

## 論文の内容の要旨

# 筋萎縮性側索硬化症において SOD1 変異が細胞毒性を発揮する共通の分子機構

藤澤 貴央

### 【序論】

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS) は上位・下位運動神経が選択的に侵される進行性の神経変性疾患である。発病後 3~5 年で死に至る極めて重篤な疾患であり、日本国内における患者数は約 8500 人、全世界では 60 万人を超えるといわれている。しかし、治療薬開発への取り組みが遅れており、現在までに病態分子機構に基づく根本的な治療法は存在しない。1993 年に ALS の原因遺伝子の一つとして、*Cu, Zn superoxide dismutase* (SOD1) が発見された。この SOD1 遺伝子変異によって産生される変異型 SOD1 タンパク質は、その獲得性細胞毒性によって運動神経細胞死を誘導することが示されている。しかし、これまでに報告されている 130 種類以上もの SOD1 遺伝子変異が運動神経細胞毒性を発揮する共通の分子機構を実験的に示した報告は皆無であった。2008 年、当研究室において 3 種類の変異型 SOD1(A4V、G85R、G93A)が、小胞体関連分解 (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation : ERAD) に関わる小胞体膜タンパク質 Derlin-1 の C 末端 12 アミノ酸(CT4)に結合し、Derlin-1 の獲得性機能異常を誘導して、小胞体ストレスを介した運動神経細胞死を引き起こすことが明らかにされた(参考文献)。そこで私は、Derlin-1 との結合を介した小胞体ストレス誘導が全ての変異型 SOD1 に共通するか否かを実験的に検討し、さらに、変異型 SOD1 が Derlin-1 と結合する分子機構を明らかにすることで、ALS 発症の共通の分子機構を解明しようと試みた。

## 【方法と結果】

### 1. 124 種類の変異型 SOD1 が Derlin-1 と結合する。

まず、ALS online database に登録されている 132 種類の変異型 SOD1 の発現ベクターを作製し、Derlin-1(CT4)との結合を共免疫沈降実験により検討した。その結果、驚くべきことに、124 種類もの変異型 SOD1 が Derlin-1(CT4)と結合することが明らかとなった(図 1)。この結果は、Derlin-1 との結合およびそれによって誘導される小胞体ストレスが、ほとんどの変異型 SOD1 に共通する毒性発揮機構であることを示唆している。

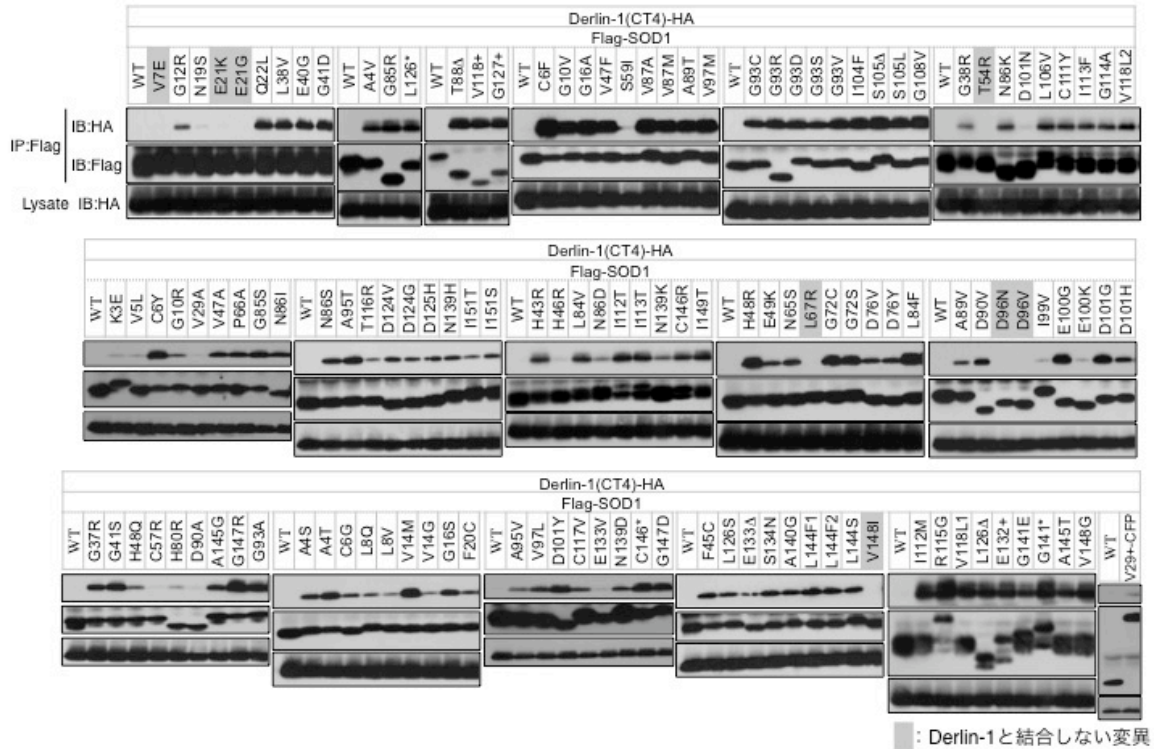


図 1. 132 種類の変異型 SOD1 と Derlin-1(CT4)の結合の検討

### 2. Derlin-1 と結合しない変異型 SOD1 は小胞体ストレスを誘導しない。

一方で、8 種類の変異型 SOD1 は Derlin-1 と結合しなかった。これらの変異型 SOD1 が小胞体ストレス誘導性運動神経細胞死に関与するか否かを明らかにするために、8 種類の変異型 SOD1 が小胞体ストレスを引き起こすかどうか検討した。運動神経系細胞である NSC34 細胞に Derlin-1 と結合する変異型 SOD1(G93A)を発現させると、小胞体ストレスによって発現誘導されるマーカータンパク質 Herp の誘導と、小胞体ストレス受容体 IRE1 の活性化依存的に起こる Xbp-1 の mRNA スプライシングが観察された。しかし、Derlin-1 と結合しない変異型 SOD1 を発現させても、野生型 SOD1 を発現させた場合と同程度にしか Herp の誘導や Xbp-1 の mRNA スプライシングは見られなかった(図 2)。よって、8 種類の変異型 SOD1 は、少なくとも小胞体ストレス誘導を介した神経細胞死を誘導しないことが示唆された。

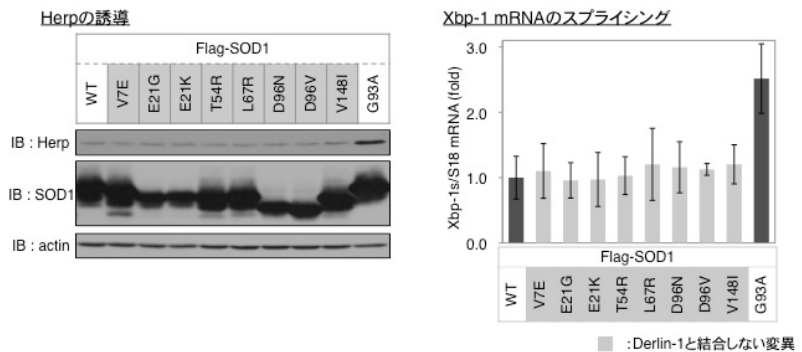


図 2. Derlin-1 と結合しない変異型 SOD1 による小胞体ストレスの検討

### 3. 野生型 SOD1 は Derlin-1 結合領域を保持している。

次に、変異型 SOD1 が Derlin-1 と結合する分子機構を検討した。SOD1 の遺伝子変異は SOD1 遺伝子の 5 つの exon 全てに分布しており、124 種類もの変異型 SOD1 のそれぞれが、各変異部位に新たに Derlin-1 との結合面を形成するとは考えにくい。そこで、野生型 SOD1 は元々 Derlin-1 結合領域を持っているが、その領域は普段は隠されており、SOD1 に遺伝子変異が入ると構造が変化して Derlin-1 結合面が露出してくるのではないかと考えた。

この仮説を検証するため、まず Derlin-1 と結合する 2 種類の変異型 SOD1 (G85R、G93A) の Derlin-1 結合領域のマッピングを行った。どちらの変異体も、N 末端 20 アミノ酸の欠損変異体は Derlin-1 (CT4) と結合せず (図 3 左)、また、SOD1 の N 末端 20 アミノ酸が全長の変異型 SOD1 (G93A) と同程度の強さで Derlin-1 (CT4) と結合した (図 3 右)。よって、SOD1 の N 末端 20 アミノ酸が Derlin-1 との結合に必要十分であることが明らかになった。さらに結合領域を絞り込んだところ、SOD1 の 5-18 アミノ酸が Derlin-1 結合領域 (Derlin-1 binding region : DBR) であることが明らかとなった。以上の結果から、元々野生型 SOD1 には DBR が存在しており、遺伝子変異が入ることによって DBR が露出する可能性が示唆された。

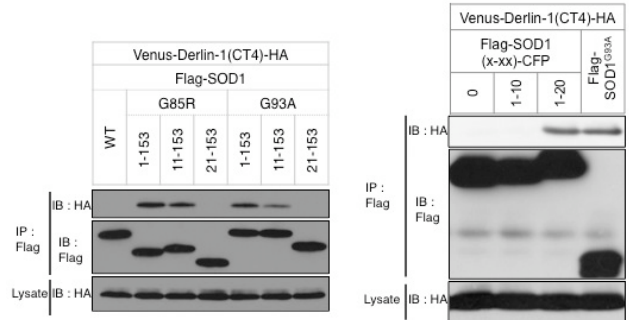


図 3. SOD1 の Derlin-1 結合領域の検討

### 4. Derlin-1 と結合する変異型 SOD1 は DBR を露出している。

次に、Derlin-1 と結合する変異型 SOD1 が、DBR を露出しているかどうかを生化学的に検証するため、当研究室において、DBR を免疫源としたモノクローナル抗体 (抗変異型 SOD1 抗体) を作製した。この抗体を用いて SOD1 の免疫沈降実験を行ったところ、野生型 SOD1 は免疫沈降されず、抗体のエピトープ部位の変異体を除いた全ての Derlin-1 と結合する変異型 SOD1 が免疫沈降された (図 4)。よって、Derlin-1 と結合可能な変異型 SOD1 は全て、「DBR の露出」という共通の構造変化を起こしていることが明らかとなった。

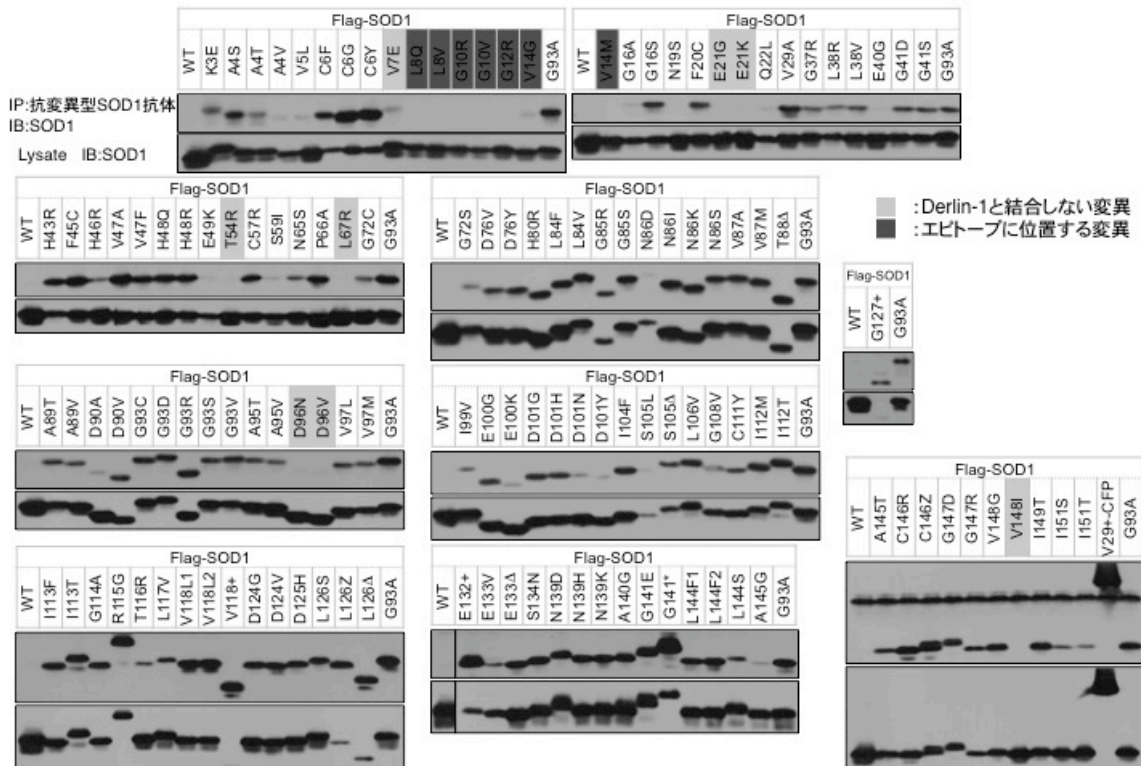


図 4. 全変異型 SOD1 の DBR 露出の検討

**5. SOD1 遺伝子変異を持つ ALS 患者由来の細胞中の内在性 SOD1 は DBR を露出している。**

最後に、DBR の露出が実際にヒトの ALS に関与しているかどうかを検討した。本学医学部神経内科よりご提供頂いた SOD1 遺伝子変異を持つヒト ALS 患者由来の B 細胞中の SOD1 を、抗変異型 SOD1 抗体により免疫沈降したところ、SOD1 遺伝子変異を有する ALS 患者由来の全ての細胞で SOD1 が免疫沈降された(図 5)。この結果は、DBR の露出という構造変化が、ヒト ALS の病因に関与している可能性を強く示唆している。

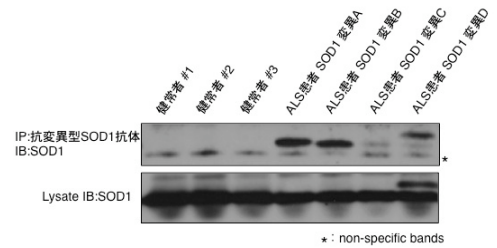


図 5. ヒト ALS 患者の細胞中の SOD1 の DBR 露出の検討

**【まとめ・考察】**

本研究において私は、ALS 病態に関連するほぼ全ての変異型 SOD1 が、野生型 SOD1 では隠されている DBR を露出し、Derlin-1 と結合することで小胞体ストレス誘導性運動神経細胞死を引き起こすことを明らかにした。本研究結果は、これまで未解明であった多くの SOD1 遺伝子変異による ALS 発症の共通の分子機構の一つを提示するものである。さらに、今回作製された抗変異型 SOD1 抗体は、世界で初めての ALS 分子標的診断ツールとしての可能性を有する。近年、孤発性 ALS 患者の組織中において、小胞体ストレス誘導および野生型 SOD1 の構造変化が報告されている。また、当教室において、生理的ストレスによって野生型 SOD1 が DBR を露出することを見出している。よって、SOD1 以外の遺伝子変異・ALS 危険因子・脊髄内の何らかの環境的因子などによって野生型 SOD1 が DBR を露出することで、Derlin-1 への結合を介した小胞体ストレスを引き起こし、SOD1 遺伝子変異によらない ALS の発症に関与している可能性が考えられる。今後、野生型 SOD1 と ALS の関わりをさらに検討していきたい。

**【参考文献】** Nishitoh H. *et al.* ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev.* (2008).