

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年6月9日現在

機関番号：34310
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2012～2013
 課題番号：24700391
 研究課題名(和文)
 ER-ミトコンドリア膜間領域(MAM)に蓄積する変異SOD1のALS病態への関与
 研究課題名(英文)
 Participation in ALS pathology of ALS linked mutant SOD1 proteins accumulated in MAM
 研究代表者
 渡辺 祥司(WATANABE, Shoji)
 同志社大学・高等研究教育機構・助教
 研究者番号：80462745
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費)3,400,000円、(間接経費)1,020,000円

研究成果の概要(和文)：

家族性ALSの主要な原因蛋白質である変異SOD1は、ERおよびミトコンドリアの膜間領域(MAM)に特異的に蓄積する。この現象が、運動ニューロンに対してどのような影響を与え、ALS病態とどのように関与するのかを目標に研究を進めてきた。

本研究では、MAMを主要な局在場所とするSigma-1 receptor(SigR1)に着目し、変異SOD1がMAMに蓄積することで、SigR1の機能を阻害しているのではないかと仮定を設け、研究を進めてきた。一連の解析により、SigR1が電位依存性K⁺チャネルの一つであるKv2.1やKv4.2と特異的に相互作用し、Kv2.1の局在に関与することを新たに見出した。

研究成果の概要(英文)：

SOD1 is a major causative protein of familial amyotrophic lateral sclerosis (fALS). I found that fALS linked mutant SOD1 proteins are specifically accumulated in mitochondria-ER associated membrane (MAM) fraction. The toxic mechanisms by this event, however, are still unknown.

I hypothesized that Sigma-1 receptor (SigR1), which is a major MAM protein was inhibited by the accumulation of mutant SOD1 proteins in MAM. In this study, I found two novel findings (1) SigR1 was directly interacted with Kv2.1 and Kv4.2 (2) SigR1 was related with the localization of Kv2.1. Although I need to investigate these results more, these findings might be contributed to elucidation of the pathomechanism of fALS.

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：SOD1, ALS, MAM

1. 研究開始当初の背景

(背景・国内外の研究動向)

筋萎縮性側索硬化症(ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis)は、運動ニューロンが選択的に変性する致死性の神経変性疾患である。ALSの大部分が遺伝性を認めない孤発性であるが、約10%が遺伝性である。現在までに、遺伝性ALSの原因遺伝子として多くの遺伝子が同定されているが、生体内の活性酸素を

除去する反応を触媒する酵素”Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1)”をコードする遺伝子の優性変異が最も多い(総ALS患者の約2%)。

変異によるSOD1の酵素活性は、ALSの発症には関係ないとされ、SOD1遺伝子を欠失したマウスでは神経変性は起こらないが、変異SOD1を発現するトランスジェニックマウスは進行性・致死性の運動ニューロン変性が

起こる。これらのことから、変異 SOD1 タンパク質が本来の酵素活性とは別に未知の毒性を発揮すること (gain of toxic function) が、運動ニューロン変性の原因であると考えられている。しかしながら、変異 SOD1 タンパク質による毒性発現機構は、現在も明らかになっていない。

(学術的背景)

現在までに、変異 SOD1 は小胞体関連分解 (ERAD) の抑制による神経細胞死の誘導や、ミトコンドリア内での変異 SOD1 の蓄積によるミトコンドリアが機能不全となり、神経細胞死が誘導されることが報告されている。これらの報告は、変異 SOD1 の標的となるオルガネラが単一ではなく複数存在していることを示唆している。

申請者は、変異 SOD1 により、ALS 発症の引き金となるオルガネラを特定するために、培養細胞およびモデルマウスのサンプルを用いて、変異 SOD1 の局在を詳細に調べた。その結果、ER とミトコンドリアの膜間領域 (mitochondria-associated ER membrane: MAM) に変異 SOD1 が特異的に蓄積していることが明らかとなった。

研究開始当初、MAM に変異 SOD1 が蓄積していることは報告されておらず、その生理的意義および ALS 病態への影響は不明であった。

2. 研究の目的

変異 SOD1 がミトコンドリアに局在する電位依存性アニオンチャンネル 1 (VDAC1: voltage-dependent anion channel) と非特異的な相互作用をすることにより、ミトコンドリアの機能不全が起こり、神経細胞死が誘導されるという重要な報告がされている。大部分の VDAC1 は、ミトコンドリアではなく、MAM に局在している。また、家族性 ALS の原因遺伝子の一つとして MAM に局在する Sigma-1 receptor (Sig1R) の変異が同定されている。これらのことから、ALS の病態に MAM という画分が関与している可能性は非常に高いと推測できる。さらに重要なこととして、VDAC1 や Sig1R は MAM における変異 SOD1 毒性に関与している可能性を示唆する一方で、両遺伝子のノックアウトマウスにおいて運動ニューロンの変成は見られない。したがって、MAM には VDAC1 や Sig1R 以外にも運動ニューロンに対する毒性因子が存在していることが予想される。そこで、変異 SOD1 が MAM に蓄積することにより惹起される細胞内現象が、ALS の病態とどのように関連するのか明らかにすることを本申請の目的とした。

3. 研究の方法

現在までに報告されている情報から、

MAM に障害が起こったときに誘導される細胞内現象に検討をつけるのは極めて困難である。MAM には、SOD1 と同様に、家族性 ALS の原因遺伝子として同定されている SigR1 が存在しており、MAM に異常をきたすモデルとして、SigR1 の ALS 変異体を用いた解析を行なうことにした。具体的な手法として、(1) コンフォーカル顕微鏡を用いたイメージングによる細胞内変化 (ミトコンドリアに対する影響など) (2) 密度勾配遠心法による蛋白質レベルでの変化 (凝集体形成なども併せて) を調べることにした。

SigR1 遺伝子をノックアウトするとポストシナプスでクラスターを形成している電位依存性 K⁺チャンネルの一種である Kv2.1 量が減少することが報告されている。また、ALS モデルマウスの終末期においても、同様の結果が得られることが報告されている。Kv2.1 は、運動ニューロンでのみポストシナプスに局在することが知られており、MAM の異常と Kv2.1 の局在が、密接に関係しているのではないかと推測された。そこで、(3) SigR1 と Kv2.1 に直接的な相互作用があるのか (4) 薬剤処理により、SigR1 を活性化または不活性化させたときに Kv2.1 の局在に与える影響を調べることにした。

4. 研究成果

(1) SigR1 の ALS 変異体の発現による細胞内変化: ミトコンドリアに対する影響
細胞内変化を見やすいように、細胞質が大きい COS-7 細胞を材料として選択し、単量体緑色蛍光蛋白質 (monomeric-Azami Green: mAG) を付加させた SigR1 発現ベクター (野生型および ALS 変異体である E102Q) を用いて、トランスフェクションした。その結果、ALS 変異体である SigR1 (E102Q) は、細胞内で軽度な凝集傾向を示した (図 1: mAG)。また、この変異体を発現している細胞では、ミトコンドリアの異常な伸張や断片化が僅かに見られた (図 1: Mito-tracker)。

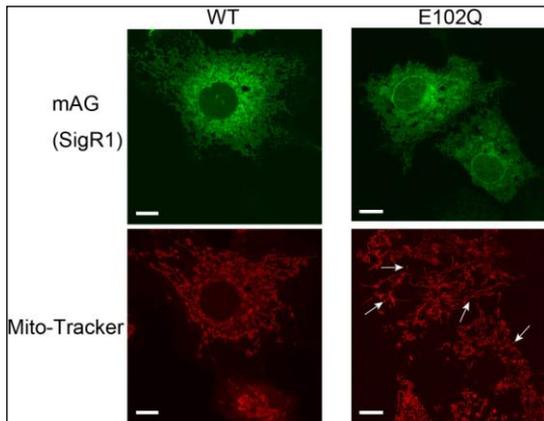


図1
COS-7細胞でSigR1(WT or E102Q)を発現させた。ALS変異体であるE102Qの変異体の発現により、ミトコンドリアの異常伸張や分断が、僅かに見られた(白矢印)。

(2) 密度勾配遠心法による蛋白質レベルでの変化

イメージングと同様に、COS-7細胞を材料とし、mAGを融合させたSigR1(野生型またはE102Q)の発現ベクターを用いてトランスフェクションした。細胞を回収し、等張液中で細胞を破碎後、Opti-prepを用いた密度勾配遠心を行ない、抗SigR1抗体でウェスタンブロッティングを行なった(図2)。定量的な解析を行なった所、僅かに変異体で変化が見られたものの、顕著な凝集傾向などは見られなかった。

MAMに異常をきたすモデルとしてSigR1のALS変異体を用いて、上記(1)(2)の解析を行なったが、顕著な異常を見出すことが出来なかった。

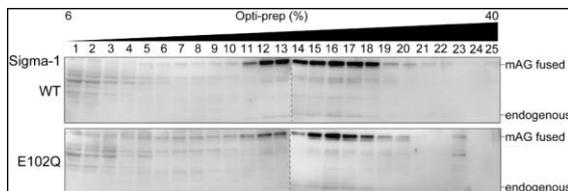


図2
SigR1(WT or E102Q)を発現させたCOS-7細胞を等張液中で破碎した細胞溶液をOpti-prep(6-40%)を用いた密度勾配遠心により分離した。各画分をSDS-PAGEで分離後、抗SigR1抗体でプロットした。WTとALS変異体であるE102Qで、大きな差は見られなかった。

(3) SigR1とKv2.1の直接的な相互作用

SigR1をノックアウトまたはALSモデルマウスの終末期では、運動ニューロンのポストシナプスでクラスターを形成しているKv2.1の量が減少することが報告されている。しかしながら、その詳細は明らかにされていない。

そこで、SigR1とKv2.1との直接的な相互作用を検討した。HEK293T細胞を材料として用い、mCherryを融合させたKv2.1またはKv4.2の発現ベクターと、mAGを融合させたSigR1(WT)の発現ベクターを用いて、トランスフェクションした。TritonX-100で可溶化した細胞抽出液を抗Kv2.1または抗RFP抗体で免疫沈降した後、各種抗体を用いてウェスタンブロッティングを行なった(図3)。興味深いことに、SigR1は、Kv2.1とだけではなく、Kv4.2とも直接相互作用していた。この結果から、SigR1は電位依存性のK⁺チャンネルと相互作用をしており、局在や機能に影響を及ぼしていることが考えられた。

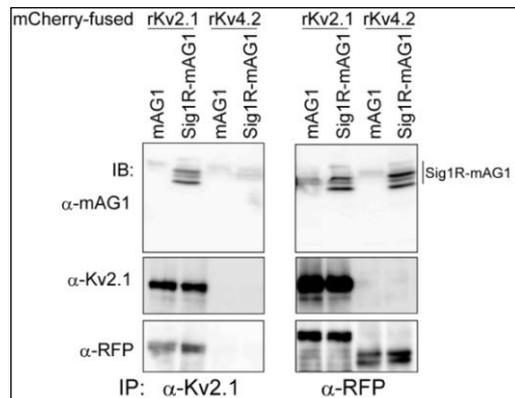


図3
mAGを融合させたSigR1とmCherryを融合させたKv2.1またはKv4.2をHEK293T細胞で共発現させた。その後、TritonX-100で細胞を可溶化し、抗Kv2.1または抗RFP抗体で免疫沈降した。溶出画分をSDS-PAGEで分離後、各種抗体でプロットした。この結果から、SigR1はKv2.1だけではなく、Kv4.2とも相互作用していることが明らかとなった。

(4) SigR1に対する薬剤処理によるKv2.1の局在に対する影響

SigR1は、麻薬様物質と特異的に結合し、活性化することが知られている。現在までに、SigR1特異的なアゴニスト(活性化剤: PRE084)およびアンタゴニスト(不活性化剤: BD1047)が開発・販売されている。そこで、ラットの海馬由来の培養神経細胞に、アゴニストまたはアンタゴニストを処理し、Kv2.1の局在に対する影響を調べた(図4)。Kv2.1は、細胞体で特徴的なクラスターを形成していることが知られているが、アンタゴニストであるBD1047で処理すると、クラスター数が顕著に減少した(図4-A)。一方、アゴニストであるPRE084で処理すると、クラスター形成が促進された(図4-B)。これらの結果は、SigR1がKv2.1のクラスター形成に重要な役割を担っていることを示唆している。

また、一部の SigR1 は Kv2.1 のクラスター内で共局在していた (data not shown) SigR1 の機能と Kv2.1 のクラスター形成との関連が見出されたことから、今後、変異 SOD1 の発現による MAM への蓄積と、Kv2.1 のクラスター形成能との関係を精査していく予定である。

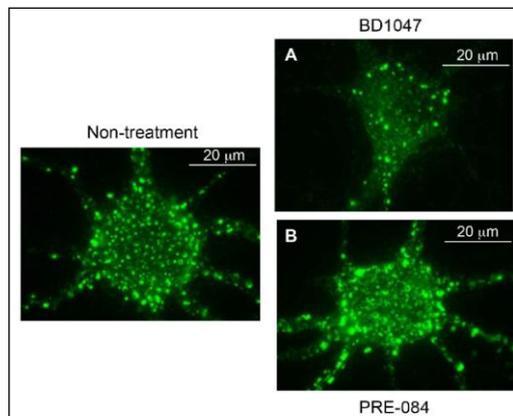


図 4
ラットの海馬由来の培養神経細胞 (培養 28 日目) に、SigR1 のアンタゴニストである BD1047 (A) またはアゴニストである PRE-084 (B) を処理した。その後、細胞を固定し、抗 Kv2.1 抗体で免疫染色を行なった。BD1047 処理により、Kv2.1 のクラスターが減少した。

以上一連の結果から、変異 SOD1 が MAM に特異的に蓄積することにより、SigR1 の機能を低下させ、Kv2.1 のクラスター形成能が失われることで、何らかの細胞毒性を示すようになったのではないかと考えられる。ALS モデルマウスの終末期や、脊髄損傷時における運動ニューロンにおいて、Kv2.1 のクラスターが消失しているという報告がされていることから、得られた結果と矛盾しない。最近、SigR1 のアゴニストが ALS モデルマウスの病態を改善するという報告がなされていることから、Kv2.1 のクラスター形成能が ALS 病態と密接に関係していることが考えられる。しかし、変異 SOD1 が MAM に蓄積することで、SigR1 の機能阻害を誘導する分子機序は不明のままであり、それを明らかにすることは今後の課題であると考えている。また、上記(3)の実験から、SigR1 は Kv2.1 だけでなく、Kv4.2 とも相互作用しており、他の電位依存性 K⁺チャネルとも相互作用し、チャネルの機能不全を誘導している可能性が考えられる。したがって、SigR1 の機能不全により影響を受ける電位依存性 K⁺チャネルを特定し、生理的のどのようなことが起きているのかを電気生理学的な解析等を取り入れ、精査することも今後の課題であると考えている。

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 2 件)

1) Jensen C. S., Watanabe, S., Rasmussen H. B., Schmitt, N., Olsen S. P., Frost N. A., Blanpied T.A., Misonou, H.

“Specific sorting and post-Golgi trafficking of dendritic potassium channels in living neuron.”
Journal of Biological chemistry., vol. 289(15), 10566-10581, 2014

2) Nomura, T.*, Watanabe, S.*, Kaneko, K., Yamanaka, K., Nukina, N., Furukawa, Y.

“Intranuclear aggregation of mutant FUS/TLS as a molecular pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis”

Journal of Biological chemistry., vol. 289(2), 1192-1202, 2014

*Equally contribution

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 祥司 (WATANABE, Shoji)
同志社大学・高等研究教育機構・助教
研究者番号：80462745

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :