

東海大学大学院令和 2 年度博士論文

家族性 2 型 ALS 原因遺伝子産物 ALS2 は
Rab17 陽性エンドソームの成熟を調節する

指導 秦野 伸二 教授

東海大学大学院医学研究科

先端医科学専攻

小野 鈴花

- この学位申請論文は、Biochemical and Biophysical Research Communications に掲載された主要公刊論文を基に作成された。
- Biochemical and Biophysical Research Communications に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ[電子書籍システム]で公開することの承諾を得ている。

1. 総括

家族性 2 型 ALS (amyotrophic lateral sclerosis: 筋萎縮性側索硬化症) は、*ALS2* 遺伝子を原因遺伝子とする常染色体劣性遺伝形式を示す若年発症型 ALS であり、*ALS2* 遺伝子の変異による ALS2 (ALS2 タンパク質) の機能喪失によって発症に至る疾患である。これまでの解析により、ALS2 は低分子量 G タンパク質 Rac1 の活性化依存的に細胞質からメンブレンラッフル (葉状仮足) を介してエンドソームへと局在移行し、低分子量 G タンパク質 Rab5 に対する GEF (guanine nucleotide exchange factor: グアニンヌクレオチド交換因子) として Rab5 を活性化することで初期エンドソームの融合を促進することが明らかにされている。したがって、ALS2 の機能喪失による細胞内膜輸送の異常が疾患発症の分子的背景の一つであると考えられる。しかし、その発症機構の全容は未だ説明されておらず、疾患に

対する根本的な治療法も確立されていない。本研究では、近年同定された新規 ALS2 結合因子 Rab17 に着目し、細胞内における ALS2 と Rab17 の機能的関連性について解析することによって、ALS2 の新たな分子機能を明らかとすることを目的とした。

HeLa 細胞を用いた細胞内局在解析の結果、Rab17 は主に Rab11 陽性のリサイクリングエンドソームに局在する一方で、ALS2 と Rab17 は Rab5 陽性の初期エンドソームにおいて共局在することが明らかとなった。また、Rab17 は、ALS2 と同様に Rac1 の活性化によってメンブレンラッフルを介したエンドサイトーシスにより初期エンドソームに局在移行するが、その挙動は ALS2 に依存しないことが示された。生化学的解析の結果、ALS2 は Rab17 と直接結合するにもかかわらず、Rab17 に対する GEF 活性を示さないことも明らかとなった。さらに、siRNA による ALS2 の発現抑制は、後期エンドソームマーカーである Rab7 及び LAMP2 が局在する肥大化した Rab17 陽性小胞の形成を誘導することが判明した。

以上の結果から、ALS2 は Rab5 の活性化による初期エンドソームの成熟だけでなく、初期エンドソームにおいて Rab17 と結合することで、リサイクリングエンドソームを介した膜小胞輸送の調節にも関与していることが新たに明らかとなった。

2. 研究の背景

ALS（筋萎縮性側索硬化症）

ALS (amyotrophic lateral sclerosis: 筋萎縮性側索硬化症) は、上位及び下位運動ニューロンの選択的変性や脱落を特徴とした神経変性疾患の一つである。ALS は、10 万人に 2～3 人が発症する難病であり、四肢の進行性筋萎縮による随意運動障害、及び構音障害や嚥下障害などの球麻痺症状を呈する一方で、知覚障害や感覚障害をきたさないという特徴的な病症を示す。ALS 患者の約 9 割は孤発性であり、その病因はグルタミン酸過剰説や環境説など多岐にわたるが、確固たる発症機構については未だ解明されていない。一方、ALS の約 1 割を占める家族性 ALS については、1993 年に同定された 1 型 ALS の原因遺伝子 *SOD1* (Cu/Zn superoxide dismutase 1) をはじめとして、現在までに 25 種以上の原因遺伝子及び関連遺伝子が同定されている。

家族性 2 型 ALS の発症機構

本研究で着目する 2 型 ALS は、常染色体劣性遺伝形式を示す若年発症型の家族性 ALS であり、2001 年に同定された *ALS2* 遺伝子がコードする ALS2 (ALS2 タンパク質) の機能喪失によって発症に至る疾患である。*ALS2* 遺伝子は、34 個のエクソンから成る約 80kb の遺伝子であり、ユビキタスな発現が認められるが、特に

脳神経組織において高く発現していることが確認されている。また、*in situ* ハイブリダイゼーション法によるマウスにおける遺伝子発現解析から、*Als2* 遺伝子発現は脳及び脊髄の神経細胞において高く保たれていることが明らかとされている。原因遺伝子産物である ALS2 は、全長 1657 アミノ酸残基から成る約 184kDa のタンパク質であり、GEF (guanine nucleotide exchange factor: グアニンヌクレオチド交換因子) に特徴的なドメイン構造である RLD (regulator of chromosome condensation-1 like domain)、DH/PH (Dbl-homology and pleckstrin-homology) ドメイン、VPS9 (vacuolar protein sorting 9) ドメインと、膜局在に關与する MORN (membrane occupation and recognition nexus) モチーフを有することが明らかとなっている。

これまでの解析から、ALS2 は活性化型の低分子量 G タンパク質 Rac1 と直接結合し、Rac1 活性化依存的に細胞質からメンブレンラッフル (葉状仮足) を介してマクロピノサイトーシスによりエンドソーム上に局在することが示されている。また、ALS2 は細胞内膜輸送を調節する低分子量 G タンパク質 Rab5 の GEF として機能し、初期エンドソームの膜動態を制御することが明らかとされている。さらに、ALS2 は初期エンドソームだけでなく、アンフィソーム (オートファゴソームとエンドソームの融合小胞) の形成を促進することも

明らかとされている。*Als2* ノックアウトマウス由来の神経細胞では、軸索伸長の遅滞やグルタミン酸受容体の一つである AMPA 受容体の輸送異常に伴う興奮毒性が認められることから、ALS2 が神経細胞における膜小胞輸送を制御する可能性が示唆されている。したがって、2 型 ALS の発症は ALS2 の機能喪失による細胞内膜輸送異常によるものと推測される。

新規 ALS2 結合因子 Rab17

細胞内において、小胞体で合成されたタンパク質や細胞外部からエンドサイトーシスによって取り込まれた物質は、脂質膜小胞によって各々の目的地へと輸送される。このような膜動態を介した輸送機構は「細胞内膜輸送」と総称される。細胞内膜輸送の制御因子の一つとして知られている Rab タンパク質は、Ras スーパーファミリーに属する低分子量 G タンパク質であり、真核生物においては約 60 種類存在することが明らかにされている。Rab タンパク質は、それぞれが特異的な膜に局在し、GEF 及び GAP (GTPase-activating protein) を介し、GTP 結合型 (活性化型) と GDP 結合型 (不活性化型) をサイクルすることによって特異的な細胞内膜輸送シグナル系を制御している。

近年、ALS2 の新規結合因子として、Rab タンパク質ファミリーの一つである Rab17 が同定された。Rab17 は、これまでに上皮細胞におけるトランスサイトーシ

スやメラノソーム輸送、さらに腫瘍形成に関与することが報告されている。これらの知見は、Rab17 が極性輸送に関与する可能性を示しているが、その具体的な分子機構については未だ不明である。さらに、Rab17 は VPS9 ドメインを有する RABGEF1 (Rabex-5) によって活性化され、それによりマウス海馬由来神経細胞においては樹状突起の形態形成やグルタミン酸受容体の輸送を調節することも明らかとなっている。しかし、RABGEF1 と同様に VPS9 ドメインを有する ALS2 と Rab17 の機能的関連性については未だ解析されていない。

本研究の目的

本研究では、ALS2 機能喪失により発症する 2 型 ALS の発症分子機構の全容解明に向けて、ALS2 の新たな分子機能を明らかにするため、新規 ALS2 結合因子 Rab17 に着目した。そして、細胞生物学的及び生化学的解析により、ALS2 と Rab17 両分子の調節する細胞内膜輸送機構を明らかにすることを目的とした。

3. 考察と展望

本研究では、ALS2 の新たな分子機能を明らかにするため、新規 ALS2 結合因子 Rab17 に着目し、HeLa 細胞において両分子の調節する細胞内膜輸送機構を特定することを目的とした。

定常条件及び Rac1 活性化条件下における細胞内局在解析により、Rab17 は主にリサイクリングエンドソームに局在する一方で、Rac1 活性化依存的にメンブレンラッフルを介して、初期エンドソームへと局在移行し、ALS2 と共局在することが明らかとなった。また GST pull-down assay により、ALS2 は Rab17^{WT} 及び Rab17^{CN} と直接結合することが明らかとなった。この結果は、ALS2 が GDP 結合型 Rab17 と結合することを示唆するため、ALS2 が Rab17 を活性化することが期待された。しかし、GDP-GTP exchange assay によって、ALS2 は Rab17 に対する GEF 活性を有さないことが示された。したがって、ALS2 と Rab17 は初期エンドソーム上において共局在し、ALS2 は Rab5 の活性化以外に、Rab17 と結合することで Rab17 の初期エンドソーム局在を調節することが示唆された。さらに、ALS2 の欠失は Rab17 陽性エンドソームの肥大化を引き起こすことが明らかとなった。ALS2 の欠失によって形成される Rab17 陽性肥大化エンドソームには、後期エンドソームマーカーである Rab7 やリソソームマーカーである LAMP2 が局在しているにもかかわらず、酸性化は進んでいない小胞であることが明らかとなった。また、pulse-chase assay の結果から、CME のカーゴである EGF 及び Tfn の輸送障害は起きていないことが示された。したがって、Rab17 が調節する輸送経路は CIE 経路である可能性が示された。これらの結果

から、ALS2 の欠失により Rab17 が制御する CIE 由来エンドソームの輸送が障害されることが示唆された。

本研究により、Rab17 は Rab11 陽性繊維状リサイクリングエンドソームに局在し、Rac1 の活性化依存的に細胞膜へと局在移行することが明らかとなった。先行研究において、繊維状リサイクリングエンドソームは、CIE 経路に関与することが報告されている。また、Rab17 は group A *Streptococcus* (GAS)-targeted autophagy やマクロファージにおける antigen-sorting のようなファゴサイトーシスに関与することが報告されている。したがって、Rab17 は HeLa 細胞においても、繊維状リサイクリングエンドソームを介して CIE 経路に関与すると推測される。しかし、Rab17 のリサイクリングエンドソームにおける分子機能については未だ明らかとなっておらず、更なる研究が必要である。

一方、ALS2 を発現抑制した HeLa 細胞において Rab17 陽性エンドソームが肥大化する現象が確認された。この現象は、ALS2 の欠失によって Rab17 陽性エンドソームの初期エンドソームへの輸送が障害されたことから、Rab17 陽性エンドソームが蓄積し、異常に融合した結果生じたものであると考えられる。しかし、ALS2 の欠失によって形成される Rab17 陽性肥大化エンドソームは、初期エンドソームマーカーである Rab5 やリサイクリングエンドソームマーカーである Rab11 が局在しない一方で、後期エンドソームマーカーであ

る Rab7 及び LAMP2 が局在する後期エンドソーム様の非酸性化小胞であることが確認された。したがって、ALS2 は Rab17 との結合を介して Rab17 陽性エンドソームの輸送及び性質を調節することが示唆された。

先行研究において、「methuosis」と呼ばれるマクロピノサイトーシスの異常が、Rab7 及びリソソームマーカである LAMP1 陽性の非酸性化小胞を形成することが報告されている。これまでの研究から、ALS2 は Rac1 活性化依存的にマクロピノサイトーシスされることが明らかとなっている。したがって、ALS2 の欠失によって生じる Rab17 陽性肥大化エンドソームは「methuosis」と関連する可能性が高い。しかし、「methuosis」と ALS2 の関連性については、現時点では明らかとなっていない。

本研究によって得られたもう一つの新たな知見は、RABGEF1 が Rab17 及び ALS2 の制御する分子機構の上流において機能することである。現時点では、本研究によって得られた RABGEF1 及び ALS2 と Rab17 が調節する分子機構が神経細胞においても存在しているかどうかは不明である。神経細胞においては Rab17 が RABGEF1 の活性化を受けて樹状突起の形態形成や成熟を調節する一方で、ALS2 は軸索の伸長を制御する因子として報告されている。また、ALS2 は樹状突起と軸索末端に分布する一方で、Rab17 は樹状突起に分布するなど、各分子の神経細胞内における分布や機能に相

違が存在する可能性がある。しかし、ALS2は樹状突起におけるグルタミン酸受容体の輸送に関与することが報告されており、Rab17についても、樹状突起における受容体の細胞膜発現に関与することが報告されている。したがって、ALS2とRab17が樹状突起においても同様に機能する可能性が考えられ、軸索伸長とは異なる機構に関与すると推測することも可能である。一方、先行研究から、Rab17はRABGEF1により活性化されることで樹状突起局在を示すが、ALS2ではRab17の樹状突起局在を促進しないことが報告されている。これらの知見から、ALS2とRABGEF1は共にRab5GEFとして機能するVPS9ファミリータンパク質であるが、Rab17を介する分子機構においては各々異なった作用を有すると考えることができる。いずれにせよ、神経細胞におけるALS2、RABGEF1及びRab17の機能的関連を明らかにするには、更なる検討が必要である。

神経細胞において、ALSをはじめとする多くの神経変性疾患（ハンチントン病、アルツハイマー病、シャルコー・マリー・トゥース病など）が細胞内膜輸送の異常を伴うことが知られており、細胞内膜輸送の制御因子であるRabタンパク質の機能異常を原因とする疾患も報告されている。運動ニューロン疾患の一つであるHSP（hereditary spastic paraplegia：遺伝性痙性対麻痺）は、その発症機序に細胞内膜輸送異常を伴う疾患の一つとして報告されている。先行研究から、HSPは

膜輸送分子 protrudin の遺伝子変異による機能異常を原因として発症することが明らかとなっている。中枢神経系において高い発現が見られる protrudin は、NGF (nerve growth factor: 神経成長因子) によって活性化された ERK (extracellular signal-regulated kinase) のリン酸化を受け、GDP 結合型 Rab11 との結合を介してリサイクリングエンドソームに局在し、限定的な方向への極性輸送を促進することで神経突起を形成することが明らかとなっている。この現象は、非神経細胞である HeLa 細胞において protrudin を強制発現することでも観察されることから、protrudin は細胞種に関わらず方向限定的な極性輸送を促進する機能を持つことが報告されている。これらの知見から、神経細胞におけるリサイクリングエンドソーム輸送が、神経細胞の機能維持や成熟に重要な役割を担うことが示唆され、またその破綻が神経変性疾患へと繋がることが考えられる。今回の解析から、ALS2 は GDP 結合型 Rab17 と結合し、Rab17 の制御する細胞内膜輸送を調節することが明らかとなった。この結果から、ALS2 の新たな分子機能として、ALS2 が Rab17 の細胞内局在を調節することによりリサイクリングエンドソームの膜動態を調節する可能性が示唆される。したがって、遺伝子変異による ALS2 の機能喪失によって、Rab17 を介したリサイクリングエンドソーム輸送が障害されることにより、神経突起の形態形成不全やタンパク質分解系の

異常が生じ、ALS2 の発症を引き起こす可能性も考えられる。

今後、ALS2 の分子機能及び疾患発症における分子的背景のさらなる理解を深めるために、ALS2 が調節する細胞内膜輸送のより詳細な分子機構を明らかにする必要がある。ALS2 に関する分子機能の解析は、細胞内膜輸送異常を起因とする他の神経変性疾患の発症機序を理解することにも寄与し、またそこから得られた知見が新たな治療法及び新薬の開発へと繋がることが期待される。

4. 結論

本研究によって新たに明らかにされた細胞内膜輸送機構は、以下のように要約される。

リサイクリングエンドソームに局在する Rab17 は、Rac1 活性化依存的にメンブレンラッフルに局在移行した後に、ALS2 陽性の初期エンドソームへと局在移行する。初期エンドソームへと移行した Rab17 は、再びリサイクリングエンドソームへと移行し、Rab11 を介したリサイクリングエンドソーム輸送への関与が想定される。一方、ALS2 欠失細胞では、ALS2 による Rab17 陽性エンドソームの初期エンドソームへの輸送が障害されるため、蓄積した Rab17 陽性エンドソームが融合し、肥大化した後期エンドソーム様の異常エンドソームを形成することで、正常な細胞内膜輸送が障害され

る。

以上から、ALS2 は初期エンドソーム上で Rab5 の活性化因子として機能するだけでなく、Rab17 との結合を介して CIE 由来のエンドソーム形成と成熟の調節因子としても機能していると考えられる。したがって、家族性 2 型 ALS の発症には、ALS2 の機能喪失による Rab17 を介したリサイクリングエンドソーム輸送の障害も関与していることが新たに示唆された。