HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	FUS R495X 変異によるALS発症機構の解明［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	河原, 大貴
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第13958号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77838
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Daiki_KAWAHARA_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）　氏 名　　河 原 大 貴

学 位 論 文 題 名

FUS R495X 変異による ALS 発症機構の解明

【序論】

筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS）は、運動神経が選択的に変性する進行性の神経変性疾患である。家族性患者の遺伝子連鎖解析から、様々な原因因子が同定されている。特に RNA の代謝に関与するタンパク質をコードする遺伝子の変異が多数報告されていることから、RNA の機能異常が ALS 発症に寄与すると考えられている。しかしながら、その発症機構は明らかではない。ALS の原因因子の一つである FUS（Fused in sarcoma）は DNA や RNA に直接結合することで、転写やスプライシング等に関与する核内 RNA 結合タンパク質である。FUS 分子内の ALS 関連遺伝子変異は、C 末端に存在する核移行シグナル(Nuclear localization signal, NLS)周囲に集中しており、同変異体タンパク質は異常な細胞質局在を呈する。また、FUS に変異を持つ家族性 ALS 患者及び一部の孤発性患者の病理所見において、FUS の異常な凝集体が主に運動神経細胞の細胞質に認められる。

これら知見から、FUS 変異体による家族性 ALS 発症機構として、核内機能喪失による Loss-of-function 及び、細胞質内での凝集体形成による toxic gain-of-function の寄与が考えられていた。しかし、FUS KO ゼブラフィッシュやマウスにおいて ALS 様の症状を示さないこと等から、FUS の loss of function は ALS 発症機構に対する寄与が低いことが示唆されている。これらの経緯から FUS の凝集体形成が ALS 発症に深く寄与すると考えられている。そのため、FUS の凝集体形成機構解明を目指しこれまで多くの研究がなされているが、未だ解明には至っていない。

家族性変異の一つである R495X 変異は、495 番目のアルギニンがストップコドンに置換しており、NLS を完全に欠損している。同変異を持つ家族性患者は急速な疾患進行を示す。所属研究室では R495X 変異体が神経細胞の細胞質において、局所的に集積し細胞内構造体を形成することを見出している。この発見を基に、本研究では、FUS R495X 変異体を用い、FUS の細胞内構造体形成分子機構及び、構造体形成と疾患発症との関連性を明らかとすることを目的とした。

【結果・考察】

<u>R495X 構造体形成分子機構に関して</u>

各 RNA 結合ドメインの欠損変異体を用い、細胞内局在を観察することで構造体形成に必須な領域を同定した。その結果、Gly-rich,RGG１,RGG２ドメインが構造体形成に必須であり、ZnF ドメインは構造体形成に一部寄与することが分かった。次に、CLIP 法を用い各欠損変異体の RNA 結合量を検証した。その結果、構造体を形成しない欠損体である ΔGly-rich, ΔRGG1, ΔRGG2 の欠損変異体では R495X 変異体と比較して RNA との結合量が約 9 割減少することを示した。以上の結果から、R495X の構造体形成には RNA との結合が重要であることが示唆された。次に精製系を用い FUS の相転移への RNA の寄与について検証した。その結果、FUS は RNA と共に相転移し、さらに FUS の相転移を RNA が促進することを示した。

以上の結果から、FUS は RNA と相互作用することで相転移する性質をもち、R495X 変異体は Gly-rich, RGG１, RGG２ドメインを介して RNA と相互作用することにより相転移が促進された結果、

構造体を形成すると考えられる。

R495X 構造体形成による細胞内変化に関して

R495X 構造体内には R495X 変異体と RNA が共に集積すると考えられることから、集積した mRNA の翻訳、分解、局在等に異常が起こる可能性を考えた。そこで本研究では FUS 分子内の RNA 結合ドメイン及び R495X 結合 RNA に着目し解析を行った。

まず、各欠損変異体の細胞死への寄与について検証した。その結果、構造体を形成しない Gly-rich, RGG1, RGG2 ドメインの欠損変異体は神経細胞死を誘引しないこと、RRM ドメインの欠損変異体は構造体を形成するにも関わらず、神経細胞死を誘引しないことが分かった。さらに RRM ドメイン内の RNA 結合に寄与するアミノ酸を置換した 4FL 変異体を作製し、同様の解析を行った。その結果、RRM ドメインの欠損体同様神経細胞死を引き起こさなかった。以上の結果から、R495X 構造体は RRM ドメインを介した RNA との結合を介して神経細胞死を引き起こすことが示唆された。

次に、R495X 変異体が結合する RNA について CLIP-RNAseq 法を用い得られた網羅的データを用い解析を行った。その結果、R495X 変異体は、細胞の形態形成及び軸索形成に関わる遺伝子群の 3’UTR に結合することが分かり、リボソームの構成に関わる遺伝子群の CDS に結合することが分かった。その後、3’UTR に着目した解析から、神経細胞の軸索や樹状突起内で局所的に翻訳される遺伝子の 3’UTR を好んで結合することが分かった。特に結合量の多かった *Actb, Mapt* に着目し、これら mRNA との結合に RRM ドメインが寄与するか RNA-IP 法により検証した。その結果、*Actb, Mapt* mRNA との結合に RRM ドメインが寄与することを明らかにした。

以上の結果から、R495X 変異体は RRM ドメインを介して *Actb, Mapt* mRNA と結合することで、軸索における局所的翻訳機構の破綻を引き起こす可能性が考えられる。

【総括】

本研究により、FUS R495X 変異体は、Gly-rich, RGG1, RGG2 ドメインを介して RNA と結合することで相転移し構造体を形成することが示唆された。また、R495X 構造体は、*Actb, Mapt* 等の局所的翻訳される RNA の 3’UTR 部分を RRM ドメインを介して認識し、構造体内に取り込むことで、局所的翻訳機構の破綻を引き起こす、新規分子機構の存在が示唆された。