

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840066

研究課題名(和文)アクチン繊維依存的な異常タンパク質の脱凝集と分解除去の新機構

研究課題名(英文) Novel mechanism of disordered protein clearance through actin filament.

研究代表者

田村 拓 (TAMURA, taku)

秋田大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80363761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：SOD1は遺伝子変異によりタンパク質凝集体を形成し、神経細胞特異的に細胞障害を引き起こし、ALSの主要な原因とされている。しかし、細胞死に至る詳細なメカニズムには不明な点が多い。申請者は、凝集するSOD1に相互作用するアクチンとそのモータータンパク質であるMyosin1bについて解析を行った。

Myosin1bを培養細胞に変異型SOD1と共に過剰発現すると、通常はアグリソームと呼ばれる封入体を形成する変異型SOD1は、細胞内に分散した。また、生化学的な解析により凝集体の量が減少したことが確認できたことから、Myosin1bが変異型SOD1の細胞内分解に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：SOD1 or superoxide dismutase 1 is one of the major incident of ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis). Genetically mutated SOD1 causes its protein aggregation specifically in neuron and eventually induces cell death. Detail in molecular mechanisms, however, in cell death induced by SOD1 aggregation. Biochemical and morphological analysis of interaction of aggregated SOD1 and actin and its motor protein Myosin1b was performed.

Overexpression of Myosin1b with mutant SOD1 in cultured cells revealed that mutated SOD1, which generally forms inclusion body (called aggresome), dispersed in whole cytoplasm. Furthermore, biochemical analysis indicated that ratio of aggregated SOD1 was decreased by the overexpression. These result suggest that Myosin1b participates the clearance of aggregated mutant SOD1 through intracellular degradation mechanism.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ALS SOD1 タンパク質凝集体 神経変性疾患 アグリソーム 脱凝集 Myosin1b

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(以下 ALS)は、筋肉の動きを制御するニューロンが死滅することで全身の筋力が低下し、呼吸や飲食に支障をきたす疾患である。発症から 3-5 年で死に至り、現在までに有効な治療法は確立されていないため、難病に指定されている¹⁾。

ALS の原因遺伝子の一つである Superoxide dismutase 1 (以下 SOD1)は、遺伝子変異によりタンパク質凝集体を形成することが知られており、ALS の発症と強く関連すると考えられている。しかし、タンパク質凝集体の形成や、その細胞毒性に関する分子メカニズムは不明な点が多く、なかでも、細胞内で形成された凝集体がどのようにタンパク質分解系に認識され分解処理されているのかは不明である。

2. 研究の目的

田村の所属する研究室では、変異型 SOD1 に特異的に相互作用する細胞由来因子として、アクチンと Myosin1b をはじめとしたアクチン結合タンパク質を複数同定した。変異型 SOD1 の細胞内分解にアクチン繊維とそのモータータンパク質が寄与している可能性を検討するために、細胞にこれらの因子を過剰発現し、変異型 SOD1 の凝集や細胞内局在を解析する目的で研究を行った。

3. 研究の方法

大量培養が比較的容易である、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞を主な実験系として用いた。変異型 SOD1 などをコードしたプラスミド発現ベクターをリポフェクション法により HeLa 細胞に導入し、目的タンパク質を発現させた。タンパク質の動態解析は、界面活性剤を含むバッファーでタンパク質を抽出し、ウ

エスタンプロット法により、定量的に検出した。界面活性剤に対する可溶性によって、タンパク質の凝集性を評価した。GFP などの蛍光タンパク質を融合した目的タンパク質を HeLa 細胞に発現させ、固定後の免疫染色や生細胞を共焦点顕微鏡による観察を行い、細胞内局在の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 変異型 SOD1 の凝集体形成における Myosin1b の効果

SOD1 は、細胞内に生じた活性酸素を無毒化する活性を持つ。しかし、遺伝子変異によりタンパク質がミスフォールドし、凝集体を形成する。ALS 罹患者の残存神経細胞からは、Lewy 小体と呼ばれる構造が観察され、異常タンパク質を標識するユビキチンなどが検出されることから、タンパク質凝集体による封入体であると考えられている。Lewy 小体が形成される過程で、異常タンパク質が細胞毒性を発揮することで ALS 発症に至るとする説が広く受け入れられているが、詳しい分子メカニズムは不明なままである。

変異型 SOD1 の細胞内分解過程を明らかにするために、HeLa 細胞に Flag タグを付加した変異型 SOD1 を発現させ、界面活性剤を含むバッファーにより抽出し、抗 Flag 抗体によるウエスタンプロット法により凝集体の形成を解析した。通常、凝集した変異型 SOD1 は細胞内のタンパク質分解系によって分解される(data not shown)。しかし、MG132 などのプロテアソーム阻害剤で処理すると凝集体が検出されることから、変異型 SOD1 の凝集体がプロテアソームで分解されていることを確認した(図 1)。この時、GFP を付加した Myosin1b を共発現させると、凝集体(P)の割合が減少した(図 1)。よって、Myosin1b が変異型 SOD1 の凝集体形成を抑制

させるか、もしくは凝集体の解体(脱凝集)を促進している可能性が示唆された。

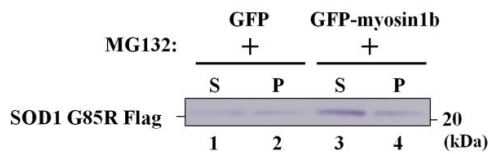


図1 GFP-Myosin1bの過剰発現は変異型SOD1の凝集体を減少させる

(2) 細胞内における変異型 SOD1 凝集体の Myosin1b による構造変化

変異型 SOD1 は、プロテアソーム阻害条件下で、培養細胞内に Lewy 小体に相当するアグリソームを形成する(図 2A)。Myosin1b のアグリソームに対する効果を検証するため、変異型 SOD1 に赤色蛍光タンパク質である mRFP を付加した発現ベクターと GFP-Myosin1b を共発現し、24 時間後に MG132 を添加した。16 時間後に細胞を固定し、それぞれのタンパク質の細胞内局在をレーザー共焦点顕微鏡で解析した。

コントロールとして GFP を共発現した変異型 SOD1 は、細胞核の近傍に凝集体を形成した(図 2A-C)。一方、GFP-Myosin1b を発現させると、凝集体が細胞質に拡散されることが観察された(図 2D-F, F inset)。Myosin1b はアクチン繊維上を移動するモータータンパク質であり、野生型ではなく変異型の SOD1 と相互作用することから、ミスフォールドした SOD1 をカーゴとし、アクチン繊維上を移動する機能があると推測される。

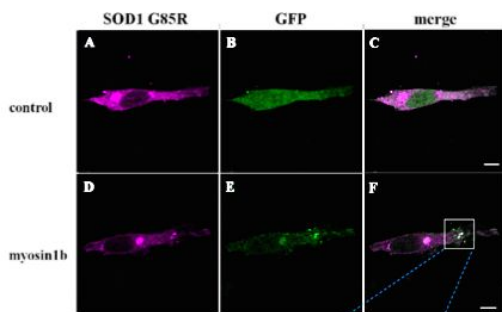


図2 GFP-Myosin1bの過剰発現は変異型SOD1の凝集体を細胞内に分散させる

(3) Myosin1b の機能的ドメインの解析

Myosin1b は、アクチン結合、可変領域およびカーゴである脂質結合部位に区分できる(図 3)。

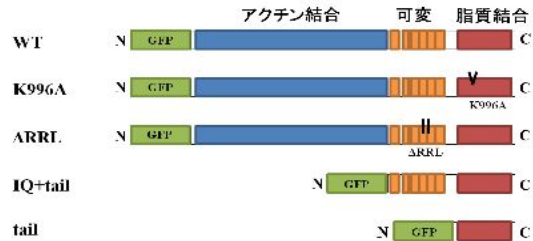


図3 Myosin1bの機能的領域と作成したコンストラクト

変異型 SOD1 の凝集体抑制効果を担う領域を同定するため、図 3 に示したようなミュータントを作成し、発現を試みた。野生型はアクチンに富んだ細胞膜に強いシグナルが観られた他、細胞質にも局在が観察された。しかし、脂質結合部位に変異を導入した K966A は細胞質にのみ局在が観察された(data not shown)。

また、これらの発現を抗 GFP 抗体によるウェスタンブロッティングで確認したところ、optineurin 結合モチーフである RRL を欠失した RRL は他のコンストラクトと比較して、顕著に凝集する傾向を示した(図 4, レーン 7 および 8)。

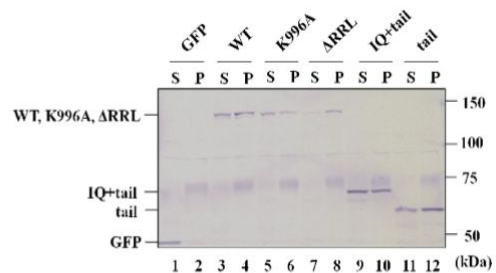


図4 optineurin結合部位を欠失したMyosin1bは凝集する
optineurin はALSの原因遺伝子の一つであり、ミスフォールドしたタンパク質のオートファジーへの輸送に関与している。Myosin1b が optineurin と相互作用できない状況で凝集することは、Myosin1b がオートファジーへカーゴである凝集体を、optineurin を介した

提示や受け渡しに阻害されている可能性が考えられる。今後は、optineurinとの連携を考慮したMyosin1bの解析を行い、変異型SOD1の分解経路の詳細が明らかにされることで、ALSへの治療に役立つ知見が得られることが期待される。

参考文献

1) ALS・運動ニューロン疾患 総編集: 辻省次、専門編集: 祖父江元 中山書店

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. Tannous, A., Patel, N., Tamura, T., & Hebert, D. N. (2015) Reglucosylation by UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase 1 delays glycoprotein secretion but not degradation. *Molecular Biology of the Cell*, 2015 26:3 390-405; doi:10.1091/mbc.E14-08-1254

2. Tamura, T., Arai, S., Nagaya, H., Mizuguchi, J., & Wada, I. (2013). Stepwise Assembly of Fibrinogen Is Assisted by the Endoplasmic Reticulum Lectin-Chaperone System in HepG2 Cells. *PLoS ONE*, 8(9), e74580. doi:10.1371/journal.pone.0074580

[学会発表](計 5 件)

1. 勝木莉子、田村 拓、北村朗、金城政孝、久保田広志

異常タンパク質の細胞内における脱凝集過程の解析 (ポスター)

岡山県岡山市 2014年11月 第9回臨床ストレス応答学会

2. 勝木莉子、田村 拓、北村朗、金城政孝、久保田広志

筋萎縮性側索硬化症原因タンパク質SOD1の脱凝集過程 (ポスター)

神奈川県横浜市 2014年11月 日本分子生物学会 第37回年会

3. 田村 拓、山田大介、久保田広志

Lysosome-dependent degradation of ALS-linked mutant SOD1 (口頭発表)

2013年11月 長野県松本市 第8回臨床ストレス応答学会

4. Taku Tamura, Akihiko Yatabe, Koji Ichinohe, Yuko Shimizu, Akira Kitamura, Masataka Kinjo and Hiroshi Kubota Actin and myosin participate in the quality control of SOD1 aggregates (ポスター)

2013年10月 秋田市 国際ミニシンポジウム Protein folding and disease

5. 田村 拓、矢田部暁彦、一戸康児、清水祐子、北村朗、金城政孝、久保田広志

アクチン・ミオシン系は筋萎縮性側索硬化症原因タンパク質SOD1変異体の凝集制御および分解に関与する (ポスターおよび口頭発表)

2013年6月 名古屋市 第65回日本細胞生物学会大会

[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]

ホームページ等

<http://kubotalabakitauniv.tumblr.com>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 拓 (Taku Tamura)

秋田大学 大学院工学資源学研究所 助教

研究者番号: 80363761

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし