

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790275

研究課題名（和文） 筋萎縮性側索硬化症におけるタンパク質凝集機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis.

研究代表者

松本 紋子 (MATSUMOTO AYAKO)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教（常勤）

研究者番号：60444519

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）におけるCu, Zn-superoxide dismutase (SOD1) の凝集体形成機構を検討し、家族性ALS (FALS) 変異型SOD1やアポ型SOD1がtransglutaminaseの基質になることを確認した。さらに、難溶性凝集体の前駆体である可溶性オリゴマーSOD1を high-resolution clear native 電気泳動法 (hrCN-PAGE) を用いて検出することに成功し、オリゴマーSOD1もSOD活性を保持しているという新たな知見を得た。

研究成果の概要（英文）：We have explored a mechanism of protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis and found that apo SOD1 and FALS mutant SODs become a substrate for transglutaminase. We could detect soluble oligomeric SOD1s by high-resolution clear native polyacrylamide gel electrophoresis (hrCN-PAGE). Moreover, hrCN-PAGE can be followed by in-gel activity assay, which revealed enzymatic activities on some oligomeric SOD1s from both wild type and FALS mutants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究代表者の専門分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：スーパーオキシドジスムターゼ、筋萎縮性側索硬化症、凝集体

1. 研究開始当初の背景

(1) 凝集体には分子シャペロンやユビキチン/プロテアソーム系のタンパク質も検出され、コンフォメーションの変化に対して分子シャペロンが作用するものの、最終的にプロテアソームによる分解処理を完了できず

に凝集体が蓄積するのではないかと考えられている。細胞内のミスフォールドしたタンパク質を無毒化するために細胞の防御のひとつとして封入体が形成されるのではないかの報告もあり、中間体である可溶性オリゴマーの方が強い毒性を持つことが示唆さ

れている。

(2) Transglutaminase (TG) は、タンパク質のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基と、各種の一級アミン(L-リジンの ϵ -アミノ基等)との間のアシル基転移反応をカルシウム存在下で触媒する酵素である。タンパク質中のリジン残基がアシル受容体として反応した場合には、タンパク質分子間または分子内に ϵ -(γ -Glu)-Lys 架橋が形成され、これによりタンパク質の重合等が起こる。TG は現在 9 種類のアイソフォームが報告されている。ポリグルタミン病やアルツハイマー病、パーキンソン病などにおいて TG2 活性の上昇に伴い、基質となる原因タンパク質の多量体化や他のタンパク質を含む凝集体の形成が見られる。実際、ハンチントン病モデルマウスにおいて、TG 阻害剤であるシスタミン投与により延命効果が認められ、現在臨床治験に至っている。また、分子機構の詳細はまだ解明されていないが、TG2 はカルシウム非依存的に protein disulphide isomerase (PDI) 活性を持つことが報告され、TG2 ノックアウトマウスの解析結果より、ミトコンドリア電子伝達系の複合体形成には TG2 の PDI 活性が必要であるとの報告もある。

2. 研究の目的

(1) SDS-PAGE 電気泳動法は変性後の共有結合のみが保持されたタンパク質を検出するのに適した方法であり、ダイマーで存在する SOD1 は SDS-PAGE を用いるとモノマーとして検出される。そこで、非共有結合による高次構造を保持した生理的な状態で可溶性オリゴマー SOD1 が検出できる簡便法を検討し、様々な疾患におけるタンパク質凝集体検出等にも汎用できる手法を確立することを目的とした。

(2) ポリグルタミン病やアルツハイマー病、

パーキンソン病で認められる異常タンパク質のミスフォールディングや凝集体形成は、ALS においても見られることより、それぞれの疾患に特有な発症機構に加え、神経変性疾患に共通した発症機構も存在するのではないかと考えられる。神経変性疾患の原因タンパク質といわれる huntingtin、tau、amyloid β 4、 α -synuclein などは TG2 の基質となることが *in vitro* や培養細胞を用いた実験で確認されているが、ALS や SOD1 に関する報告はない。そこで TG に着目し、ALS におけるタンパク質凝集機構や病態形成との関連性を究明することを目的とした。

3. 研究の方法

Blue Native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) は Invitrogen のシステムを用いた。グラジエントゲルの作成ならびに high-resolution clear native PAGE (hrCN-PAGE) は Schagger らの原著論文などを参考にした。Human SOD1 (WT, H46R, F50E/G51E, H80S/D83S, G37R, G41D, G85R, G93A) を COS-1 細胞に過剰発現させた。オリゴマー SOD1 の指標は、リコンビナント human SOD1 (Wako) に HCO_3^- と H_2O_2 を反応させて作成した (J. Biol. Chem. 278: 24078-89, 2003)。アポ型 SOD1 は HiTrap Chelating Column (GE) を用いてホロ型と分離した。Transglutaminase (guinea pig liver) はオリエンタル酵母株式会社から購入した。Human TG2 は Nucleofector Kit V (Amaxa Biosystems, Germany) を用いて Amaxa III の T-024 プログラム (N2a 用) にてエレクトロポレーションによりトランスフェクトし、72 時間後に細胞を回収した。Human TG2 の cDNA (pcDNA3.1-tTG) は Dr. G. V. W. Johnson (University of Alabama Birmingham, USA) から供与頂いた。

4. 研究成果

(1) BN-PAGE の改良型である hrCN-PAGE を用いて in-gel SOD activity assay へと応用できるか検討した。リコンビナント SOD1 を BN-PAGE と hrCN-PAGE により電気泳動し、Coomassie 染色にて泳動パターンを比較したところ、同様の泳動パターンであることが確認できた。次に、in-gel activity assay へと応用した結果、SOD 活性が確認できた(図

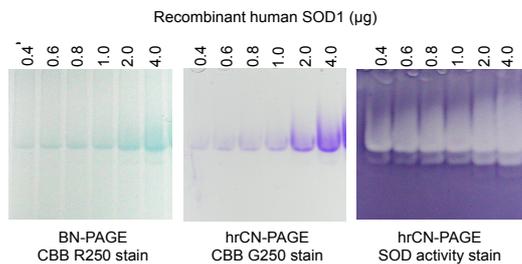


図1. SOD1のBN-PAGE とhrCN-PAGEとSOD活性染色

1)。BN-PAGE や hrCN-PAGE を用いると、アポ型 SOD1 とホロ型 SOD1 は、異なった移動度のバンドとして検出することができた

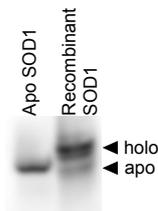


図2. hrCN-PAGEにおける apo型・holo型SOD1

(図2)。また、リコンビナント human SOD1 に HCO_3^- と H_2O_2 を反応させ、トリプトファン残基の共有結合させたオリゴマー SOD1 を hrCN-PAGE した後、in-gel activity assay した結果、オリゴマー SOD1 も活性を保持していることが確認できた(図3)。さらに COS-1 細胞に過剰発現させた野生型 (WT)、銅結合部位変異型 (H46R)、亜鉛結合部位変異型 (H80S/D83S)、単量体型 (F50E/G51E) の human SOD1 を指標とし、FALS 変異型 SOD1 (G37R, G41D, G85R, G93A) の過剰発現細胞における SOD1 の形態を hrCN-PAGE/Western blotting で比較検討した。単量体 SOD1 は市販の 4-16%

グラジエントゲルでは至適サイズ(約 20~1048 kDa)の検出限界外であったので、自作グラジエントゲルを用いた。その結果、FALS 変異型 SOD1 では、アポ型、ホロ型のダイマー SOD1 や、モノマー、オリゴマー SOD1 などが検出できた(図4)。さらに in-gel activity assay により、SOD 活性を保持しているオリゴマー SOD1 も確認できた(投稿中)。

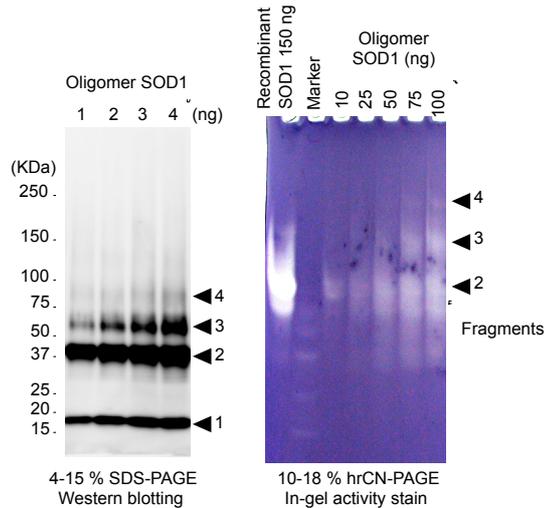


図3. オリゴマー SOD1 の作成と活性測定

(2) Human SOD1 のタンパク質表面には多数のリジン残基やグルタミン残基が露出しており(図4)、TG の基質になる可能性があり、その結果、SOD1 間や他のタンパク質との間に共有結合による架橋が形成されるであろうと予想した。また、アポ型 SOD1 やミスフォールディング、アンフォールディングにより立体構造に変化が生じやすい FALS の変異

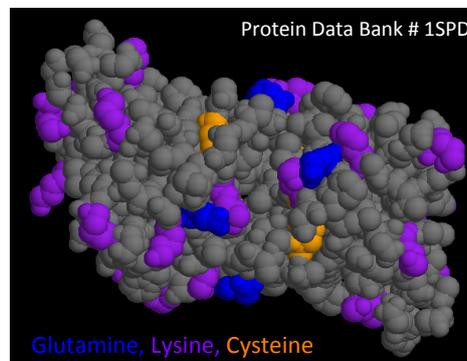


図4. Human SOD1 のタンパク質表面

SOD1 も TG の基質になるであろうとも予想した。そこで様々なリコンビナント human SOD1 を精製し、TG2 と Ca²⁺存在下でインキュベートし、SOD1 が TG2 の基質になり得るかどうか検討した結果、FALS 変異 SOD1 は TG2 の酵素反応によって、オリゴマーSOD1 を形成することや、野生型 SOD1 もアポ型であれば基質になることが確認された (図5)。これらのオ

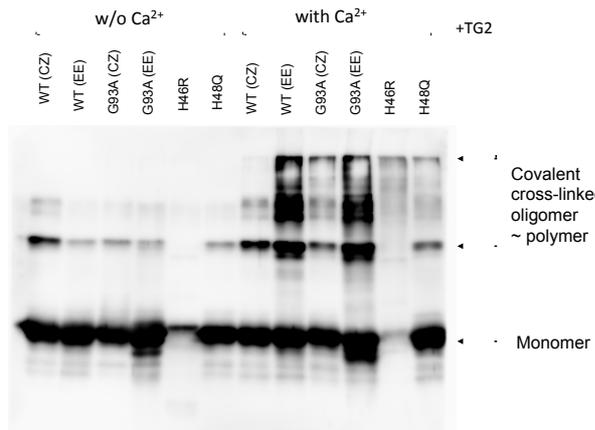


図5. SOD1は*in vitro*でTG2の基質となる

リゴマーSOD1 は還元 SDS-PAGE で検出できることより、TG によりリジン残基とグルタミン残基が共有結合したオリゴマーであることが示唆された。次に、human SOD と TG2 を共発現させた細胞で検討した。N2a 細胞に G37R を過剰発現させただけでは可溶性画分に抗 SOD 1 抗体陽性の高分子バンドは検出されなかったが、TG2 も共発現させ、さらに Ca ionophore 処理すると、抗 SOD 1 抗体陽性の高分子バンドが SDS-PAGE/western blotting にて検出され、TG 阻害剤のシスタミン処理により、抗 SOD 1 抗体陽性の高分子バンドが消失・減少した。これらのことより、ALS における SOD1 の凝集体形成に TG2 が関与している可能性が示唆された。

本研究課題の成果に基づき、今後、可溶性オリゴマーSOD1 に着目し、ALS の治療応用へと繋がる研究へと発展させたい。

5. 代表的な研究成果

[学会発表] (計2件)

- ①松本紋子・松本明郎・谷口直之、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の凝集体形成におけるトランスグルタミナーゼの関与、トランスグルタミナーゼ研究会、2010年12月8日、神戸、
- ②松本紋子・松本明郎、谷口直之、Improved analysis for the oligomeric SOD1s of familial amyotrophic lateral sclerosis and their SOD activities by high resolution clear native electrophoresis、第33回日本分子生物学会第83回日本生化学会大会合同大会(BMB2010)、2010年12月7日8日、神戸

[図書] (計1件)

- ① 藤原範子・松本紋子・谷口直之・鈴木敬一郎、監修：谷口直之、編集：赤池孝章、鈴木敬一郎、内田浩二、羊土社、病態解明に迫る 活性酸素シグナルと酸化ストレス、分担執筆：ALS における酸化ストレスおよび酸化型 SOD1 の関与、2009 年、p140-144

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 紋子 (MATSUMOTO AYAKO)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教(常勤)

研究者番号：60444519

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし