

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590987

研究課題名（和文） 変異 SOD1 による ALS 病変選択性の分子機序の解明

研究課題名（英文） Research on the molecular pathogenetic mechanism of tissue-specific toxicity mediated by ALS-linked mutant SOD1

研究代表者

丹羽 淳一 (NIWA JUN-ICHI)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：50378022

研究成果の概要：SOD1 タンパク質は内部にジスルフィド(S-S)結合を形成しうるシステイン残基を4ヶ所(6, 57, 111, 146番アミノ酸)有しており、これらのうち57番と146番が酸化され相互にS-S結合を形成してSOD1分子を安定させている。我々は、6番と111番のシステイン残基の異常な酸化が変異SOD1特異的に脳幹・脊髄で生じてタンパク質凝集を促進し、高分子複合体を形成することで運動ニューロンに毒性を発揮して、筋萎縮性側索硬化症(ALS)を引き起こしていることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：筋萎縮性側索硬化症(ALS)、神経変性、変異 SOD1、Dorfin、タンパク質凝集、ユビキチン化、ジスルフィド結合、プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は成年期以降に発症し、大脳の上位運動ニューロンおよび脳幹・脊髄の下位運動ニューロンが選択的に変性する神経難病の一つである。球麻痺・呼吸筋麻痺・四肢麻痺が急速に進行するため、罹患者の苦痛が極めて大きいばかりでなく、介護者の負担も極めて大きい。現在のところ有効な治療法はなく、早急な原因究明と治療法の開発が急務である。その特異な病像(極めて急速な進行、運動機能のみの障害)や著名人の罹患(Lou Gehrigら)により社会におけるALSの認知度は非常に高く、病態解明と有効な治療法の開発の与える社会的な

インパクトは大きい。1993年に家族性ALSの原因の一つとしてSOD1遺伝子変異が同定され、変異SOD1を導入したALSモデルマウスが確立されて以降ALSの研究は大きく前進したが、いまだALSの分子病態機序は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

変異SOD1は、脳幹・脊髄ばかりではなく肝臓などの一般臓器にも広く豊富に発現しているため、変異SOD1の存在だけではALSにおける病変の選択性を説明できない。運動ニューロン特異的な病変はALSを最も特徴づけるものであり、変異SOD1の病変部位選

抗性に関わる分子機序は ALS 病態の中心的な部分と密接に関連していると予想される。従って、病変部位選択性の分子機序を明らかにすることは ALS の病態解明および治療法開発につながる重要な課題である。

SOD1 遺伝子変異に伴う ALS の脳幹・脊髄においては、症状の出現に先立って変異 SOD1 凝集体 (高分子複合体) が出現し、経過とともに増加してゆくことが報告されており、ALS の分子病態解明のためには、変異 SOD1 タンパク質が脳幹・脊髄特異的に凝集体を形成する機序を解明することが必要である。我々は SOD1 タンパク質内部に存在し、酸化されることによりジスルフィド(S-S)結合を形成しうるシステイン残基に着目し、システイン残基を他のアミノ酸に置換することにより S-S 結合の形成をコントロールすることで、変異 SOD1 の凝集体形成能や毒性に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 野生型 (WT) および変異 (G85R, G93A) SOD1 タンパク質を哺乳動物細胞にて発現するコンストラクト pcDNA3.1/MyHis-SOD1 および pEGFP-N1-SOD1 を作製し、site-directed mutagenesis を用いて、SOD1 の 4 つの部位のシステイン残基を各種の組み合わせで S-S 結合を形成できないセリン残基に置換 (1 部位のみの置換、2 部位の置換、4 部位全ての置換: 全 11 種類) する変異 (C→S 変異) を導入した。

(2) 上記発現ベクターをマウス神経芽細胞腫由来の培養細胞 Neuro-2a に発現させ、レチノイン酸にて神経細胞へ分化させた。SOD1 の凝集体形成を、SOD1 の融合タンパク質として発現させた GFP の蛍光により蛍光顕微鏡下で観察した。また、培養細胞よりタンパク質を抽出し、Western blot および Filter Trap アッセイにより、S-S 結合を介した SOD1 の難溶性高分子複合体形成を生化学的に解析した。さらに、MTS および WST-1 アッセイを用いて、システイン残基の置換が変異 SOD1 による神経細胞毒性に及ぼす影響を解析した。

(3) 変異 SOD1 トランスジェニック (Tg) マウスである B6SJLTgN(SOD1-G93A)1Gur を用いて、ALS 発症後の大脳皮質・脳幹・脊髄・肝臓など各種組織における S-S 結合を介した高分子複合体形成の有無について Western blot を用いて生化学的に解析した。

(4) 培養細胞に FLAG タグで標識した野生型および変異を強制発現させ、抗 FLAG 抗体でコーティングしたビーズに結合したタンパク質を高感度マス (MS/MS) スペクトロメーターを用いて分析し、変異 SOD1 と特異的に相互作用する神経特異的タンパク質の同定を行った。

(5) Neuro-2a に、システイン残基を改変した野生型あるいは変異 SOD1 と我々が同定した変異 SOD1 特異的ユビキチンリガーゼ Dorfin を発現させ、免疫沈降法と Western blot を用いて、Dorfin による変異 SOD1 認識とユビキチン化に及ぼすシステイン残基置換の影響を検討した。

(6) Dorfin を脳および脊髄にて発現する Tg マウスを 2 系統確立し、変異 SOD1-Tg マウスと交配することにより、ALS に対する Dorfin 高発現による改善効果を、経時的に運動行動学的、免疫病理組織学的、生化学的に解析した。

4. 研究成果

(1) SOD1 分子内の 6 番および 111 番のシステイン残基の酸化と非生理的 S-S 結合形成が、変異 SOD1 による病変部位選択的高分子複合体形成および毒性発揮に重要である

57 番および 146 番のシステイン残基が酸化されて形成される分子内 S-S 結合が SOD1 分子の安定化に関わっていることはこれまでに知られているが、我々は野生型および変異 SOD1 を発現させた培養神経細胞モデルにおいて、ユビキチン-プロテアソーム系阻害に伴い異常な S-S 結合を形成した難溶性の SOD1 高分子複合体が変異 SOD1 特異的に生じることを見出した (図 1)。

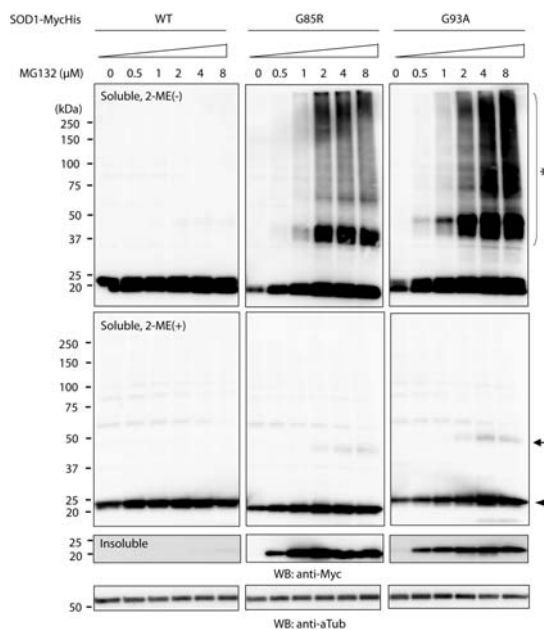


図 1. プロテアソーム阻害に伴う S-S 結合を介した変異 SOD1 特異的高分子複合体形成

変異 SOD1 特異的な難溶性高分子複合体形成は、SOD1 分子の 6 番および 111 番のシステイン残基を同時に置換することにより著明に抑制され、4 か所全てのシステイン残基をセリン残基に置換することで完全に抑制された (図 2)。タンパク質非吸着性フィル

ターにトラップされる難溶性画分に含まれる高分子複合体も同様に、6番および111番のシステイン残基を同時に置換することにより減少した。GFPを付加した変異SOD1を発現させたNeuro-2aを神経分化させると核近傍に凝集体を形成したが、変異SOD1による細胞質内凝集体形成も6番および111番のシステイン残基の同時置換により著明に抑制された。

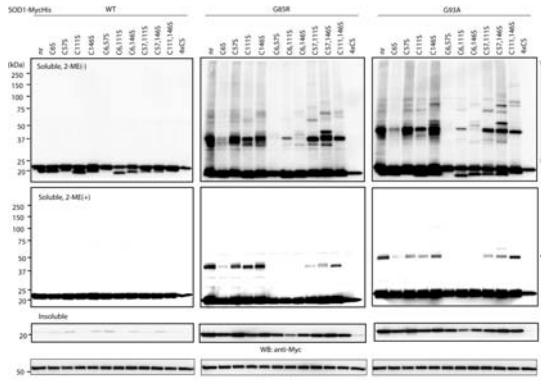


図2. 変異SOD1による高分子複合体形成における、6番、111番のシステイン残基の重要性

システイン残基置換に伴う変異SOD1の細胞毒性に及ぼす影響を、C→S変異体を発現させ神経分化させたNeuro-2aにおいて検討したが、6番および111番のシステイン残基の同時置換により有意に変異SOD1の神経細胞毒性が減弱した(図3)。

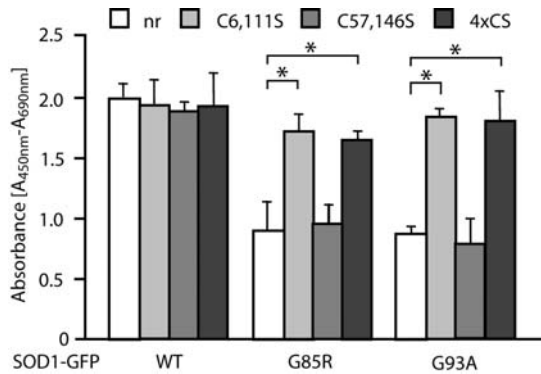


図3. 変異SOD1による神経毒性発揮には、6番および111番のシステイン残基が必要である

培養細胞モデルにおいてSOD1のシステイン残基が変異SOD1の凝集体形成および細胞毒性に強く関与することが示されたが、さらに、ALSを発症した変異SOD1-Tgマウスを用いて、実際にin vivoでも変異SOD1が病変に関連した異常なS-S結合を形成しているかどうかを検討したところ、病変の存在する脳幹および脊髄特異的に難溶性の異常なS-S結合を形成した変異SOD1高分子複合

体形成が生じていた(図4)。

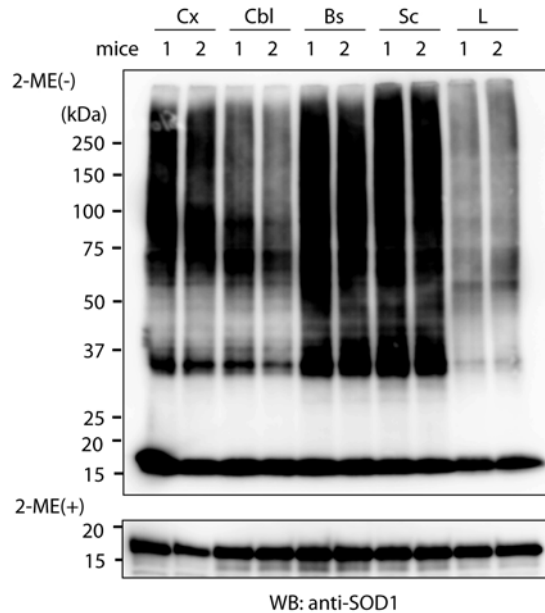


図4. 変異SOD1-TgマウスにおけるS-S結合を介した病変特異的SOD1高分子複合体形成

以上の結果から、SOD1タンパク質は分子内S-S結合を57番と146番のシステイン残基間で形成することにより分子を安定化させているが、6番および111番のシステイン残基により分子内ではなく分子間で誤ったS-S結合を病変選択的に形成することが、変異SOD1の凝集体形成および細胞毒性に強く関与していると考えられた。

異常なS-S結合を介した変異SOD1の高分子複合体形成は、細胞モデルを用いて簡便かつ安定して再現できるため、高分子複合体形成の抑制を指標とすることにより、我々の構築した細胞モデルはALS治療薬のスクリーニングにも応用可能である。

(2)変異SOD1と相互作用する神経特異的タンパク質の新規同定

異常なS-S結合形成は病変部位選択的に生じており、SOD1のS-S結合形成に神経特異的に関与する因子の存在が示唆される。そこで、我々は、マスマスペクトロメトリーを用いた高感度ハイスループットプロテオーム解析を用いて、変異SOD1特異的に結合するタンパク質を網羅的にスクリーニングすることで、神経細胞特異的核タンパク質(X)を新たに同定した。Xは、野生型SOD1とは結合せず、培養神経細胞モデルにおいて高発現させることで変異SOD1の毒性を軽減した。

TDP-43やFUS/TLSなどの核タンパク質が、孤発性・家族性ALSの病態機序へ密接に関与することが近年明らかにされつつあり、今回同定されたXも核タンパク質である

ことから、Xの生理的機能や変異SOD1による運動ニューロン選択的な障害発現に果たす役割を今後さらに研究する必要がある。

(3) ユビキチンリガーゼDorfinは、異常なS-S結合を生じた変異SOD1を特異的に認識し、分解を促進することで変異SOD1の神経毒性を緩和する

Dorfinは、我々が同定したユビキチンリガーゼで、ubiquitousに発現しているタンパク質である。生理的ユビキチン化の基質については現時点では判明していないが、変異SOD1やsynphilin-1と結合し、ユビキチン化することでそれらの分解を促進し、神経毒性を緩和する機能を有している。Neuro-2aに変異SOD1の各種C→S変異体をDorfinと共発現させ、免疫沈降法を用いてDorfinの変異SOD1結合能を検討したところ、Dorfinの変異SOD1結合能およびユビキチン化能は、6番および111番のシステイン残基を置換することで消失した(図5)。

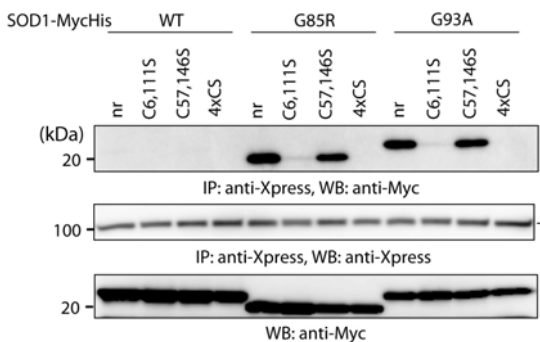


図5. Dorfinは6番および111番のシステイン残基を介して変異SOD1を認識する

変異SOD1が6番および111番のシステイン残基を介した異常な分子間S-S結合により高分子複合体を病変部位特異的に形成することと、Dorfinが異常なS-S結合を形成した変異SOD1を特異的に認識し、そのユビキチン化分解を促進しうることが明らかになったことから、我々は次に、Dorfinにより変異SOD1によるALSを治療可能かどうか検討した。

Dorfinを脳・脊髄に高発現するTgマウスを作製し、変異SOD1-Tgマウスと交配したところ、Dorfinの高発現により、変異SOD1-Tgマウスの平均生存期間を有意差を持って延長した。さらに、免疫病理組織学的に運動ニューロンの脱落を軽減し、脊髄前角に蓄積する変異SOD1のユビキチン化凝集体を減少させた。Tgマウス脊髄より抽出したタンパク質を用いた生化学的分析においても、Dorfinの高発現により、脊髄において変異SOD1の蓄積は軽減していた。

(4) 結論

本研究により、変異SOD1の病変選択的高分子複合体形成および毒性発揮に、SOD1分子内の6番および111番アミノ酸であるシステイン残基が変異SOD1特異的に非生理的酸化を受け、分子間で異常なS-S結合を形成することが必要である明らかとなった。我々が同定したユビキチンリガーゼDorfinは、この変異SOD1特異的な6番、111番のシステイン残基の異常な酸化を認識することができ、Dorfinの高発現により変異SOD1による運動ニューロン障害を緩和させることができた。

今後、変異SOD1の非生理的な分子間S-S結合形成に関わる神経特異的因子の同定・解析研究が、変異SOD1によるALSのさらなる病態解明と治療法開発に必要である。

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6件)

- ① Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Yamada S, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata K, Arimura N, Watanabe T, Kaibuchi K, Sobue G. TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases. *J Biol Chem.* in press (2009) 査読有
- ② Sone J, Niwa J, Kawai K, Ishigaki S, Yamada S, Adachi H, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Dorfin ameliorates phenotypes in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res.* in press (2009) 査読有
- ③ Niwa J, Yamada S, Ishigaki S, Sone J, Takahashi M, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Disulfide bond mediates aggregation, toxicity, and ubiquitylation of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1. *J Biol Chem.* **282**:28087-28095 (2007) 査読有
- ④ Jiang YM, Yamamoto M, Tanaka F, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. Gene expressions specifically detected in motor neurons (dynactin 1, early growth response 3, acetyl-CoA transporter, death receptor 5, and cyclin C) differentially correlate to pathologic markers in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* **66**:617-627 (2007) 査読有
- ⑤ Tanaka F, Niwa J, Ishigaki S, Katsuno M, Waza M, Yamamoto M, Doyu M, Sobue G. Gene expression profiling toward

understanding of ALS pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* **1086**:1-10 (2007) 査読有

⑥ Ishigaki S, Niwa J, Yamada S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G. Dorsin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity. *Neurobiol Dis.* **25**:331-341 (2007) 査読有

〔学会発表〕(計2件)

①田中 章景, 和座 雅浩, 丹羽 淳一, 山本正彦, 祖父江 元. 孤発性ALS病態関連分子の探索と疾患モデルの開発. 第49回日本神経学会総会, 2008.5.17, 横浜.

②丹羽 淳一, 山田 新一, 曾根 淳, 高橋 美穂, 道勇 学, 祖父江 元. 変異SOD1と特異的に結合するタンパク質の探索同定. 第48回日本神経学会総会, 2007.5.17, 名古屋.

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 淳一(NIWA JUN-ICHI)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50378022

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

祖父江 元(SOBUE GEN)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 20148315

田中 章景(TANAKA FUMIAKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 30378012