

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22682

研究課題名（和文）ALSにおけるミトコンドリア障害とRNAヘリカーゼの関連

研究課題名（英文）Association of RNA helicase with mitochondrial damage in ALS

研究代表者

引網 亮太（Hikiami, Ryota）

滋賀医科大学・神経難病研究センター・客員助教

研究者番号：10885354

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：FUSは筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子の一つです。今回、私達はFUSの結合タンパク質としてDHX30を同定しました。DHX30は主にミトコンドリアに局在するRNAヘリカーゼで、ミトコンドリアDNAの翻訳に必要とされます。またDHX30の遺伝子変異が発達障害で報告されていることから、中枢神経において重要な機能を担っていると推察されています。FUS変異体は、DHX30のジスルフィド結合を介した構造変化からその機能喪失をおこし、ミトコンドリア機能障害、神経細胞毒性を来している可能性が示唆されました。DHX30の機能回復が治療ターゲットとなりうるかについては、今後さらなる検証を要します。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FUS遺伝子変異は本邦の家族性ALSで2番目に多く、孤発性ALSでは最も多い遺伝子変異で、その一部は若年発症・急速進行性ALSの原因となります。ただその病態機序は不明で、有効な治療法はありません。私達の研究により、ALS-FUSのミトコンドリア障害において、DHX30が鍵分子である可能性が示唆されました。また遺伝子変異のない孤発性ALSでもDHX30が関与している可能性も考慮されました。DHX30の機能回復は、神経難病であるALSの治療ターゲットとして今後の発展性が期待されます。

研究成果の概要（英文）：FUS is one of the causative genes of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). In this study, we identified DHX30 as an interacting protein with FUS. DHX30 is an RNA helicase localizing mainly within mitochondria and required for the translation of mitochondrial DNA. It is speculated that DHX30 play an important role in central nervous system, considering previous reports that the missense mutations in the DHX30 gene have been identified as a genetic cause of neurodevelopmental disorders. FUS mutants disrupted the conformation of mitochondrial DHX30 via excessive disulfide formation, leading to its loss of function, mitochondrial dysfunction and neuronal cytotoxicity. Further studies are needed to determine whether restoration of DHX30 function could be a potential therapeutic target.

研究分野：neuroscience

キーワード：ALS FUS RNA helicase DHX30

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ALS (筋萎縮性側索硬化症) の約 10%程度が家族性に発症するとされ、近年の大規模解析や遺伝子技術の進歩に伴い、その原因遺伝子やリスク遺伝子の同定がすすんでいる。なかでも RNA 結合タンパク質の液液相分離の障害による細胞質内凝集体形成や、神経細胞の生存維持に重要なオルガネラであるミトコンドリア障害などは中心的病態として注目されている。RNA 結合タンパク質をコードする *FUS* 遺伝子は ALS 関連遺伝子として 2009 年に報告され、本邦の家族性 ALS では 2 番目に多く、孤発性 ALS では最も多い。ALS-*FUS* 患者では *FUS* 変異体による細胞質内凝集体が特徴とされ、過去の動物実験等より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治療標的となりうる鍵分子は同定されていない。

我々は *FUS* の新たな結合タンパク質として DHX30 を初めて同定した。DHX30 は主にミトコンドリアに局在する RNA ヘリカーゼで、ミトコンドリアリボソームの生成に参与する (Antonicka H et al., 2015)。ミトコンドリア DNA にコードされるタンパク質の翻訳に重要で、培養細胞で DHX30 のノックダウンは酸化的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。さらに遺伝子変異例がヒトでも報告されており、発達障害や運動障害を呈し、優性阻害によるとされ、神経細胞において重要な働きを担っていると推察される (Lessel D et al., 2017)。予備実験結果より、DHX30 は RNA を介して野生型/変異型 *FUS* の両方と結合し、ミトコンドリアから *FUS* 凝集体へと異所性局在が示唆された事、変異型 *FUS* の過剰発現は酸化的リン酸化複合体の形成障害を来し、そのパターンが DHX30 のノックダウンと同様である事、さらに ALS 患者脊髄組織において *FUS* 凝集体に DHX30 が共同在する事を認めた。

以上より変異型 *FUS* の細胞質凝集体形成による毒性とミトコンドリアでの DHX30 の機能喪失との関連の可能性が示唆されたが、ALS-*FUS* の病態における DHX30 の機能喪失の重要性や、その治療標的としての可能性、また他の ALS 原因遺伝子変異例での関与などは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、変異型 *FUS* 発現が DHX30 に与える影響、また DHX30 の機能喪失が ALS-*FUS* 病態においてどの程度重要なのか、また治療標的となりうるか、同様の現象が他 ALS 関連遺伝子変異例等でも観察されるかを解明する。また創薬への応用の可能性についても検証する。

3. 研究の方法

①変異型 *FUS* 発現にともなう DHX30 の細胞内局在・構造変化について

予備実験では、WB (非変性条件下) で *FUS* 変異体発現はミトコンドリア内の DHX30 の検出量を低下させ、ALS-*FUS* 患者脊髄で *FUS* 細胞質内凝集体と DHX30 の共同在を認めた。この結果から、当初は DHX30 がミトコンドリアから細胞質へ異所局在したためと考えていたが、その仮説に反する実験結果がみられた。そのため DHX30 の細胞内分布や構造変化について、免疫染色、電子顕微鏡、連続遠心、超遠心等による検証を追加した。

変異型 *FUS* 発現によるミトコンドリアタンパク質の翻訳障害について

DHX30 のノックダウンがミトコンドリアタンパク質の翻訳障害を来すことは既に報告されている。FLAG-*FUS* WT/P525L を過剰発現した培養細胞、さらに DHX30 をノックダウンした培養細胞からミトコンドリアを遠心分離し、新規合成タンパク質を抽出し、その発現変化を評価した。また同様に RNA を回収し qPCR を行い、その発現変化が翻訳もしくは転写レベルなのか検証した。

DHX30 の発現上昇が *FUS* 変異体による毒性を改善するか

マウス初代神経細胞に AAV を用いて FLAG-*FUS* P525L と DHX30-Myc を発現させ、変異型 *FUS* による細胞毒性、ミトコンドリア毒性、ATP 産生能低下が、DHX30 の発現に伴い改善されるかを検証した。

低分子による *FUS* と DHX30 の結合障害が、治療法となりうるか

抗 FLAG 抗体をコーティングした 96 マルチウェルプレートに、FLAG-*FUS* P525L、DHX30-Myc を過剰発現した培養細胞のライセートと、市販の低分子ライブラリー由来の低分子を添加し反応させ、抗 Myc 抗体で検出し、薬剤による結合変化を評価した。*FUS* と DHX30 の結合を障害した薬剤が、*FUS* P525L による毒性を改善するか評価した。

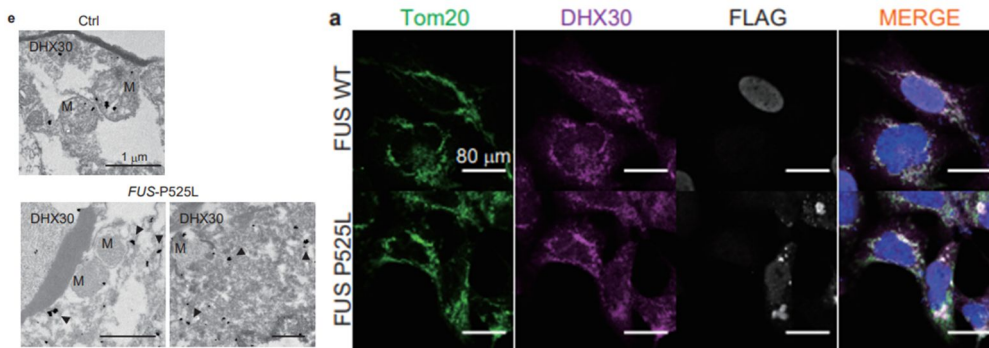
他 ALS 関連遺伝子変異例でも、DHX30 の機能障害は観察されるか

他 ALS 原因遺伝子である TDP-43 や SOD1 等を発現した培養細胞、また孤発性 ALS 患者の脊髄運動ニューロンにおいて検証した。

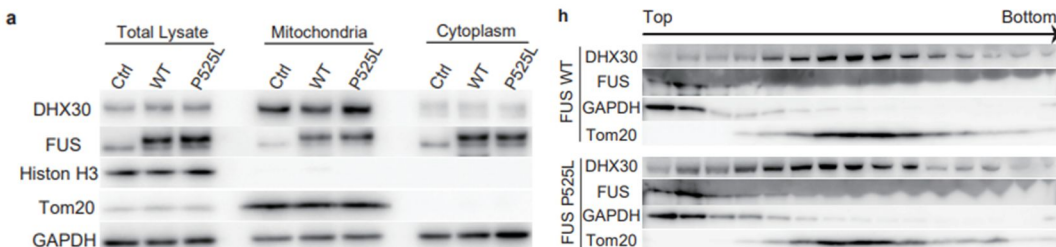
4. 研究成果

①変異型 FUS 発現にともなう DHX30 の細胞内局在・構造変化について

ALS-FUS 患者の脊髄運動ニューロンの病理所見で、FUS の細胞質内凝集体と DHX30 が共局在していた。さらに電子顕微鏡写真では、ミトコンドリア内の DHX30 の染色性は低下し、細胞質へ移行する傾向を認めた(左図)。培養細胞でも同様の結果が見られるか、HEK293A に FLAG-FUS WT, P525L を過剰発現させ検証した。FUS 変異体発現細胞では、FUS 凝集体と DHX30 の共局在は観察され、ミトコンドリア内の DHX30 の染色性は低下していた(右図)。染色写真からは、ミトコンドリア内の DHX30 の発現低下・細胞質への異所性局在が示唆された。

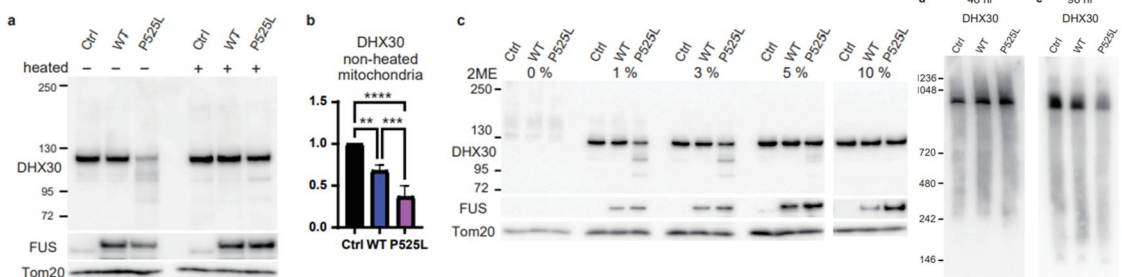


細胞内局在をより評価するため、HEK293A を連続遠心で分画した。変性条件下の WB ではミトコンドリア内の DHX30 は低下していなかった(左図)。さらに核分画除去後の超遠心でも評価したが、DHX30 のごく一部が細胞質移行を示すのみだった(右図)。



免疫染色と細胞分画の結果の乖離から、DHX30 の構造変化の可能性を考慮し、様々な変性条件下で検証した。非変性条件下の WB では FUS 変異体発現に伴い DHX30 の描出は低下していたが、加熱や 2ME により DHX30 の描出は回復した(a-c)。これらは DHX30 のジスルフィド結合を介した構造変化を示唆する。また BN-PAGE で DHX30 を含むタンパク複合体形成を検証、96 時間後には複合体形成障害が明らかとなった(d-e)。

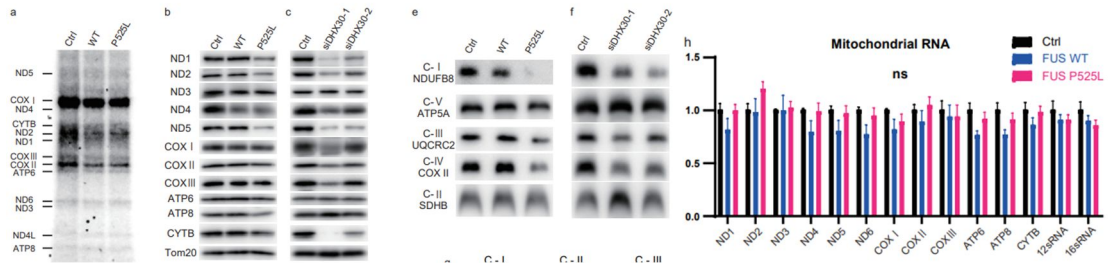
このような構造変化を示唆する所見は、CCCp によるミトコンドリア障害や、MG132 や Tunicamycin によるタンパク毒性によっては生じず、FUS 変異体発現に伴う二次的な変化の可能性は、積極的に考えにくかった。つまり FUS と DHX30 の相互作用に伴い、DHX30 に構造変化を来した可能性が考慮された。



変異型 FUS 発現によるミトコンドリアタンパク質の翻訳障害について

DHX30 はミトコンドリア DNA にコードされるタンパクの翻訳に重要と報告されている。FUS 変異体発現による DHX30 の構造変化が、機能障害を来しうるか検証した。FLAG-FUS WT, P525L を過剰発現した HEK293A を用いて、ミトコンドリア内の新規合成タンパクを RI 標識した。FLAG-FUS WT/P525L 発現によりミトコンドリア DNA の翻訳低下を認めた(a)。さらに変異体有意にミトコンドリア DNA にコードされるタンパクの発現低下(b)、呼吸鎖複合体形成障害(e)を認めた。これら FUS 変異体発現細胞で見られる変化は、DHX30 ノックダウンに伴う変化と類似していた(c, f)。また RNA レベルでの低下はなく、翻訳低下によるタンパク低下に矛盾はなかった(h)。以上より、FUS 変異体発現が、DHX30 の構造障害を介して、ミトコンドリアでの DHX30 の機能喪失を来す可

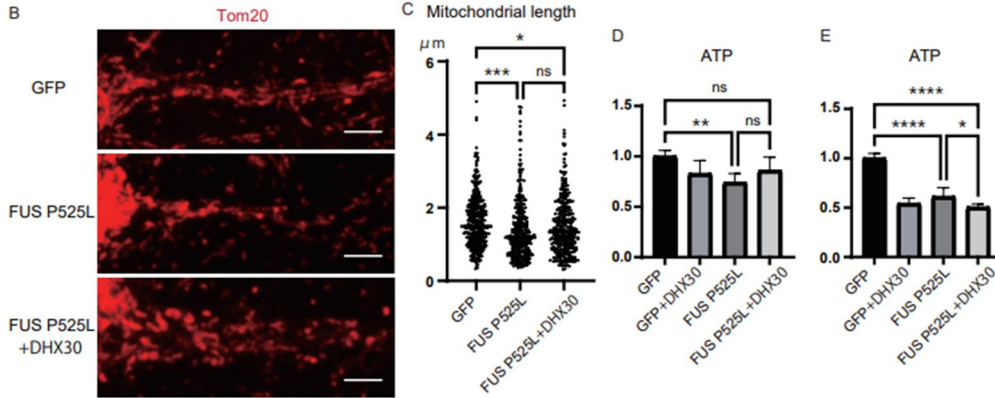
能性が示唆された。



DHX30 の発現上昇が FUS 変異体による毒性を改善するか

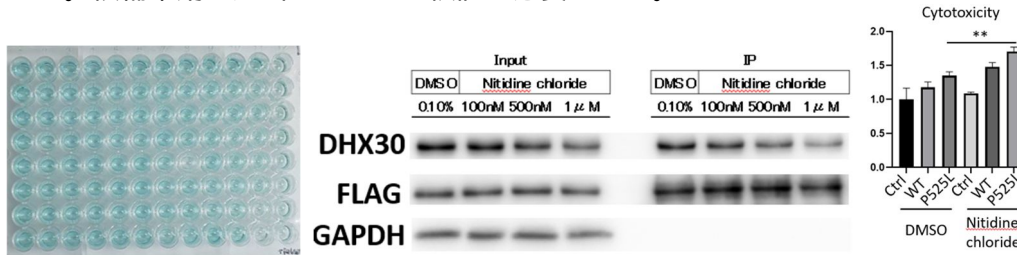
マウス初代神経細胞に AAV を用いて FLAG-FUS P525L、DHX30-Myc を発現させ、FUS 変異体による毒性を、DHX30 の発現上昇でレスキューできるか検証した。FUS 変異体発現に伴い、ミトコンドリア長径は短縮、ATP 産生は低下した(B-E)。しかし DHX30 の共発現は、FUS 毒性を改善できなかった(B-D)。また DHX30 の発現量を増加させると、むしろ毒性は有意に増悪した(E)。

DHX30 の発現上昇がレスキューできなかった原因として2つ考えられた。1つ目は、培養細胞で FUS 変異体と DHX30 を共発現させると FUS の細胞質内凝集体形成が明らかに亢進した事から、凝集体毒性を増悪させた可能性が考慮された。2つ目は、培養細胞で DHX30 を過剰発現させると DHX30 の構造障害・呼吸鎖複合体形成の障害を来した事から、ミトコンドリア内の過剰量の DHX30 が自身の構造障害・機能喪失を増悪させた可能性が考慮された。



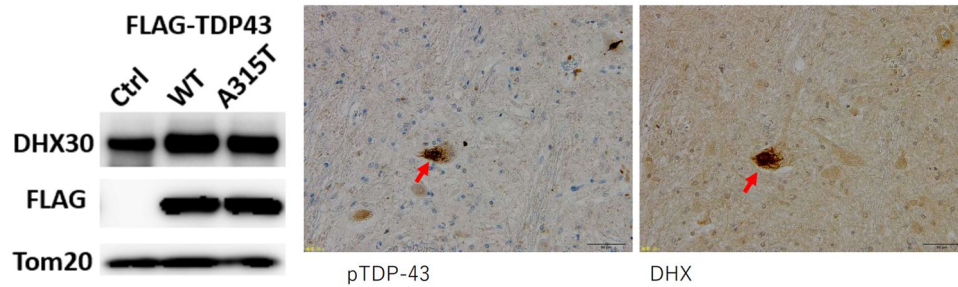
低分子による FUS と DHX30 の結合阻害が、治療法となりうるか

FUS 変異体と DHX30 の結合を阻害する薬剤を検索するため、ELISA アッセイを用いて約 1000 種の低分子ライブラリーから 9 種の候補薬剤を得た。しかし残念ながらいずれも細胞毒性があり、実際に使用可能な薬剤に乏しかった。Nitidine chloride は免疫沈降でも結合阻害を示す可能性は考慮されたが、細胞毒性はレスキューできず、むしろ増悪する結果となった。候補薬剤の選出はさらなる検証が必要である。



他 ALS 関連遺伝子変異例でも、DHX30 の機能障害は観察されるか

他 ALS 原因遺伝子である TDP-43 や SOD1 を過剰発現した培養細胞では、FUS 変異体発現細胞でみられたような構造変化は指摘できず、DHX30 の構造変化は FUS に比較的特異的な現象と考えられた。TDP-43 や SOD1 については当初はモデルマウスでも検証する予定だったが、培養細胞で FUS と同様の結果が得られず、また DHX30 の構造変化を検証する事は困難と考えられ、行わなかった。そこで孤発性 ALS の精髓運動ニューロンの免疫染色を追加した。DHX30 は TDP-43 凝集体と共局在をしめし、同様の病態が、孤発性 ALS でも起きている可能性が示唆された。



以上より、FUS 変異体が DHX30 の構造変化を介して機能喪失を引き起こし、神経毒性を来している可能性が示唆され、DHX30 は ALS-FUS のミトコンドリア毒性における鍵分子の候補と考えられた。但し DHX30 の過剰発現や、低分子薬剤では、FUS 毒性はレスキューできず、DHX30 の占める重要性や治療標的としての可能性は今後の検証を要する。また病理所見からは、DHX30 が孤発性 ALS 病態においても重要である可能性も示唆され、こちらも検証が必要である。これらの成果については第 62 回日本神経学会学術大会で発表し、さらに現在国際学術誌に投稿し現在査読中である（2022 年 6 月現在）。

< 引用文献 >

1. 引網亮太, 南山素三雄, 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症 - プロテノパチーの観点から. 医学のあゆみ. 273(1): 44-49, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 引網亮太
2. 発表標題 FUS induced structural alteration of DHX30 in mitochondrion and impaired respiratory chain complex
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究の成果については現在国際学術誌に投稿し現在査読中である（2022年6月現在）。
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------