

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20770130  
 研究課題名（和文）筋萎縮性側索硬化症に関わる SOD1 蛋白質の凝集抑制メカニズム  
 研究課題名（英文）A molecular mechanism regulating pathological aggregation of SOD1 proteins  
 研究代表者  
 古川 良明 (Furukawa Yoshiaki)  
 独立行政法人理化学研究所・構造神経病理研究チーム・基礎科学特別研究員  
 研究者番号：40415287

## 研究成果の概要（和文）：

SOD1 は酸化ストレス軽減に関わるタンパク質だが、変異が生じると凝集体を形成し、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因となる。しかし、SOD1 凝集体の分子構造は明らかでない。そこで、質量分析法によるタンパク質凝集体の構造解析手法を開発し、SOD1 凝集体の分子構造が変異の種類に依存することを明らかにした。罹病期間などの ALS 病態は変異の種類に依存することから、凝集体構造の相違は疾患表現型の制御因子の一つではないかと考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

ALS-causing mutations facilitate aggregation of SOD1, upon which significant structural changes of SOD1 have been assumed; however, a structure of protein aggregate remains obscure. Here, by utilizing mass spectrometry, I have identified a protease-resistant core in wild-type as well as ALS-causing mutant SOD1 aggregates. SOD1 aggregates exhibit mutation-dependent structural polymorphism, which further regulates biochemical properties of aggregates such as solubility. Based upon these results, I propose a new pathomechanism of fALS in which mutation-dependent structural polymorphism of SOD1 aggregates can affect disease phenotypes.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学 ・生物物理学

キーワード：タンパク質凝集、SOD1、神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症、アミロイド

## 1. 研究開始当初の背景

SOD1 遺伝子に変異を有する家族性 ALS 患者において、変異 SOD1 タンパク質を含む凝集体の病巣への蓄積が主要な病理変化として観察することができる。神経細胞内に不溶性の SOD1 凝集体が形成することで、様々な細胞機能が阻害され、神経細胞死につながるのではないかと考えられている。通常、SOD1 は銅・亜鉛イオンを結合し、さらに分子内 S-S 結合を形成することで安定化する。しかし、SOD1 に変異が生じると、上記の翻訳後修飾プロセスが阻害され、SOD1 タンパク質の三次元構造が不安定化し容易に変化するために、凝集体が形成する。

そこで、変異 SOD1 が原因となって発症する ALS の治療法開発の一つの戦略として、変異 SOD1 の凝集体形成を抑制することが考えられる。しかし、凝集抑制に効果的な薬剤等を合理的に分子設計するためには、これまでの研究成果に加えて、SOD1 タンパク質のどの領域が凝集に関わっているのか、その部位を特定する必要があると考えた。つまり、凝集に関わる部位を特定することができれば、例えば、それらを特異的に認識する抗体を作製し結合させることで、凝集を引き起こす分子間相互作用を阻害し、SOD1 の凝集を抑えることが可能ではないかと考えられる。

## 2. 研究の目的

ALS の発症要因とされる SOD1 タンパク質凝集を抑制する手法を確立するために、SOD1 凝集体の分子構造に関する知見を得る。具体的には、SOD1 を構成するアミノ酸配列のうち、凝集に関与する領域を実験的に特定する。本課題で得られる SOD1 凝集体の構造情報を基にして、凝集抑制剤の合理的な分子設計を目指すことが目的である。

## 3. 研究の方法

本課題では、精製した SOD1 タンパク質を用いることで、その凝集プロセスを試験管内にて再現し、SOD1 凝集体を作製した。また、凝集体の構造情報を、質量分析法を用いて明らかにする新たな手法を開発することで、SOD1 のアミノ酸配列のうち凝集に関与する領域を特定した。具体的には、約 10 種類の変異 SOD1 タンパク質を大腸菌に発現させることで

大量合成し、クロマトグラフィー等を用いて精製した。さらに、精製した変異 SOD1 タンパク質を 37 °C で振とうすることで、凝集を再現し、SOD1 凝集体を得ることに成功した。

## 4. 研究成果

SOD1 は生体内酸化ストレスの軽減に関わるタンパク質だが、アミノ酸変異が生じると神経難病の一つである ALS の原因となる。現在までに同定された SOD1 のアミノ酸変異は 100 種類以上にのぼり、それらは共通して、不溶性の SOD1 凝集体の形成を促進する。さらに、SOD1 凝集体が神経細胞内に蓄積することでさまざまな細胞機能が低下し、ALS が発症するのではないかと考えられている。これまでの研究において、アミノ酸変異による SOD1 の構造安定性の低下が凝集の引き金になることが示唆されてきた。しかし、凝集に伴う SOD1 の構造変化、あるいは凝集体の分子構造については明らかとなっていない。

タンパク質は、ある特定のアミノ酸配列（コア領域）を相互作用部位として分子間で会合を行い凝集する。一般に、コア領域は凝集体構造の内部に埋もれ、プロテアーゼによる分解を受けにくいことが知られている。そこで、SOD1 凝集体におけるプロテアーゼ耐性の領域を質量分析法により同定し、SOD1 が凝集する際に重要となるコア領域を決定した。同様の実験を、10 種類の変異 SOD1 を用いて行い、比較検討を行った。その結果、SOD1 のアミノ酸配列において 3 つの領域が凝集体のコア形成に関与しており、それらは変異体によって異なっていることが分かった。さらに、異なる変異 SOD1 を発現する三種類の ALS モデルマウスの脊髄から抽出・精製した SOD1 凝集体についても同様の実験を行うことで、凝集に関わるコア領域を同定し、それらは変異の種類に依存していることを明らかにした。

次に、タンパク質凝集体は界面活性剤の存在下で可溶化されるが、その可溶化の条件、特に温度は凝集体構造の安定性を評価する指標としてみなすことができる。そこで、10 種類の変異 SOD1 を用いて、各々の凝集体が可溶化する温度を電気泳動法により定量化した。その結果、凝集体の可溶化温度は、変異の種類によっては約 20°C も異なることが明らかとなり、さらに、凝集体のコア形成に関わる領域の相違と相関することが分かった。

以上のように、SOD1 凝集体の分子構造は変異の種類に依存しており、SOD1 凝集体の形態や生化学的性質の相違を生む要因であることが示唆された。実際、ALS 患者において、罹病期間や発症部位といった病態は変異の種類に依存していること

を考慮すると、SOD1 凝集体の分子構造は疾患表現型の制御因子の一つになりうるのではないかと考えている。今後、本課題で得られた SOD1 の構造情報を基にして、凝集抑制手法の合理的分子設計を行う計画である。

#### 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: Yoshiaki Furukawa, Kumi Kaneko, Koji Yamanaka, and Nobuyuki Nukina; “Mutation-dependent polymorphism of Cu,Zn-superoxide dismutase aggregates in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis”, **The Journal of Biological Chemistry**, 2010, in press (査読有り)

2: Tomoyuki Yamanaka, Asako Tosaki, Haruko Miyazaki, Masaru Kurosawa, Yoshiaki Furukawa, Mizuki Yamada, and Nobuyuki Nukina; “Mutant huntingtin fragment selectively suppresses Brn-2 POU domain transcription factor to mediate hypothalamic cell dysfunction”, **Human Molecular Genetics**, 2010, in press (査読有り)

3: Yoshiaki Furukawa, Kumi Kaneko, Gen Matsumoto, Masaru Kurosawa, and Nobuyuki Nukina; “Cross-seeding Fibrillation of Q/N-rich Proteins Offers New Pathomechanism of Polyglutamine Diseases”, **The Journal of Neuroscience**, 2009, 29, 5153-5162 (査読有り)

4: 古川 良明; 「翻訳後修飾が制御するSOD1蛋白質の活性化と凝集のメカニズム」, **生物物理** 2009, 49, 90-91 (査読有り)

5: Yoshiaki Furukawa, Kumi Kaneko, Koji Yamanaka, Thomas V. O'Halloran, and Nobuyuki Nukina; “Complete Loss of Post-translational Modifications Triggers Fibrillar Aggregation of SOD1 in the Familial Form of Amyotrophic Lateral Sclerosis”, **The Journal of Biological Chemistry**, 2008, 283, 24167-24176 (査読有り)

6: Hiroshi Doi, Kazumasa Okamura, Peter O. Bauer, Yoshiaki Furukawa, Hideaki Shimizu,

Masaru Kurosawa, Yoko Machida, Haruko Miyazaki, Kenichi Mitsui, Yoshiyuki Kuroiwa, and Nobuyuki Nukina; “RNA-binding Protein TLS Is a Major Nuclear Aggregate-interacting Protein in Huntingtin Exon 1 with Expanded Polyglutamine-expressing Cells”, **The Journal of Biological Chemistry**, 2008, 283, 6489-6500 (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

1: Yoshiaki Furukawa, Kumi Kaneko, and Nobuyuki Nukina; “SOD1 Fibrillation Mechanism Relevant to Familial Form of ALS”, **20<sup>th</sup> International Symposium on ALS/MND**, Berlin, Germany, December 8-10, 2009

2: 古川 良明 「ポリグルタミン病の新たな分子病理メカニズム-タンパク質線維の構造伝播による発症制御の可能性」**日本生物物理学会第 47 回年会**(徳島文理大学) 2009 年 10 月 31 日-11 月 1 日

3: 古川 良明 「翻訳後修飾が制御する蛋白質凝集の分子メカニズム」**第82回日本生化学会大会**(神戸ポートアイランド) 2009 年 10 月 21-24 日

4: Yoshiaki Furukawa, Kumi Kaneko, Nobuyuki Nukina “SOD1 Fibrillation Mechanism Relevant to Familial Form of ALS – Molecular Dissection of Mutation-dependent Pathogenicity”; **14<sup>th</sup> International Conference on Biological Inorganic Chemistry**, Nagoya, Japan, July 25-30, 2009

5: 古川 良明、金子 貢巳、貫名 信行 「翻訳後修飾が制御するSOD1蛋白質の線維化と筋萎縮性側索硬化症」**第36回生体分子科学討論会**(北海道大学学術交流会館) 2009 年 6 月 19-20 日

6: 古川 良明、金子 貢巳、貫名 信行 “Molecular dissection of SOD1 aggregation and its structural rationale”; **日本生物物理学会第 46 回年会**(福岡国際会議場) 2008 年 12 月 3-5 日

7: Yoshiaki Furukawa, Kumi Kaneko, Gen Matsumoto, Masaru Kurosawa, and Nobuyuki Nukina “Cross-seeded Fibrillization Describes Recruitment of RNA-binding Protein into Polyglutamine Aggregates”**第 31 回日本神経科学学会年会**(東京国際フォーラム) 2008 年 7 月 9-11 日

8: 古川 良明 「神経変性疾患におけるSOD1蛋白質

の成熟化と凝集制御のメカニズム」第8回日本  
蛋白質科学会年会(タワーホール船堀) 2008  
年6月10-12日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 良明 (Furukawa Yoshiaki)

独立行政法人理化学研究所・構造神経病理研  
究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：40415287