

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20800076

研究課題名（和文）筋萎縮性側索硬化症における蛋白質凝集体の毒性発揮メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms for toxicity of the protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

井上 信一 (Inoue Shinichi)

独立行政法人理化学研究所・田中研究ユニット・研究員

研究者番号：20466030

研究成果の概要（和文）：

大腸菌から大量調製した精製変異型ヒト SOD1 には、アミロイド線維形成能があり、かつシーディング能も備えている事が分かった。ミトコンドリア特異的脂質成分には、精製変異型 SOD1 のアミロイド線維形成を促進する働きはなく、むしろ抑制に働いた。Neuroblastoma の Neuro2a 培養細胞株を用いて、変異型 SOD1 のアミロイド線維には毒性があることを確認した。

研究成果の概要（英文）：

Here we show that mutant human SOD1 proteins formed amyloid fibril, and possessed a seeding ability. Mitochondria-specific lipid inhibit amyloid fibril aggregation, rather than promote it. Furthermore, this study confirmed toxicity of the mutant SOD1 amyloid fibrils.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：筋萎縮性側索硬化症、アミロイド線維、ミトコンドリア、脂質

## 1. 研究開始当初の背景

近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病、プリオン病など、多くの神経変性疾患では、各原因蛋白質がミスフォールドし、 $\beta$ シート構造に富んだアミロイド

線維が凝集体を形成・沈着する事で病態を引き起こすという共通の発症メカニズムが明らかになっている。これまでの研究で、家族性筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) の原因となる変異型 Cu/Zn superoxide dismutase

(SOD1)蛋白質も凝集体を形成する事で病態発症を引き起こしている事が示唆されている (Bruijn *et al.*, Science, 1998)。ALSは運動ニューロンを障害する神経変性疾患であり、変異型 SOD1 による運動ニューロン死のメカニズムとして、変異型 SOD1 の凝集体形成と共凝集蛋白質の機能低下、蛋白質分解系異常、ミトコンドリア機能異常、酸化ストレス、軸索輸送の異常、グリア細胞に起因する神経炎症などが提唱されている。原因蛋白質のミスフォールディングによる凝集体の形成は多くの神経変性疾患に共通している事からも、非常に関心の高い現象であるが、変異型 SOD1 の凝集体が運動ニューロンに対してどの様にして毒性を発揮するのかと言う事に関してはあまり分かっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では変異型 SOD1 凝集体がどのように毒性を生じ、ALS の発症に関与しているのかを解明する事を最終的な目的とする。そして特に、ミトコンドリア障害がそれにどのようにして関与しているのかを詳しく解明した。

ALS は、進行性、致死性の運動神経変性疾患であり、脳や脊髄の運動ニューロンが選択的に細胞死を起こし、随意筋麻痺となるという特徴をもつ。ALS 発症の原因は詳しく分かっておらず、有効な治療法も確立されていないのが現状であるが、近年の研究により、家族性 ALS の約 20%では SOD1 の突然変異が原因であると言う事が分かってきた (Rosen *et al.*, Nature, 1993)。さらに、変異型 SOD1 トランスジェニックマウスが ALS 動物モデルとして樹立され、ALS 研究は大きく発展する事となった。SOD1 は細胞質において活性酸素種のスーパーオキシドを除去する機能を担っているために、当初は SOD1 の機能不全により過度の酸化ダメージを受けることが ALS 発症の

原因であると推測されていた。しかしながら、酵素活性が不変な変異型も存在する事や、SOD1 ノックアウトマウスには神経変性疾患病態がみられない事からも、変異による単なる機能不全ではなく、変異型 SOD1 の毒性獲得が ALS 発症の原因であると考えられるようになった (Reaume *et al.*, Nature Genetics, 1996)。変異型 SOD1 による運動ニューロン死のメカニズムとしては、前述の通りの様々な説が提唱されているが、やはり、多くの神経変性疾患に共通しているアミロイド凝集体形成の関与が興味深い。アミロイド線維は医学研究の重要な研究対象であると同時に、蛋白質科学研究として *in vitro* 解析が盛んに行なわれてきた。変異型 SOD1 蛋白質も例外ではなく、多くの物性研究が行なわれている。しかし、変異型 SOD1 がアミロイド線維をどのような条件で形成するのか、*in vitro* で形成されたアミロイドは毒性をもつのか、他の多くのアミロイド線維と同様に変異型 SOD1 アミロイド線維断片が核 (シード) となり線維伸長反応を促進させる (シーディング) のかなど未解明な事は多い。また、共凝集による蛋白質機能低下は他の神経変性疾患でも数多く解明されているが、変異型 SOD1 凝集体ではあまり明らかになっていないのが現状である。

変異型 SOD1 の凝集体形成から毒性を発揮するまでのメカニズムの1つとして、ミトコンドリアの関与が示唆されている。SOD1 トランスジェニックマウスの運動ニューロンでは、発症前にミトコンドリアが膨張し分解されている形態像が観察されている (Wong *et al.*, Neuron, 1995)。さらに、本来 SOD1 は細胞質に局在するが、変異型 SOD1 は病態部位特異的にミトコンドリアにも局在するようになる事が分かってきている (Liu *et al.*, Neuron, 2003)。これらの報告などから、ミスフォールドした変異型 SOD1 がミトコンドリアに移行して凝集体を形成することでミトコンドリア障害を引き起こす事が ALS の発症に関与しているとの仮説が提唱されているが、ミトコンドリアへの具体的な移行メカニズムやミトコンドリア障害を引

き起こすまでに関与する因子はほとんど明らかにされていないのである。

### 3. 研究の方法

*in vitro* 大量培養系により変異型 SOD1 を精製して、そのアミロイド形成能やそのシーディング能を検討する。アミロイド形成能の検討には様々な物理的・化学的条件を試み、まずチオフラビン蛍光色素やコンゴレッド色素などのアミロイド検出試薬を用いる事で定性的(ある程度定量的)な測定を行って効率的に条件の正否を判断する。さらに、反応がみられた条件で原子間力顕微鏡や電子顕微鏡による直接観察を行う。それと同時に、変異型 SOD1 アミロイドのシーディング能の有無をチオフラビン蛍光色素との反応のタイムコースをとって解析する事で検討する。変異型 SOD1 だけではアミロイドが形成しにくい場合も考えられるが、単離ミトコンドリア/ミトコンドリア蛋白質や脂質と混合する事、もしくは単離ミトコンドリア直接導入することで凝集(アミロイド線維)形成が促進されるのかを検討する。また、細胞に導入してその毒性も確かめる。

SOD1 は培養細胞に強制発現させる事で変異型特異的に凝集体を形成するが、その発現用プラスミドの蛍光タグの付け方によって凝集体形成が起きにくいものと起きやすいものがある事を確認している。近年、アミロイドを形成させる原因蛋白質を酵母に強制発現する事により、様々な神経変性疾患酵母モデル(Outeiro *et al.*, Science, 2003)が確立されており、その病態抑制(促進)因子のスクリーニングに応用されている。酵母は哺乳類細胞などに比べて非常に扱いが簡便であるため、大量スクリーニングに非常に向いているのである。しかし、変異型 SOD1 はそのまま発現させたのでは凝集しにくいため、モデルとしては確立されてこなかった。

そこで、凝集しやすくなった哺乳類細胞発現用プラスミドを模して酵母用に組換えることで、世界に先駆けて酵母の ALS モデルを確立し、それを用いて病態抑制因子(遺伝子・化合物)のスクリーニングに応用する。酵母 ALS モデルにおいて変異型 SOD1 凝集体に毒性がみられるのならば、その酵母発現プラスミドを酵母遺伝子ノックアウト(KO)ライブラリーに導入し、その毒性が抑制される遺伝子を網羅的に探索する事が可能である。また同時に、変異型 SOD1 凝集体の毒性を促進してしまう様な遺伝子の探索にもなる。化合物のスクリーニングは、酵母発現用プラスミドを発現させた酵母に化合物ライブラリーの化合物を添加する事で、毒性が抑制されるのかを検討する事で候補を特定する。ただし、もしも酵母において凝集体がみられても毒性がほとんどなかったとした場合、凝集体の大きさや数の変化を引き起こす遺伝子・化合物を特定した後に、培養細胞モデルやマウスモデルを用いてその効果の検討を行う。

### 4. 研究成果

ALS の酵母モデルの作製を目指したものの、酵母内では培養細胞内の様に変異型 SOD1 の凝集がごくわずかな確率でしか見る事が出来なかった。更に、培養条件などを様々試したが、改善される事はなかった。したがって、本研究では、スクリーニング系に使える様な状態の ALS の酵母モデルの作製にはいたらなかった。

*in vitro* 大量培養系により野生型 SOD1 と変異型(G93A)SOD1 蛋白質を精製して、還元剤存在下での震盪培養によってそのアミロイド線維形成能が確認された(Fig. 1)。チオフラビン色素やコンゴレッド色素などによっても、アミロイド線維形成が示唆された(data not shown)。変異型(G93A)SOD1 特異的に線維形成がなされると思われたが、野生型にも線維様の構造物が確認された。

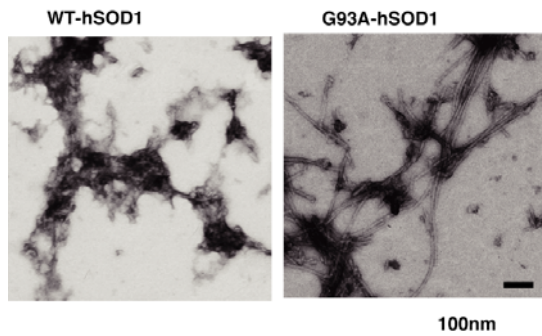


Fig.1

さらに、これらの線維はシーディング能を有している事が確認された (Fig. 2)。

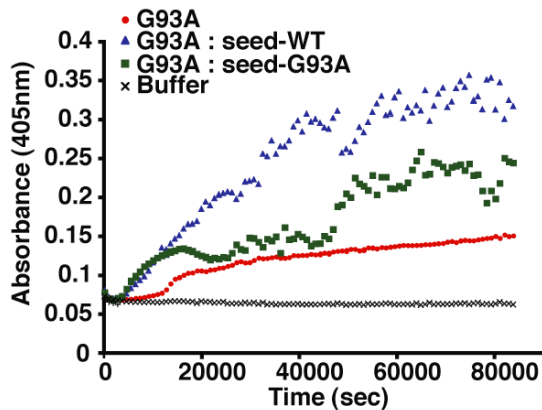


Fig.2

変異型 (G93A) SOD1 が凝集する (アミロイド線維化する) 事により、神経細胞毒性が出るのかどうかを検討する為に、Neuro2a cell line に変異型 SOD1 と野生型 SOD1 の強制発現を行ない、その毒性を比較した。まず、野生型 SOD1 ではほとんど細胞内凝集は見られなかったのに対し、変異型 (G93A) SOD1-EYFP 融合蛋白質の強制発現により細胞内凝集が見られる様になった (data not shown)。MTT assay により細胞生存試験を行ったところ、変異型 (G93A) SOD1-EYFP 発現によって細胞の生存度は下がったものの、非常にわずかなものだった (Fig. 3)。そこで、*in vitro* で精製し、調製した SOD1 蛋白質のアミロイド線維をプラスミドとともに Neuro2a に導入したところ、その差が顕著になった。ただし、*in vitro* 調製・精製した SOD1 アミロイド線維の添加効果は野生型でも変異型でも同様に見られた (Fig. 3)。

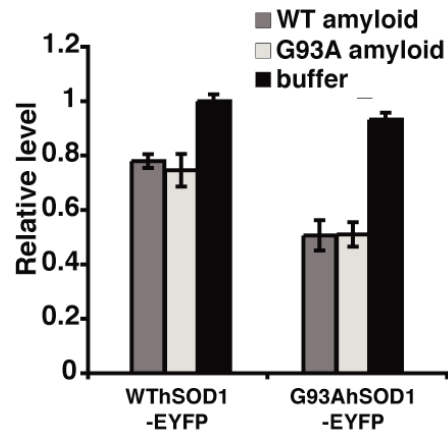


Fig.3

ミトコンドリアが変異型 SOD1 蛋白質の凝集体形成の場として働いている可能性が示唆されているので、ミトコンドリアを野生型マウスから単離し、アミロイド線維形成を促進するのか調べたが、特にそのような促進作用は持たなかった (data not shown)。そこで、今度は、ミトコンドリア特異的脂質であるカルジオリピンを添加したところ、アミロイド線維形成を促進せず、むしろ抑制に働いた (Fig. 4)。また、飽和脂肪酸の一つであるステアリン酸を添加すると、アミロイド線維形成の強い促進作用を呈した (Fig. 4)。

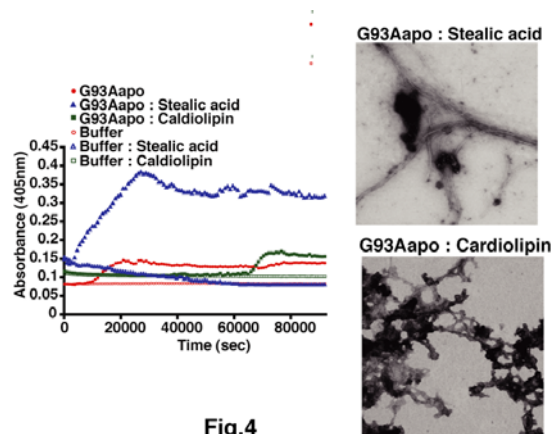


Fig.4

以上、本研究の結果から、精製変異型ヒト SOD1 には、アミロイド線維形成能があり、かつシーディング能も備えている事が分かり、変異型 SOD1 のアミロイド線維には毒性があることを確認した。予想外にも、ミトコンドリア特異的脂質成分には、精製変異型 SOD1 のアミロイド線維形成を促進する働きはなく、むしろ抑制に働くことが分かり、

ミトコンドリアが単に変異型 SOD1 の凝集の場となっている訳ではなく、阻害している面も存在する事を示唆する結果となった。

#### 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)

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

井上 信一 (Inoue Shinichi)

独立行政法人理化学研究所・田中研究ユニット・研究員

研究者番号：20466030