

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770187

研究課題名（和文）SOD1-Derlin-1結合を介した新規ストレス認識機構の解明

研究課題名（英文）The novel mechanism of stress recognition through the interaction of SOD1 with Derlin-1

研究代表者

門脇 寿枝 (KADOWAKI HISAE)

東京大学・大学院薬学系研究科・特任研究員

研究者番号：40568200

研究成果の概要（和文）：細胞質内環境の変化が野生型 SOD1 の構造を変化させ、変異型 SOD1 と同様に Derlin-1 に直接結合し小胞体ストレスを誘導していると考えられる。そこで我々は野生型 SOD1 と Derlin-1 の結合を誘導する因子を明らかにすることにした。その結果、血清飢餓ストレスによって野生型 SOD1 が Derlin-1 に結合し、小胞体ストレスを誘導することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The structure of wild type SOD1 is thought to be changed by some cellular stress, and induces the endoplasmic reticulum stress through the interaction with Derlin-1, which is the important component of endoplasmic reticulum quality control system. Then, we tried to identify the factor which induces the interaction between wild type SOD1 and Derlin-1. Then, we identified the serum starvation induces the interaction and triggers endoplasmic reticulum stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：タンパク質、小胞体ストレス、Derlin-1、SOD1

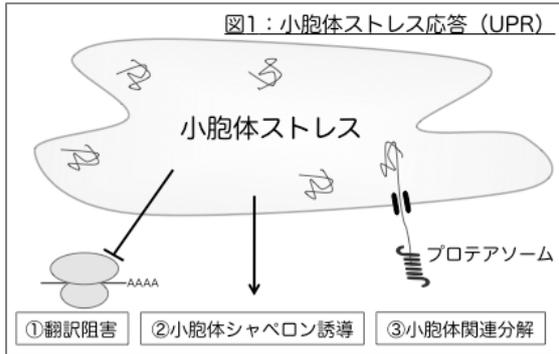
1. 研究開始当初の背景

学術的背景 新規合成された分泌・膜タンパクは小胞体内腔で翻訳後修飾を受け、適切な立体構造に折り畳まれる。細胞が受ける様々なストレスによって蓄積した不良タンパクは、小胞体ストレスを惹起する。その際細胞は、Unfold protein response(UPR)すなわち①タンパク質翻訳停止、②小胞体シャペロン

の発現誘導、③小胞体関連分解(Endoplasmic reticulum-associated degradation: ERAD)により、小胞体の恒常性の回復を図る(図1)。しかし、持続的なストレスや UPR 機能不全によってアポトーシスが誘導される。この小胞体ストレス誘導性アポトーシスは、糖尿病や神経変性疾患などの様々な疾患に関わっている (Kadowaki *J. Chem. Neuroanat.*

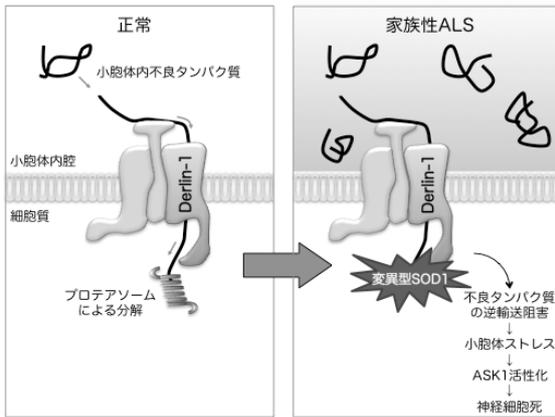
2004)。

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は進行性運動神経変性疾患で、家族性 ALS のうち最も頻度



の高いものが SOD1 の遺伝子変異で、これまでに 120 種類以上の変異型が報告されている。ALS 発症は、変異型 SOD1 の新規獲得性細胞毒性を介した運動神経細胞死による。最近我々は、複数の変異型 SOD1 が、小胞体関連分解(ERAD)で重要な働きを持つ Derlin-1 に結合し、不良タンパクの小胞体から細胞質への逆輸送を阻害し、小胞体ストレス誘導性神経細胞死を誘導していることを明らかにした。(Nishtioh, Kadowaki *Genes Dev.* 2008)(図 2)。その阻害メカニズムは、変異型 SOD1 と結合することで新たに獲得した Derlin-1 の機能異常による。すなわち、小胞体不良タンパクの細胞質への逆輸送が阻害され、小胞体内に不良タンパクが蓄積し、小胞体ストレス誘導性 ASK1 活性化を介して細

図2: ERADと変異型SOD1によるALS分子機構



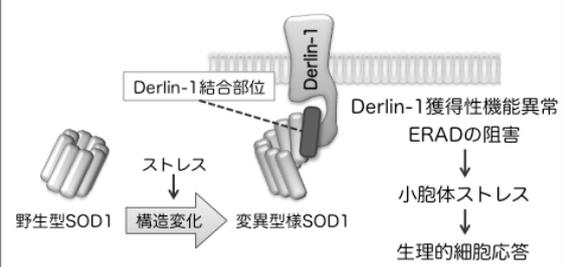
胞死が誘導される(図 2)。

現在我々は、複数の変異型 SOD1 が Derlin-1 と結合することから、この結合は家族性 ALS 関連変異型 SOD1 に共通する性質であり、SOD1 変異による家族性 ALS 全てに関わっているのではないかと考えている。実際に、124 個の ALS 関連変異型 SOD1 を作成し検討したところ、ほとんどの変異型 SOD1 が Derlin-1 と結合することが明らかとなった(Fujisawa *Ann. Neurol* in press)。

一方で、このように多くの変異型 SOD1 が

共通して Derlin-1 と結合することから、野生型 SOD1 には、もともと Derlin-1 との結合部位が存在し、変異により結合部位が露出されることで Derlin-1 と結合すると考えられる。さらに野生型 SOD1 も何らかの条件下で Derlin-1 と結合することが想定された(図 3)。そこで様々な細胞刺激条件を検討した結果、血清飢餓条件下で細胞を培養すると、野生型 SOD1 が Derlin-1 と強く結合することを見いだした。すなわち、何らかの細胞質内環境の変化(細胞質ストレス)が野生型 SOD1 の構造を変化させ、変異型 SOD1 と同様に Derlin-1 に直接結合し、ERAD の機能阻害を介して小胞体ストレスを誘導している可能性があることが考えられた。以上のことから、我々は、**細胞質ストレスが、野生型 SOD1 を**

図3: 野生型SOD1-Derlin-1結合を介した小胞体ストレス仮説



介して小胞体ストレスに変換されることで最適なストレス応答を誘導する機構が存在するのではないかとこの着想に至った(図 3)。

2. 研究の目的

小胞体が正確に機能することは細胞の機能維持に必須であり、その破綻は疾患発症に結びつく。近年、多くのコンフォメーション病(神経変性疾患など)において小胞体ストレスの関与が示されており、小胞体ストレス応答を明らかにすることは、様々な疾患の病態分子機構の解明に繋がり意義は大きい。申請者らはこれまでに、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態分子メカニズムに関する研究から、細胞質内に蓄積した疾患原因タンパク質“変異型 SOD1”が特異的に結合する標的分子として、小胞体膜貫通型タンパク質 Derlin-1 を同定した。さらに Derlin-1 の獲得性機能異常により小胞体ストレスが惹起されることを示してきた。最近の研究により、少なくとも 100 種類以上の変異型 SOD1 が Derlin-1 に結合したことから、野生型 SOD1 にもともと Derlin-1 結合領域が存在し、何らかの細胞ストレスによって野生型 SOD1 の構造変化が誘発され、変異型様 SOD1 となり Derlin-1 に結合することで小胞体ストレスを惹起すると考えられる。すなわち、**細胞ストレスが小胞体ストレスに変換される分子スイッチとして、SOD1-Derlin-1 結合が機能している**という仮説をたてた。

そこで本研究課題では、変異型 SOD1 と Derlin-1 の結合様式を明らかにするとともに、野生型 SOD1-Derlin-1 結合を誘導する生理的ストレスの同定、ならびにこの結合によって起こる小胞体ストレスの意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

これまでの変異型 SOD1 に関する研究により、SOD1 には Derlin-1 結合領域が存在すること、さらに、血清飢餓ストレスによって野生型 SOD1 が Derlin-1 に結合することを示唆する結果を得ている(図4)。さらに、この両者の結合は、血清の再添加によって解除されることを明らかにしてきた(図4)。

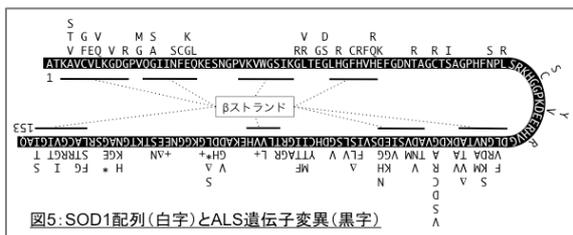
そこで本研究では、SOD1-Derlin-1 の結合様式を、特に SOD1 側から明らかにする。

また、血清中に存在する、SOD1-Derlin-1 結合制御因子の同定を試みたとともに、他の細胞質ストレスを検討した。これら、結合制御因子の同定により、このメカニズムの生理的意義を明らかにする。また、SOD1-Derlin-1 結合によって誘導される小胞体ストレスが、どのような遺伝子発現を惹起するかを検討するため、マイクロアレイによる SOD1-Derlin-1 結合依存的な遺伝子発現解析を行い、結合誘導ストレスとの関係を明らかにした。

これらの研究によって、これまでにない新規のストレス認識機構の実体を明らかにできた。

-平成 22 年度-

①SOD1 の Derlin-1 への結合部位および結合阻害部位の同定



ヒト SOD1 は、153 アミノ酸からなるタンパク質で、8つのβストランドからなるβバレル構造を有し、その間に各種ループ構造を持つ(図5)。この1次構造をもとに、さまざまな欠失変異体を作成し、Derlin-1 との結合部位を同定した。その際、すでに解明されている野生型 SOD1 の立体構造情報を参考にした。

②野生型 SOD1 と Derlin-1 の結合を誘導する細胞質ストレスの同定

①で得られた知見をもとに、野生型 SOD1 と Derlin-1 の結合を誘導する細胞質ストレスを探索した。現在のところ、*in vitro*においては、高濃度の還元剤の処理によって、細胞レベルでは、血清飢餓条件下で細胞を培養することで、野生型 SOD1 と Derlin-1 の結合が検出された。しかし、これらの刺激は、どのような生理的意義を持つのか不明である。一方、SOD1 の C 末端領域にある Electrostatic channel loop 領域が Derlin-1 との結合を阻害する領域であることを示唆する知見を得ていることから、この領域の構造に変化を与える酸・アルカリなどの pH の変化やイオン流入、浸透圧ストレスなどを検討した。

また、小胞体ストレスを誘導することが明らかとなっている虚血やアミノ酸飢餓などの環境での結合も検討する。さらに、SOD1 は活性酸素の一種であるスーパーオキシドを過酸化水素と水とに不均化する酵素であることから、活性酸素の蓄積が引き起こす酸化ストレスについても関連を検討した。

③野生型 SOD1-Derlin-1 結合を阻害する因子の同定

血清飢餓によって誘導された野生型 SOD1-Derlin-1 結合は、血清の再添加によって再び解離することを明らかにしている(図4)。従って、血清中にはこの結合を阻害する因子が含まれると予想されることから、この因子の同定を、ゲルろ過カラムやイオン交換カラムなどを用いた精製手法により同定を試みた。

-平成 23 年度-

④細胞質ストレス存在化における野生型 SOD1 の生理的役割の解明

②において同定される細胞質ストレス依存的に誘導される小胞体ストレスが、SOD1-Derlin-1 結合を介しているかを、RNA 干渉法を用いて SOD1・Derlin-1 をノックダウンすることで検討した。さらに、細胞質ストレス状況下における SOD1 複合体を単離し、細胞質ストレスが小胞体ストレスに変換される際の分子スイッチとして機能する関連因子を同定し、その役割について解析した。なお、タンパク質同定に必要とされる、アフィニティ精製の手法や質量分析計の技術はすでに確立されている。

⑤Derlin-1 ペプチドによる SOD1 依存的な小胞体ストレスの阻害効果の検討

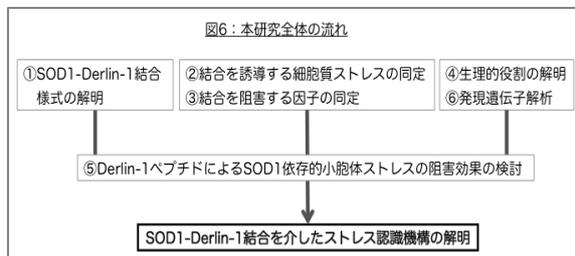
SOD1 結合領域である 12 アミノ酸を含んだ Derlin-1 ペプチドを細胞内に導入したとき、変異型 SOD1 と Derlin-1 の結合および細胞質ストレス条件化における野生型 SOD1 と Derlin-1 の結合が阻害されるかを検討する。それと同時に小胞体ストレスセンサーである IRE1 や PERK の活性化、あるいはその下流

で誘導される BiP や CHOP などを指標に、小胞体ストレスの緩解が図られているかどうかも検討した。さらに、SOD1 と Derlin-1 の結合を阻害する低分子化合物のスクリーニングを開始することを視野に入れ、SOD1 と Derlin-1 の結合をより簡便に確認する実験系を構築するために、当研究室ですでに導入している Biacore システムを取り入れ両者の結合を *in vitro* で検討した。

⑥発現遺伝子解析

野生型 SOD1 は潜在的に Derlin-1 と結合する能力を有し、生体内では血清中の何らかの因子の濃度変化を感知して小胞体ストレスを誘導する働きがあることが示唆されている。小胞体ストレスに対する応答は活性化される経路、細胞種によって異なっており、ATF6、ATF4、XBP-1 等の転写因子を介して様々な遺伝子が誘導されることから、血清中の因子の減少を感知した SOD1 が小胞体ストレスを介して、生理的小胞体ストレスを惹起する方向に働いていることが考えられる。そこで、この生理的意義を明らかにするために、血清飢餓誘導性 SOD1-Derlin-1 結合によって引き起こされる、小胞体ストレスによって発現が制御されている遺伝子の網羅的スクリーニングを行い、③によって明らかにされる因子との関連性を考察し、野生型 SOD1-Derlin-1 結合の生理的意義の解明を目指した。

4. 研究成果



我々は、本来野生型に存在すると予想される SOD1 側の Derlin-1 への結合部位を同定するため、SOD1 の 1 次構造をもとにさまざまな欠変異体を作成した。その結果、SOD1 の N 末端の 1-20 アミノ酸 (Derlin-1-binding region : DBR) で Derlin-1 と結合していることがわかった。

また我々が作成した 114 個の ALS 関連変異型 SOD1 のほとんどが Derlin-1 と結合すること、野生型 SOD1 の立体構造などから予想するに、野生型 SOD1 では DBR がマスクされており、ALS の病態においてはアミノ酸変異によって、一方で何らかの細胞質ストレスによって、DBR が露出することで Derlin-1 との結合能を獲得すると考えられた。この予想を生化学的に証明するため、DBR を露出した構造変化を伴う SOD1 を特異的に認識するモノクローナル抗体 (MS785) を作製し、SOD1 と

Derlin-1 の結合様式を調べた。その結果、細胞に発現させた 114 個の ALS 関連変異型 SOD1 のほとんどが MS785 で免疫沈降されることがわかり、野生型 SOD1 では免疫沈降されなかった。このことから、ALS の病態においてはアミノ酸変異によってマスクされていた DBR が露出することにより、Derlin-1 に結合できることが証明された。

次に、我々は野生型 SOD1 が DBR を露出して Derlin-1 への結合能を獲得するような細胞質ストレスを探索した。*in vitro* においては、高濃度の還元剤の処理によって、細胞レベルでは、血清飢餓条件下で細胞を培養することで、野生型 SOD1 と Derlin-1 の結合が検出されている。しかし、これらの刺激はどのような生理的意義を持つのか不明である。そこで血清成分に着目し、血清中の何らかの因子が存在する状況下では SOD1 と Derlin-1 は結合しないが、この因子が欠乏することにより、SOD1 が構造変化をおこし DBR を露出して Derlin-1 に結合するようになるのではないかと考え、その因子の同定を試みた。その結果、その因子は、熱・酸アルカリ処理・プロテアーゼに耐性であること、が明らかとなった。今後は、この因子の特定を進める予定である。

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 1 件)

① Fujisawa T, Homma K, Yamaguchi N, Kadowaki H, Tsuburaya N, Naguro I, Matsuzawa A, Takeda K, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Nishitoh, Ichijo H. A novel monoclonal antibody reveals a conformational alteration shared by amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants. *Ann. Neurol.*
査読有 印刷中

〔学会発表〕 (計 2 件)

① Fujisawa T, Homma K, Tsuburaya N, Yamaguchi N, Kadowaki H, Nishitoh H, Ichijo H. A common mechanism for motoneuron death by ALS-linked SOD1 mutations. Gordon Research Conference, Stress Proteins in Growth, Development & Disease 2011. 7. 17-22 Italy

② Fujisawa T, Homma K, Tsuburaya N, Yamaguchi N, Kadowaki H, Nishitoh H, Ichijo H. A common mechanism for motoneuron death by ALS-linked SOD1 mutations. 13th International TNF Conference 2011. 5. 15-18 Awajishima

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

特記事項無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門脇 寿枝 (KADOWAKI HISAE)

東京大学・大学院薬学系研究科・特任研究員

研究者番号：40568200

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し