

氏 名 堀尾 朋世

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2436 号

学位授与の日付 2023 年 6 月 30 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 神経変性疾患因子 FUS 及び TDP-43 の神経 RNA 顆粒への
集積は、RNG105/caprin1 の動態を上昇させてシナプス損失
を引き起こす

論文審査委員 主 査 東島 眞一
基礎生物学コース 教授
椎名 伸之
基礎生物学コース 准教授
木下 典行
基礎生物学コース 准教授
片平 正人
京都大学エネルギー理工学研究所 教授

(様式3)

博士論文の要旨

氏名 堀尾 朋世

論文題目

神経変性疾患因子FUS及びTDP-43の神経RNA顆粒への集積は、RNG105/caprin1の動態を上昇させてシナプス損失を引き起こす

(Regulation of RNG105/caprin1 dynamics by pathogenic cytoplasmic FUS and TDP-43 in neuronal RNA granules modulates synaptic loss)

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD) are incurable neurodegenerative diseases. A contributing feature of these diseases is decreased synaptic density and loss of mature dendritic spines before the neuronal loss. A common histopathological hallmark of ALS and FTD neurons is the cytoplasmic aggregation of fused-in-sarcoma (FUS) and TAR DNA binding protein 43 (TDP-43), RNA-binding proteins (RBPs) normally located in the nucleus and play multiple functions in RNA metabolism. In ALS and FTD neurons, FUS and TDP-43 translocate excessively from the nucleus to the cytoplasm and accumulate within cytoplasmic RNA granules. RNA granules, formed by liquid-liquid phase separation (LLPS), play roles under physiological conditions in transporting mRNAs encoding proteins required for synapse formation/potentialiation from the cell body to dendrites, and locally translating those mRNAs in response to synaptic stimulation. The accumulation and eventual aggregation of FUS and TDP-43 within RNA granules are thought to influence LLPS status and RNA granule function. However, it is unclear whether FUS and TDP-43 accumulation in RNA granules affects the dynamics of other RNA granule components that normally regulate RNA granule function, and whether such changes in the dynamics of RNA granule components are related to the FUS- and TDP-43-induced impairment

of synapse formation/potentiation.

To address this issue, I used primary cultured neurons from the mouse cerebral cortex to investigate the effects of FUS and TDP-43 overexpression on the dynamics of RNA granule scaffold RBPs such as FMRP, Staufen1 (Stau1), Stau2, Pumilio2 (Pum2), and RNG105 (a.k.a. caprin1). First, using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) and cell permeabilization assays, I found that FUS and TDP-43 accumulation in dendritic RNA granules increased RNG105 dynamics and facilitated its dissociation from the granules. This dissociation was specific for RNG105 and was not observed for FMRP, Stau1/2, or Pum2.

Since RNG105 is reportedly responsible for the transport of mRNAs in dendrites and essential for synaptic plasticity and long-term memory formation, alterations in the dynamics of RNG105 within RNA granules was thought to affect mRNA localization and local translation in/near the granules. I therefore investigated the effects of FUS and TDP-43 on mRNA localization and translation in RNG105-localizing RNA granules in dendrites. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with a poly(dT) probe and analysis of translation activity using the SunTag system revealed that the accumulation of FUS and TDP-43 in RNA granules reduced the levels of mRNA and translation in/near the granules.

To validate whether these reductions were mediated by the dissociation of RNG105 from the granules, I generated RNG105 mutants that are not dissociated from RNA granules by FUS or TDP-43. To this end, I first identified the FUS- and TDP-43-sensitive domain of RNG105 as the RNA-binding domain (RBD) RBD1. I then replaced RNG105 RBD1 with the RBDs of Pum2 and Stau1 to generate RNG105 mutants that stably localize to RNA granules. Indeed, these RBD1-substituted mutants abrogated the FUS- and TDP-43-induced increased dynamics and dissociation from dendritic RNA granules. These non-dissociable RNG105 mutants suppressed the reduction of mRNA and translation levels in RNA granules. Furthermore, they suppressed the loss of

dendritic spines caused by FUS and TDP-43. These results suggested that the defects caused by FUS and TDP-43 were mediated by dissociation of RNG105 from RNA granules.

In conclusion, this study showed that the accumulation of FUS and TDP-43 in RNA granules increases the dynamics of RNG105 and dissociates it from the granules, which mediates the FUS- and TDP-43-caused defects including loss of mRNA and translation in/near the granules and synapse formation impairment. FUS and TDP-43 have been thought to co-aggregate with RNA granule components and exert toxic effects through suppression or sequestration of components essential for neural function. Contrary to this co-aggregation model, I found that FUS and TDP-43 increased the dynamics of RNG105 and caused it to dissociate from RNA granules. The newly discovered mode of regulation that excludes the required factors, RNG105 and its associated mRNAs, from RNA granules provides a novel model for FUS- and TDP-43-induced RNA granule dysfunction.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 堀尾 朋世

Title
論文題目 神経変性疾患因子 FUS 及び TDP-43 の神経 RNA 顆粒への集積は、RNG105/caprin1 の動態を上昇させてシナプス損失を引き起こす

筋萎縮性側索硬化症および前頭側頭葉変性症の神経変性疾患において、FUS や TDP-43 などの原因遺伝子産物が神経細胞の細胞質で凝集体を形成することが、シナプス形成低下を含む病態の原因と考えられている。これらの凝集体は RNA 顆粒に FUS や TDP-43 が集積することで形成されるが、RNA 顆粒の構成因子に与える影響は不明な点が多い。出願者の堀尾朋世さんは、マウス大脳皮質由来の神経培養細胞で FUS および TDP-43 を過剰発現させ、蛍光イメージングと定量解析によって、RNA 顆粒を構成する RNA 結合タンパク質のダイナミクス、mRNA の集積と翻訳、および RNA 顆粒が関与するシナプス（スパイン）形成と成熟への影響を解析した。

出願者はまず、FUS および TDP-43 の集積が RNG105 タンパク質の RNA 顆粒内での流動性を増加させ、RNG105 を顆粒から解離させることを見出した。これに伴い、顆粒内の mRNA 量が減少し、顆粒近傍での局所的な翻訳も低下した。また、RNG105 の解離には RNG105 の RNA 結合ドメイン RBD1 が必要であることを特定した。そこで、このドメインを他の RNA 顆粒の RNA 結合タンパク質由来の RNA 結合ドメインで置換することで、FUS/TDP-43 により顆粒から解離しない RNG105 変異体を作成した。この非解離型 RNG105 は、FUS/TDP-43 による RNA 顆粒内の mRNA 減少と局所的翻訳低下を抑制し、さらに FUS/TDP-43 によるスパイン形成と成熟の低下を軽減した。これらの結果は、FUS/TDP-43 による障害を RNG105 の解離が媒介することを示した。

以上の解析は、GFP や mRFP1 タグを持つ RNA 結合タンパク質を用いて行われた。しかし、RNA 顆粒は液-液相分離によって形成されるため、タグが相分離に影響を与える可能性が考えられた。そこで出願者は、タグのない RNA 結合タンパク質や内在性の RNA 結合タンパク質に対して同様の解析を行った。その結果、タグがないことによって RNG105 の相分離能は増加したものの、FUS/TDP-43 による顆粒からの解離にはタグは影響しないことを確認した。

本研究により、FUS および TDP-43 の RNA 顆粒への集積が RNG105 の顆粒内でのダイナミクスの増加と顆粒からの解離を促進することにより、mRNA の顆粒局在の減少、顆粒近傍での局所的翻訳の低下、そしてスパイン形成と成熟の低下が引き起こされることが明らかになった。従来、FUS や TDP-43 の RNA 顆粒への集積と凝集化は、RNA 顆粒構成因子のダイナミクスを制限して顆粒内に隔離することによって病態に関与すると考えられてきたが、本論文は RNG105 のダイナミクスの上昇と顆粒からの放出が病態に関わることを示唆し、FUS および TDP-43 の新たな作用機序を示した。よって審査委員会は、本論文が同分野に重要な貢献をするものであり、学位の授与に相応しいものであると判断した。