

平成 22 年 6 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ~ 2009

課題番号：19500313

研究課題名 (和文) 新規酸化 SOD1 特異抗体を用いた ALS 発症機構の解明

研究課題名 (英文) The role of oxidized SOD1 on ALS using the new antibody against oxidized SOD1 (anti-C111ox-SOD1)

研究代表者

藤原 範子 (FUJIWARA NORIKO)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10368532

研究成果の概要 (和文)：

Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ (Cu/Zn-SOD、以下 SOD1) は生体にとって有害なスーパーオキシドを酸素と過酸化水素に変換する酵素で、酸化ストレスから生体を守る役割を果たしている。本酵素の Cys111 残基の SH 基がスルホン酸(SO<sub>3</sub>H)にまで酸化されることを質量解析で同定した。さらに Cys111 の SH 基がスルホン酸(SO<sub>3</sub>H)に酸化された酸化型 SOD1 を特異的に認識する抗体が ALS モデルマウス脊髄の封入体と空胞の縁を特異的に染色することを見いだした。これは ALS の病態において酸化ストレスおよび酸化型 SOD1 が関与していることを示唆するものである。

研究成果の概要 (英文)：

Copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) plays a protective role against oxidative stress. On the other hand, recent studies suggest that SOD1 itself is a major target of oxidative damage and has its own pathogenicity in various neurodegenerative diseases, including familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). Only human and great ape SOD1s among mammals have the highly reactive free cysteine residue, Cys111, at the surface of the SOD1 molecule. The purpose of this study was to investigate the role of Cys111 in the oxidative damage of the SOD1 protein, by comparing the oxidative susceptibility of recombinant human SOD1 modified with 2-mercaptoethanol at Cys111 (2-ME-SOD1) to wild-type SOD1. Wild-type SOD1 was more sensitive to oxidation by hydrogen peroxide generating fragments and oligomers compared with 2-ME-SOD1. Moreover, wild-type SOD1, but not 2-ME-SOD1, generated an upper shifted band in reducing SDS-PAGE even by air oxidation. Using mass spectrometry and limited proteolysis, this upper band was identified as an oxidized subunit of SOD1; the sulfhydryl group (Cys-SH) of Cys111 was selectively oxidized to cysteine sulfinic acid (Cys-SO<sub>2</sub>H) and to cysteine sulfonic acid (Cys-SO<sub>3</sub>H). The antibody raised against a synthesized peptide containing Cys111-SO<sub>3</sub>H reacted with only the Cys111-peroxidized SOD1 by Western blot analysis, and labeled Lewy-body-like hyaline inclusions and vacuole rims in the spinal cord of human SOD1-mutated ALS mice by immunohistochemical analysis. These results suggest that Cys111 is a primary target for oxidative modification and plays an important role in oxidative damage to human SOD1 including FALS mutants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：スーパーオキシドジスムターゼ、Cu/Zn-SOD、抗体、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、酸化的翻訳後修飾、MALDI-TOF-MS

1. 研究開始当初の背景

家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子が *SOD1* であることが報告されて以来、現在まで 100 以上の変異が報告されている。変異 *SOD1* が toxic な作用を有することは様々な実験で明らかにされているが、その毒性の本体、さらにはいかなるメカニズムで運動神経を障害するかは全く不明である。また、FALS 患者や変異 *SOD1* トランスジェニックマウス、および孤発性の ALS 患者では *SOD1* 免疫陽性の封入体が観察されており、特に変異 *SOD1* は生体内で構造変化を起こし、aggregation を起こしやすいことが示唆されている。また活性酸素種が aggregation を起こす可能性も示唆されている。ヒト *SOD1* は 4 個のシステイン残基を有している。そのうち Cys57 と Cys146 はジスルフィド結合し、構造の安定化に寄与している。一方、Cys6 と Cys111 はフリーのまま存在する。本研究においても証明されたが、特に Cys111 は *SOD1* 分子の表面にあり、非常に反応性が高いことが予想される。また、ヒト *SOD1* を酸化すると SDS-PAGE で上にシフトするバンドが認められていたが、このバンドの分子は不明であった。このバンドが Cys111 に関与するののかも明らかではなかった。

2. 研究の目的

タンパク自身に及ぼす酸化ストレスの影響を検討し、ALS への酸化ストレスの関与を明らかにするための手段を探ることを目的とした。特に、システイン残基の酸化と ALS の関連性を検討するために、Cys111 の SH 基に 2-メルカプトエタノール (2-ME) を導入し

た 2-ME-*SOD1* を用いて、*SOD1* の酸化における Cys111 の役割を検討した。さらに、Cys111 が酸化した *SOD1* のみを特異的に検出できる酸化 *SOD1* 特異抗体を新規に作製し、この抗体を用いて、酸化型 *SOD1* が ALS に関与するかどうかを検討した。

3. 研究の方法

2-ME を導入した *SOD1* タンパク質は宇部興産から供与していただいた。

(1) Cys111 にのみ 2-ME が結合していること、ほかの Cys には 2-ME が結合していないことを MALDI-TOF-MS 解析で確認した。さらに 2-ME を加えて Cys111 の 2-ME がはずれて元の野生型 *SOD* に戻るかどうかを検討した。20 mM の 2-ME で処理すると完全に 2-ME がとれた *SOD* に戻ることが示唆されたため、その *SOD* をトリプシン処理し、Cys111 を含むペプチドにも 2-ME が結合していないことを確かめた。そこで、2-ME がついた *SOD* を 2-ME-*SOD*、はずして元に戻したものを WT-*SOD1* と呼ぶことにする。

(2) この 2 つの *SOD* を用いて、酸化に対する反応性を比較検討した。WT-*SOD1* を酸化すると SDS-PAGE で上にシフトした 2 本目のバンドが現れた。このバンドは酸化的修飾された *SOD1* と予想されたため、その分子を MALDI-TOF-MS および LC-ESI-MSMS を用いて同定を行った。

(3) 2-ME-*SOD1* および WT-*SOD1* を酸化させ、2 次元電気泳動を行い、チャージアイソマー生成について検討した。

(4) スルホン酸にした Cys111 を含むペプチド-KLH をウサギに免疫し、酸化型 *SOD1* に特異的な抗体を作製し、ALS モデルマウスで

ある G93Atg マウスの脊髄切片の免疫組織染色を行った。

#### 4. 研究成果

Cys111 にのみ 2-ME が結合していること、もう 1 つのフリーのシステインである Cys6 には 2-ME が結合していないことを MALDI-TOF-MS 解析で確認した。さらに 20 mM の 2-ME とインキュベートすることで、Cys111 の 2-ME がはずれて元の SH 型のシステインになることを確認した。次に種々の濃度の過酸化水素を両 SOD に加え 20 分間インキュベート、希釈した後、SDS-PAGE を行った。過酸化水素の濃度が 1 mM 以上になると、WT-SOD1 では主に 2 本のバンドになり、時間がたつと SOD が分解され、バンドの色が薄くなっていく様子が見られた。一方、2-ME-SOD1 も分解はされたが、その程度は低く、2 本目のバンドは認められなかった。従って、この 2 本目のバンドは Cys111 に由来することが予想された。回転式攪拌器でゆっくり攪拌させる空気酸化によっても、WT-SOD1 のみ 2 本目のバンドを出現させることがわかった。この空気酸化 WT-SOD1 を MonoQ カラムにかけると、2 本のピークに分かれた。MS 解析によって、2 本目のピークには元の SOD1 の質量と約 45 大きい質量の 2 種類の SOD1 が存在することがわかった。また、それぞれのピーク部分を SDS-PAGE すると、1 本目のピーク (a) は 1 本の SOD1 バンド、2 本目のピーク (b) は 2 本のバンドが観察された (図 1)。

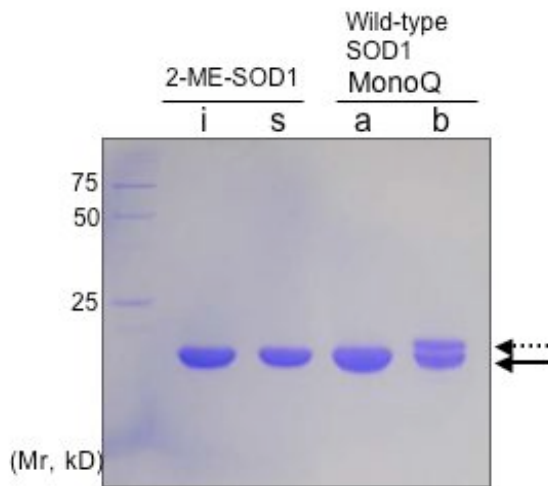
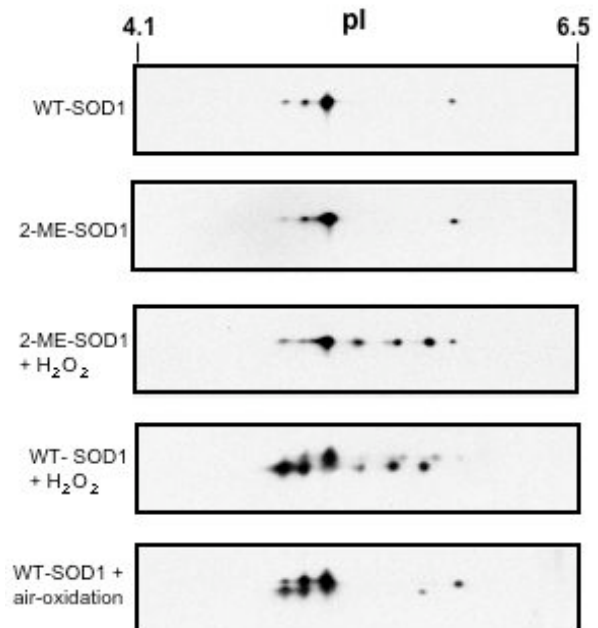


図 1 2-ME-SOD1 の空気酸化後 (s) および WT-SOD1 の空気酸化後に MonoQ で分離した後の SDS-PAGE

そこで、図 1 の SDS-PAGE で分離した 2 本のバンドのそれぞれを切り出し、トリプシン処

理し、Cys111 を含むペプチドの質量を調べたところ、上のバンドからはペプチドの質量 +32 および +48 の質量数が得られた。さらに 2 本バンドの MonoQ カラム画分をリジエンドペプチダーゼ処理して得られたペプチドを MSMS 解析することで、Cys111 はスルフィン酸 (SO<sub>2</sub>H) およびスルホン酸 (SO<sub>3</sub>H) に酸化されることを証明した。さらに、隣の His110 や酸化されやすいと報告されてきた His120 は酸化されていないことを証明した。

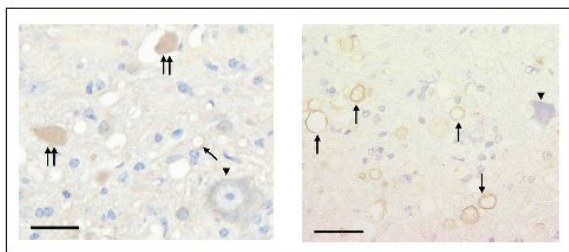
次に 2-ME-SOD1 および WT-SOD1 を酸化させ、2 次元電気泳動を行い、チャージアイソマー生成について検討した。図 2 に示すように、2-ME-SOD1 および WT-SOD1 は pI 5.15 のメインスポットの他に 3 つの小さなスポットを有する。両者を過酸化水素で酸化させると、2-ME-SOD1 では、pI 5.15 のメインスポットと pI 5.8 のスポットの間に 3 つのスポットが新たに生成されることがわかった。一方、WT-SOD1 では、上記 3 つのスポット以外に、メインスポットよりも酸性側に大きなスポットが 2 つ、そしてそれぞれのスポットの上にシフトしたスポットが 6 つ生成した。また WT-SOD1 を空気酸化した場合は pI 5.15 のメインスポットよりも酸性側に上下 4 つの新たなスポットが生成したが、メインスポットの塩基性側には小さなスポットが 1 つ生まれただけであった。従って、pI 5.15 のメインスポットよりも酸性側にできたスポットは Cys111 の酸化に依るものであると考えられる。アルツハイマー病患者の病変脳からも SOD1 のチャージアイソマーの存在が報告されており、これらのアイソマーが ALS に関与しているかどうか、今後の検討課題である。



**図2 2-ME-SOD1 および WT-SOD1 の酸化、未酸化状態における二次元電気泳動**

Cys111 をスルホン酸にした合成ペプチドを免疫し、酸化型 SOD1 に特異的な抗体を作製した。本抗体はウエスタンブロットで、酸化型 SOD1 の上バンドのみを強く認識することを確認した。本抗体を用いて、ALS モデルマウスの脊髄切片の免疫組織染色を行ったところ、病変部にできた封入体と空胞の縁がこの抗体によって特異的に染色されることを見いだした (図3)。

これらの結果は、ALS の病態において酸化ストレスおよび酸化型 SOD1 が関与していることを強く示唆するものである。本抗体は ALS への酸化ストレスの関与の解明に役立つと期待できる。また変異 SOD1 の Cys111 の SH を特異的に保護する薬剤または抗体の開発は、ALS の治療にもつながる可能性があると考えられる。



**図3 G93A<sub>tg</sub> マウス脊髄切片の酸化型 SOD1 特異抗体による免疫組織染色**

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5件)

- ① Yoshihara D., Fujiwara N., Ookawara T., Kato S., Sakiyama H., Yokoe S., Eguchi H. and Suzuki K.: Protective role of glutathione S-transferase A4 induced in copper/zinc-superoxide dismutase knockout mice, *Free Radic. Biol. Med.* 47, 559-567, 2009 (査読有)
- ② 藤原範子、松本紋子、鈴木敬一郎、谷口直之: ALS における酸化ストレスおよび酸化型 SOD1 の関与、*実験医学(増刊)『病態解明に迫る活性酸素シグナルと酸化ストレス』*(谷口直之監修)、羊土社、Vol. 27, No. 15, 140-144, 2009 (査読無)
- ③ 江口裕伸、藤原範子、大河原知水、鈴木

敬一郎、谷口直之: 酸化ストレスと健康、「*生物資料分析*」Vol. 32, No. 4, 247-256, 2009 (査読無)

- ④ 藤原範子: *MEDICAL TOPICS* 第 28 回、ヒト Cu, Zn-SOD (SOD1) のシステイン残基の酸化的修飾とその特異抗体の開発、*THE LUNG perspectives*, メディカルレビュー社、Vol. 16, No. 3, p90-95, 2008 (査読無)
- ⑤ Fujiwara N., Nakano M., Kato S., Yoshihara D., Ookawara T., Eguchi H., Taniguchi N., Suzuki K.: Oxidative modification to cysteine sulfonic Acid of cys111 in human copper-zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* (2007) 282, 35933-35944. (査読有)

[学会発表] (計10件)

- ① Fujiwara N., Nakano M., Kato S., Yoshihara D., Eguchi H., Sakiyama H., Taniguchi N. and Suzuki K. (2009) Oxidative modification of Cys111 residue in human Copper/zinc superoxide dismutase and its immuno-probe, The 5th Joint Meeting of The Societies For Free Radical Research Australasia and Japan, 12. 1-4, Sydney, Australia
- ② 藤原範子、伊原健太郎、若槻壮市、谷口直之、鈴木敬一郎 (2009) 抗酸化能を獲得した 2-メルカプトエタノール修飾型 Cu, Zn-SOD の構造解析、第 82 回日本生化学会大会、10. 21-24、神戸
- ③ 伊原健太郎、藤原範子、富本裕介、若槻壮市、谷口直之、鈴木敬一郎 (2009) 2ME 化 SOD1 の結晶構造解析 第 26 回 PF シンポジウム 3. 24-25 つくば
- ④ 藤原範子、中の三弥子、大河原知水、吉原大作、横江俊一、加藤信介、谷口直之、鈴木敬一郎 (2008) ヒト Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) の Cys111 の酸化と酸化型 SOD1 特異抗体の作製、第 61 回日本酸化ストレス学会学術集会、6. 19-20、京都、(抄録、p66)
- ⑤ Fujiwara N., Nakano M., Yoshihara D., Ookawara T., Eguchi H., Taniguchi N. and Suzuki K. (2008) Cys111 in human copper-zinc-superoxide dismutase is a

primary target for peroxidation to cysteine sulfonic acid, The Gordon Research conference on Thiol-based Redox Regulation and Signaling, 5. 25-30, Lucca, Italy

- ⑥ Fujiwara,N., Nakano,M., Yoshihara,D., Ookawara,T., Taniguchi,N. and Suzuki,K. (2007) Role of Cys111 in an oxidative damage and generation of charge isomers of human Cu/Zn-superoxide dismutase, 第30回日本分子生物学会大会、第80回日本生化学会大会、合同大会 (BMB2007)、12. 11-15, 横浜(講演要旨集、838)
- ⑦ Fujiwara,N., Iso,H., Kitanaka,N., Kitanaka,J., Yoshihara,D., Ookawara,T., and Suzuki,K. (2007) Effects of copper metabolism on behavioral functions and brain monoamine contents in Wistar and Wilson's disease model rats, ISTERH2007, 10. 21-26, Crete, Greece
- ⑧ Fujiwara,N., Nakano,M., Yoshihara,D., Ookawara,T., Eguchi,H., Taniguchi,N. and Suzuki,K. (2007) Role of Cys111 in an oxidative damage of human Cu/Zn-superoxide dismutase, 第30回日本神経科学大会、第50回日本神経化学会大会、第17回日本神経回路学会大会、合同大会 (Neuro 2007)、9. 10-12, 横浜, (講演要旨集、S119)

[図書] (計1件)

- ① 鈴木敬一郎、藤原範子、大河原知水 : CHAPTER 3, 生体の抗酸化システム (1) スーパーオキシドジスムターゼ系、酸化ストレスの医学 (吉川敏一監修)、診断と治療社、23-30、2008

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤原 範子 (FUJIWARA NORIKO)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 10368532

### (2) 研究分担者

鈴木 敬一郎 (SUZUKI KEIICHIRO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 70221322  
崎山 晴彦 (SAKIYAMA HARUHIKO)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 30508958  
江口 裕伸 (EGUCHI HIRONOBU)  
兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 60351798

大河原 知水 (OOKAWARA TOMOMI)

兵庫医療大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 50330452

(H20-H21:連携研究者)

横江俊一 (YOKOE SYUNICHI)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 40454756

(H21:連携研究者)