



TITLE:

Conformational change of RNA - helicase DHX30 by ALS/FTD - linked FUS induces mitochondrial dysfunction and cytosolic aggregates(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Hikiami, Ryota

CITATION:

Hikiami, Ryota. Conformational change of RNA - helicase DHX30 by ALS/FTD - linked FUS induces mitochondrial dysfunction and cytosolic aggregates. 京都大学, 2023, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2023-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k24319>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏名	引網 亮太
論文題目	Conformational change of RNA - helicase DHX30 by ALS/FTD - linked FUS induces mitochondrial dysfunction and cytosolic aggregates (ALS-FTD 関連タンパク質の FUS は、RNA-helicase である DHX30 の構造障害を介して、ミトコンドリア機能異常や細胞質内凝集体形成を誘導する)		
(論文内容の要旨) <p>FUS 遺伝子は RNA 結合タンパク質をコードし、その遺伝子変異は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を引き起こす。本邦の家族性 ALS では 2 番目に頻度が高く、孤発性 ALS では最も頻度が高い。ALS-FUS 患者の病理は、FUS の核から細胞質への異所性局在と、FUS 陽性細胞質内凝集体が特徴で、過去の動物実験等より毒性獲得説が有力と考えられている。液-液相分離を介した凝集体形成が近年注目されているが、その病態機序は未だ不明である。加えてミトコンドリア障害は ALS-FUS の病態機序において有力な候補の一つだが、変異型 FUS がミトコンドリア機能障害をどのように引き起こすかは明らかにされていない。</p> <p>FUS 結合タンパク質を同定するため、野生型・変異型 FUS を発現する培養細胞を用いて、免疫沈降と質量分析を行い、同定された候補より主にミトコンドリアに局在する RNA ヘリカーゼである DHX30 に着目した。DHX30 はミトコンドリアマトリックス内で RNA 顆粒を構成し、ミトコンドリアリボソームの形成に関与し、ミトコンドリア DNA 由来のタンパク質の翻訳に重要な機能を有する。培養細胞で DHX30 発現を抑制すると酸化リン酸化複合体の形成障害を来し、ノックアウトマウスは周産期に死亡する。さらにその遺伝子変異例は神経発達障害を有する患者で報告されており、神経細胞において重要な機能を担っていると推察される。本研究では、DHX30 が ALS-FUS の病態機序において鍵分子となりうる可能性を示した。</p> <p>免疫沈降で、野生型・変異型 FUS は共に DHX30 と RNA 依存性に結合する事を示した。免疫蛍光染色で、野生型 FUS は DHX30 のミトコンドリア局在に影響を与えなかったが、変異型 FUS はミトコンドリア内の DHX30 のシグナルを低下させ、FUS 陽性細胞質内凝集体で DHX30 やストレス顆粒マーカーと共局在した。ALS-FUS 患者の脊髄の免疫化学染色でも、運動ニューロン内の FUS 陽性凝集体における共局在を認め、免疫電子顕微鏡ではミトコンドリア内の DHX30 シグナルの減少が観察された。さらに変異型 FUS 発現細胞で DHX30 は不溶性分画へ移行し、密度勾配超遠心法では細胞質分画への一部移行が確認された。また DHX30 が変異型 FUS 陽性細胞質内凝集体へリクルートされ、凝集体形成を促進することも明らかにした。</p> <p>興味深いことに、細胞小器官分画成分のウェスタンブロット法解析では、変異型 FUS 発現細胞におけるミトコンドリア内の DHX30 の総量は明らかな減少を認めず、免疫染色解析での変化は、ジスルフィド結合の形成異常を介した DHX30 の構造障害が原因と判明した。この構造障害は酸化ストレスと相関せず、さらにミトコンドリアストレス、小胞体ストレス、プロテアソーム阻害等の誘発刺激では認めないことから、変異体 FUS と DHX30 の相互作用が DHX30 の構造障害を引き起こしていると考えられた。さらにパルスラベル実験でミトコンドリアでの翻訳阻害を認め、ブルーネイティブゲル電気泳動で酸化リン酸化複合体の形成障害を認めた。これらは DHX30 遺伝子発現抑制細胞と類似しており、変異型 FUS が DHX30 の構造障害から機能喪失を引き起こし、ミトコンドリア障害を来したと推察された。</p> <p>これらの結果から、DHX30 はジスルフィド結合の形成異常による構造障害を介して、ALS-FUS におけるミトコンドリア機能障害と細胞質凝集体形成に関与する、極めて重要な分子である可能性が示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

FUS 遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症 (ALS-FUS) は、病理所見や動物実験結果から、FUS の細胞質への異所性局在と凝集体形成等による毒性獲得説が有力とされるが、その病態機序は未だ不明である。毒性獲得の鍵分子を同定するため、野生型・変異型 FUS 発現培養細胞を用いた共免疫沈降・質量分析を行い、FUS 結合タンパク質として、ミトコンドリアリボソームの形成・翻訳に重要な機能を有する DHX30 を同定した。免疫染色において、変異型 FUS 発現細胞では、ミトコンドリア内 DHX30 のシグナルが低下し、FUS 陽性細胞質内凝集体と DHX30 の共局在を認めた。また免疫化学染色・電子顕微鏡法にて、ALS-FUS 患者脊髄運動ニューロン内に上記と合致する所見を確認した。変異型 FUS 発現細胞のミトコンドリア内 DHX30 の発現レベルは低下していなかったが、ジスルフィド結合の形成異常を認めた。さらにミトコンドリア DNA にコードされるタンパク質の翻訳障害や発現低下、酸化リン酸化複合体の形成障害を認め、変異型 FUS が DHX30 の構造障害から機能喪失を引き起こし、ミトコンドリア機能障害を来したと推察された。

以上の研究は ALS-FUS のミトコンドリア機能障害の機序の解明に貢献し、治療法開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和4年12月26日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降