

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15358

研究課題名(和文) SOD1の細胞内構造変化ダイナミクスとその破綻によるALS発症機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of conformational alteration in SOD1 and its disruption in the pathogenesis of ALS

研究代表者

藤澤 貴央 (Fujisawa, Takao)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：50636644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic Lateral Sclerosis; ALS)は治療のない神経変性疾患であり、一刻も早い創薬基盤の開発が望まれている。家族性ALSの原因遺伝子の一つであるSOD1は、遺伝子変異により構造変化を起こして細胞毒性を発揮する。これまでに我々は野生型SOD1もストレス状況下では変異型様構造をとることを見出していたが、その詳細な分子機構やALSへの関与は不明であった。本研究では、変異型様SOD1に着目し、細胞内局在・結合因子探索・翻訳後修飾・分解系といった網羅的基礎研究を行うことにより、ストレス条件下でSOD1が構造変化する分子基盤を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変異型SOD1がALSの原因になることはよく知られているが、ストレス条件下で変異型様に構造が変化した野生型SOD1のALSへの関与については不明な点が多い。本研究で明らかにした野生型SOD1の構造変化の分子基盤に関する基礎的知見は、SOD1遺伝子変異によらない家族性ALSおよび孤発性ALSにおけるSOD1の病態生理学的意義の解明や創薬ターゲットの発見につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease with no cure. SOD1, one of the causative genes in familial ALS, is structurally altered by ALS-linked genetic mutation and exerts cytotoxicity. We have previously reported that wild-type SOD1 (SOD1 WT) also adopts a mutant-like conformation under stress conditions, but the detailed molecular mechanism and its involvement in ALS have not been clarified. In this study, we focused on mutant-like SOD1 and performed comprehensive studies on its subcellular localization, binding factors, post-translational modifications, and degradation systems. We elucidated the molecular basis of conformational alteration in SOD1 WT under stress conditions.

研究分野：分子細胞生物学

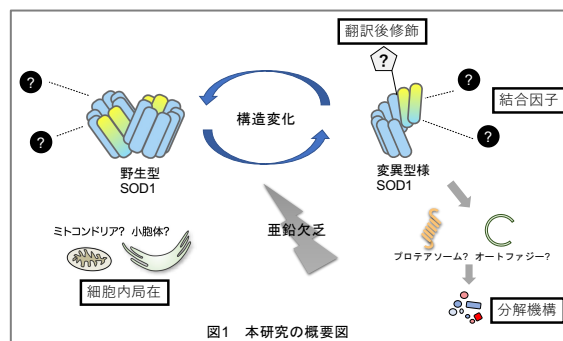
キーワード：ALS SOD1

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis ; ALS) は病態分子機構に基づく根本的な治療法の無い極めて重篤な進行性神経変性疾患である。常染色体優性遺伝形式を示す家族性 ALS において、日本で最も高頻度に見られる原因は *Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1)* の遺伝子変異であり、この遺伝子変異によって産生される変異型 SOD1 タンパク質は、野生型 SOD1 とは異なる立体構造をとり、その獲得性細胞毒性によって運動神経細胞死を誘導する。これまでに研究代表者は、野生型 SOD1 もストレス状況下では変異型様構造をとることを見出していたが、その詳細な分子機構は全く解明されておらず、変異型様 SOD1 タンパク質の性質自体ほとんど不明であった。そのため、ストレス条件下で変異型様に構造変化した野生型 SOD1 の ALS における病態生理学的意義も明らかとなっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、ストレス条件下で変異型様に構造変化した野生型 SOD1 に着目し、細胞内局在・翻訳後修飾・結合因子・分解系といった網羅的基礎研究を行うことにより、ストレス条件下で SOD1 が構造変化する分子機構の詳細を明らかにし、*SOD1* 遺伝子変異によらない家族性 ALS および孤発性 ALS における変異型様 SOD1 の病態生理学的意義を新規提唱することを目的とした。



## 3. 研究の方法

本研究では、「変異型様 SOD1」を SOD1 の新たな形態として捉え、その性質を解明するため以下の(1)～(3)の研究に取り組んだ。

### (1) 変異型様 SOD1 の細胞内局在解析

これまでに研究代表者は、亜鉛欠乏ストレスにより野生型 SOD1 が構造変化することを生化学的実験により明らかにしていた (Homma *et al.*, *Mol Cell*, 52, 75-86, 2013) が、構造変化した SOD1 の細胞内局在については不明であった。そこで、亜鉛欠乏ストレス刺激依存的な SOD1 の細胞内局在を、共焦点顕微鏡による観察と定量解析により検討した。

### (2) 変異型様 SOD1 の翻訳後修飾と結合因子の同定と解析

変異型様 SOD1 の機能解析を行う上で、翻訳後修飾や相互作用タンパク質の情報を得ることは重要である。これまで、遺伝子変異により産生される変異型 SOD1 の翻訳後修飾や結合因子については複数のグループにより解析が進められてきたが、ストレス依存的に構造変化した変異型様 SOD1 の翻訳後修飾や結合因子については解析が進んでいなかった。そこで、質量分析法により、亜鉛欠乏ストレス依存的に構造変化した変異型様 SOD1 に見られる翻訳後修飾と新規結合因子の探索を行った。本研究は、産業技術総合研究所の夏目徹博士と八田知久博士との共同研究として実施した。

### (3) 変異型様 SOD1 の分解機構の解析

変異型様 SOD1 の蓄積は ALS 病態発症の一因である可能性が報告されていることから、正常細胞においては何らかのクリアランス機構があると想定される。そこで、変異型様 SOD1 の蓄積を指標としたゲノムワイド RNAi スクリーニングを行い、変異型様 SOD1 がクリアランスされる分子機構の検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 変異型様 SOD1 の細胞内局在解析

まずはじめに、HEK293A 細胞に FLAG-SOD1 を発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた細胞免疫染色実験により、亜鉛欠乏ストレス依存的な SOD1 の細胞内局在の検討を行った。その結果、通常、細胞全体に局在していた SOD1 が、亜鉛欠乏ストレス状況下では細胞質に局在することが明らかとなった。また、このとき、研究代表者らが独自に作製した抗変異型 SOD1 特異的抗体 (Fujisawa *et al.*, *Ann. Neurol.*, 72, 739-749, 2012) により細胞免疫染色を行ったところ、構造変化した SOD1 が細胞質に存在することもわかり、SOD1 が亜鉛欠乏ストレスに応答して細胞内で局在変化することが明らかとなった。また、本研究成果については、第 42 回日本分子生物学会年會にてポスター発表を行った。

##### (2) 変異型様 SOD1 の翻訳後修飾と結合因子の同定と解析

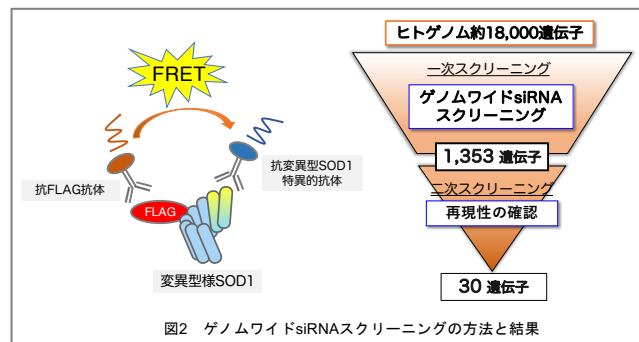
まず、SOD1-FLAG を恒常的に発現する HeLa 細胞株を作製した。その細胞株を用いて、無刺激または亜鉛欠乏ストレス時の SOD1 を抗 FLAG 抗体により免疫沈降し、翻訳後修飾と結合因子について質量分析法により検討した。

翻訳後修飾については、亜鉛欠乏ストレス依存的に複数のリン酸化とアセチル化が変動していることが明らかとなった。現在、翻訳後修飾のダイナミックな変動が SOD1 の構造変化を制御する可能性について検討を進めている。

また、結合因子については、亜鉛欠乏ストレス依存的に SOD1 と結合する複数のタンパク質を同定することに成功した。そのうち、特に顕著に結合増強が見られたタンパク質については、共免疫沈降実験により亜鉛欠乏ストレス依存的な SOD1 との結合について確認した。さらに、野生型 SOD1 においては立体構造上内部に隠され、亜鉛欠乏ストレス依存的に露出してくる N 末端側領域が、新規因子との結合に必要であることも明らかにした。本研究成果については、第 44 回日本分子生物学会年會と第 94 回日本生化学会大会にて学会発表を行った。

##### (3) 変異型様 SOD1 の分解機構の解析

変異型様 SOD1 のクリアランス機構を明らかにするため、変異型様 SOD1 の蓄積を指標としたゲノムワイド RNAi スクリーニングを行った。まず、構造変化した SOD1 を特異的に認識する抗変異型 SOD1 特異的抗体を用い、蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer: FRET) を用いたスクリーニング系を構築し、約 18,000 遺伝子の中から 30 種類のヒット遺伝子を得た (図 2)。その中で、これまで SOD1 と



の関連が報告されていなかった DDB1- and CUL4-associated factor 4 (DCAF4)に着目し、詳細な解析を行った。その結果、DCAF4 が ALS の原因遺伝子の一つでもある optineurin (OPTN)とも相互作用することで、構造変化型 SOD1 のオートファジー依存的な分解に関与することが明らかとなった。本研究成果は論文発表を行った (Homma *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 295, 3148-3158, 2020)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 H. Matsui, T. Iriyama, S. Sayama, N. Inaoka, K. Suzuki, M. Yoshikawa, M. Ichinose, K. Sone, K. Kumasawa, T. Nagamatsu, T. Fujisawa, I. Naguro, H. Ichijo, T. Fujii, Y. Osuga	4. 巻 115
2. 論文標題 Elevated placental histone H3K4 methylation via upregulated histone methyltransferases SETD1A and SMYD3 in preeclampsia and its possible involvement in hypoxia-induced pathophysiological process.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Placenta	6. 最初と最後の頁 60-69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.placenta.2021.09.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugawara, S., Kanamaru, Y., Sekine, S., Maekawa, L., Takahashi, A., Yamamoto, T., Watanabe, K., Fujisawa, T., Hattori, K. and Ichijo, H.	4. 巻 295
2. 論文標題 The mitochondrial protein PGAM5 suppresses energy consumption in brown adipocytes by repressing expression of uncoupling protein 1.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 5588-5601
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.011508	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Homma, K., Takahashi, H., Tsuburaya, N., Naguro, I., Fujisawa, T. and Ichijo, H.	4. 巻 295
2. 論文標題 Genome-wide siRNA screening reveals that DCAF4-mediated ubiquitination of optineurin stimulates autophagic degradation of Cu/Zn superoxide dismutase.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 3148-3158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.010239	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Lambert JP, Picaud S, Fujisawa T, Hou H, Savitsky P, Uuskula-Reimand L, Gupta GD, Abdouni H, Lin ZY, Tucholska M, Knight JDR, Gonzalez-Badillo B, St-Denis N, Newman JA, Stucki M, Pelletier L, Bandeira N, Wilson MD, Filippakopoulos P, Gingras AC	4. 巻 73
2. 論文標題 Interactome Rewiring Following Pharmacological Targeting of BET Bromodomains	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 621 ~ 638.e17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2018.11.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsuburaya N, Homma K, Higuchi T, Balia A, Yamakoshi H, Shibata N, Nakamura S, Nakagawa H, Ikeda SI, Umezawa N, Kato N, Yokoshima S, Shibuya M, Shimonishi M, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Naguro I, Imamura K, Inoue H, Fujisawa T, Ichijo H	4. 巻 9
2. 論文標題 A small-molecule inhibitor of SOD1-Derlin-1 interaction ameliorates pathology in an ALS mouse model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-05127-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 藤澤貴央, 一條秀憲
2. 発表標題 亜鉛欠乏依存的なヒストンH3K14ac減弱メカニズムの解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹中哲, 藤澤貴央, 一條秀憲
2. 発表標題 亜鉛欠乏下における H3K14ac 認識タンパク質の機能解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中志和, 藤澤貴央, 一條秀憲
2. 発表標題 亜鉛欠乏刺激下におけるSOD1の新規結合因子からALSの病態分子機構に迫る
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤澤貴央, 一條秀憲
2. 発表標題 亜鉛欠乏依存的なヒストンH3K14ac減弱メカニズムの解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中志和, 藤澤貴央, 一條秀憲
2. 発表標題 亜鉛欠乏刺激下におけるSOD1の新規結合因子からALSの病態分子機構に迫る
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤澤貴央, 竹中哲, 坪田充司, 一條秀憲
2. 発表標題 MEK-ERK経路は亜鉛欠乏ストレス依存的なSOD1の構造変化を制御する
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 若月大晃, 藤澤貴央, 一條秀憲
2. 発表標題 栄養飢餓状態におけるMBD3の発現量低下とその生理的意義の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹中哲, 藤澤貴央, 坪田充司, 一條秀憲
2. 発表標題 MEK-ERK経路は亜鉛欠乏ストレス依存的なSOD1の構造変化を制御する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hayashi, Y., Fujisawa, T., Ichijo, H.
2. 発表標題 Analysis of Quality Control Autophagy of Aberrant ER Membrane Proteins Using a Novel Model Substrate
3. 学会等名 Gordon Research Conference -Stress Proteins in Growth, Development and Disease- (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsubota, A., Fujisawa, T., Ichijo, H.
2. 発表標題 Molecular mechanism of zinc deficiency-induced structural change of SOD1 explored by a genome-wide siRNA screen
3. 学会等名 ISZB2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林裕輝, 藤澤貴央, 一條秀憲
2. 発表標題 新規モデル基質を用いた小胞体における不良膜タンパク質のオートファジー分解機構の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪田充司, 藤澤貴央, 一條秀憲
2. 発表標題 ゲノムワイドsiRNAスクリーニングによる亜鉛欠乏依存的なSOD1構造変化制御機構の解明
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田淵璃子, 藤澤貴央, 一條秀憲
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症で見られるSOD1遺伝子変異の毒性発揮機構の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林裕輝, 藤澤貴央, 一條秀憲
2. 発表標題 小胞体における膜タンパク質の品質管理機構としての選択的オートファジー
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田淵璃子, 藤澤貴央, 一條秀憲
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症を引き起こすSOD1遺伝子変異に共通する構造変化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 前川リラ, 竹中哲, 坪田充司, 藤澤貴央, 一條秀憲
2. 発表標題 亜鉛欠乏依存的に構造変化したSOD1の機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤澤貴央, 圓谷奈保美, 本間謙吾, 一條秀憲
2. 発表標題 SOD1-Derlin-1結合を標的とした低分子化合物によるALS病態モデルの改善
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関