

令和元年6月13日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15077

研究課題名(和文)クロスシーディングが神経変性疾患の病態形成に果たす役割

研究課題名(英文)Role of cross-seeding in the pathogenesis of neurodegenerative disorders

研究代表者

徳田 栄一 (Eiichi, Tokuda)

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：00757510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：変異型superoxide dismutase-1(SOD1)は、筋萎縮性側索硬化症の運動ニューロン内にミスフォールド体として蓄積する。近年、神経変性疾患の病因タンパク質は、異常型プリオンと似た性質を持つことが指摘されている。すなわち、ミスフォールド体が構造的な鋳型となり、正常型タンパク質のミスフォールディングを誘発するプリオン仮説である。

本課題では、変異型SOD1がプリオン仮説に基づき、野生型SOD1のミスフォールディングを誘発するか、変異型と野生型SOD1を共発現させたマウスで検証した。その結果、野生型SOD1のミスフォールディングが疾患早期から誘発された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SOD1変異を伴うALS患者は、約98%が優性遺伝であるため、変異型と野生型SOD1が共発現している。本課題では、マウスに変異型と野生型SOD1を共発現させると、変異型SOD1が野生型SOD1のミスフォールディングを誘発し、マウスの運動マヒ発症を早めることを明らかにした。本成果は動物実験ではあるが、SOD1変異を伴うALS患者の遺伝形式を再現している。野生型SOD1のミスフォールディングはALS発症に関与していることから、将来、野生型SOD1のミスフォールド状態を測定することで、ALSの発症時期が予測できるようになるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Mutations in the gene encoding superoxide dismutase-1 (SOD1) is causative for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Accumulation of conformational disordered SOD1 protein (i. e. misfolded SOD1) in motor neurons is a hallmark of ALS with SOD1 mutations. Several lines of evidence suggest that misfolded proteins observed in neurodegenerative diseases have prion-like properties: namely, misfolded proteins act as conformational templates that convert normal proteins into a pathogenic form.

To clarify whether the prion paradigm could be applicable for the misfolding of SOD1 in vivo, I investigated double transgenic mice expressing both mutant and wild-type SOD1. I found that misfolding of wild-type SOD1 was induced by the expression of mutant SOD1 even at an early stage of the disease and exaggerated ALS-like motor neuron symptoms.

研究分野：神経科学、生化学

キーワード：クロスシーディング タンパク質凝集体 ミスフォールドタンパク質 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患に関連する病因タンパク質の多くは、天然型とは異なる構造を呈することが知られている。このような異常構造型タンパク質はミスフォールド型タンパク質と呼ばれ、ニューロンの内外に蓄積し、ニューロンの変性や脱落を引き起こすと考えられている。例えば、変異型 superoxide dismutase-1 (SOD1) は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病因タンパク質であり、ALS の運動ニューロン内にミスフォールド型として蓄積することが報告されている。

興味深いことに、神経変性疾患で観察されるミスフォールド型タンパク質は、異常型プリオンタンパク質と類似した特性を有する可能性が指摘されている。すなわち、ミスフォールド型タンパク質が構造的な鋳型となり、正常型タンパク質のミスフォールディングを誘発するとする「プリオン仮説」である。その結果、ミスフォールド型タンパク質が中枢神経系内に異常蓄積し、ニューロン死を引き起こすと提唱されている。

2. 研究の目的

本課題では、変異型 SOD1 が「プリオン仮説」に基づき、野生型 SOD1 (wild-type SOD1) のミスフォールディングを誘発し、運動ニューロンの死を引き起こすか、モデルマウスを用いて検討した。

3. 研究の方法

変異型および野生型 SOD1 を共発現させたトランスジェニックマウスの作製

ヒト変異型 SOD1 (*G127insTGGG*, G127X) を発現させトランスジェニックマウスとヒト wild-type SOD1 を発現させたマウスを交配させ、変異型と野生型の両 SOD1 タンパク質を共発現させたダブルトランスジェニックマウスを作製した。G127X SOD1 はフレームシフト型の変異体であり、全長 153 個のアミノ酸からなる SOD1 タンパク質のうち 134 番以降が欠損している。このため、G127X SOD1 は構造的に不安定であり、ミスフォールド型としてマウスの生体内に存在する。

ミスフォールド SOD1 の測定

疾患早期 (マヒ発症前)、マヒ発症後、および、末期のマウスから脊髄組織を摘出し、可溶性タンパク質を抽出した。Wild-type SOD1 のミスフォールディングが誘発されているか確認するため、ミスフォールド SOD1 を特異的に認識する抗体を用いてサンドウィッチ ELISA を行った。サンドウィッチ ELISA を行う上で、ミスフォールド型 G127X SOD1 とミスフォールド型 wild-type SOD1 の識別に留意した。G127X SOD1 は C 末端側のアミノ酸が欠損している点に着目し、SOD1 の C 末端を特異的に認識する抗体を利用することで、G127X SOD1 と wild-type SOD1 の識別を行った。

運動ニューロンの生存数のカウント

病期の異なるマウス (疾患早期、マヒ発症後、および、末期) から脊髄組織を摘出し、中性ホルマリン緩衝液で固定後、パラフィンブロックを作製した。脊髄切片を抗 NeuN 抗体で免疫染色し、運動ニューロンの生存数を測定した。

4. 研究成果

変異型 G127X SOD1 によって誘発される wild-type SOD1 のミスフォールディング

まず初めに、変異型 G127X SOD1 がプリオン仮説に基づき、wild-type SOD1 のミスフォールディングを誘発するか検討した。SOD1 タンパク質の C 末端を認識する抗体 (wild-type SOD1 のみ認識) とミスフォールド型 SOD1 特異的抗体 (G127X SOD1 と wild-type SOD1 のミスフォールド体とともに認識) を用いて、サンドウィッチ ELISA を行ったところ、疾患早期の段階で wild-type SOD1 のミスフォールディングが誘発されていた。

Wild-type SOD1 のミスフォールディングにより加速する運動ニューロン死

つぎに、wild-type SOD1 のミスフォールディングの結果、マウスの運動ニューロンの生存率がどのように変化するか調べた。G127X SOD1 のみを発現させたマウスと比較して、G127X SOD1 と wild-type SOD1 を共発現させたマウスの運動ニューロン生存率は、マヒ発症後では 31% 減少、末期では 58% 減少した。以上より、wild-type SOD1 がミスフォールディングすると運動ニューロン死が加速することが判明した。

Wild-type SOD1 のミスフォールディングにより増悪する運動ニューロン症状

最後に、wild-type SOD1 がミスフォールドした結果、マウスの運動ニューロン症状がどのように変化するか解析した。G127X SOD1 のみを発現させたマウスと比較して、G127X SOD1 と wild-type SOD1 を共発現させたマウスの運動マヒは 49% 早発し、生存期間は 42% 短縮した。以上より、wild-type SOD1 のミスフォールディングによりマウスの運動ニューロン症状が増悪することが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Fujiwara N, Wagatsuma M, Oba N, Yoshihara D, **Tokuda E**, Sakiyama H, Eguchi H, Ichihashi M, Furukawa Y, Inoue T, Suzuki K.

Cu/Zn-superoxide dismutase forms fibrillar hydrogels in a pH-dependent manner via a water-rich extended intermediate state.

PLoS One. (2018) 13, e0205090. 査読あり

Tokuda E, Nomura T, Ohara S, Watanabe S, Yamanaka K, Morisaki Y, Misawa H, Furukawa Y.

A copper-deficient form of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase as an early pathological species in amyotrophic lateral sclerosis.

Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. (2018) 1864, 2119-2130. 査読あり

Fukuoka M, **Tokuda E**, Nakagome K, Wu Z, Nagano I, Furukawa Y.

An essential role of N-terminal domain of copper chaperone in the enzymatic activation of Cu/Zn-superoxide dismutase.

J Inorg Biochem. (2017) 175, 208-216. 査読あり

Tokuda E, Furukawa Y.

Abnormal protein oligomers for neurodegeneration.

Oncotarget. (2017) 8, 39943-39944. 査読あり

Ishiguro T, Sato N, Ueyama M, Fujikake N, Sellier C, Kanegami A, **Tokuda E**, Zamiri B, Gall-Duncan T, Mirceta M, Furukawa Y, Yokota T, Wada K, Taylor JP, Pearson CE, Charlet-Berguerand N, Mizusawa H, Nagai Y, Ishikawa K.

Regulatory Role of RNA Chaperone TDP-43 for RNA Misfolding and Repeat-Associated Translation in SCA31.

Neuron. (2017) 94, 108-124. 査読あり

[学会発表] (計 21 件)

笠井佑美、安宅菜月、阿部友美、**徳田栄一**、瀬津弘順、井上 正久

ヒト子宮頸部扁平上皮病変(CSIL)における細胞周期調節因子 p27Kip1 発現の免疫組織化学的検討

日本薬学会 第 139 年会 幕張 2019 年 3 月 22 日

仙石瞳友、廣瀬陽美、前田紗希、阿部友美、**徳田栄一**、瀬津弘順、井上 正久

横紋筋融解症に伴う急性尿細管障害に対する Edaravone 反復投与の影響

日本薬学会 第 139 年会 幕張 2019 年 3 月 22 日

Tokuda E.

Neuroprotection of metallothionein in ALS-SOD1 is mediated by an endocytic receptor Megalin

1st International Symposium on Metal in ALS, Yokohama, Japan, March 20, 2019.

Anzai I, **Tokuda E**, Mukaiyama A, Akiyama S, Furukawa Y

A misfolding mechanism of Cu/Zn-superoxide dismutase under oxidative conditions of amyotrophic lateral sclerosis.

9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, Singapore, December 11, 2018.

Toba A, **Tokuda E**, Furukawa Y.

Conformation-dependent toxicity of Cu/Zn-superoxide dismutase in *Caenorhabditis elegans*.

9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, Singapore, December 11, 2018.

Furukawa Y, **Tokuda E**, Ohara S, Fujiwara N.
Wild-type SOD1 is misfolded in cerebrospinal fluid of sporadic ALS
29th International Symposium on ALS/MND, Glasgow, UK, December 7, 2018.

小野真一、**徳田栄一**
筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic Lateral Sclerosis;ALS)と Cu,Zn,そして misfolding
メタルバイオサイエンス研究会 2018 仙台 2018年11月16日

吉田昂生、**徳田栄一**、古川良明
バクテリアにおける SodC-II タンパク質の「抗老化」機能
メタルバイオサイエンス研究会 2018 仙台 2018年11月17日

羽飼友昭、福岡真実、**徳田栄一**、古川良明
銅シャペロン CCS による SOD1 タンパク質への金属イオン供給メカニズム
メタルバイオサイエンス研究会 2018 仙台 2018年11月17日

古川良明、安齋樹、**徳田栄一**、向山厚、秋山修志
酸化ストレスが引き起こす銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼのミスフォールディング機構
メタルバイオサイエンス研究会 2018 仙台 2018年11月16日

安齋樹、**徳田栄一**、古川良明
システイン残基の酸化が促進する SOD1 タンパク質のミスフォールディング
第2回慶應ライフサイエンスシンポジウム 横浜 2018年9月13日

松本響佳、中村滉平、**徳田栄一**、古川良明
筋萎縮性側索硬化症に見られる SOD1 タンパク質の凝集を抑制するメカニズム
日本蛋白質学会 第18回年会 新潟 2018年5月23日

安齋樹、**徳田栄一**、古川良明
システイン残基の酸化が促進する SOD1 タンパク質のミスフォールディング
日本蛋白質学会 第18回年会 新潟 2018年5月23日

羽飼友昭、福岡真実、**徳田栄一**、古川良明
SOD1 タンパク質への銅イオン供給に金属シャペロン CCS が果たす役割
日本蛋白質学会 第18回年会 新潟 2018年5月23日

徳田栄一、Stefan L. Marklund、古川良明
運動ニューロン疾患 ALS におけるミスフォールドタンパク質のプリオン様特性:
現状と今後の展望
日本薬学会 第138年会 金沢 2018年3月28日

Tokuda E, Nagasawa K, Yamanaka K, Misawa H, Ohara S, Furukawa Y.
Development of peptides that specifically recognize misfolded SOD1 proteins in amyotrophic lateral sclerosis
28th International Symposium on ALS/MND, Boston, USA, December 9, 2017.

徳田栄一、大原慎司、山中宏二、三澤日出巳、古川良明
神経変性疾患 ALS の病初期に現れる銅イオン欠乏型 SOD1
メタルバイオサイエンス研究会 2017 岡山 2017年10月13日

安齋樹、**徳田栄一**、向山厚、秋山修志、古川良明
筋萎縮性側索硬化症における変異型 SOD1 タンパク質のミスフォールディングメカニズム
第1回慶應ライフサイエンスシンポジウム 横浜 2017年8月28日

徳田栄一、三澤日出巳、山中宏二、大原慎司、古川良明
筋萎縮性側索硬化症における変異 SOD1 オリゴマーの免疫化学的な検出
第1回慶應ライフサイエンスシンポジウム 横浜 2017年8月28日

Tokuda E, Nagasawa K, Nomura T, Misawa H, Yamanaka K, Furukawa Y.
Development of peptides that specifically recognize misfolded SOD1 proteins in amyotrophic lateral sclerosis
The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. Makuhari, July 21, 2017.

- 21 古川良明、**徳田栄一**、長澤健一、野村尚生、山中宏二、三澤日出巳、大原慎司
タンパク質の構造異常を検出できるファージの開発と神経変性疾患の病理解明への応用
第44回 生体分子科学討論会 秋田 2017年6月23日

〔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〕

ホームページ等

研究室ホームページ <https://furukawa.mixh.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者 該当なし

(2) 研究協力者 該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。