

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18513

研究課題名(和文) 亜鉛関連遺伝子群によるSOD1構造制御機構とALS発症機構の解明

研究課題名(英文) Revealing the molecular mechanism of regulating SOD1 proteostasis by zinc-related genes for understanding ALS pathogenesis

研究代表者

本間 謙吾 (Homma, Kengo)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・特任研究員

研究者番号：60708171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ALS関連変異型SOD1がDerlin-1との結合を介して運動神経細胞毒性を発揮することを報告した。一方で、野生型のSOD1も亜鉛欠乏環境下で構造変化し、Derlin-1と結合することを明らかにしている。本研究では、環境要因により構造変化したSOD1がSOD1遺伝子変異非依存的なALSの発症に関与している可能性を検証するため、亜鉛欠乏依存的なSOD1構造変化の分子メカニズムの解明を目指した。スクリーニングにより亜鉛欠乏依存的な構造変化に必要な因子として同定された亜鉛トランスポーターZIP13を解析した結果、ゴルジ体の亜鉛がSOD1構造制御に重要な役割を果たしていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：ALS is a devastating neurodegenerative disease characterized by the selective motoneuron death. We have previously reported that SOD1 mutants interact with Derlin-1, leading to the motoneuron death. In addition, we have found that the zinc depletion induced the conformational change of wild-type SOD1 (SOD1WT) and the interaction between SOD1WT and Derlin-1. To evaluate the possibility that the conformationally-disordered SOD1WT could be involved in the pathogenesis of SOD1 mutation-negative ALS, we investigated the molecular mechanism of SOD1WT conformational change. The analysis of ZIP13, a zinc transporter, that was identified as a mediator of zinc depletion-induced SOD1WT conformational change revealed the essential role of the Golgi apparatus in zinc depletion-induced SOD1WT conformational change.

研究分野：分子生物学

キーワード：亜鉛 SOD1 ALS 亜鉛トランスポーター

## S1 . 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis : ALS) は、運動神経細胞が選択的に侵される晩発性の神経変性疾患である。これまでにおよそ 20 の原因遺伝子が発見されているが、未だ詳細な発症メカニズムはわかっておらず、根本的な治療方法も存在していない。Cu, Zn Superoxide dismutase (SOD1) は家族性 ALS の原因遺伝子として知られており、これまでに 160 種類を超える SOD1 遺伝子変異が ALS 患者で報告されている。SOD1 は抗酸化酵素として機能するが、SOD 活性と ALS 病態の間に相関はみられず、様々な変異型 SOD1 が細胞毒性を発揮する共通のメカニズムは未解明であった。我々は以前、変異型 SOD1 が小胞体品質管理機構を破綻させ、小胞体ストレスを誘導することを報告した (Nishitoh et al., Genes Dev. 2008)。小胞体ストレスは、小胞体内腔に不良タンパク質が蓄積することで生じる。家族性 ALS に関連した変異型 SOD1 は、小胞体の品質管理を担う膜タンパク質 Derlin-1 に結合し、Derlin-1 の機能を阻害することで、小胞体ストレスを介した運動神経細胞死を誘導することがわかった。Derlin-1 との結合は 100 種類を超える ALS 関連変異型 SOD1 で観察されたことから、ALS の原因となる変異型 SOD1 に共通の性質であると考えられる (Fujisawa et al., Ann. Neurol. 2012)。さらに、亜鉛欠乏という環境要因によって野生型 SOD1 も変異型様の構造に変化し、Derlin-1 と結合することが明らかとなった (Homma et al., Mol. Cell 2013)。このことから、環境要因により構造変化した SOD1 と Derlin-1 の結合が SOD1 変異による ALS のみならず、SOD1 遺伝子変異非依存性の ALS 病態にも関わっている可能性が考えられる。しかしながら、SOD1 の構造制御機構の詳細は未解明な点が多く、実際に ALS 病態に野生型 SOD1 が関わっているかの検証はできていない。そこで本研究では、野生型 SOD1 が ALS 病態に寄与する可能性を検討するため、SOD1 の構造制御機構の分子メカニズムを明らかにすることを目指した。

## 2 . 研究の目的

これまでの研究により、変異型 SOD1 と Derlin-1 の結合が運動神経細胞死を誘導することが明らかとなっている。そこで、野生型 SOD1 と Derlin-1 の結合が ALS 病態に関与するかを解析するため、SOD1 構造制御機構の詳細を解明することを目指した。本研究により SOD1 構造制御機構が明らかになることで、ALS における SOD1 構造変化の原因・重要性の検証が可能となり、ALS 発症機構の解明や、ALS 発症のリスクファクターの同定が可能になることが期待される。

## 3 . 研究の方法

### (1) 候補遺伝子の絞り込み

我々は、これまでに SOD1 構造変化をハイスループットに検出する実験系を利用して、亜鉛欠乏依存的な SOD1 構造変化に必要な遺伝子と、構造変化した SOD1 の蓄積を防ぐために必要な遺伝子の探索を目的としたゲノムワイド siRNA スクリーニングを完了している。本研究では、亜鉛欠乏依存的な構造変化に必要な遺伝子の中で、最も顕著な差を示した亜鉛関連遺伝子である *SLC39A13* に着目して解析した。

### (2) SOD1 構造変化の検出

変異型構造の SOD1 の検出は、以前作製した変異型 SOD1 特異的抗体 (MS785、MS27) を用いた免疫沈降法により行った (Fujisawa et al., Ann. Neurol. 2012、Fujisawa et al., Neurobiol. Dis. 2015)。細胞は HeLa 細胞または、Flag-SOD1<sup>WT</sup> を恒常発現した HEK293A 細胞を用いた。

## 4 . 研究成果

### (1) スクリーニングの妥当性の確認

*SLC39A13* はゴルジ体に局在する亜鉛トランスポーター ZIP13 をコードしている。まずは、スクリーニング結果の妥当性を検討するため、ZIP13 が内在性 SOD1 の構造変化に与える影響を検討した。ZIP13 の発現を抑制した細胞では、亜鉛欠乏依存的な SOD1 の構造変化が減弱しており、スクリーニングにより SOD1 構造変化に必要な遺伝子が同定できていることが確認できた (図 1.)。

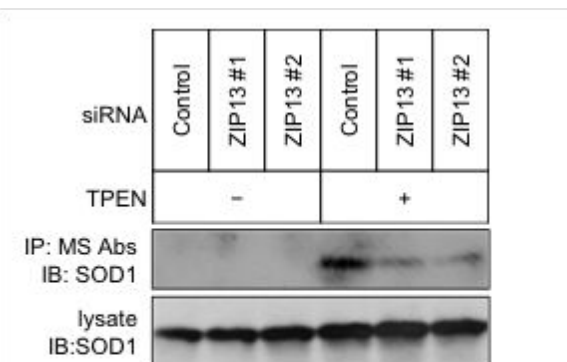


図1. ZIP13の発現抑制により、亜鉛欠乏依存的なSOD1構造変化が減弱した

### (2) ZIP13 亜鉛輸送活性の検討

そこで、実際に ZIP13 の亜鉛輸送活性が SOD1 構造変化に必要なかを検討するため、ZIP13 の過剰発現実験を行った。しかしながら、過剰発現した ZIP13 の多くはゴルジ体局在を示さず、ゴルジ体の形態変化が観察された。ゴルジ体の形態変化は、ZIP13 の亜鉛輸送能ではなく、発現する ZIP13 のタンパク質量が重要であることが示唆されたことから、今後は発現方法を検討することで、ZIP13 に

よる SOD1 構造変化促進機構の詳細を明らかにしたい。

### (3) ゴルジ体に局在する亜鉛トランスポーターの関与の検討

ZIP13 はゴルジ体に局在し、亜鉛をゴルジ体内から細胞質へと輸送する。そこで、ZIP13 の発現抑制により減弱する SOD1 構造変化が、ゴルジ体内の亜鉛量の増加によるものであるかを検討するため、ほかのゴルジ体に局在する亜鉛トランスポーターの関与を検討した。ZIP13 と逆向き、つまり亜鉛をゴルジ体内へと輸送する亜鉛トランスポーターとして、ZnT5 と ZnT6 のヘテロ複合体ならびに ZnT7 のホモ複合体が知られている。これらの複合体は代償的に働くことが報告されていたことから、輸送活性を担う ZnT5 と ZnT7 を発現抑制した細胞で、亜鉛欠乏依存的な SOD1 構造変化を評価した。すると、これらのトランスポーターを発現抑制した細胞においても亜鉛欠乏依存的な SOD1 構造変化が減弱した(図 2.)。

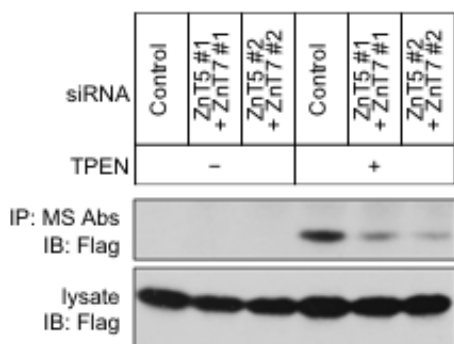


図2. ZnT5 と ZnT7 の発現抑制により、亜鉛欠乏依存的な SOD1 構造変化が減弱した (Flag-SOD1<sup>WT</sup> 恒常発現 HEK293A 細胞)

一方で、ZnT5 と ZnT6 の両者、または ZnT7 を過剰発現した細胞では、亜鉛欠乏依存的な SOD1 の構造変化が促進した(図 3.)。

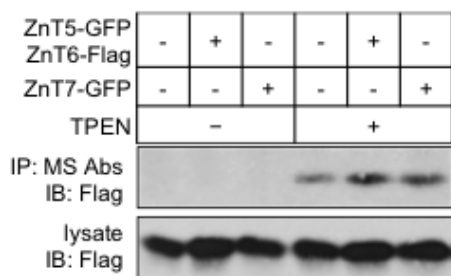


図3. ZnT5 と ZnT7 の過剰発現により、亜鉛欠乏依存的な SOD1 構造変化が促進した (Flag-SOD1<sup>WT</sup> 恒常発現 HEK293A 細胞)

以上の結果から、亜鉛欠乏依存的な SOD1 構造変化にはゴルジ体に局在する亜鉛トランスポーターが重要な役割を果たすことがわかった。さらに、単なるゴルジ体内の亜鉛量の増加や減少ではなく、各トランスポーターを介した亜鉛の動きが SOD1 構造制御に関わ

っていることが示唆された。

本研究により、亜鉛欠乏依存的な SOD1 の構造変化にはゴルジ体に局在する複数の亜鉛トランスポーターが必要であることがわかった。ゴルジ体での亜鉛量の変化が重要な役割を果たしていることが示唆されたことから、今後は細胞全体の亜鉛欠乏ではなく、局所的な亜鉛動態に着目して解析を行うことにより、環境要因により構造変化した SOD1 と Derlin-1 の結合が SOD1 変異による ALS のみならず、SOD1 遺伝子変異非依存性の ALS 病態にも関わっている可能性を検討していきたい。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

(1) Imamura, K., Izumi, Y., Watanabe, A., Tsukita, K., Woltjen, K., Yamamoto, T., Hotta, A., Kondo, T., Kitaoka, S., Ohta, A., Tanaka, A., Watanabe, D., Morita, M., Takuma, H., Tamaoka, A., Kunath, T., Wray, S., Furuya, H., Era, T., Makioka, K., Okamoto, K., Fujisawa, T., Nishitoh, H., Homma, K., Ichijo, H., Julien, J.-P., Obata, N., Hosokawa, M., Akiyama, H., Kaneko, S., Ayaki, T., Ito, H., Kaji, R., Takahashi, R., Yamanaka, S. and Inoue, H. The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis *Sci. Transl. Med.*, 9, pii: eaaf3962 (2017). DOI:10.1126/scitranslmed.aaf3962 (査読有)

(2) Fujisawa, T., Takahashi, M., Tsukamoto, Y., Yamaguchi, N., Nakoji, M., Endo, M., Kodaira, H., Hayashi, Y., Nishitoh, H., Naguro, I., Homma, K. and Ichijo, H. The ASK1-specific inhibitors K811 and K812 prolong survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.*, 51, 81-89 (2016). DOI:10.1093/hmg/ddv467 (査読有)

(3) Tsubota, A., Ichijo, H., Homma, K. Mislocalization, aggregation formation and defect in proteolysis in ALS. *AIMS Molecular Science*, (review article), 3(2): 246-268 (2016) DOI:10.3934/molsci.2016.2.246 (査読有)

(4) Hayashi, Y., Homma, K. and Ichijo, H. SOD1 in Neurotoxicity and its controversial roles in SOD1 mutation-negative ALS

*Adv. Biol. Regul.*, (review article), 60,  
95-104 (2016).

DOI:10.1016/j.jbior.2015.10.006 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) Atsushi Tsubota, Kengo Homma, Takao,  
Fujisawa, Hidenori Ichijo  
Identification of a zinc transporter as a  
mediator SOD1 conformational change under  
zinc deficiency  
International society for zinc  
biology/Zinc-net meeting 18<sup>th</sup>  
2017 年 6 月 18 日～22 日  
Pyla, Cyprus

(2) 本間謙吾、一條秀憲  
ゲノムワイド siRNA スクリーニングによる  
SOD1 の構造制御機構の解明  
第 39 回日本分子生物学会年会  
2016 年 11 月 30 日～12 月 2 日  
パシフィコ横浜 (横浜)

(3) 坪田充司、本間謙吾、一條秀憲  
ゲノムワイド siRNA スクリーニングによる亜  
鉛欠乏依存的な SOD1 の構造変化を制御する  
因子の同定  
第 39 回日本分子生物学会年会  
2016 年 11 月 30 日～12 月 2 日  
パシフィコ横浜 (横浜)

(4) Atsushi Tsubota, Kengo Homma, Hidenori  
Ichijo  
Functional analysis of factors that  
control the SOD1 structure  
9th Korea-Japan conference on cellular  
signaling for young scientist  
2016 年 7 月 21 日～23 日  
ソウル、韓国

〔その他〕

東京大学・大学院薬学系研究科 (薬学部)  
細胞情報学教室  
<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~toxicol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 謙吾 (Homma Kengo)  
東京大学・大学院薬学系研究科 (薬学部)・  
特任研究員

研究者番号 : 60708171