

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21290

研究課題名(和文)ミスフォールド型タンパク質の経口摂取による毒性発揮の実験的検証

研究課題名(英文)Detection of misfolded Cu/Zn-superoxide dismutase proteins with *Caenorhabditis elegans*

研究代表者

古川 良明 (Furukawa, Yoshiaki)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授

研究者番号：40415287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：家族性筋萎縮性側索硬化症(fALS)では、変異型Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)タンパク質の構造異常化(ミスフォールド)が病態の特徴である。本研究は、線虫を用いて、ミスフォールドしたSOD1の毒性を検出しようとするユニークな方法を提案するものである。変異型SOD1タンパク質は、アミロイド様の不溶性凝集体やジスルフィド結合した可溶性オリゴマーを形成するが、このようなミスフォールドしたSOD1タンパク質を線虫に投与すると、可溶性オリゴマーだけが寿命の短縮、運動性の低下といった悪影響を与えることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、食材に含まれるタンパク質が、その構造に依存して毒性を発揮する可能性を検証した。天然構造から異常化した「ミスフォールド型」タンパク質の経口摂取はほとんど検討されていないが、線虫をモデルにして得られる本研究の成果を基盤として、ミスフォールド型タンパク質の摂取が生体に及ぼす影響を明らかにできれば、より良い食生活に向けた指針をタンパク質分子レベルで提案でき、社会的な意義も大きく挑戦的な課題である。

研究成果の概要(英文)：Misfolding of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) proteins is a pathological hallmark of a neurodegenerative disease, familial amyotrophic lateral sclerosis (fALS).

Here, we describe a unique method to detect misfolded SOD1 by using a nematode, *Caenorhabditis elegans*. A mutant SOD1 protein is known to misfold into either amyloid-like, insoluble aggregates or disulfide-crosslinked, soluble oligomers in vitro. When those misfolded SOD1 proteins in vitro were administered to the worms, we observed adverse effects of the oligomers but not the aggregates on *C. elegans* such as shortened lifespan, decreased motility, and deteriorated defecation. While a mechanism behind the trapping of worms with the oligomers remains obscure, this study reveals that *C. elegans* has potential to detect misfolded proteins even in a sub-micromolar concentration.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：ミスフォールディング

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病に代表される神経変性疾患では、その病変部位にミスフォールド型タンパク質が蓄積していることから、ミスフォールド型タンパク質を培養細胞に添加することで、その潜在的な毒性発揮のメカニズムが頻りに議論されている。一方で、ミスフォールド型タンパク質を「食べる」ことで生体に及ぶ影響は検討がほとんどなされていない。BSE などのプリオン病が、異常型プリオン(ミスフォールド型タンパク質)の経口摂取によって感染することはよく知られているものの、ミスフォールド型タンパク質が経口で個体間を伝播する現象はプリオン病に限定的であるとされている。代表的なモデル動物であるマウスを用いて、プリオン以外のタンパク質が経口摂取を通じて毒性を発現する可能性を評価するには、多量の精製タンパク質を長期間(年単位)投与する必要があるが生じる。そこで、一週間程度で世代交代する線虫であれば、投与するミスフォールド型タンパク質を微量に抑えることも可能で、様々な条件でミスフォールドさせたタンパク質の経口摂取による毒性の発現を探索的に評価できるのではないかと本構想を提案するに至った。

2. 研究の目的

各種の神経変性疾患においてミスフォールドするタンパク質は、生物種間において高度に保存されたアミノ酸配列を有しており、私たちの日常の食事の中にも動物性タンパク質として含まれうる。よって、ミスフォールド型タンパク質を日常的に経口摂取していることになり、私たちはその潜在的毒性に常に晒されていると考えることができる。そこで、取り扱いが比較的容易な線虫を用いて、タンパク質がその構造に依存して毒性を発揮する可能性を検証することである。特に、天然構造から異常化した「ミスフォールド型」タンパク質の経口摂取については、その毒性評価の実験的手法も含めて検討されていないが、ミスフォールド型タンパク質を摂取することが、様々な疾患の要因になりうるのではないかというアイデアを検証する。

3. 研究の方法

本研究では、神経変性疾患である家族性筋萎縮性側索硬化症(fALS)においてミスフォールドすることが知られている変異型 Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)タンパク質に着目し、ミスフォールドした SOD1 タンパク質を線虫に与えることで、その毒性を評価した。

まず、ミスフォールドした SOD1 タンパク質については、研究代表者がこれまでに報告してきた手法に従って(Furukawa et al. JBC 2008; Anzai et al. Protein Sci 2017 など)、金属イオンを結合していないアポ型 SOD1 を準備し、それらを 37°C で 5 日間静置・振盪することで調製した。なお、SOD1 に保存された分子内ジスルフィド(S-S)結合を保持したまま静置すると、異常な分子間 S-S 結合でクロスリンクしたオリゴマーが形成し、分子内 S-S 結合を還元して切断した状態で振盪すると、アミロイド様の不溶性凝集体が形成する。

次に、同調培養を行うことで日齢を揃えた線虫(*C. elegans* N2)を準備し、液体培地での飼育を行うとともに、成虫になる 1 日前の L4 ステージの線虫に対して、SOD1、SOD1 オリゴマー、および、SOD1 凝集体を添加して、液体培地での飼育を継続した。各種 SOD1 タンパク質が線虫に対して及ぼす影響については、線虫の寿命・屈曲運動(スラッシング)・排泄間隔を計測することで評価した。具体的には、線虫をピッカーで突いても動かず、咽頭のポンピングも見られない状態を「死」と定義して、生存曲線を作成した。また、液体培地中での屈曲運動を動画撮影し、30 秒間の屈曲回数をカウントすることで、スラッシングを評価した。さらに、液体培地で飼育している線虫を寒天培地に移してから、実体顕微鏡で観察することによって、排泄から次の排泄までの時間を計測した。

4. 研究成果

ALS の原因となる変異型(A4V)SOD1 を用いて、オリゴマーと凝集体を作製し、線虫に与えたところ、SOD1 タンパク質や凝集体を与えても寿命に違いは見られなかったが、オリゴマーを投与した場合には線虫の寿命が顕著に減少した(図1)。また、スラッシングの回数や排泄間隔についても、オリゴマーを与えた時のみに影響が見られ、経口摂取を開始してから 3~5 日後には、スラッシングの回数は減少し、排泄間隔については大幅に遅延するとともに一定のリズムを刻まなくなった(図2、図3)。よって、ミスフォールドしたタンパク質を経口摂取することによって生体に悪影響をもたらされる可能性があることがわかった。また、悪影響が見られるのは SOD1 のオリゴマーを投与した時のみで、SOD1 の凝集体を経口摂取させても、線虫の寿命や運動性、排泄には顕著な影響が見られないことから、タンパク質のコンフォメーション依存的に毒性が発現していることが示唆された。

これまでも、ミスフォールドタンパク質の経口摂取によって線虫が被る影響については、いくつかの報告があり、線虫の咽頭ポンピング速度に着目した機能評価などがなされている。例えば、心毒性を持つ免疫グロブリン軽鎖(LC)を線虫に与えると、寿命が短くなるとともに、咽頭ポンピング速度も低下したことが報告されている。詳細な毒性発揮メカニズムは明らかでないもの

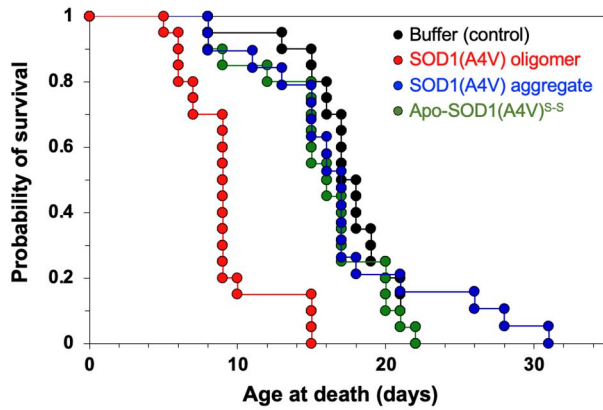


図 1 : SOD1 タンパク質の経口摂取が線虫の寿命に及ぼす影響

本研究においても、SOD1 を経口摂取することで線虫が被る影響は、SOD1 のコンフォメーションに依存するというを示しており、経口摂取により惹起される毒性は、タンパク質の種類というよりも、そのコンフォメーションに大きく依存するのではないかと考えることができる。オリゴマーが不溶性凝集体よりも毒性が強いことは、培養細胞を使った実験でも示唆されているものの（例えば、Proctor et al. PNAS 2016; Zhu et al. PNAS 2018 など）、その毒性は線虫を使用した今回の実験系で観察されたものとは全く異なるメカニズムで説明されると考えられる。また、今回の研究を含めて、多くの先行研究において使用されている SOD1 のオリゴマーや凝集体は、リコンビナントタンパク質から試験管内で調製されたものであり、実際の ALS 患者の病変部位で形成するミスフォールド型の SOD1 とはその性質を異にする可能性も十分に考慮しなければならない。つまり、試験管内で調製した SOD1 オリゴマーが線虫や培養細胞に対して発揮する毒性が、必ずしも ALS における運動ニューロンの変性を引き起こす毒性を表すものではない。しかし、SOD1 オリゴマーの経口摂取によって線虫に毒性が発揮されることから、そのメカニズムを明らかにすることで、SOD1 ミスフォールディングが ALS の発症に果たす役割の解明に貢献できるのではないかと期待している。

の、ミトコンドリアでの活性酸素種の産生が促進されて、咽頭の細胞が減少したためと考えられている (Diomedea et al. Blood 2014)。一方で、外傷性脳損傷モデルマウスの脳ホモジネートに含まれる異常なタウタンパク質を線虫に与えても咽頭障害は観察されなかったが、オリゴマー状態を含む異常なタウでは、スラッシングの頻度が有意に低下したという報告もなされている (Zanier et al. Neurobiol Dis 2021)。つまり、同じタンパク質を線虫に経口投与したとしても、線虫に惹起される表現型は、そのタンパク質のコンフォメーションによって異なることが示唆される。

本研究においても、SOD1 を経口摂取

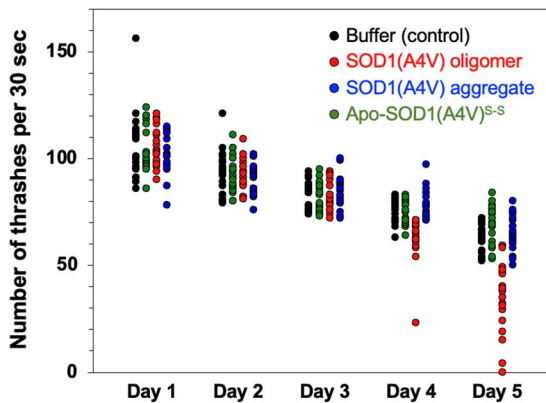


図 2 : SOD1 タンパク質の経口摂取が線虫の運動性 (スラッシング) に及ぼす影響

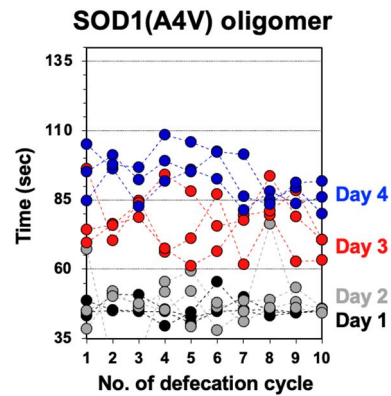


図 3 : SOD1 タンパク質の経口摂取が線虫の排泄間隔に及ぼす影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Anzai Itsuki, Tokuda Eiichi, Handa Sumika, Misawa Hidemi, Akiyama Shuji, Furukawa Yoshiaki	4. 巻 147
2. 論文標題 Oxidative misfolding of Cu/Zn-superoxide dismutase triggered by non-canonical intramolecular disulfide formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 187 ~ 199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furukawa Yoshiaki, Tokuda Eiichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Does wild-type Cu/Zn-superoxide dismutase have pathogenic roles in amyotrophic lateral sclerosis?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Neurodegeneration	6. 最初と最後の頁 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40035-020-00209-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furukawa Yoshiaki	4. 巻 50
2. 論文標題 Good and Bad of Cu/Zn-Superoxide Dismutase Controlled by Metal Ions and Disulfide Bonds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 331 ~ 341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.200770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 FURUKAWA Yoshiaki	4. 巻 60
2. 論文標題 Misfolding of Cu/Zn-Superoxide Dismutase in Neurodegenerative Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 338 ~ 341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.60.338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tajiri Michiko, Aoki Hiroto, Shintani Atsuko, Sue Kaori, Akashi Satoko, Furukawa Yoshiaki	4. 巻 183
2. 論文標題 Metal distribution in Cu/Zn-superoxide dismutase revealed by native mass spectrometry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 60 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2022.03.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 古川 良明
2. 発表標題 線虫をモデルにした筋萎縮性側索硬化症関連タンパク質SOD1の毒性評価
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古川良明
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症に見られるタンパク質凝集のメカニズム
3. 学会等名 第8回日本アミロイドーシス学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川良明
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症における生命金属動態の破綻とSOD1タンパク質のミスフォールディング
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川良明
2. 発表標題 酸化ストレスに伴う金属タンパク質のミスフォールディングと神経変性疾患
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会・第21回日本N0学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Furukawa Lab. Home https://furukawa-lab.org</p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------