

## FET タンパク質ファミリーの疾患との関わり

松本 健

### 1. はじめに

遺伝子発現は、転写段階のみならず、転写後の核内プロセシング、mRNA 核外輸送、細胞質での翻訳や mRNA 安定性と分解などの各段階で調節されており、mRNA に結合するタンパク質群や非コード RNA がその制御を担う。これらの各段階は密接に関連して制御されているのが特徴で、転写と転写後 mRNA 代謝調節の双方に関わるタンパク質が数多く同定されている。そしてこれらのタンパク質の異常に起因する遺伝性疾患が多く知られている。本稿では、このような多機能性タンパク質の一つのファミリーである FET タンパク質群について、その機能と疾患との関わりを中心に述べ、後半では、FET タンパク質の一つである EWS についての我々の研究を紹介したい。

### 2. FET タンパク質

FET タンパク質は FUS, EWS, TAF15 という相同性の高い三つのタンパク質からなるファミリーで、それぞれの頭文字をとって FET タンパク質群と呼ばれている (FUS は TLS, EWS は EWSR1, TAF15 は TAF<sub>II</sub>68 と呼ばれる。そのため FET タンパク質群は TET タンパク質群とも呼ばれるが、DNA 脱メチル化に関わる TET タンパク質群とは別である)<sup>1)</sup>。FUS や EWS は、肉腫で見られる融合遺伝子の 5'側遺伝子として、TAF15 は RNA ポリメラーゼ II の基本転写因子 TFIID を構成するタンパク質の一つとして見いだされた。

FET タンパク質群のドメイン構造を図 1A に示す。N 末端のセリン、チロシン、グリシン、グルタミン (SYGQ) に富む領域は天然変性領域と予想され、RNA ポリメラーゼ II や転写因子など多くのタンパク質に結合して、転写

活性化領域として働く。C 末端側は、RNA および DNA への結合能を持つ領域が並ぶ。また、C 末端には PY-NLS と呼ばれる核移行シグナルがあり、RGG 繰り返し領域 3 (RGG3) およびこの PY-NLS が核移行を担う。後述のようにこれらの部位の点変異は FET タンパク質を細胞質にとどまらせる。このタンパク質群は核と細胞質を行き来するが、GFP 融合タンパク質として発現させるか免疫染色を行うと、多くの細胞では核に局在がみられる。

FET タンパク質は遺伝子発現調節に関わる多様な機能を持つ。具体的には転写調節、microRNA 生合成制御、選択的スプライシングの調節、mRNA 核外輸送、翻訳調節などに関与し<sup>1)</sup>、核での転写やプロセシングと細胞質での mRNA 代謝の連携制御に関わるタンパク質の一種と考えられる (図 1B)。

最近、我々を含む複数のグループによって FET タンパク質が細胞内で結合している RNA が同定された<sup>2,3)</sup>。FUS, EWS, TAF15 それぞれに結合する mRNA を調べると互いに同じ mRNA が多く含まれていたが、mRNA 内の結合部位をみると、FUS は長いイントロンによく結合しているのに対し、EWS と TAF15 はタンパク質コード領域や 3'非翻訳領域 (3'UTR) に結合している例が多いという違いがある<sup>2)</sup>。mRNA のほか、FUS はパラスペックルに局在する Neat1 などの長鎖非コード RNA にも結合する。我々は、EWS がどのような mRNA に対して働くのかを知るため、HeLa 細胞抽出液から EWS とともに免疫沈降される mRNA をマイクロアレイで調べた。その結果、907 個の mRNA が EWS と結合していると考えられた<sup>3)</sup>。これらについてどのような生物学的プロセスに関わるのかを検討したところ、スプライソソームの形成、DNA 修復、タンパク質フォールディングに関与する mRNA が顕著に濃縮されていた。EWS はこれらの mRNA の代謝を調節することで機能を発揮すると考えられる。

### 3. 筋萎縮性側索硬化症

家族性の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や前頭側頭葉変性症の患者において最近、三つの FET タンパク質いずれの遺伝子にも点変異が報告されている<sup>4)</sup>。点変異部位は患者

独立行政法人理化学研究所 吉田化学遺伝学研究室  
(〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1)

Functions of the FET protein family in health and disease  
Ken Matsumoto (Chemical Genetics Laboratory, RIKEN, 2-1  
Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan)

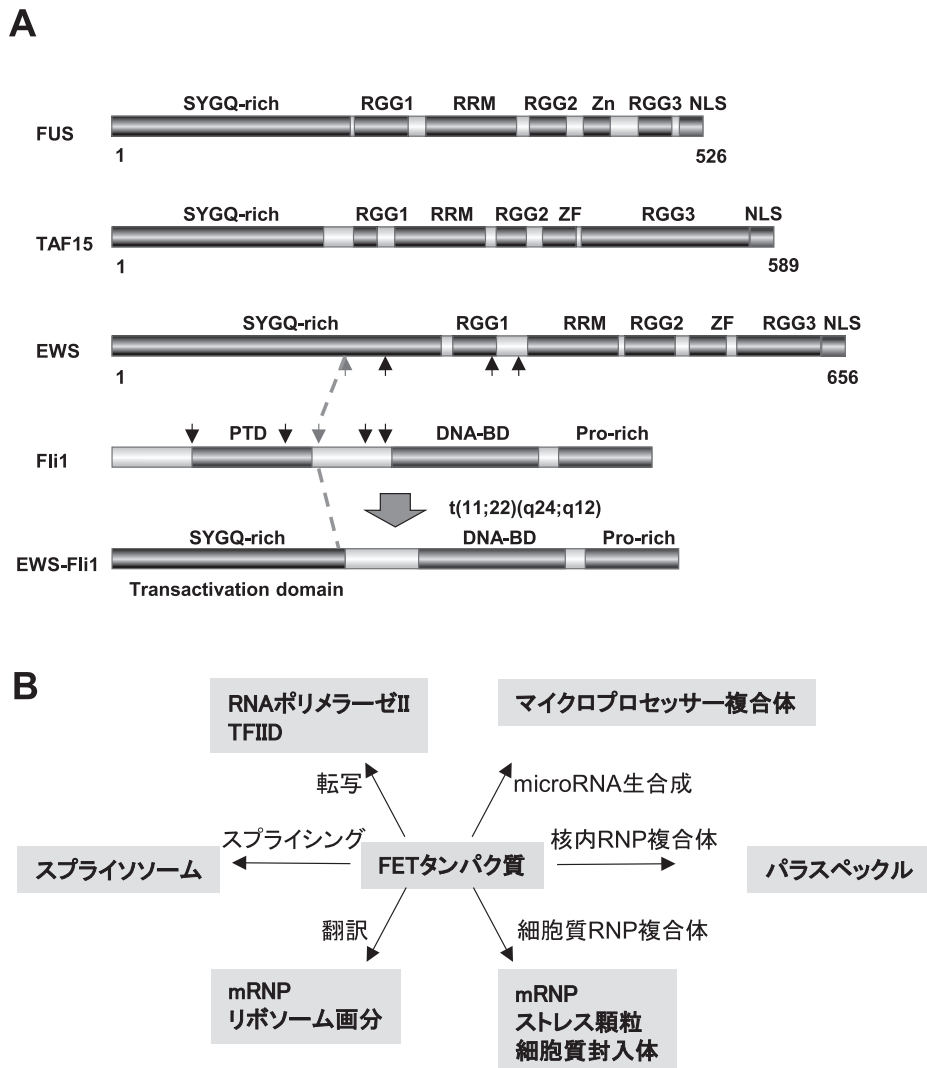


図1 FET タンパク質群の構造と機能

(A) FET タンパク質群のドメイン構造. FUS, TAF15, EWS は, N 末端に転写活性化領域として働きうる SYGQ に富む領域を持つほか, RGG 繰り返しに富む領域, RNA 認識モチーフ (RRM), Zn フィンガー, C 末端に核移行シグナル (NLS) を持つ. 番号はアミノ酸数. 下に, 転写因子 Fli1 と EWS-Fli1 融合タンパク質の構造も示す. Fli1 の PTD は pointed domain, DNA-BD は DNA 結合ドメイン, Pro-rich はプロリンに富む領域を示す. 矢印は, さまざまな EWS-Fli1 における EWS と Fli1 の融合部位を示す. (B) FET タンパク質の多様な機能と FET タンパク質が含まれる複合体.

ごとに異なるが, 主に C 末端側の RGG 繰り返し領域 3 と核移行シグナルに集中している. ALS を含む神経変性疾患の多くでは細胞質あるいは核にタンパク質の不溶性凝集体が観察され, これらの凝集体が病態と密接に関わる. FUS 点変異を持った ALS 患者の脳でも, FUS は細胞質の凝集体となっている. これまで神経細胞の凝集体はタンパク質代謝異常によって形成されると考えられてきたが, 多くの RNA 結合タンパク質が凝集体に含まれることや RNA 結合タンパク質の点変異が見つかることから, RNA 代謝異常も疾患原因と考えられるようになった. ALS で見つかった変異 FUS に結合する mRNA には野生型 FUS と同

じ mRNA が多いものの, 結合部位はイントロンでなく 3'UTR が顕著に増えていた<sup>2)</sup>. こうした結果から, 細胞質への局在変化を伴う FET タンパク質の変異によって RNA 代謝異常や凝集体形成が起きると考えられる.

#### 4. FET タンパク質凝集体とストレス顆粒

神経細胞に限らず, 多くの培養細胞を各種ストレスにさらすと, 全体的な翻訳活性が顕著に低下し, 翻訳抑制された mRNP の凝集体であるストレス顆粒 (SG) が形成される. ALS 患者で見つかった変異 FUS をヒト培養細胞に発

現させると、核に限局せず細胞質にも検出され、一部の細胞では非ストレス条件下でも細胞質でSG様の凝集を示し、既知のSG局在タンパク質eIF4Eも共局在した(図2A)。また、細胞を熱ストレスにさらすと、これら変異FUSはほとんどの細胞でSGに局在した。一方、変異を持たない野生型FUSはストレス条件下でもSGにはほとんど局在しなかった。

試験管内での実験では、FUSは単独で非常に凝集しやすい性質を持つ<sup>5)</sup>。FETタンパク質は、広範囲にわたって変性しやすい領域からなり(図2B)、またプリオン様の領域を持つタンパク質を探索するアルゴリズムでも、とても上位にランクされる(ヒト2万種のタンパク質中でFUS13位、TAF15が22位、EWS25位)<sup>4)</sup>。以前より、SG形成にはRNA結合タンパク質や翻訳抑制因子のプリオン様領域や、ホモ二量体形成領域どうしの結合が重要と考えられてきた。最近、天然変性領域やアミノ酸配列の複雑さの低い領域(low complexity region)を持つタンパク質どうしは、他の細胞質と隔てられた液滴状の性質を持つようになることがわかってきた<sup>6)</sup>。SGや神経変性疾患でみられる細胞質凝集体はこのような分子機構で形成されるのかもしれない。こうしたタンパク質がRNA上に集合することで局所的濃度が上昇し、凝集体形成が促進されるとも考えられる。しかし、SGはストレスが解消されれば分解される可逆的な構造であるのに対し、神経変性疾患でみられる細胞質凝集体は非可逆である。細胞質凝集体がSGからさらなる変化を経て形成されるのか、あるいは両者はまったく別の経路で形成されるのか、さらにオートファゴソームやアグリソームとの関係などは今後の解析を待たねばならない<sup>7)</sup>。

## 5. 肉腫

肉腫は骨、筋肉などの結合組織に生じる悪性度の高い腫瘍である。肉腫を含むがんでFETタンパク質がほかの転写因子と融合タンパク質となっている例が多く知られている。EWSはユーイング肉腫を含む小円形細胞肉腫で、FUSは粘液型脂肪肉腫で、またTAF15は急性白血病などでみられる融合タンパク質のN末端領域となっている(図1A)。いずれもFETタンパク質のN末端領域が転写因子のC末端領域に融合した構造で、転写因子のDNA結合活性とFETタンパク質N末端の転写活性化領域を持つ強力な転写因子となっている。ユーイング肉腫ではEWSはETSファミリー転写因子と融合タンパク質となっている例が多く、その中でもユーイング肉腫の85%でみられる融合タンパク質がEWS-Fli1である(図1A)<sup>8)</sup>。これらEWS-ETS融合タンパク質はETSのターゲット遺伝子の転写を強力に調節するが、さらにEWSのRNAポリメラーゼIIへの

結合を介して、本来のETSターゲット以外の遺伝子の転写調節にも関与して細胞のがん化を引き起こすと考えられている。

ユーイング肉腫においてEWS-Fli1をノックダウンすると腫瘍形成能が低下するので、肉腫形成や悪性化にはこの融合タンパク質が必要であることは明らかだが(図3D参照)<sup>9)</sup>、逆にEWS-Fli1を発現させると多くの細胞株ではアポトーシスを起こすことなどから、EWS-Fli1の発現だけでは肉腫形成は説明できない。そこで考えられているのは、ETS転写因子の特定のターゲット遺伝子が発現する細胞(組織)にEWS-Fli1が発現することが肉腫形成の引き金となるといった細胞特異性の可能性や、EWS-Fli1がドミナントネガティブとしてEWSの本来の機能を阻害する可能性、そしてEWSの発現量の低下が肉腫形成に関与する可能性などである。多くのがんは複数の遺伝子の一方のアリルの欠損の蓄積で生じる<sup>9)</sup>。ユーイング肉腫細胞ではEWS遺伝子の一つが転座によって融合遺伝子となっているため、EWSを発現するのは残り一つの野生型遺伝子のみであり、実際にEWSタンパク質の発現量は低下していた<sup>3)</sup>。我々はEWSによるmRNAの活性制御が、肉腫細胞のがん細胞としての性質に影響しているとの結果を得たので、以下に紹介する<sup>3,10)</sup>。

## 6. EWSタンパク質の機能

EWSは上述のように核局在が観察され、転写因子、スプライシング因子としての機能が知られている。ノックアウトマウスの解析から明らかとなったEWSの生理機能は、Bリンパ球や褐色脂肪細胞の分化および減数分裂に必要であること、そしておそらく選択的スプライシングの調節を介して、ゲノム安定性やDNA修復に関与することである<sup>11,12)</sup>。これは2節に述べたようにEWS結合mRNAにこれらのプロセスに関与するmRNAが濃縮されていることと一致する。

我々はEWSのmRNA結合タンパク質としての機能に興味を持ち、ヒトHeLa細胞に発現させたEWSをレポーターmRNAの3'UTRに強制的に結合させる系を利用して、EWSがmRNAの挙動および翻訳に影響するかどうかを調べた(図3A, B)。その結果、EWSが結合した場合にはレポーターmRNAからできるルシフェラーゼ活性が顕著に低下した。このときレポーターmRNAの量やスプライシングにはEWSの影響はみられなかったため、EWSはレポーターmRNAの核外輸送あるいは翻訳を抑制する、という可能性が考えられた。野生型EWSがSGにはほとんど局在せず、翻訳されているmRNAを含むリボソーム画分に検出されるため、翻訳抑制よりもmRNAの核外輸送を阻害する可能性を調べた。*in situ*ハイブリダイゼー

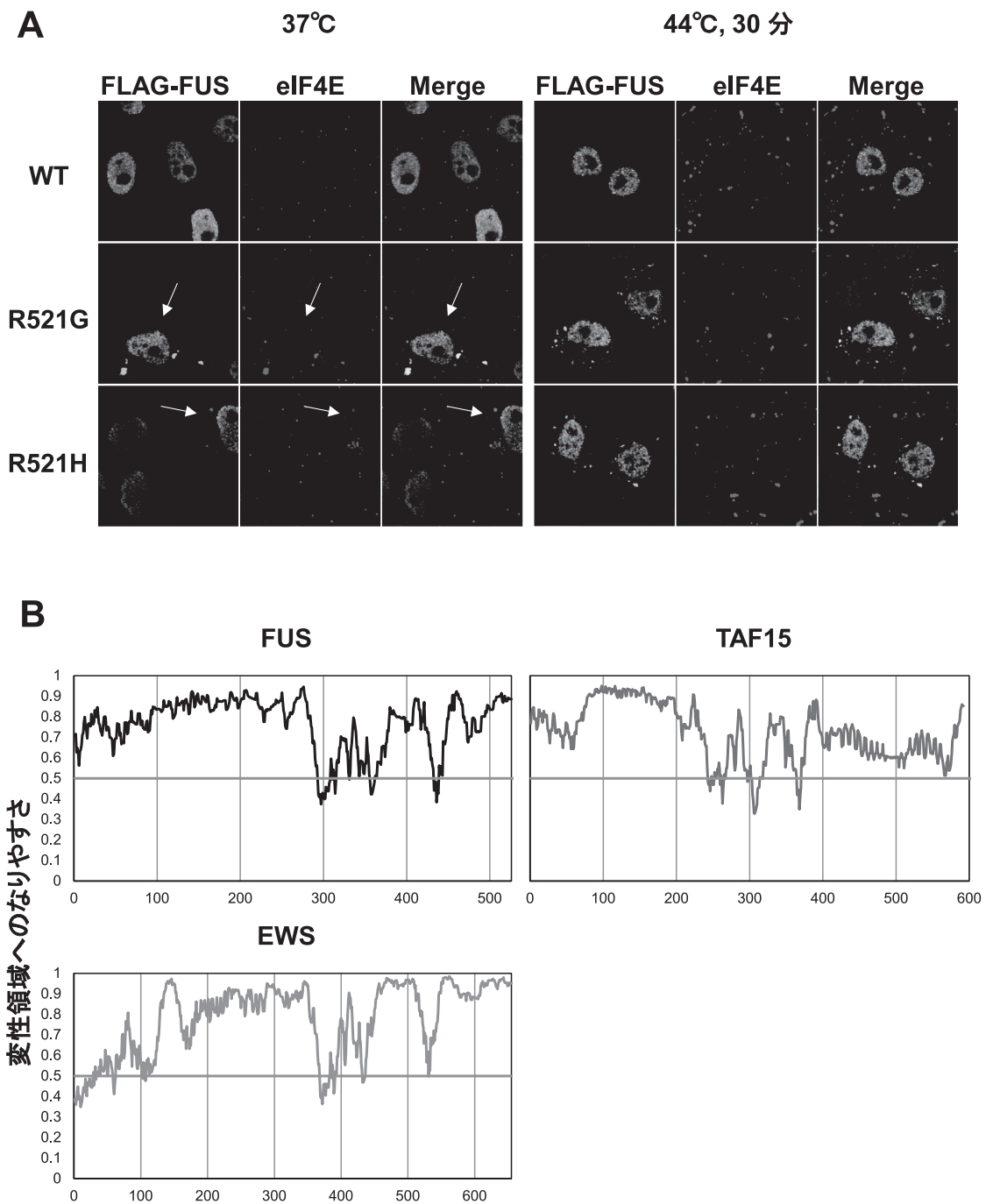


図2 FETタンパク質の凝集体形成とストレス顆粒(SG)への局在

(A) 変異FUSのストレス顆粒への局在. HeLa S3細胞に, 野生型(WT)あるいはALS患者でみられる変異FUS(521番目のアルギニンのグリシン変異R521Gおよびヒスチジン変異R521H. これらはC末端の核移行シグナル内の点変異である)をFLAGタグ付きタンパク質として発現させ, 抗FLAG抗体と抗eIF4E抗体で免疫染色を行った. キャップ結合タンパク質eIF4Eは熱ストレスで形成されるSGに局在することが知られている. 通常の37°Cで培養した場合, 細胞固定直前に44°Cで30分間の熱ストレスを与えた場合を示す. 野生型FUSは核に局限して観察された. それに対し, 変異型は37°Cで一部の細胞で細胞質にも存在し, 顆粒状にも観察された(白矢印). こうした変異体FUS高発現によって形成されるSG様の顆粒にはeIF4Eも共局在を示した. 44°C処理後には, 変異体は熱ストレスで形成されるSGに局在した(未発表データ). (B) FETタンパク質の天然変性領域. IUPred(<http://iupred.enzim.hu/>)での解析結果を示す. 横軸はタンパク質のアミノ酸番号, 縦軸が変性領域へのなりやすさを表し, 0.5以上が変性領域と予想される.



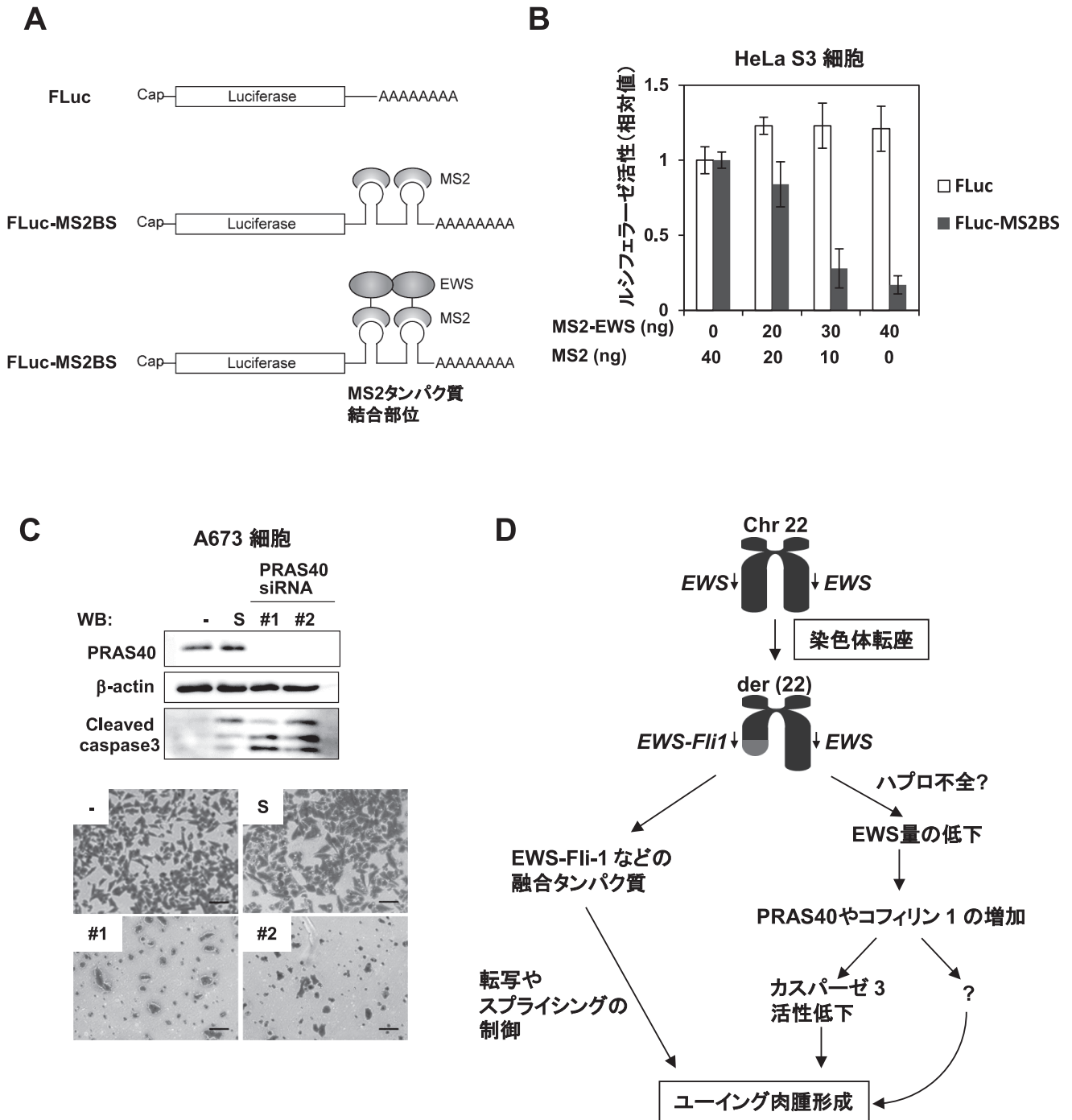


図3 EWSによる結合 mRNA の抑制

(A) EWS タンパク質を 3'非翻訳領域に結合させるレポーター mRNA 実験系。MS2 ファージコートタンパク質とその結合する RNA 配列との組み合わせにより、MS2 と融合させた EWS を細胞内でルシフェラーゼ mRNA に結合させる。(B) HeLa 細胞にレポーター mRNA と MS2-EWS あるいは MS2 [数字 (ng) はトランスフェクションに用いた DNA 量] を発現させ、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。レポーター mRNA が MS2 結合部位を持ち、MS2-EWS を発現させた場合に、ルシフェラーゼ活性の低下がみられた。(C) ユーイング肉腫由来 A673 細胞において 2 種の siRNA (#1 と #2) を用いて PRAS40 をノックダウンし (上図, S はコントロールとして用いた scrambled siRNA), これらの細胞の浸潤能を測定した (下図)。PRAS40 のノックダウンにより、浸潤能の顕著な低下がみられた。(D) 染色体転座によるユーイング肉腫形成のモデル。肉腫細胞では少なくとも 1 本の染色体の EWS 遺伝子が転座によって転写因子遺伝子と融合している。EWS は残りの染色体からのみ発現するので発現量が少なく、その結果、EWS 結合 mRNA の産物の量が増加すると考えられる。(文献 3 より引用, 改変)

シオンによってレポーター mRNA を観察すると、高発現させた EWS とともに核に局在していた。一方、C 末端の核移行シグナルを欠失した EWS を用いた場合には、レポーター mRNA と EWS はともに細胞全体に検出され、ルシフェラーゼ活性の低下はみられなかった。つまり、EWS が結合したレポーター mRNA は核外輸送が抑制されていると考えられる。EWS による mRNA 核外輸送調節の分子機構は明らかでなく、今後の課題である。

レポーターアッセイの結果から EWS が mRNA の翻訳産物の量を低下させると予想されたので、EWS 高発現による EWS 結合 mRNA の翻訳産物量の変化を調べた。すると、EWS 高発現によって、PRAS40 やコフィリン 1 を含むいくつかの EWS 結合 mRNA の翻訳産物の量が低下することがわかった。PRAS40 は mTORC1 の構成因子として知られ、細胞増殖への関与が考えられるタンパク質であり<sup>13)</sup>、コフィリン 1 はアクチンフィラメントの分解に関与し、細胞の移動に関わることが知られる<sup>14)</sup>。EWS がこれらの mRNA の 3'UTR に結合すること、ルシフェラーゼ ORF にこれらの 3'UTR をつないだレポーター mRNA は EWS 高発現によって抑制されたことから、EWS が 3'UTR への結合によって PRAS40 やコフィリン 1 の発現を抑制していることが示唆された。

ユーイング肉腫由来の培養細胞では、コントロール細胞に比べて EWS タンパク質の発現が低下し、逆に PRAS40 やコフィリン 1 タンパク質は増加していた。つまり、HeLa 細胞で見いだした EWS による結合 mRNA の抑制が、肉腫細胞でも起きている可能性が考えられた。確かに、肉腫細胞株で EWS を siRNA でノックダウンすると PRAS40 やコフィリン 1 タンパク質の量が増加した。レポーター mRNA での結果と同様に、EWS 高発現によってコフィリン 1 mRNA が核内に貯留されることも明らかになった。そこで、肉腫細胞で PRAS40 やコフィリン 1 をノックダウンしたところ、細胞増殖やコロニー形成能が抑制され、さらに細胞の遊走や浸潤活性が顕著に抑制されることがわかった(図 3C)。逆に EWS をノックダウンするとコロニー形成能は増加した。以上の我々の結果は、内在性 EWS の量の低下によって EWS 結合 mRNA の産物が増加することが、肉腫細胞のがん細胞としての性質に貢献していることを示唆しており(図 3D)、EWS 結合 mRNA 産物は肉腫治療の新たなターゲットとなりうると思われる。

## 7. おわりに

ここで述べたように FET タンパク質は遺伝子発現のさまざまな段階の RNA 代謝調節に関わる。FET タンパク質の本来の機能および疾患における機能には N 末端側の天

然変性領域が重要である。この領域を介して FET タンパク質が RNA ポリメラーゼ II 最大サブユニットの C 末端ドメイン上に集合することが転写活性化のメカニズムであるという最近の報告<sup>15)</sup>や、mRNP 顆粒が細胞間を伝播する可能性があるなど、今後の研究からも目が離せない。

## 謝辞

本稿で紹介した我々の研究は、黄琳博士(現大連医科大学)を中心として行いました。黄博士はじめ共同研究者の中井雄治博士(東京大学)、桑原いく氏、黒川留美氏(理化学研究所)に感謝します。

- 1) Kovar, H. (2011) *Sarcoma*, 2011, 837474.
- 2) Hoell, J.I., Larsson, E., Runge, S., Nusbaum, J.D., Duggimpudi, S., Farazi, T.A., Hafner, M., Borkhardt, A., Sander, C., & Tuschl, T. (2011) *Nat. Str. Mol. Biol.*, 18, 1428-1431.
- 3) Huang, L., Nakai, Y., Kuwahara, I., & Matsumoto, K. (2012) *Cancer Res.*, 72, 1260-1269.
- 4) Couthouis, J., Hart, M.P., Shorter, J., DeJesus-Hernandez, M., Erion, R., Oristano, R., Liu, A.X., Ramos, D., Jethava, N., Hosangadi, D., Epstein, J., Chiang, A., Diaz, Z., Nakaya, T., Ibrahim, F., Kim, H.J., Solski, J.A., Williams, K.L., Mojsilovic-Petrovic, J., Ingre, C., Boylan, K., Graff-Radford, N.R., Dickson, D.W., Clay-Falcone, D., Elman, L., McCluskey, L., Greene, R., Kalb, R.G., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Ludolph, A., Robberecht, W., Andersen, P.M., Nicholson, G.A., Blair, I. P., King, O.D., Bonini, N.M., Van Deerlin, V., Rademakers, R., Mourelatos, Z., & Gitler, A.D. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 20881-20890.
- 5) Kato, M., Han, T.W., Xie, S., Shi, K., Du, X., Wu, L.C., Mirzaei, H., Goldsmith, E.J., Longgood, J., Pei, J., Grishin, N.V., Frantz, D.E., Schneider, J.W., Chen, S., Li, L., Sawaya, M.R., Eisenberg, D., Tycko, R., & McKnight, S.L. (2012) *Cell*, 149, 753-767.
- 6) Kedersha, N., Ivanov, P., & Anderson, P. (2013) *Trends Biochem. Sci.*, 38, 494-506.
- 7) Jucker, M. & Walker, L.C. (2013) *Nature*, 501, 45-51.
- 8) Sankar, S. & Lessnick, S.L. (2011) *Cancer Genet.*, 204, 351-365.
- 9) Greenman, C.D. (2012) *Science*, 337, 47-48.
- 10) Huang, L., Kuwahara, I., & Matsumoto, K. (2013) *Oncogene*, advance online publication, July 8, 2013; doi:10.1038/onc.2013.255.
- 11) Li, H., Watford, W., Li, C., Parmelee, A., Bryant, M.A., Deng, C., O'Shea, J., & Lee, S.B. (2007) *J. Clin. Invest.*, 117, 1314-1323.
- 12) Park, J.H., Kang, H.J., Kang, S.I., Lee, J.E., Hur, J., Ge, K., Mueller, E., Li, H., Lee, B.C., & Lee, S.B. (2013) *Dev. Cell*, 26, 393-404.
- 13) Wiza, C., Nascimento, E.B., & Ouwens, D.M. (2012) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 302, E1453-1460.
- 14) Bravo-Cordero, J.J., Magalhaes, M.A., Eddy, R.J., Hodgson, L., & Condeelis, J. (2013) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 14, 405-415.
- 15) Kwon, I., Kato, M., Xiang, S., Wu, L., Theodoropoulos, P., Mirzaei, H., Han, T., Xie, S., Corden, J.L., & McKnight, S.L. (2013) *Cell*, 155, 1049-1060.

---

**著者寸描**

●松本 健 (まつもと けん)

独立行政法人理化学研究所専任研究員.

■ホームページ <http://www.riken.jp/matsumok/index.html>

そのほかは, 78 巻第 5 号, 438 ページを参照.