

論文の内容の要旨

論文題目「家族性筋萎縮性側索硬化症 2 型疾患発症変異体の
高次構造異常はALS2タンパク質のエンドソーム局在能喪失を招く」

学位申請者 佐藤 海

キーワード： ALS、ALS2、エンドソーム、エンドサイトーシス、多量体

【背景・目的】

家族性筋萎縮性側索硬化症2型 (Amyotrophic lateral sclerosis type2:ALS2) は常染色体劣性形式を示す若年発症型ALS (Amyotrophic lateral sclerosis; ALS) であり、ALS2遺伝子変異によるALS2タンパク質 (ALS2) の機能喪失により発症へ至る。ALS2は低分子量Gタンパク質Rab5を活性化型へ変換するグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor; GEF) として機能し、初期エンドソーム上でRab5を活性化する。このRab5GEF活性にはALS2のC末端を介した自己相互作用が必須であると考えられている。これまでに、ミスセンス変異を持つALS2疾患原因変異体であるALS2C157YおよびALS2G540Eは、エンドソームへの局在能が喪失していると報告されている。しかし、エンドソーム局在能の喪失を引き起こす分子機構については明らかにされていない。そこで、本研究ではALS2のエンドソーム局在に必須である多量体化に注目し、新たに同定された疾患原因変異体も含め、ALS2の高次構造と細胞内局在の関連性を解析することで、ミスセンス変異によるALS2発症メカニズムの解明を目的とした。

【方法】

細胞内局在解析

HeLa細胞へ発現コンストラクトをトランスフェクションし、蛍光抗体染色を行った。染色像の観察は共焦点レーザー顕微鏡LSM700を用いた。画像解析はimageJを使用した。

ゲルろ過クロマトグラフィー

COS-7細胞へ野生型および変異体ALS2発現コンストラクトをトランスフェクションし、細胞抽出液をSuperose 6 10/300カラムへ注入した。得られたフラクションはSDS-PAGE/WB法を用いて解析した。

ホモロジーモデル解析

BLASTプログラムを用いてALS2—RLDのアミノ酸配列を元に、鋳型タンパク質を探索した。その結果、最も相同性が高いものとしてヒトHERC2タンパク質の3つ目のRLDを同定した。3KC1に対してMODELLERを利用した Build Homology Modelプロトコルを用

いて、ALS2-RLD のアミノ酸配列に対応するモデルを作成した。得られたモデルをPDF およびDOPEスコアにより評価し、最も良いモデルを選定した。

【結果】

細胞内局在解析の結果、新たに同定された疾患原因変異体は、先行研究と同様にエンドソーム局在能が喪失していた。ゲルろ過クロマトグラフィーによる高次構造解析の結果、野生型ALS2は4量体を形成するのに対して、疾患原因変異体は4量体以上の多量体や2～3量体と推定される異常な多量体を形成していた。疾患原因変異の多くがALS2のアミノ末端に存在する自己相互作用ドメインの1つであるRLD (regulator of chromosome condensation 1-like domain) に集中していることから、疾患原因変異によるRLDの高次構造の変化が異常な多量体形成の原因ではないかと考え、野生型RLDおよび疾患変異型RLDの高次構造解析を行った。その結果、疾患変異型RLDは野生型RLDに比べ多量体構造が高分子側へシフトしていた。さらに、ALS2-RLDのホモロジーモデルを作成し、変異によるタンパク質の安定性を評価したところ、変異型RLDは野生型に比べタンパク質の安定性が低下することが判明した。さらに、NSC-34細胞を用いた全長ALS2疾患原因変異の安定性をタンパク質翻訳阻害実験により評価したところ、疾患原因変異体は野生型に比べ早く分解しており、ホモロジーモデルのシミュレーションを反映する結果が得られた。

【考察】

これらの結果より、ミスセンス変異を伴うALS2疾患原因変異体は、変異により自己相互作用ドメインが構造異常を呈することで不安定となり、正常な4量体を形成することができず、その結果、ALS2のエンドソームへの局在能の喪失を招き、結果的にALS2の細胞内機能喪失をもたらすと推察された。

【結論】

正常型のALS2は4量体を形成し、低分子量Gタンパク質Rac1の刺激によりメンブレンラッフル/ドーサルラッフルへと局在移行する。ALS2は、マクロピノサイトーシスを介してマクロピノソームおよび初期エンドソームへと局在移行する。しかし、疾患原因変異体ではRac1の刺激によりメンブレンラッフルまでは局在できるものの、自己相互作用領域 (RLDまたはMORN/VPS9) の高次構造異常により正常な多量体を形成できず、マクロピノソームへALS2は局在移行ができなくなり、その結果ALS2を介した初期エンドソーム上でのRab5GEF活性を含むシグナル伝達が大きく破綻する可能性があると考えられる