

## 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 6月 7日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790838

研究課題名（和文） ALS関連変異型SOD1の異常な蛋白質結合を介した  
毒性発現機序の解析と応用検討研究課題名（英文） Toxicity of ALS-linked mutant SOD1 mediated  
by aberrant protein interactions

研究代表者

株田 智弘（KABUTA TOMOHIRO）

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第四部・室長

研究者番号：70535765

研究成果の概要（和文）：

明らかな運動障害を示す初の変異型 SOD1 トランスジェニック・ショウジョウバエの開発に成功した。また他の ALS 関連蛋白質である TDP-43 も変異型 SOD1 と結合することを見出した。変異型 SOD1 結合蛋白質の多くは SOD1 の 1-23 アミノ酸部分に結合することを明らかにした。さらに 1-23 アミノ酸部分を標的として、変異型 SOD1 の異常な蛋白質結合を阻害する低分子化合物を取得した。

研究成果の概要（英文）：

We have developed mutant SOD1-transgenic flies that display apparent motor dysfunction. We found that mutant SOD1 interacts with TDP-43. We have demonstrated that most of the mutant SOD1-interacting proteins interacts with 1-23 aa of SOD1. We have identified several small compounds that inhibit the aberrant interactions between mutant SOD1 and other cellular proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、神経内科学

キーワード：神経分子病態学

## 1. 研究開始当初の背景

家族性 ALS の約 20% は superoxide dismutase 1 (SOD1) の変異によって発症し、優性遺伝形式をとる。SOD1 変異のほとんどはミスセンス変異であるが、C 末端部分を欠損させる変異もある。これまでの様々な研究結果から、SOD1 酵素活性の減弱や欠損ではなく、変異により新たに獲得された変異型 SOD1 の毒性が ALS の原因となることがわ

かっている。国内外の研究結果から、変異型 SOD1 毒性には他の蛋白質との異常結合が関与することが明らかになりつつある。以前我々は、変異型 SOD1 が本来結合しない多種類の細胞内蛋白質と結合することを報告した。

## 2. 研究の目的

SOD1 変異による ALS 発症の分子機序の解

明と疾患治療薬のリード化合物を取得することを目的とした。

### 3. 研究の方法

SOD1 変異による ALS 発症の分子機序を解明するために、変異型 SOD1 と他の ALS 関連蛋白質との結合性を検討した。また変異型 SOD1 と多種類蛋白質との異常結合に必要な SOD1 の部位の同定を行った。結合性はマウスや培養細胞サンプルを用いた共免疫沈降法により評価した。

疾患治療薬のリード化合物を取得するために、*in silico* で Structure-Based Drug Design を行った。さらに *in vitro* で変異型 SOD1 の異常結合性の阻害実験を行った。

ショウジョウバエの運動能力の評価にはクライミング・アッセイを用いた。

### 4. 研究成果

ALS 関連蛋白質である TDP-43 も変異型 SOD1 と結合することを見出した。

変異型 SOD1 と多種類蛋白質との異常結合は SOD1 の N 末端  $\beta$  シート領域 1-23 aa を介していることを見出した。

変異型 SOD1 の異常な蛋白質結合を阻害する低分子化合物を取得するために、コンピューター・プログラムを用いた Structure-Based Drug Design を行った。すなわち G85R 変異型 SOD1 の 1-23 aa 部分に結合する低分子化合物をスクリーニングした。ドッキングスコア上位 11 化合物中 10 化合物が *in vitro* で変異型 SOD1 の異常な蛋白質結合を阻害し、結合を強く阻害できる低分子化合物を 3 種類取得できた。この結果は、変異型 SOD1 の蛋白質結合が 1-23 アミノ酸を介していることを裏付けるものである。また、この方法は ALS 治療薬のリード化合物の探索に貢献すると考えられた。

神経変性疾患のモデル生物としてショウジョウバエは有用であるが、過剰発現したヒト SOD1 の酵素活性が神経保護的に働くため、これまで明らかな運動障害を示す変異 SOD1 発現ショウジョウバエの確立はされていなかった。我々は、SOD1 の酵素活性が欠失した C 末端欠損変異型 SOD1 (T116X または L126X) を神経細胞に発現するショウジョウバエを作製することにより、明らかな運動障害を示す初の変異型 SOD1 トランスジェニック・ショウジョウバエの開発に成功した。これらのショウジョウバエでは寿命短縮も観察された。

### 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 8 件)

全て査読有

1. Konya C, Hatanaka Y, Fujiwara Y, Uchida K, Nagai Y, Wada K, Kabuta T. Parkinson's disease-associated mutations in alpha-synuclein and UCH-L1 inhibit the unconventional secretion of UCH-L1. *Neurochem Int.* 2011; 59, 251-258.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018611001860>

2. Higashi S, Moore DJ, Minegishi M, Kasanuki K, Fujishiro H, Kabuta T, Togo T, Katsuse O, Uchikado H, Furukawa Y, Hino H, Kosaka K, Sato K, Arai H, Wada K, Iseki E. Localization of MAP1-LC3 in vulnerable neurons and Lewy bodies in brains of patients with dementia with Lewy bodies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2011; 70, 264-280.

<http://ovidsp.tx.ovid.com/sp-3.5.1a/ovidweb.cgi?QS2=434f4e1a73d37e8c54b7bccef7797d0cdb53f05ad3a4d1c3b26bd796923b86f733e687cf678e4da62d9832a1f418fb666f10bb3957c0173d25b9268c1a52c1ee3d82114fc19965926abca3e829ea7c690748e18d561c00469a9f385a8b938a7a1f44aea94be2861d616d67e991e3542c45127f04a2f623f673f085918df8d63d852eadd4acdb6669df7b7dfd71d387e85b3e213e95325517cd6462a26ae3f0d69f87c7738e9315e20d38fa81bc1eef722b15d634bac77d1c7f54f6ae09de8c0fa0afea3f667a594356b749b40ec3a9dc16046c910af51124c63edec077af87056bbf66cb152ff967ae80bf5a71367718744a7e27c993af5e7ff602cf16e2319ee77824c6aaaca157593ef554b55900e5448d25399cd64660e4ec1e44f54078f53d81b161c96ccc879cb23c4be6782933c41d8a11577698e77249fdbec10d710030043eee960bb56aafb22a979cb3c25a1901ba0bdda04f819be24a2f16d76f167b9f093ce3defc88471e963a2adfd60f8084483b2ff6b66bd79a1c2bc355d04b93fba24d87227c550cfa8b9f715dbb7d>

3. Higashi S, Tsuchiya Y, Araki T, Wada K, Kabuta T. TDP-43 Physically Interacts with Amyotrophic Lateral Sclerosis-Linked Mutant CuZn Superoxide Dismutase. *Neurochem. Int.* 2010; 57, 906-913.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018610003001>

4. Higashi S, Iseki E, Minegishi M, Togo T, Kabuta T, Wada K. GIGYF2 is present in endosomal compartments in the mammalian brains and enhances IGF-1-induced ERK1/2 activation. *J. Neurochem.* 2010; 115, 423-437.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1>

111/j.1471-4159.2010.06930.x/abstract;jsessionid=4CF7294F753B1E0F660FE9A227C207FF.d03t03

5. Yamamoto K, Yamada D, Kabuta T, Takahashi A, Wada K, Sekiguchi M. Reduction of abnormal behavioral response to brief restraint by information from other mice in dystrophin-deficient mdx mice. *Neuromuscul. Disord.* 2010; 20, 505-511.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960896610002191>

6. Nagamine S, Kabuta T, Furuta A, Yamamoto K, Takahashi A, Wada K. Deficiency of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) leads to vulnerability to lipid peroxidation. *Neurochem. Int.* 2010; 57, 102-110.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019701861000149X>

7. Kabuta T, Hakuno F, Cho Y, Yamanaka D, Chida K, Asano T, Wada K, Takahashi S. Insulin receptor substrate-3, interacting with Bcl-3, enhances p50 NF-kappaB activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 394, 697-702.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X10004924>

8. Mitsui T, Hirayama K, Aoki S, Nishikawa K, Uchida K, Matsumoto T, Kabuta T, Wada K. Identification of a novel chemical potentiator and inhibitors of UCH-L1 by in silico drug screening. *Neurochem. Int.* 2010; 56, 679-686.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018610000549>

[学会発表] (計5件)

1. 株田智弘: パーキンソン病関連変異型 UCH-L1 の異常な分子性質. 第54回日本神経化学学会大会 シンポジウム, 加賀, 9.26, 2011

2. 株田智弘: 筋萎縮性側索硬化症モデルシヨウジョウバエにおける単量体 mutant SOD1 の神経毒性. 第34回日本神経科学大会 シンポジウム, 横浜, 9.16, 2011

3. 畑中悠佑, 紺谷千穂, 藤原悠紀, 向野佳奈子, 浅羽研亮, 和田圭司, 株田智弘: UCH-L1 によるシナプス調節機構の解析. 第34回日本神経科学大会, 横浜, 9.14-17, 2011

4. 紺谷千穂, 藤原悠紀, 永井義隆, 内田健康, 和田圭司, 株田智弘: 家族性パーキンソン病変異による UCH-L1 の分泌減少. *BMB2010*, 神戸, 12.7, 2010

5. Higashi S, Iseki E, Minegishi M, Togo T, Kabuta T, Wada K: GIGYF2 is present in endosomal compartments in the mammalian brains and enhances IGF-1-induced ERK1/2 activation. 14th European Federation of Neurological Societies (EFNS) Congress. Geneva, Switzerland. 9.26, 2010

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r4/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

株田 智弘 (KABUTA TOMOHIRO)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第四部・室長

研究者番号: 70535765

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

