

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20790619

研究課題名（和文）小胞体内異常蛋白蓄積をターゲットとした筋萎縮性側索硬化症の
遺伝子治療研究課題名（英文）Derlin-1 overexpression ameliorates mutant SOD1-induced endoplasmic
reticulum stress by reducing mutant SOD1 accumulation

研究代表者

山下 賢 (YAMASHITA SATOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・特任助教

研究者番号：20457592

研究成果の概要（和文）：小胞体（ER）ストレス・アポトーシス関連分子の活性化をもたらすUPR（unfolded protein response）は、変異Cu/Zn superoxide dismutase（SOD1）が関与する家族性amyotrophic lateral sclerosis（ALS）モデルや孤発性ALSに関与している。我々は、Derlin-1過剰発現がERストレスの抑制により、変異SOD1による細胞毒性の軽減や細胞活性の促進をもたらすことを示した。さらに外因性Derlin-1は、遺伝子導入した培養細胞の総細胞成分およびマイクロソーム分画における野生型および変異SOD1の蛋白発現を減少させた。Derlin-1はプロテアソームやオートファジーによってSOD1の分解を促進する一方、SOD1のmRNAレベルには影響しなかった。変異SOD1に及ぼすDerlin-1の影響を検討することは、ALSにおける運動ニューロン変性に対する治療法開発に有用である。

研究成果の概要（英文）：Unfolded protein responses, including induction of stress sensor kinases, chaperones, and apoptotic mediators, are involved in the familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) model related to mutant Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) and sporadic ALS. We hypothesized that the endoplasmic reticulum-resident factor Derlin-1 plays a pivotal role in the regulation of misfolded proteins evoked by mutant SOD1. We show that Derlin-1 overexpression reduced mutant SOD1-induced cell toxicity and increased cell viability by suppressing the activation of the ER stress pathway factors: immunoglobulin-binding protein, activating transcription factor 6 p50, and C/EBP homologous protein. Interestingly, exogenous Derlin-1 resulted in a decrease in the amount of mutant SOD1, and a lesser decrease in that of wild-type SOD1, in transfected cells. Reduced SOD1 protein expression was observed in the microsomal fraction of wild-type and mutant SOD1 cells. Our results indicate that Derlin-1 regulates the turnover of SOD1 by promoting the proteasomal and autophagosomal degradation of SOD1 protein, but not by decreasing mutant SOD1 mRNA levels. Insights into the effects of Derlin-1 on mutant SOD1 may facilitate advancements in the treatment of motor neuron degeneration associated with ALS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：(A)神経分子病態学

1. 研究開始当初の背景

近年 unfolded protein response (UPR) は、Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 変異による家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のみならず、弧発性 ALS の病態においてもその関与が示唆されている。変異 SOD1 が選択的に UPR を誘導する可能性を支持する所見として、Nishitoh らは変異 SOD1 が、Der1p の哺乳類のホモログ遺伝子である Derlin-1 の C 末端細胞質領域と選択的に相互作用し、小胞体関連分解 (ERAD) の基質が小胞体から細胞質へ逆行性輸送されることの障害によって小胞体 (ER) ストレスを惹起することを明らかにした。

2. 研究の目的

我々は Derlin-1 の過剰発現が、変異 SOD1 によって誘発される蛋白のミスフォールディングを制御する可能性について検討した。

3. 研究の方法

野生型および変異型 SOD1 発現神経細胞において、Derlin-1 の過剰発現、もしくは siRNA による発現抑制によって、細胞内凝集形成、細胞毒性、細胞生存性、ER ストレス関連ファクターの発現、および細胞内 SOD1 含量に及ぼす影響を評価した。

4. 研究成果

(1)野生型および変異型 SOD1 は、Derlin-1 に部分的に共局在する。

Derlin-1 の過剰発現が、免疫蛍光染色において SOD1 と共局在を示すかどうか検討した。neuro2a 細胞に FLAG 標識された各種 SOD1 (野生型、変異型 G93A および G85R) と、Derlin-1 もしくは pcDNA5 を共発現した。抗 FLAG 抗体および抗 Derlin-1 抗体による二重染色では、野生型、変異型 G93A および G85R が内在性および外因性 Derlin-1 と部分的に共局在を示した (図 1A)。さらに変異型 SOD1 (G93A、G85R) を発現する細胞は、Oh ら (2008) の報告と同様、野生型と比較して、有意に多くの凝集塊が観察された。Derlin-1 の過剰発現は、変異型 SOD1 (G93A、G85R) 発現細胞において、凝集塊陽性細胞の割合を有意に減少させた (図 1B)。

(2)Derlin-1 過剰発現は、変異 SOD1 による細胞毒性を軽減し、細胞活性を改善した。

各種 SOD1 安定発現細胞において、細胞死

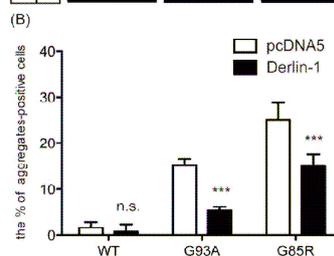
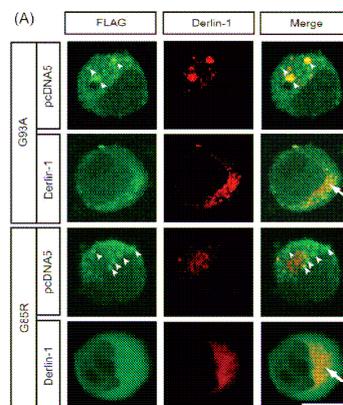


図 1. 野生型および変異型 SOD1 は Derlin-1 に部分的に共局在し、Derlin-1 過剰発現は変異 SOD1 の凝集の減少をもたらす。

を評価するために propidium iodide (PI) 染色し、flow cytometry を用いて検出した。過去の報告と同様 (Rizzardini et al. 2005)、変異 SOD1 (G93A、G85R) 安定発現細胞では、コントロールあるいは野生型 SOD1 安定発現細胞に比して、アポトーシス細胞の割合が多かった (図 2A)。Annexin V による検討でも同様の結果を得た (図 2B)。

次に Derlin-1 過剰発現が変異 SOD1 による細胞死に及ぼす影響について検討した。Derlin-1 過剰発現は、transfection の 48、72 h 後における変異 SOD1 (G93A) 発現細胞におけるアポトーシス核の割合を有意に減少させた (図 2D)。変異 SOD1 (G85R) 発現細胞では Derlin-1 発現は、24 h 後における変異 SOD1 (G85R) 細胞におけるアポトーシス核の割合を有意に減少させ、48、72 h 後も減少傾向を呈した (図 2E)。対照的に Derlin-1 は野生型 SOD1 発現細胞に影響しなかった (図 2C)。MTT assay による細胞活性の評価でも野生型、変異型 (G93A、G85R) SOD1 安定発現細胞では Derlin-1 過剰発現時に細胞活性増加がみられた (図 2F)。

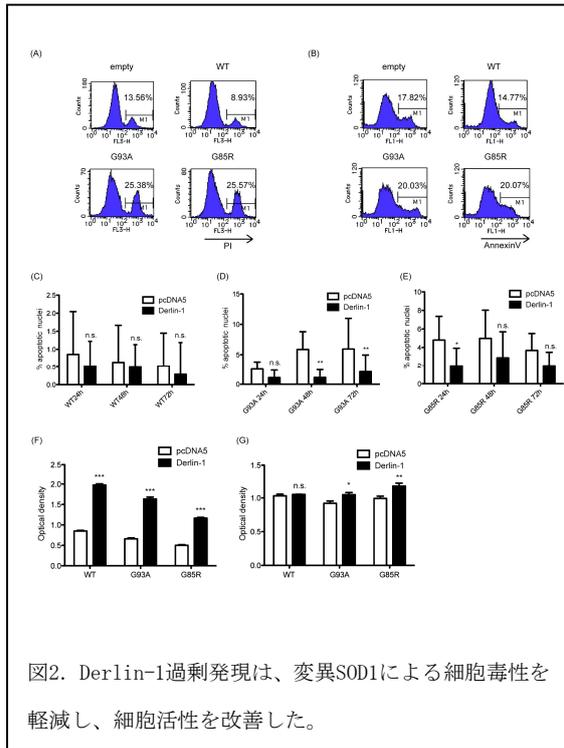


図2. Derlin-1過剰発現は、変異SOD1による細胞毒性を軽減し、細胞活性を改善した。

(3) Derlin-1 は、変異 SOD1 によって引き起こされた ER ストレス経路の活性化を軽減する。

Derlin-1 過剰発現が、変異 SOD1 による ER ストレス経路による細胞毒性を軽減するかどうか検討した。Derlin-1 の存在/非存在下の各種 SOD1 安定発現細胞からのマイクロゾーム分画において、GRP94、BiP、Derlin-1 の発現レベルを検討したところ、Derlin-1 過剰発現時の変異 SOD1 (G93A、G85R) 発現細胞でのマイクロゾーム分画では、BiP は有意に減少していたが、野生型 SOD1 発現細胞では有意差はみられなかった (図 3A、B)。さらにサイトゾール分画における ATF6 p50、CHOP の発現に及ぼす Derlin-1 の影響を検討したところ、Derlin-1 過剰発現時に ATF6 p50 の発現レベルは、変異 SOD1 (G93A) 細胞において有意に減少し、野生型や変異 SOD1 (G85R) 細胞でも減少がみられた (図 3D)。また Derlin-1 過剰発現は、変異 SOD1 (G93A、G85R) 細胞において、有意に CHOP の発現レベルを低下させ、野生型 SOD1 細胞においても低下させた (図 3E)。

(4) Derlin-1 は、野生型および変異型 SOD1 蛋白を減少させる。

変異 SOD1 は、ERAD メカニズムによって ER から排除されるべき異常な蛋白であることから、SOD1 発現に及ぼす外因性 Derlin-1 の影響を検討した。各種 SOD1 (野生型および変異型 G93A、G85R) ベクターと Derlin-1 あるいは pcDNA5 を一過性に共発現し、western blot で細胞内 SOD1 蛋白含量を定量化した (図 4A)。

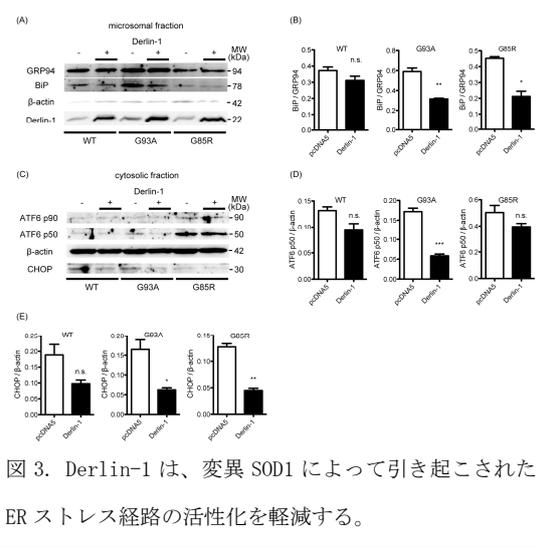


図 3. Derlin-1 は、変異 SOD1 によって引き起こされた ER ストレス経路の活性化を軽減する。

Derlin-1 過剰発現は、変異 SOD1 (G93A、G85R) 蛋白レベルを有意に減少させた (G93A 37.0%、G85R 52.7%)。一方、野生型 SOD1 蛋白レベルに有意差はみられなかった (図 4B)。各種 SOD1 安定発現細胞においても SOD1 蛋白の定量化を行ったところ、Derlin-1 過剰発現により、変異 SOD1 (G93A、G85R) 蛋白レベルは有意に減少させた (G93A 61.9%、G85R 52.2%) (図 4E)。一方、一過性発現時と異なり、野生型 SOD1 細胞内における SOD1 蛋白レベルは Derlin-1 過剰発現により有意に減少がみら

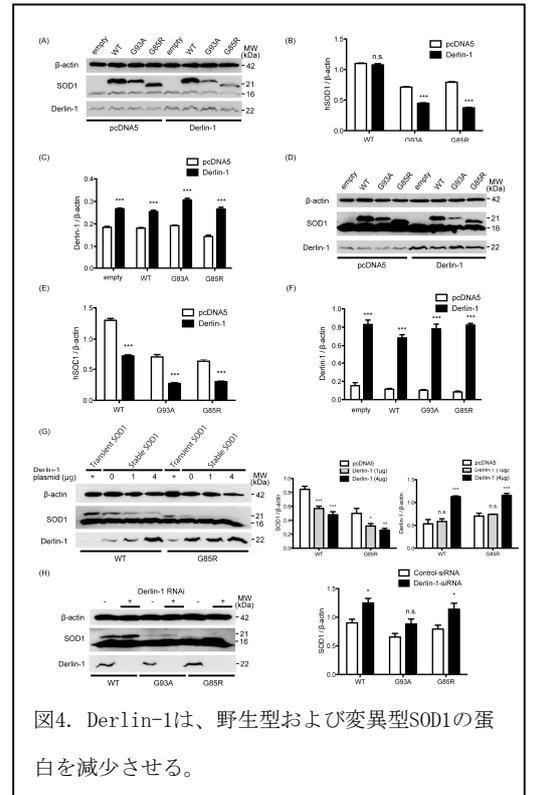


図 4. Derlin-1 は、野生型および変異型 SOD1 の蛋白を減少させる。

れた (43.6%)。野生型 SOD1 分解における相違は、それぞれの実験における Derlin-1 の発現

レベルの違いによると考えられた。そのため、transfectionにおけるDerlin-1プラスミド量を変化させたところ、野生型および変異SOD1 (G93A、G85R) 両者において、Derlin-1の発現レベルが強ければ強い程、SOD1発現レベルが減少した。すなわちDerlin-1過剰発現は用量依存性に細胞内SOD1レベルを減少させた。他方Derlin-1のsiRNAによる発現抑制が、SOD1蛋白分解に及ぼす影響を検討した。細胞内SOD1含量は野生型および変異SOD1 (G93A、G85R) 細胞すべてにおいて有意に増加した (図4H)。

(5) Derlin-1過剰発現は、マイクロゾーム分画におけるSOD1蛋白を減少させた。

次に、Derlin-1 過剰発現が ER の含まれるマイクロゾーム分画において SOD1 蛋白を減少させるかどうかを検討した。Derlin-1 過剰発現は、変異(G93A、G85R)および野生型 SOD1 安定発現細胞のマイクロゾーム分画において、SOD1 蛋白減少をもたらした(図 5B)。さらに Derlin-1 過剰発現は、野生型および変異型 SOD1 (G93A) をサイトゾール分画においても有意に減少させたが、変異型 SOD1 (G85R) に関しての有意差はみられなかった (図 5C、D)。

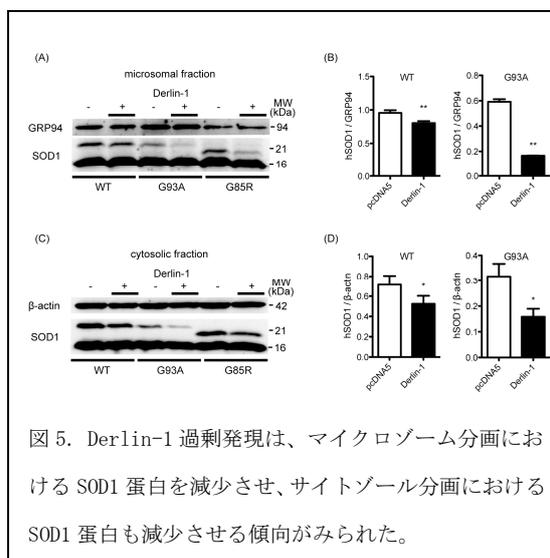


図 5. Derlin-1 過剰発現は、マイクロゾーム分画における SOD1 蛋白を減少させ、サイトゾール分画における SOD1 蛋白も減少させる傾向がみられた。

(6) Derlin-1 による SOD1 蛋白減少は、SOD1 mRNA レベルの低下ではなく、SOD1 蛋白の分解促進による。

各種 SOD1 における mRNA レベルを定量化するため、fluorescence-based real-time reverse transcription PCR 法を用いた。全ての SOD1 安定発現細胞において、Derlin-1 過剰発現による影響はみられなかった (図 6A)。そのため Derlin-1 過剰発現による SOD1 発現低

下は、SOD1 分解促進によるものであると推測した。Derlin-1 による SOD1 蛋白分解のメカニズムを解明するために、Derlin-1 存在下におけるプロテアソーム阻害剤 (MG132 50 μM) およびマクロオートファジー阻害剤 (3-MA 5 mM) の影響を検討した。プロテアソーム阻害剤、オートファジー阻害剤はいずれも Derlin-1 によって減少していた変異 SOD1 (G93A/G85R) 含量の低下を回復させた (図 6B)。これにより、Derlin-1 による変異 SOD1 蛋白減少は、プロテアソームとマクロオートファジー両者が関与する可能性が示唆された。Derlin-1 が直接的にプロテアソーム活性を促進する可能性を除外するために、erlin-1 の存在/非存在下で、プロテアソーム活性測定を行った。Derlin-1 過剰発現は、プロテアソーム活性に影響しないと考えられた (図 6C)。

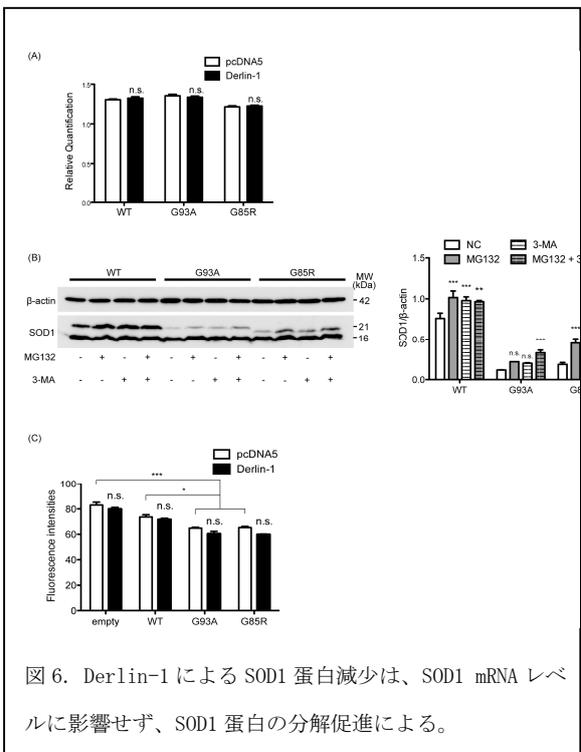


図 6. Derlin-1 による SOD1 蛋白減少は、SOD1 mRNA レベルに影響せず、SOD1 蛋白の分解促進による。

結論：外因性Derlin-1発現は、変異SOD1蛋白のmRNAレベルに影響せず、プロテアソームやオートファジーによる分解を促進させることによって、変異SOD1蛋白制御に関与することが示唆された。変異SOD1に及ぼすDerlin-1の影響を検討することは、ALSにおける運動ニューロン変性に対する治療法開発に有用である。

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 4 件)

- ①Mori A, Yamashita S, et al. Derlin-1 overexpression ameliorates mutant SOD1-induced endoplasmic reticulum stress by reducing mutant SOD1 accumulation. *Neurochem Int* 58: 344-353, 2011. (査読有り)
- ②Yamashita S, et al. Amyotrophic lateral sclerosis in a patient with Kartagener syndrome. *Amyotroph Lateral Scler* 11: 402-404, 2010. (査読有り)
- ③Yamashita S, et al. DJ-1 forms complexes with mutant SOD1 and ameliorates its toxicity. *J Neurochem* 113: 860-870, 2010. (査読有り)
- ④Yamashita S, et al. Flexor-dominant myopathic phenotype in patients with His46Arg substitution in the Cu/Zn superoxide dismutase gene. *J Neurol Sci* 281:6-10, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

- ①Yamashita S, et al. DJ-1 forms complexes with mutant SOD1 and ameliorates its toxicity. Society for Neuroscience 2010, 462.13, San Diego, San Diego Convention Center, USA, November 15, 2010
- ②Mori A, Yamashita S, et al. Society for Neuroscience 2010, 462.11, San Diego, San Diego Convention Center, USA, November 15, 2010
- ③Yamashita S, et al. DJ-1 forms complexes with mutant SOD1 and ameliorates its toxicity. Neuro 2010, Kobe, Kobe Convention Center, Japan, September 2, 2010
- ④山下 賢ら、DJ-1 は変異 SOD1 と相互作用し、神経毒性を軽減する、第 51 回日本神経学会総会、東京、東京国際フォーラム、2010 年 5 月 20 日～22 日
- ⑤山下 賢ら、DJ-1 による変異 SOD1 毒性の軽減効果に関する検討、第 50 回日本神経学会総会、仙台、仙台 国際センター、2009 年 5 月 20 日～22 日
- ⑥山下 賢ら、変異 SOD1 の小胞体内蓄積をターゲットとした家族性 ALS の遺伝子治療開発、第 49 回日本神経学会総会、横浜、パシフィコ横浜、2008 年 5 月 15 日～17 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 賢 (YAMASHITA SATOSHI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・特任助教
研究者番号：20457592

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし