複合体を構成し、その過剰発現によるシナプス小胞の放出障害が報告されていることから、TDP-43 及び FUS の機能喪失は Syntaxin 1A の上昇を介してシナプス機能障害を惹起する可能性が示唆される。また TDP-43 及び FUS の発現抑制により最も発現量が減少

した遺伝子は TGF- β シグナルの伝達に関与する *Tgfbr1* であった。ALS や、運動ニューロン疾患である球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) のモデルマウスにおいても TGF- β シグナル経路の異常が報告されていることから、同経路が FTLD/ALS 及び運動ニューロン疾患に共通する分子病態に関与することが示唆された。

【結語】

マウス大脳皮質神経細胞において、TDP-43 と FUS の標的分子プロファイルには近似性が認められ、共通する標的分子が ALS/FTLD の神経変性に関与する事が示唆される。