



# 文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム平成 28 年度秀でた利用成果 神経変性疾患の発症に関わるタンパク質ミスフォールディング

慶應義塾大学理工学部 古川 良明, 安齋 樹 自然科学研究機構 分子科学研究所 秋山 修志, 向山 厚



(左から) 慶應義塾大学理工学部 古川 良明,安齋 樹,分子科学研究所 秋山 修志,向山 厚



多くのタンパク質は、新生ポリペプチド鎖として mRNA から翻訳された後に、天然構造と呼ばれる個々 にユニークな立体構造を構築することで、その生理機能 を発揮する. タンパク質が天然構造を獲得するまでの 「フォールディング」と呼ばれるプロセスは、生体内にお けるタンパク質機能の発現制御を理解する上で非常に重 要である.一方で、アミノ酸変異や様々な環境変化が引 き金となって、タンパク質がその天然構造を構築できず に異常な立体構造を形成することがある. このプロセス は「ミスフォールディング」と称され、タンパク質の機 能喪失や新たな毒性獲得などを通じて、アルツハイマー 病やアミロイドーシスといったコンフォメーション病と 呼ばれる様々な疾患の発症に関わると考えられている [1]. よって、ミスフォールド型タンパク質の構造・物性 を明らかにすることができれば、疾患の発症メカニズム の解明、ひいては、治療・予防法開発へと応用的に展開 することが可能となるはずである.

実際,タンパク質フォールディング・ミスフォールディ ングに関する研究は精力的に進められているものの,発 症に関わるミスフォールド構造については,多くの疾患 において不明なままであるのが現状であると私たちは考 えている.なぜなら,タンパク質のフォールディングは 天然構造と言う単一の構造へと「収斂」していくプロセ スであるのに対して、ミスフォールディングは天然構造 ではない構造への「発散」と考えることができ、ミスフォー ルド構造はほぼ無限にあるといっても過言ではないから である.例えば、精製タンパク質を非生理的な溶液条件 (化学的変性剤の添加や溶液 pH の変化)におくことでミ スフォールドさせ、その構造・物性についての詳細な評 価がなされているが、それらが患者の体内で実際に生じ るミスフォールド構造と同一であるのかは定かでない. つまり、コンフォメーション病の病理にタンパク質ミス フォールディングが果たす役割を明らかにするためには、 我々の体内で進行しうるミスフォールディングの経路を 見極める必要があると考えられる.

私 たちの研究グループでは、Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1)というタンパク質に着目し、疾患の 発症に関わるミスフォールディングについてタンパク質 科学的・病理学的な研究を進めている. SOD1 は筋萎縮性 側索硬化症 (ALS)で最初に同定された責任遺伝子で [2], 150 種類以上の病因性変異が現在までに報告されている [3]. ALS は重篤な筋萎縮を主症状とする神経変性疾患で、 脊髄運動ニューロンが選択的に変性・脱落することが知 られているものの、その病理については未だ不明な点が 多く、予防・治療法は確立していない. モデル動物を利 用した ALS 病理の研究は比較的多く [4]、マウスに変異 SOD1 タンパク質を発現させることで ALS 様の症状を再 現できるのに対して [5], SOD1 遺伝子をノックアウトし たマウスは ALS 様の症状を呈さないことが報告されてい る [6]. よって,変異に伴う SOD1 の生理機能低下が ALS を発症させる要因ではなく,神経毒性につながる新たな 物性を SOD1 が変異によって獲得すると考えられている. 特に, ALS の病変部位である脊髄運動ニューロンには変 異 SOD1 が異常に蓄積していることからも [7],変異によ る SOD1 のミスフォールディングが毒性の発揮に関与し ているのではないかと提案されている.

SOD1 はホモ二量体で,各々のサブユニットに銅・亜鉛 イオンが結合し,分子内ジスルフィド(S-S)結合が形成 することで,非常に安定な天然構造へとフォールディン グするタンパク質である(図1).しかし,病因性変異に よって,金属イオンとの親和性や分子内S-S結合の安定 性が低下し[8][9],SOD1の構造はミスフォールドするこ とが提案されている.特に,私たちの研究グループでは, ALSのモデルマウスが疾患を発症すると,SOD1 がS-S結 合でクロスリンクされた異常なオリゴマー(S-Sオリゴ マー)が形成することを初めて見いだしている[10].そ こで,タンパク質分子レベルでのALS病理を理解するた めには,S-Sオリゴマーの構造や形成メカニズムを明らか にする必要があると考え,タンパク質構造・物性解析の ための研究設備が充実している分子科学研究所と共同研 究を開始するに至った.なかでも特に,文部科学省ナノ テクノロジープラットフォーム事業(分子・物質合成プ ラットフォーム)として利用が可能である円二色性分光 装置(CD),及び,X線小角散乱装置(SAXS)を通じて(図 2),ミスフォールド型SOD1の溶液構造を明らかにした (詳細な実験内容・結果については,[11]を参照されたい). 能を発揮する.通常はS-S結合の形成に関与しないCys6/ Cys111(橙色)についても示した.



# 1 示差走査熱量分析(DSC)による SOD1の 熱変性解析

In vitro/in vivo のいずれの条件においても,ALS 変異 の導入に伴って SOD1 と金属イオンとの親和性が低下す ることが報告されている [8][12][13].そこで,ALS 変異 の一つである G37R 変異を有した SOD1 を作製し,銅・ 亜鉛イオンを結合していないアポ型タンパク質の示差走 査熱量分析を行うことで,SOD1 の熱変性について評価し



図 1 SOD1のX線結晶構造(PDB ID: 1HLA) SOD1は、銅イオン(青色)、及び、亜鉛イオン(赤色)を結合し、サブユニット内に S-S 結合(黄色)を形成することで機能を発揮する.通常はS-S 結合の形成に関与しない Cys6/Cys111(橙色)についても示した.



図 2 (左)円二色性分光装置(CD),(右)X 線小角散乱装置(SAXS)

た. その際, 熱変性によって S-S 結合によるクロスリンク が生じないように、SOD1 の S-S 結合に関与する Cvs 残基 (Cys57/Cys146) 以外の2つのCys 残基(Cys6/Cys111) を Ser に置換した pSOD1 を使用して実験を行った(図 1). 既に報告されているように [14],アポ型 pSOD1 の融点 (変性中点, Tm)はG37R 変異が導入されることで低下し, タンパク質の熱安定性が低下することが確認されたもの の、サーモグラムをより詳細に検討すると、観察される 吸熱ピークが左右対称の形状をしておらず(図3A),ア ポ型 pSOD1 の熱変性は天然状態(F状態)と変性状態(U 状態)の単純な二状態転移(F⇔U)では説明できなかった. 代わりに,中間的な状態(1状態)が熱変性過程において 存在すると考えることで実験結果をうまく説明すること ができた (*F*⇔*I*⇔*U*). 特に, 生理的温度である 37℃付 近では、pSOD1の大部分がF状態にあると考えられるの に対して、G37R変異型 pSOD1 では状態転移を示唆する 吸熱が既に始まっており(図 3A), I状態として存在して いることが示唆された.

# 2.2 円二色性分光(CD)を利用した SOD1 の二次 構造解析

DSC 測定により得られた結果をもとにすると、ALS 変 異が導入されたアポ型 SOD1 は、生体内環境(37°C)に おいて*I* 状態にミスフォールドしていることが考えられ た.そこで、タンパク質の二次構造情報を得ることがで きる CD スペクトルを測定し、G37R 変異型 pSOD1 の*I* 状態の構造について検討した.比較的低い温度(20°C付 近)では、210nm 付近に負のピークを示す CD スペクト ルが得られ、 $\beta$ -シートに富んだ構造の形成が確認された (図 3B 青).しかし、溶液の温度を上昇させて 37°C付近 にすると、 $\beta$ -シートに特徴的な 210nm 付近の CD シグナ ルは消失し、ランダムコイル構造に見られる 200nm の負 のピークを示す CD スペクトルに変化した(図 3B 赤). よっ て,変異型 SOD1 が 37℃付近で形成する I 状態においては, 二次構造がほぼ消失していると考えられるものの, DSC により得られるサーモグラムが示すように,溶液の温度 をさらに上昇させることで,いわゆる変性状態(U 状態) への転移を示す吸熱過程が観察される(図 3A).つまり, I 状態は二次構造を消失した状態ではあるものの,U 状態 とは異なることが示唆されるが,37℃で優勢に存在する I 状態とは,いったいどのような構造をしているのだろう か?

# 2.3 X線小角散乱 (SAXS) による SOD1 のコンフォ メーション解析

そこで,タンパク質の溶液構造に関する情報を提供す る SAXS を利用し、I 状態のコンフォメーション(タンパ ク質の形状)の検討を行った.具体的には,G37R変異 型 pSOD1 の散乱曲線を 10℃から 60℃まで溶液温度を変 化させて測定し、各々の散乱曲線についてギニエ解析を 行うことで,各温度における慣性半径 Rg,ならびに,相 対分子質量*M*<sub>r</sub>を算出した.その結果,溶液温度が40℃ 以下で得られる R<sub>a</sub>は 20.9Å, SOD1 の天然状態の結晶 構造から計算される値とほぼ同一であった(図4A).ま た, M, はおよそ 32,000 と計算され, SOD1 (分子量: 16,000)の天然状態がホモ二量体として存在することと 一致した(図4B).一方で,溶液温度が40℃以上になる と、R<sub>g</sub>は増大し、M<sub>r</sub>は減少することから、G37R 変異型 pSOD1がU状態へ熱変性していることが確認できた(図 4A, B). つまり, 37℃における SOD1 の I 状態は, 二次 構造が消失しているものの,天然構造とほぼ同じR。を有 したコンパクトな構造で、ホモ二量体として存在するこ とが考えられた.実際,37℃で測定した散乱曲線のクラ ツキープロットにも極大が確認されることから(図4C),



#### 図 3 アポ型 pSOD1 の熱変性

(A) pSOD1 (○),及び,G37R 変異型 pSOD1 (●)のDSC 測定により得られたサーモグラム.点線はガウス曲線によるフィットを示す.
(B)G37R 変異型 pSOD1 の CD スペクトルの温度変化.10℃から 60℃まで温度を変化させてスペクトル測定を行った.20℃,及び,37℃で得られた CD スペクトルを,それぞれ青色,赤色で示した.

*I* 状態にある G37R 変異型 pSOD1 はコンパクトな構造を 有していることが示唆された.

## 2.4 SOD1のS-Sオリゴマー形成メカニズム

生理的な温度条件である 37℃において、ALS 変異を有 したアポ型 SOD1 は I 状態として存在し、天然構造とほ ぼ変わらないコンパクトな全体構造を有していたものの, 二次構造含量が大きく低下した状態であることが分かっ た. そこで, 全ての Cys 残基を有した本来の SOD1 を用 いて、アポ型のG37R変異SOD1を37℃に静置したとこ ろ, S-S 結合でクロスリンクされた S-S オリゴマーを容易 に形成することが分かった(図4D).一方で,溶液温度 を30℃以下にすることでF状態を優勢にすると、オリゴ マー形成が認められなくなった (図 4D). 私たちのグルー プでは、SOD1のミスフォールディングに伴って、S-S結 合形成に通常は関与しない2つのCys 残基(Cys6/111) が、分子内 S-S 結合を形成する Cys57/146 を求核攻撃 し、S-S結合がシャッフルするメカニズムを提唱してき た[15]. 実際,結晶構造に代表されるようなF状態では, Cys6/111はCys57-Cys146のS-S結合から距離的に離れ ており、シャッフルが生じるような求核攻撃を可能にす るような位置関係にはない(図1).しかし、変異の導入 に伴って、二次構造含量が低下した*I*状態へと移行するこ とで、S-S 結合のシャッフルが分子内・間で可能となり、 S-S オリゴマーが形成するのではないかと推察された.つ まり、本研究で見いだした*I*状態は SOD1 オリゴマー化の 前駆体ではないかと考えられた.

### 2.5 ALS 病理において見られる S-S オリゴマー

さらに私たちは,SOD1のS-Sオリゴマー形成が,試験 管内だけでなく生体内環境においても進行し,ALSの発 症に関与するのかについても研究を進めている.特に近 年には,試験管内にて作製したS-Sオリゴマーを抗原とし てウサギを免疫することで,S-Sオリゴマーを特異的に認 識する抗体(S-Sオリゴマー抗体)を作製・精製すること に成功した[16].私たちのS-Sオリゴマー抗体は非常に 認識特異性が高く,SOD1のフォールド型はもちろんのこ と,酸や変性剤で変性させたSOD1,及び,不溶性の凝集 体とは反応せず,可溶性のS-Sオリゴマーのみを認識する ことが分かった.そこで,S-Sオリゴマー抗体を用いて,



#### 図 4 SOD1 コンフォメーションの温度変化

(A, B) 各温度において得られた pSOD1 (黒),及び,G37R 変異型 pSOD1 (赤)の散乱曲線に対してギニエ解析を施すこ とで得られる (A) 慣性半径 R<sub>g</sub>,及び,(B) 相対的分子質量 *M*,を示した.(C) 各温度における G37R 変異型 pSOD1 の散乱 曲線のクラツキープロットを示した.(D) アポ型の G37R 変異 SOD1 を,ゲル上部に示した温度で 16 時間静置した後に,SDS-PAGE による解析を行った.

ALS モデルマウスや ALS 患者における S-S オリゴマーの 免疫化学的検出を試みたところ,病変が限定的である小 脳や脊髄後角領域では免疫化学的なシグナルが検出され なかった一方で,主要な病変部位である脊髄運動ニュー ロンには S-S オリゴマーの形成が認められた(図 5).ま た,脊髄に検出される S-S オリゴマー量は病期の進行に伴 い増加したことから(図 5),変異 SOD1 のオリゴマー化 が ALS の発症に関与していることが考えられた.



本研究において、ALS 変異型の SOD1 は、金属イオン との親和性が低下し、高い構造安定性を失うことで、生 理的環境では*I*状態として存在することが示された. さら に、変異型 SOD1 の*I*状態は、天然構造にみられるような 非常にコンパクトなホモ二量体としての形状を維持して



図 5 生体内における S-S オリゴマーの形成と ALS

(A) G93A 変異 SOD1 を発現させた ALS のモデルマウスから, 腰髄(赤色), 頚髄(緑色), 脳幹(青色), 及び,小脳(灰色)を取り出してホモジナイズし, S-S オリゴマー抗体を用いたサンドウィッチ ELISA によって S-S オリゴマーの検出を行った. 各々の組織において, 30 日齢でのデータに対する統計的有意性についても示した(\*\*: P<0.01).

(B) SOD1 遺伝子に C111Y 変異を有する ALS 患者の腰髄(前角領域)切片を S-S オリゴマー抗体で免疫染色したもの. 運動ニューロン内に染色が認められ, S-S オリゴマーの形成が示唆される.



図 6 本研究で提案する SOD1 のミスフォールディング経路

アポ型の変異 SOD1 は, 生理的温度(37℃)付近では1状態として存在し, S-S 結合が分子内・間でシャッフルしや すい状況にあると考えられる. S-S 結合がシャッフルすることで S-S オリゴマーが形成し, ALS の発症や病態の進行に 寄与していることが推察される. いるにもかかわらず,二次構造含量が大幅に低下してお り,システイン残基の間で S-S 結合がシャッフルし,S-S オリゴマーが容易に形成しうる状態にあることが示唆さ れた(図6).また,ALSの病期が進むにつれて,S-S オ リゴマーが病変部位である脊髄運動ニューロンに蓄積し ていくことから,S-S オリゴマーの形成は ALS 病態に関 連した SOD1 のミスフォールディング経路であることが 考えられた.現在は,これらの知見をもとにして,変異 SOD1 における F から I への状態転移,ならびに,S-S オ リゴマーの形成過程をターゲットとすることで,疾患に 関連したミスフォールディング経路を抑制できる薬剤の 開発を進めている [17].



本研究において中心的な役割を果たした実験手法であ る CD, 及び, SAXS の測定については, 文部科学省ナノ テクノロジープラットフォーム事業(分子科学研究所 分子・物質合成プラットフォーム)からの支援を受けて 実施された.また,DSCを用いた熱変性の評価についても, 分子科学研究所の共同利用を通じて得られた成果である. 実施機関(分子科学研究所)の担当者である秋山 修志教 授,及び,向山 厚助教には,装置の扱い方や測定手法は もちろんのこと、サンプル調製に関する指導から、具体 的なデータ解析に至るまで、手取り足取りのお世話になっ た. 特に, SAXS については, 単なる装置利用に留まらず, 有効的かつ友好的な共同研究として大いに勉強させて頂 いた. また, モデルマウスのサンプルは, 名古屋大学環 境医学研究所の山中 宏二教授,慶應義塾大学薬学部の三 澤 日出巳教授に、ALS 患者のサンプルについては、まつ もと医療センター神経内科の大原 慎司副院長に提供して 頂いた. この場を借りて深謝する次第である.



- F. Chiti, C.M. Dobson, Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, Annu Rev Biochem, 75 (2006) 333-366.
- [2] D.R. Rosen, T. Siddique, D. Patterson, D.A. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J.P. O'Regan, H.X. Deng, Z. Rahmani, A. Krizus, D. McKenna-Yasek, A. Cayabyab, S.M. Gaston, R. Berger, R.E. Tanzi, J.J. Halperin, B. Herzfeldt, R. van den Bergh, W.Y. Hung, T. Bird, G. Deng, D.W. Mulder, C. Smyth, N.G. Laing, E. Soriano, M.A. Pericak-Vance, J. Haines, G.A. Rouleau, J.S. Gusella, H.R. Horvitz, R.H.J. Brown, Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis, Nature,

362 (1993) 59-62.

- [3] O. Abel, J.F. Powell, P.M. Andersen, A. Al-Chalabi, ALSoD: A user-friendly online bioinformatics tool for amyotrophic lateral sclerosis genetics, Hum Mutat, 33 (2012) 1345-1351.
- [4] B.J. Turner, K. Talbot, Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1mediated familial ALS, Prog Neurobiol, 85 (2008) 94-134.
- [5] M.E. Gurney, H. Pu, A.Y. Chiu, M.C. Dal Canto, C.Y. Polchow, D.D. Alexander, J. Caliendo, A. Hentati, Y.W. Kwon, H.X. Deng, et al., Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation, Science, 264 (1994) 1772-1775.
- [6] A.G. Reaume, J.L. Elliott, E.K. Hoffman, N.W. Kowall, R.J. Ferrante, D.F. Siwek, H.M. Wilcox, D.G. Flood, M.F. Beal, R.H. Brown, Jr., R.W. Scott, W.D. Snider, Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury, Nat Genet, 13 (1996) 43-47.
- [7] L.I. Bruijn, M.K. Houseweart, S. Kato, K.L. Anderson, S.D. Anderson, E. Ohama, A.G. Reaume, R.W. Scott, D.W. Cleveland, Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1, Science, 281 (1998) 1851-1854.
- [8] L.J. Hayward, J.A. Rodriguez, J.W. Kim, A. Tiwari, J.J. Goto, D.E. Cabelli, J.S. Valentine, R.H. Brown, Jr., Decreased metallation and activity in subsets of mutant superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis, J Biol Chem, 277 (2002) 15923-15931.
- [9] A. Tiwari, L.J. Hayward, Familial amyotrophic lateral sclerosis mutants of copper/zinc superoxide dismutase are susceptible to disulfide reduction, J Biol Chem, 278 (2003) 5984-5992.
- [10] Y. Furukawa, R. Fu, H.X. Deng, T. Siddique, T.V. O'Halloran, Disulfide cross-linked protein represents a significant fraction of ALS-associated Cu, Znsuperoxide dismutase aggregates in spinal cords of model mice, Proc Natl Acad Sci USA, 103 (2006) 7148-7153.
- [11]I. Anzai, E. Tokuda, A. Mukaiyama, S. Akiyama, F. Endo, K. Yamanaka, H. Misawa, Y. Furukawa, A misfolded dimer of Cu/Zn-superoxide dismutase leading to pathological oligomerization in amyotrophic lateral sclerosis, Protein Sci, 26 (2017) 484-496.

- [12] P.A. Jonsson, K.S. Graffmo, P.M. Andersen, T. Brannstrom, M. Lindberg, M. Oliveberg, S.L. Marklund, Disulphide-reduced superoxide dismutase-1 in CNS of transgenic amyotrophic lateral sclerosis models, Brain, 129 (2006) 451-464.
- [13] H.L. Lelie, A. Liba, M.W. Bourassa, M. Chattopadhyay, P.K. Chan, E.B. Gralla, L.M. Miller, D.R. Borchelt, J.S. Valentine, J.P. Whitelegge, Copper and zinc metallation status of copper-zinc superoxide dismutase from amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice, J Biol Chem, 286 (2011) 2795-2806.
- [14] J.A. Rodriguez, B.F. Shaw, A. Durazo, S.H. Sohn, P.A. Doucette, A.M. Nersissian, K.F. Faull, D.K. Eggers, A. Tiwari, L.J. Hayward, J.S. Valentine, Destabilization of apoprotein is insufficient to explain Cu,Zn-superoxide dismutase-linked ALS pathogenesis, Proc Natl Acad Sci USA, 102 (2005) 10516-10521.

- [15] K. Toichi, K. Yamanaka, Y. Furukawa, Disulfide scrambling describes the oligomer formation of superoxide dismutase (SOD1) proteins in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis, J Biol Chem, 288 (2013) 4970-4980.
- [16] E. Tokuda, I. Anzai, T. Nomura, K. Toichi, M. Watanabe, S. Ohara, S. Watanabe, K. Yamanaka, Y. Morisaki, H. Misawa, Y. Furukawa, Immunochemical characterization on pathological oligomers of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis, Mol Neurodegener, 12 (2017) 2.
- [17] I. Anzai, K. Toichi, E. Tokuda, A. Mukaiyama, S. Akiyama, Y. Furukawa, Screening of drugs inhibiting in vitro oligomerization of Cu/Zn-superoxide dismutase with a mutation causing amyotrophic lateral sclerosis, Front Mol Biosci, 3 (2016) 40.

(慶應義塾大学理工学部 古川 良明)

