

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591259

研究課題名(和文)新規モノクローナル抗体を用いた変異SOD1の構造解析とALS免疫療法の開発

研究課題名(英文)Structure analysis of mutant SOD1 and ALS immunotherapy using new monoclonal antibodies

研究代表者

藤原 範子 (Fujiwara, Noriko)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10368532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)を引き起こす変異SOD1は、不安定で凝集しやすく野性型SOD1とは構造やモノクローナル抗体(mAb)との反応性が異なる。変異SOD1に特異的な構造を認識する抗体はALS免疫療法に役立つと考えられるが、どのような抗体が効果的で安全かは不明である。そこでSOD1の変異による構造変化の検出と効果的なALS免疫療法の開発を進めるために、10種類のmAbを作製した。抗体によって変異体に対する反応性が異なっていること、ALSモデルマウスの病変部位を免疫組織染色できることを見いだしている。これらの抗体は変異SOD1の微小構造の解析やALS免疫療法の開発に利用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Although mutations of Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1) gene is one of causes of Familial Amyotrophic lateral sclerosis (FALS), the mechanism responsible for FALS remains unclear. Because mutant SOD1s are unstable and prone to aggregate, they would have different conformation and reactivity of monoclonal antibodies (mAbs) compared with wild-type SOD1. In this study, we made new various mAbs in order to detect tiny conformational differences between mutant SOD1s and wild-type SOD1. Some mAbs exhibited the different reactivity against the different mutation of SOD1 and labeled Lewy-body-like hyaline inclusions in the spinal cord of ALS model mice by immunohistochemical analysis. Therefore, these mAbs will be useful in detecting the conformational changes of SOD1 by mutation and developing a new ALS immunotherapy. In addition, we determined the crystal structure of SOD1, which will be also useful in determining the structure of SOD1-mAb complex.

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：ALS SOD1 免疫療法 モノクローナル抗体 構造解析

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は運動ニューロンが選択的に障害される致死性の神経変性疾患である。生体にとって有害なスーパーオキシドを消去する Cu, Zn-スーパーオキシドジスムターゼ (以下 SOD1) の遺伝子変異が家族性 ALS の原因になることが明らかになっているが、その発症機構は未だ解明されておらず、有効な治療法も見つかっていない。ALS を引き起こす変異 SOD1 は立体構造が不安定で凝集体を形成しやすいことが数多く報告されている。すなわち、変異 SOD1 が野生型 SOD1 とは異なる構造を有していることが示唆される。また SOD1 タンパクが凝集する前には必ず構造変化が起こっていると考えられる。しかし、「変異 SOD1 と野生型 SOD1 とでは、どの部分の構造がどのように異なっているのか？」や「どのような構造変化がきっかけで凝集化を引き起こすのか？」という本質的な疑問は未解決のままであった。申請者らは、SOD1 のループ VI (102-115 番目のアミノ酸残基) を認識するモノクローナル抗体 (mAb-N6) に対し、変異型 SOD1 と野生型 SOD1 で反応性が異なることを報告している (Fujiwara N et al, J. Biol. Chem. 2005)。これは、モノクローナル抗体を用いることで微小な構造の違いを検出できることを示している。また抗体と結合させた変異 SOD1 の X 線結晶解析を行うことで、より明らかな構造の違いを解明できると考えている。さらに、変異 SOD1 を特異的に認識する抗体や凝集体形成を阻害する抗体は、ALS 免疫治療における利用価値が高いと考えられる。一方、申請者らはループ VI 内に存在する Cys111 の反応性が高く、スルホン酸にまで過酸化されることを報告してきた (Fujiwara N et al, J. Biol. Chem. 2007)。この Cys111 に 2-メルカプトエタノールを結合させた 2-ME-SOD1 (宇部興産からの供与) は酸化剤やアルキル化剤に対して強い耐性を示すが、その安定性の原因は未解明であった。

2. 研究の目的

本申請研究では免疫療法の開発と微小構造の違いを解析することを目的に新たなモノクローナル抗体の作製および抗体特性の検討を行った。さらに、2-ME-SOD1 の安定性の原因解明と抗体と結合する前の SOD1 の構造

解析を目的として 2ME-SOD1 の X 線結晶解析を行った。また酸化型 SOD1 の溶液 ^{17}O -NMR 測定に挑戦した。

3. 研究の方法

(1) 変異 SOD1 と野生型 SOD1 を大腸菌で発現させ、精製したものを抗原としてモノクローナル抗体を作製した。抗体の作製は北山ラパス社に抗原を送付し、ハイブリドーマの作製を依頼した。そのハイブリドーマの上清を送り返してもらい、野生型 SOD1 と変異型 SOD1 を用いた ELISA でハイブリドーマの選別を行った。

(2) 選別したハイブリドーマを RPMI 培地で培養し、その培養液からモノクローナル抗体をカラムクロマトグラフィにて精製した。

(3) 変異 SOD1 と野生型 SOD1 と精製抗体の反応性を ELISA およびウエスタンブロットにて解析した。

(4) ALS モデルマウスである G93A トランスジェニックマウスの脊髄切片を用いて精製抗体の免疫組織染色を行った。

(5) ヒト SOD1 遺伝子の deletion mutant を作製し、大腸菌で発現させて精製した deletion mutant を用いてエピトープマッピングを行った。

(6) X 線結晶構造解析には Cys111 を 2-メルカプトエタノール (2ME) で修飾された 2ME-SOD1 を用いた。これは宇部興産から供与されたものである。結晶の作製と構造解析は、高エネルギー加速器研究機構 (KEK) との共同研究で行った。

(7) 真空ポンプで脱気した還元型 SOD1 に $^{17}\text{O}_2$ ガスにて SOD1 を酸化した。溶液 ^{17}O -NMR 測定は理化学研究所との共同研究で行った。

4. 研究成果

(1) 新規モノクローナル抗体の作製と反応性について

本年度までに 5 種類のマウスモノクローナル抗体と 5 種類のラットモノクローナル抗体を得ている。これらの抗体の特性を調べるために、精製したリコンビナントタンパク質の野生型 (WT) および各変異 SOD1 (A4V, G37R, H46R, G93A) に対する反応性の違いを検討した。その結果、マウスモノクローナル抗体の 18B25、2A2、8H11 は、A4V に強く反応し、H46R に弱く反応するという特徴が見られた。一方、

19G6は他の変異体よりもH46Rに、9D3はG93Aに比較的強く反応した。エピトープマッピングより、9D3は90-110残基部分に、19G6は60-90残基部分にエピトープがあることを明らかにした。18B25、2A2、8H11はどのペプチド部分にも反応せず全長のSOD1にのみ反応したことから、SOD1の立体構造を認識していると考えられる。9D3と18B25はALSモデルマウスの脊髄切片の病変部位を免疫組織染色することがわかった。ラットmAbは作製したばかりであり、変異SOD1に対する反応性やエピトープマッピングについて現在検討中である。今後、これらのモノクローナル抗体を用いて変異SOD1の微小構造の解析および抗体療法の開発を続けていきたい。

(2) ヒト2ME-SOD1の結晶構造解析

まず構造解析で明らかになった興味深い現象は、2-MEが結合したままの2-ME-SOD1を結晶化するには硫酸イオンが必須であることがわかった。他のリン酸イオンやクエン酸イオンでも結晶はできるが、なぜか硫酸イオン以外の陰イオンを用いた結晶では2-MEを観測することができなかった。最終的に、硫酸イオンを用いて作製した2-ME-SOD1結晶の構造を、1.8オングストロームの高分解能で解析することに成功した(図1)。

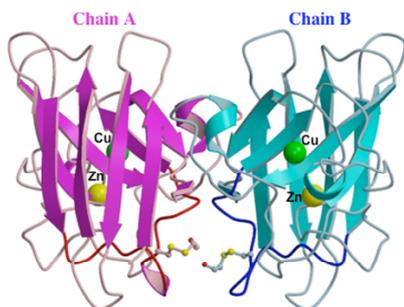


図1 2ME-SOD1の立体構造

ダイマーを形成するサブユニット同士の主鎖を重ね合わせてみたところ、ループVI(102-115残基)の一部(108-111残基)が重ならないことを見いだした(図2)。

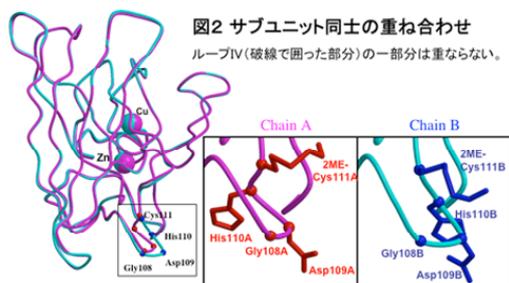


図2 サブユニット同士の重ね合わせ
ループIV(破線で囲った部分)の一部分は重ならない。

この部分の側鎖は違う方向を向いており、ホモダイマーであるSOD1の一部は非対称になっていることを示している。そこで、この非対称性の原因を探ったところ、A鎖ではSer105のNHとHis110のC0が直接水素結合をしているが、B鎖ではSer105のNHとHis110のC0がそれぞれ水分子と水素結合をしているために、構造が異なっていることを見いだした(図3)。

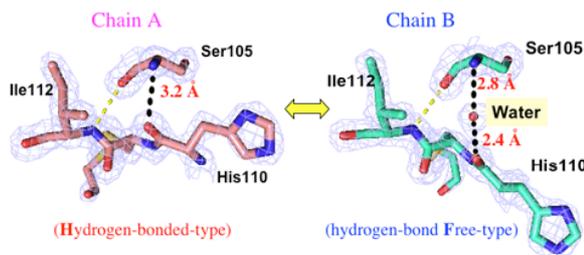


図3 A鎖とB鎖の構造の違い

A鎖はSer105とHis110が直接水素結合をしているが、B鎖では水分子を介している。

直接水素結合をしているA鎖をH型

(Hydrogen-bonded-type)、B鎖をF型

(hydrogen-bond Free type)と名づけた。PDB

内の種々のSOD1構造を解析したところ、このH型とF型の構造は、2ME-SOD1以外のSOD1にも見つかると、野生型のヒトSOD1ではH型とF型がダイマーを形成する非対称型が多く、ALS変異SOD1ではHH型の対称型が多く見つかった。

さらに、アミノ酸配列が異なる他の生物のSOD1もループVI構造はH型とF型の2種類に分類することができ、種を越えた普遍性を見いだすことができた。構造解析が多く報告されているウシのSOD1はすべてHH型であるが、過酸化水素処理をしたSOD1の構造はHF型に変化しており、この2つのタイプの構造は互いに交換が可能であると考えられる。酵母のSOD1はALS変異体も含めすべてFF型であった。このようなSOD1の微小構造の解析は将来変異SOD1の構造解析や免疫療法の開発の一助になると考えられる。

(3) ^{17}O -NMRにおける酸化型SOD1の検出

SOD1の酸化修飾を直接 ^{17}O -NMRで検出できるかどうかを検討した。酸素には3つの安定同位体があるが、NMRでシグナルを観測できるのは存在比が0.037%の ^{17}O のみである。その存在比の低さから、これまでタンパク質の構造解析に ^{17}O -NMRはほとんど活用されておらず、シグナルの帰属データも少ない。我々は、脱気した還元型SOD1に $^{17}\text{O}_2$ ガスを吹き込んで空気酸化を行い、 ^{17}O でラベルされたCys111-SO₂Hと

Cys111-SO₃HがSOD1に導入されたことをHPLCおよび質量分析で確認した。さらに¹H-NMRによって、銅イオンの価数はCu²⁺であることを確認した後、溶液¹⁷O-NMR測定を行なった。その結果、化学シフト値165 ppmに線幅が広い(線幅: 470 Hz) Cys111-SO₃Hのシグナルを得た。Cu²⁺は常磁性を有するため、NMRシグナルを妨害する可能性がある。そこで、酸化型SOD1にアスコルビン酸を加えて銅イオンを還元し、Cu⁺型にすると、164 ppmにCys111-SO₃Hのシャープなシグナル(線幅: 130 Hz)を得ることができた。この結果は、SOD1内の銅イオンの酸化還元状態(Cu²⁺とCu⁺の違い)によって、Cys111-SO₃H付近の構造や酸素分子付近の環境の変化が起こることを示している。また、140 ppm付近に出現するはずのCys111-SO₂Hのピークを観察することはできなかった。溶液¹⁷O-NMR測定では、Cys-SO₂HはCys-SO₃Hよりも検出がしにくいと考えられる。溶液¹⁷O-NMRによる酸化修飾タンパク質の新規検出方法は、SOD1だけではなく種々のタンパク質の酸化修飾や構造の動的変化の研究に貢献できると期待している。

(4) TDP43に関する研究

連携研究者との共同研究として、ALSを引き起こす別のタンパク質であるTDP43に関する研究を行った。TDP-43には2つのRNA結合部位、RRM1とRRM2が存在する。RRM1が易凝集性を示すこと、RRM1に存在する2つのシステイン残基(C173とC175)がフリー状態でない(変異や修飾がある)と、凝集体形成が促進されることを見いだした。一方、RRM2においては、246番目のグルタミン酸(E246)と247番目のアスパラギン酸(D247)がその構造維持に重要であることを突き止めた。E246やD247に変異を加えたTDP-43は病的な可溶性オリゴマーを形成し、細胞内では核内や細胞質で凝集体を作ること明らかにした。この現象は、E246の変異体よりもD247の変異体でより著明に認められた。つまり、これらのアミノ酸残基がTDP-43の正常な構造維持に重要な役割を果たし、正常ではタンパク内部で存在するものが、病的状態になると外部に露出すると考えられる。以上のSOD1およびTDP-43の構造と病態に関する研究は、ALSの発症機構の解明と治療法開発に役立つと考えられる。

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)

① [雑誌論文] (計 8 件)

1. Hanashima S., Fujiwara N.*, Matsumoto K., Iwasaki N, Zheng G-Q, Torigoe H, Suzuki K, Taniguchi N, Yamaguchi Y.: Solution ¹⁷O-NMR approach for observing an oxidized cysteine residue in Cu,Zn-superoxide dismutase. **Chem. Commun.** 49, 1449-1451, 2013, doi: 10.1039/c2cc36918d. (査読有)
2. Shodai A., Morimura T., Ido A., Uchida T., Ayaki T., Takahashi R., Kitazawa S., Suzuki S., Shirouzu M., Kigawa T., Muto Y., Yokoyama S., Takahashi R., Kitahara R., Ito H., Fujiwara N., Urushitani M.: Aberrant Assembly of RNA-Recognition Motif 1 Links to Pathogenic Conversion of TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43). **J. Biol. Chem.** 288, 14886-14905. 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.451849. (査読有)
3. Shodai A., Ido A., Fujiwara N., Ayaki T., Morimura T., Oono M., Uchida T., Takahashi R., Ito H., Urushitani M.: Conserved Acidic Amino Acid Residues in a Second RNA Recognition Motif Regulate Assembly and Function of TDP-43. **PLoS ONE**, 7, e52776, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0052776. (査読有)
4. Ihara K[#], Fujiwara N.*[#], Yamaguchi Y., Torigoe H., Wakatsuki S., Taniguchi N., Suzuki K.: Structural switching of Cu,Zn-superoxide dismutases at loop VI: Insights from the crystal structure of 2-mercaptoethanol modified enzyme. **Biosci. Rep.** 38, 539-548, 2012, doi: 10.1042/BSR20120029. (査読有)
5. Yoshihara D., Fujiwara N.*, Kato S., Sakiyama H., Eguchi H. and Suzuki K.: Alterations in renal iron metabolism caused by a copper/zinc-superoxide dismutase deficiency. **Free Rad. Res.** 46, 750-757, 2012, doi: 10.3109/10715762.2012.673223. (査読有)
6. Chen X., Shang H., Qiu X., Fujiwara N., Cui L., Li X-M., Gao T-M, Kong J.: Oxidative Modification of Cysteine 111 Promotes Disulfide Bond-Independent Aggregation of SOD1. **Neurochem. Res.** 37, 835-845, 2012, doi: 10.1007/s11064-011-0679-8. (査読有)
7. Eguchi H., Fujiwara N., Sakiyama H., Yoshihara D., Suzuki K.: Hydrogen peroxide enhances LPS-induced nitric oxide production via the expression of interferon beta in BV-2 microglial cells, **Neurosci. Lett.**, 494, 29-33, 2011, doi: 10.1016/j.neulet.2011.02.047. (査読有)
8. 藤原範子, Cu, Zn-スーパーオキシドジスム

ターゼに関する研究、兵医大医会誌、第36巻1号、59-65、2011(査読無)

② [学会発表] (計17件)

1. Fujiwara Noriko, Urushitani Makoto, Yoshihara Daisaku, Morimura Toshifumi, Sakiyama Haruhiko, Eguchi Hironobu, Suzuki Keichiro: Immunotherapy targeting loop VI in Cu,Zn-superoxide dismutase exacerbates ALS pathogenesis, SFRR2014, Kyoto, 2014.3.24
2. 藤原範子 (2013) SOD1 の酸化修飾および構造解析---ALS 病態への関与---: レドックス・ライフイノベーション第170委員会、第6回夏の委員会、8. 23、弘前
3. 藤原範子、花島慎弥、山口芳樹、鄭国慶、鳥越秀峰、谷口直之、鈴木敬一郎 (2013) 酸素 NMR による酸化型 SOD1 の新規検出方法、第66回日本酸化ストレス学会学術集会、6. 13、名古屋
4. Fujiwara N, Ihara K, Kato S, Yoshihara D, Eguchi H, Sakiyama H, Suzuki K: TWO FORMS OF LOOP VI INCLUDING REACTIVE CYS¹¹¹ OF HUMAN COPPER-ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE, 13th International Congress of Biochemistry and Molecular biology 2012 (FAOBMB CONGRESS), Bangkok, Thailand, Nov.25-29, 2012
5. 寺西佑理、河原正浩、藤原範子、上田宏、鈴木敬一郎、長棟輝行 (2012) 細胞増殖活性を指標とした抗体選択法、化学工学会 第77年会、3. 15-17、東京
6. 野口隆弘、藤原範子、鴨田信子、北野隆之、武内悠希、吉原大作、崎山晴彦、江口裕伸、鈴木敬一郎 (2012) 変異型 SOD1 に対する新規モノクローナル抗体の反応性、第59回日本生化学会近畿支部例会、5. 19、京都
7. 藤原範子、伊原健太郎、山口芳樹、鳥越秀峰、若槻壮市、谷口直之、鈴木敬一郎 (2012) Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼのループVI構造は2種類のタイプに分類される、第85回日本生化学会大会、12. 14-16、福岡
8. Fujiwara N, Ihara K, Kato S, Yoshihara D, Eguchi H, Sakiyama H, Wakatsuki S, Taniguchi N, and Suzuki K: Oxidation of Cys111 residue in loop VI of human copper/zinc superoxide dismutase, 12th Int. Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins, Beijing 2011, Beijing, China, Aug.1-5, 2011
9. Fujiwara N, Ihara K, Yamaguchi Y, Torigoe H, Yoshihara D, Eguchi H, Sakiyama H, Wakatsuki S, Taniguchi N, and Suzuki K: TWO TYPES OF LOOP VI STRUCTURE IN COPPER ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE, 5th

Biennial Meeting of SFRR Asia (5th SFRR Asia), Kagoshima, Japan, Aug.31-Sep.4, 2011

③ [図書] (計2件)

1. 藤原範子: 活性酸素の生成・消去は日常茶飯事、活性酸素の本当の姿(鈴木敬一郎編) 14-34, 有限会社 ナップ、2014
2. 藤原範子; アミノ酸・タンパク質、(鈴木敬一郎、本家孝一、大河原知水、藤原範子編) 集中講義・生化学、108-185、メジカルビュー社、2011

④ [産業財産権]

○出願状況 (計2件)

1. 名称: TDP-43 の凝集体が蓄積する疾患を治療及び/又は予防するための化合物のスクリーニング方法
発明者: 漆谷真、藤原範子、北原亮、伊東秀文

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 2013-046451

出願年月日: 2013年3月8日

国内外の別: 国内

2. 名称: TDP-43 の凝集体が蓄積する疾患の発症リスクを予測する方法、診断薬及び治療薬
発明者: 漆谷真、藤原範子、伊東秀文

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 2012-028737

出願年月日: 2012年2月13日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 範子 (FUJIWARA NORIKO)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 10368532

(2) 研究分担者

鈴木 敬一郎 (SUZUKI, KEIICHIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70221322

崎山 晴彦 (SAKIYAMA, HARUHIKO)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号: 30508958

江口 裕伸 (EGUCHI, HIRONOBU)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号: 60351798

吉原 大作 (YOSHIHARA, DAISAKU)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00567266

(3) 連携研究者

漆谷 真 (URUSHITANI, MAKOTO)

京都大学・医学部・准教授

研究者番号: 60332326