

Title	筋萎縮性側索硬化症(ALS)病態誘導人工遺伝子によるALS病態再現
Sub Title	De novo design of cytoplasmic RNA-binding protein with prion-like domain related to ALS/FTD proteinopathies.
Author	伊東, 大介(Ito, Daisuke)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2018
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>近年, 筋萎縮性側索硬化症(ALS)/前頭側頭型認知症(FTD)の原因遺伝子が次々と同定されている。これまで同定されたALS/FTDを引き起こす原因遺伝子6つTDP-43, FUS, TAF15, ESWR1, hnRNPA1, hnRNPA2, TIA1は, 生化学的, 細胞生物学的に共通性が見られる。すなわち1)RNA recognizing motif (RRM)を持つRNA結合蛋白である。2)prion-like domain (PrLD)を持ち凝集性が高い。このPrLDはアミノ酸配列において2つの特徴があり glycine/serine-tyrosine glycine/serine (G/S-Y-G/S)の繰り返し配列があり, さらに glutamine と asparagine-(Q/N)に富む。3)ストレス顆粒の構成分子である。4)患者死後脳で細胞質への局在異常を起こし封入体を形成する。これらの特徴は, ALS/FTDの分子病態を理解するにあたり極めて重要と考えられる。我々は, ALS原因RNA結合蛋白における4つの共通性を持つALS病態誘導人工cDNAを合成し, 発現ベクターにサブクローニングした。cDNA作成に当たり以下の条件によりアミノ酸配列を設計した。1)G/S-Y-G/Sの67リピートをコードするcDNA(SYG-NES-GFP)を塩基の繰り返し配列を極力避けた。また, G/S-Y-G/Sのリピートに加えもう一つの特徴である glutamine (Q)に富むcDNA(SYGQ-NES-GFP)(50リピート)も合成した。2)RNA結合部位は, 特異的なRNA結合を極力減らすため, オレンジ由来RNA recognition motifをもちいた。3)Nuclear exit signalを配置し, 細胞質への局在を誘導した。本人工遺伝子を培養細胞に導入してその細胞学的特徴を解析し以下の研究結果を得た。1)ALS病態誘導人工遺伝子は細胞質封入体を形成。2)ストレス顆粒の構成分子となる。3)人工遺伝子による神経系細胞Neuro2a細胞の突起伸張作用の抑制と細胞死誘導。4)ALS病態誘導人工遺伝子の凝集性。以上より, 人工遺伝子を培養細胞に導入することによって, 細胞質に封入体形成, ストレス顆粒への移行, 細胞毒性, 凝集を備えておりALS関連分子の生化学的, 細胞学的特性を再現できたと考えられる。今後は, ALS病態誘導人工遺伝子モデル動物の確立を目指す。</p> <p>Aberrant RNA-binding proteins form the core of the neurodegeneration cascade in spectrums of disease, such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/frontotemporal dementia (FTD). Six ALS-related molecules, TDP-43, FUS, TAF15, EWSR1, heterogeneous nuclear (hn)RNPA1, and hnRNPA2, are RNA-binding proteins containing candidate mutations identified in ALS patients and that share several common features, including harboring an aggregation-prone prion-like domain (PrLD) containing a glycine/serine-tyrosine-glycine/serine (G/S-Y-G/S)-motif-enriched low-complexity sequence and rich in glutamine and/or asparagine. Additionally, these six molecules are components of RNA granules involved in RNA quality control and become mislocated from the nucleus to form cytoplasmic inclusion bodies (IBs) in the ALS/FTD-affected brain. To reveal the essential mechanisms involved in ALS/FTD-related cytotoxicity associated with RNA-binding proteins containing PrLDs, we designed artificial RNA-binding proteins harboring G/S-Y-G/S-motif repeats with and without enriched glutamine residues and nuclear-import/export-signal sequences and examined their cytotoxicity in vitro. These proteins recapitulated features of ALS-linked molecules, including insoluble aggregation, formation of cytoplasmic IBs and components of RNA granules, and cytotoxicity instigation. These findings indicated that these artificial RNA-binding proteins mimicked features of ALS-linked molecules and allowed the study of mechanisms associated with gain of toxic functions related to ALS/FTD pathogenesis. Our results offered insight into RNA dysregulation mediated by aggregated RNA-binding proteins and will potentially aid the development new strategies for the treatment of ALS/FTD proteinopathies.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2017000001-20170301

研究代表者	所属	医学部臨床教室	職名	専任講師	補助額	300 (A) 千円
	氏名	伊東 大介	氏名 (英語)	Dasiuke Ito		
研究課題 (日本語)						
筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 病態誘導人工遺伝子による ALS 病態再現						
研究課題 (英訳)						
De novo design of cytoplasmic RNA-binding protein with prion-like domain related to ALS/FTD proteinopathies.						
1. 研究成果実績の概要						
<p>近年、筋萎縮性側索硬化症(ALS)/前頭側頭型認知症(FTD)の原因遺伝子が次々と同定されている。これまで同定された ALS/FTD を引き起こす原因遺伝子 6 つ TDP-43, FUS, TAF15, ESWR1, hnRNPA1, hnRNPA2, TIA1 は、生化学的、細胞生物学的に共通性が見られる。すなわち 1) RNA recognizing motif (RRM) を持つ RNA 結合蛋白である。2) prion-like domain (PrLD) を持ち凝集性が高い。この PrLD はアミノ酸配列において 2 つの特徴があり glycine/serine-tyrosine glycine/serine (G/S-Y-G/S) の繰り返し配列があり、さらに glutamine と asparagine-(Q/N) に富む。3) ストレス顆粒の構成分子である。4) 患者死後脳で細胞質への局在異常を起こし封入体を形成する。これらの特徴は、ALS/FTD の分子病態を理解するにあたり極めて重要と考えられる。我々は、ALS 原因 RNA 結合蛋白における 4 つの共通性を持つ ALS 病態誘導人工 cDNA を合成し、発現ベクターにサブクローニングした。cDNA 作成に当たり以下の条件によりアミノ酸配列を設計した。1) G/S-Y-G/S の 67 リピートをコードする cDNA (SYG-NES-GFP) を塩基の繰り返し配列を極力避けた。また、G/S-Y-G/S のリピートに加えもう一つの特徴である glutamine (Q) に富む cDNA (SYGQ-NES-GFP) (50 リピート) も合成した。2) RNA 結合部位は、特異的な RNA 結合を極力減らすため、オレンジ由来 RNA recognition motif をもちいた。3) Nuclear exit signal を配置し、細胞質への局在を誘導した。本人工遺伝子を培養細胞に導入してその細胞学的特徴を解析し以下の研究結果を得た。1) ALS 病態誘導人工遺伝子は細胞質封入体を形成。2) ストレス顆粒の構成分子となる。3) 人工遺伝子による神経系細胞 Neuro2a 細胞の突起伸張作用の抑制と細胞死誘導。4) ALS 病態誘導人工遺伝子の凝集性。以上より、人工遺伝子を培養細胞に導入することによって、細胞質に封入体形成、ストレス顆粒への移行、細胞毒性、凝集を備えており ALS 関連分子の生化学的、細胞学的特性を再現できたと考えられる。今後は、ALS 病態誘導人工遺伝子モデル動物の確立を目指す。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>Aberrant RNA-binding proteins form the core of the neurodegeneration cascade in spectrums of disease, such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/frontotemporal dementia (FTD). Six ALS-related molecules, TDP-43, FUS, TAF15, EWSR1, heterogeneous nuclear (hn)RNPA1, and hnRNPA2, are RNA-binding proteins containing candidate mutations identified in ALS patients and that share several common features, including harboring an aggregation-prone prion-like domain (PrLD) containing a glycine/serine-tyrosine-glycine/serine (G/S-Y-G/S)-motif-enriched low-complexity sequence and rich in glutamine and/or asparagine. Additionally, these six molecules are components of RNA granules involved in RNA quality control and become mislocated from the nucleus to form cytoplasmic inclusion bodies (IBs) in the ALS/FTD-affected brain. To reveal the essential mechanisms involved in ALS/FTD-related cytotoxicity associated with RNA-binding proteins containing PrLDs, we designed artificial RNA-binding proteins harboring G/S-Y-G/S-motif repeats with and without enriched glutamine residues and nuclear-import/export-signal sequences and examined their cytotoxicity in vitro. These proteins recapitulated features of ALS-linked molecules, including insoluble aggregation, formation of cytoplasmic IBs and components of RNA granules, and cytotoxicity instigation. These findings indicated that these artificial RNA-binding proteins mimicked features of ALS-linked molecules and allowed the study of mechanisms associated with gain of toxic functions related to ALS/FTD pathogenesis. Our results offered insight into RNA dysregulation mediated by aggregated RNA-binding proteins and will potentially aid the development new strategies for the treatment of ALS/FTD proteinopathies.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
Mitsuhashi K, Ito D, Mashima K, Oyama M, Takahashi S, Suzuki N.	De novo design of RNA-binding proteins with a prion-like domain related to ALS/FTD proteinopathies.	Scientific Reports	2017 Dec 4;7(1):16871. doi: 10.1038/s41598-017-17209-0.			