

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22772

研究課題名(和文) 神経変性疾患における「野生型」SOD1タンパク質の構造異常

研究課題名(英文) Structural abnormality of wild-type Cu/Zn-superoxide dismutase in neurodegenerative disease

研究代表者

佐藤 正寛 (Sato, Masahiro)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・特任助教

研究者番号：60877124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)の遺伝的な発症要因として、SOD1タンパク質をコードする遺伝子への変異が報告されており、変異型SOD1タンパク質の構造異常(ミスフォールディング)に伴って、脊髄運動ニューロンが変性する病態機序が提案されている。そこで、試験管内でミスフォールドさせたSOD1(misSOD1)を用いて、それらを特異的に認識する抗体による免疫沈降実験やELISA法を行うことで、ALS患者の検体からmisSOD1を検出するために必要となる実験条件の最適化を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSは50代以降に発症確率が増加する神経変性疾患で、予防法や治療法のない難病であり、その発症メカニズムの解明は急務とされている。ALSの一部には家族歴が見られ、特にSOD1遺伝子に変異が見られることが多く、変異に伴うSOD1タンパク質の構造異常(ミスフォールディング)が毒性を発揮しているという提案がある。よって、構造異常化したSOD1の検出条件を最適化することでALSの早期診断などに展開できるため、意義のある課題である。

研究成果の概要(英文)：Mutations to the gene encoding the Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) protein have been reported as a genetic cause of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and a pathological mechanism has been proposed in which degeneration of spinal motor neurons is accompanied by structural abnormalities (misfolding) of the mutant SOD1 protein. Nonetheless, mutations in the SOD1 gene are not confirmed in most of the ALS cases, and it remains controversial whether SOD1 misfolding is relevant in the pathomechanism of ALS. Therefore, we prepared misfolded SOD1 (misSOD1) in vitro, and by using those misSOD1, we attempted to optimize the experimental conditions to detect misSOD1 in ALS patient samples by immunoprecipitation and ELISA.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：SOD1 ミスフォールディング

1. 研究開始当初の背景

多くの神経変性疾患では、その病変部位において特定のタンパク質がミスフォールドし、毒性を発揮することで神経が変性するといった病理機序が提案されている。本研究で着目する ALS は、脊髄運動ニューロンが選択的に変性する難治性の神経変性疾患で、責任遺伝子の一つに *SOD1* 遺伝子が同定されている (*SOD1*-ALS)。*SOD1*-ALS の病理機序として、遺伝子変異に伴うアミノ酸置換によって *SOD1* がミスフォールドし、運動ニューロンを変性させる毒性を発揮することが提案されている。一方で、ALS 全症例のおよそ 9 割以上には、*SOD1* 遺伝子に変異が認められないことから (*non-SOD1*-ALS)、*SOD1* のミスフォールディングが ALS の発症に果たす病理学的役割は極めて限定的ではないかとの指摘もなされている。しかし、試験管内での実験では、病因性変異に伴うアミノ酸置換の有無にかかわらず、*SOD1* は生理的な条件でミスフォールドしうることを示されている。よって、症例の大多数を占める *non-SOD1*-ALS においても、野生型 *SOD1* がミスフォールドし、病態形成に関与することが十分に考えられる。実際、*SOD1* 変異の有無にかかわらず、ALS 患者の脳脊髄液には共通して、ミスフォールドした *SOD1* (*misSOD1*) が検出されている (*Mol Neurodegener* **2019** 14:42)。さらに、一部のパーキンソン病 (PD) 患者の脳脊髄液からも *misSOD1* が検出されることから、*SOD1* のミスフォールディングは *SOD1*-ALS だけで進行する限定的な現象ではなく、*non-SOD1*-ALS や他の神経変性疾患の病態形成に関わる重要なプロセスであると考えられる。しかし、ALS を含めた各種神経変性疾患の患者に見られる野生型 *SOD1* の構造的・生化学的性質、毒性などに関する詳細な検討はほとんどなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、各種神経変性疾患の患者に生じうると考えられる野生型 *SOD1* (銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼ) に見られる構造異常の詳細を明らかにし、異常化した *SOD1* が病態形成に果たす役割を理解する。これまでの研究によると、*SOD1* 遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では、変異に伴いアミノ酸置換された *SOD1* (変異型 *SOD1*) が構造異常を呈し (ミスフォールドし)、毒性の発揮に関与すると考えられている。また、ALS 症例の 9 割近くには *SOD1* 遺伝子変異が認められないものの、野生型 *SOD1* のミスフォールディングが疾患の発症に関与している可能性も指摘されている。しかし、野生型 *SOD1* の病理学的役割については賛否両論があり、神経変性疾患に関連する研究分野に残された大きな課題の一つとされている。

SOD1 は銅・亜鉛イオンを結合し、分子内にジスルフィド (S-S) 結合を有する金属タンパク質で、極めて高い熱安定性を有することから ($T_m > 90^\circ\text{C}$)、タンパク質構造を容易に変化させるとは考えにくい。一方で、病因性変異に伴うアミノ酸置換が導入されると、金属イオンとの結合親和性や S-S 結合の安定性が低下し、タンパク質構造が不安定化するために、ミスフォールディングが惹起されることが提案されている (*JBC* **2005** 280:17266)。上述のように、ALS を含む各種神経変性疾患において、ミスフォールドした野生型 *SOD1* が検出されているものの、極めて高い安定性を有した野生型 *SOD1* が患者の生体内において、なぜどのようにミスフォールドするのか、そのメカニズムは明らかでない。

そこで、*in vitro* で調製した野生型および ALS 変異型 *SOD1* を用いて、銅イオンと亜鉛イオンを解離させたアポ型とすることでミスフォールディングを促進し、各種の *SOD1* 抗体を用いて、ミスフォールドした *SOD1* を選択的に検出できる実験条件の最適化を行う。

3. 研究の方法

野生型 (WT) および ALS 変異型 (G37R, G93A) ヒト *SOD1* は既報 (*Protein Sci* **2017** 26

484) に従って作製・精製し、銅・亜鉛イオンを結合していないアポ型で分子内ジスルフィド結合を形成した状態 (apo-SOD1^{S-S}) として調製した。SOD1 のミスフォールディングを検出するために、ミスフォールドした SOD1 を特異的に検出できるモノクローナル抗体 (C4F6, *PNAS* 2007 104 2495) を用いたサンドウィッチ ELISA を行った。なお、C4F6 は MediMabs 社より購入したものを使用した。

4. 研究成果

まず、C4F6 抗体を ELISA プレートの底面に吸着させて、リコンビナントタンパク質として調製した apo-SOD1(G37R)^{S-S} をサンドウィッチ ELISA による検出する実験条件を精査したところ、得られるシグナルが C4F6 のロットの違いによって全く異なることがわかった (図 1)。Lot A と Lot C はシグナルが非常に高いものの、apo-SOD1(G37R)^{S-S} の添加量に依存しておらず、ミスフォールドした SOD1 を認識できていない可能性が考えられた。一方の Lot B はシグナルの値そのものは低いものの、apo-SOD1(G37R)^{S-S} の添加量に応じてシグナル値が増加しており、ミスフォールドした SOD1 を認識できていることが示唆された。Lot A/C は 2020-2021 年に納品された C4F6 抗体であるのに対して、Lot B は 2015-2016 年に購入して研究室で保管されていた抗体であった。

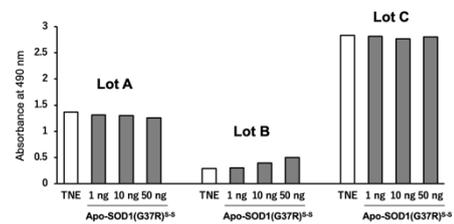


図 1 C4F6 を用いたサンドウィッチ ELISA による apo-SOD1(G37R)^{S-S} の検出

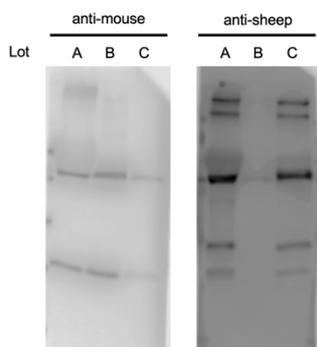


図 2 Western blotting による C4F6 の各ロットの解析

そので次に、Lot A/C と Lot B の違いを明らかにするために、それぞれの C4F6 抗体をウェスタンブロッティングにより解析したところ、C4F6 はマウスモノクローナル抗体であることから、抗マウス抗体を二次抗体とすることで C4F6 の重鎖と軽鎖に相当する位置にバンドが検出された (図 2 左)。抗ヒツジ抗体を二次抗体とした場合、C4F6 抗体は検出されないはずであり、確かに、Lot B ではバンドが検出されなかったものの、Lot A/C では重鎖と軽鎖と思われる位置に明確なバンドが検出された (図 2 右)。また、すべてのロットにおいて、抗体量は同じと考えられるものの、サンドウィッチ ELISA において最もシグナルが高値であった Lot C では、抗マウス抗体で検出されるバンド強度が極めて低く、C4F6 抗体の量は非常に少ないことが考えられた (図 2 左)。つまり、Lot A/C には抗ヒツジ抗体で検出される何らかの異なる抗体が不純物として含まれており、特に Lot C では C4F6 抗体の量は非常に少ないのではないかと疑われる。また、図 1 のサンドウィッチ ELISA では、検出抗体としてヒツジ抗 SOD1 抗体、二次抗体として抗ヒツジ抗体を用いて実験を行っていたために、Lot A/C ではシグナルが高値であったと考えられる。そこで、検出抗体をウサギ抗 SOD1 抗体、二次抗体として抗ウサギ抗体を用いて、C4F6 (Lot C) によるサンドウィッチ ELISA を行うと、シグナル強度は非常に低く、ALS 変異型 SOD1 の検出はできなかった。C4F6 の Lot B と Lot C を使って、apo-SOD1(G37R)^{S-S} の他にも、apo-SOD1(WT)^{S-S} や apo-SOD1(G93A)^{S-S} をサンドウィッチ ELISA によって検出できるかを確認したところ、やはり Lot C ではいずれの

そこで次に、Lot A/C と Lot B の違いを明らかにするために、それぞれの C4F6 抗体をウェスタンブロッティングにより解析したところ、C4F6 はマウスモノクローナル抗体であることから、抗マウス抗体を二次抗体とすることで C4F6 の重鎖と軽鎖に相当する位置にバンドが検出された (図 2 左)。抗ヒツジ抗体を二次抗体とした場合、C4F6 抗体は検出されないはずであり、確かに、Lot B ではバンドが検出されなかったものの、Lot A/C では重鎖と軽鎖と思われる位置に明確なバンドが検出された (図 2 右)。また、すべてのロットにおいて、抗体量は同じと考えられるものの、サンドウィッチ ELISA において最もシグナルが高値であった Lot C では、抗マウス抗体で検出さ

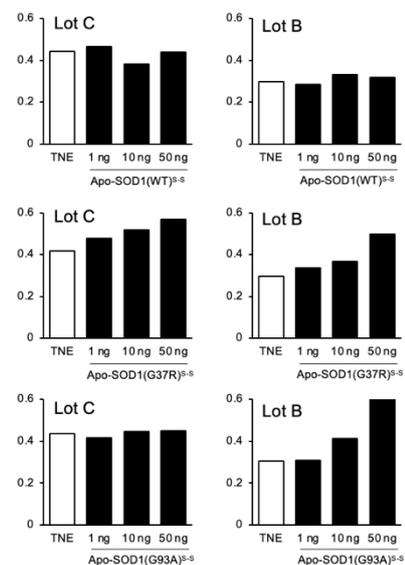


図 3 C4F6 の各ロットを用いたサンドウィッチ ELISA による SOD1 の検出

SOD1 タンパク質も検出できていないのに対して、Lot B を使用した場合には、G37R/G93A といった ALS 変異型 SOD1 を数 ng の感度で検出できることがわかった (図 3)。また、WT には反応性を示さなかったことから、ミスフォールドした SOD1 を特異的に検出できていることを確認できた。

以上より、C4F6 はミスフォールドした SOD1 を特異的に認識できる抗体であるものの、その市販品はロットによる性能のばらつきが大きく、その使用には十分な注意が必要であることがわかった。よって、ALS 検体に生じるミスフォールド型 SOD1 の存在について議論するためには、C4F6 以外のミスフォールド型 SOD1 認識抗体も合わせて検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|