

Title	神経変性疾患の病態を進行させる分子メカニズムの解明
Sub Title	Molecular mechanism underlying propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative disorders
Author	徳田, 栄一(Tokuda, Eiichi)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>筋萎縮性側索硬化症(ALS)の責任病巣ではCu/Zn-superoxide dismutase(SOD1)タンパク質の不溶性凝集体が異常蓄積している。病変部位は疾患の進行とともに、拡大していくことが知られている。本課題では、ALSの病変部位拡大の分子メカニズムを、SOD1凝集体のシーディング現象の観点から明らかにすることを目的とした。SOD1トランスジェニック線虫にシードとしてSOD1凝集体を暴露し、生体内でシーディング現象が誘導されるか検討した。しかしながら、体内でSOD1の凝集化は誘導されなかった。さらに、シードを導入しても線虫の生存期間および運動機能に変化は認められなかった。</p> <p>Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common motor neuron disease. The disease begins focally and spreads contiguously, resulting in progressive paralysis. The pathological hallmark of ALS is the accumulation of insoluble protein aggregates containing Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) in motor neurons. The aim of this project was to clarify a molecular mechanism underlying the spread of lesion sites in the disease from the viewpoint of seeding activity of insoluble SOD1 aggregates. I first established two different methods : oral intake of E.coli forming the aggregates by thermoregulation, and exposure of the purified aggregates. Although transgenic C.elegans harboring human SOD1 were fed with the aggregates, feeding with either E.coli forming the aggregates or the purified aggregates did not induce the aggregation of human SOD1 in C.elegans. Furthermore, these aggregates did not affect overall lifespan and motor function of C.elegans.</p>
Notes	研究種目：研究活動スタート支援 研究期間：2015～2016 課題番号：15H06588 研究分野：生化学, 病態生理学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15H06588seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15H06588seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06588

研究課題名(和文) 神経変性疾患の病態を進行させる分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism underlying propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative disorders

研究代表者

徳田 栄一 (Eiichi, Tokuda)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・助教

研究者番号：00757510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)の責任病巣ではCu/Zn-superoxide dismutase(SOD1)タンパク質の不溶性凝集体が異常蓄積している。病変部位は疾患の進行とともに、拡大していくことが知られている。本課題では、ALSの病変部位拡大の分子メカニズムを、SOD1凝集体のシーディング現象の観点から明らかにすることを目的とした。SOD1トランスジェニック線虫にシードとしてSOD1凝集体を暴露し、生体内でシーディング現象が誘導されるか検討した。しかしながら、体内でSOD1の凝集は誘導されなかった。さらに、シードを導入しても線虫の生存期間および運動機能に変化は認められなかった

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common motor neuron disease. The disease begins focally and spreads contiguously, resulting in progressive paralysis. The pathological hallmark of ALS is the accumulation of insoluble protein aggregates containing Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) in motor neurons. The aim of this project was to clarify a molecular mechanism underlying the spread of lesion sites in the disease from the viewpoint of seeding activity of insoluble SOD1 aggregates. I first established two different methods: oral intake of E.coli forming the aggregates by thermoregulation, and exposure of the purified aggregates. Although transgenic C.elegans harboring human SOD1 were fed with the aggregates, feeding with either E.coli forming the aggregates or the purified aggregates did not induce the aggregation of human SOD1 in C.elegans. Furthermore, these aggregates did not affect overall lifespan and motor function of C.elegans.

研究分野：生化学、病態生理学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 タンパク質凝集体 シーディング 線虫

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、骨格筋萎縮を主症状とする予後不良な神経変性疾患である。ALS の臨床的な特徴は、発症直後の病変部位は非常に局所的 (例えば、片手の筋力低下のみ出現) であるにも関わらず、病態の進行とともに病変部位が急激に拡大していくことである。一方、病理学的な特徴として、責任病巣である運動ニューロン内に Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) などの疾患関連タンパク質の不溶性凝集体の異常蓄積が挙げられる。タンパク質の不溶性凝集体は構造的な鋳型 (シード) として機能することで、さらなるタンパク質の線維化を爆発的に促進することが知られている (シーディング)。

本課題を構想した段階で、このような不溶性 SOD1 凝集体のシーディング現象が、ALS における病態の拡がりを制御していることが提唱されていたが、それらを直接的に明らかにした知見は報告されていなかった。

## 2. 研究の目的

本課題では、ALS の病変部位拡大の分子メカニズムを、不溶性 SOD1 凝集体のシーディング現象の観点から明らかにすることを目的とした。具体的には、以下の 2 項目に焦点を当てた。

- (1) SOD1 凝集体のシーディング現象を *in vivo* で簡便かつ評価/再現できる新たなモデル動物の構築。
- (2) 構築したモデル動物を用いて、不溶性 SOD1 凝集体のシーディングが ALS 様の表現型 (運動機能低下、致死性) を誘発するかどうかの検証。

## 3. 研究の方法

本課題では線虫 (*C. elegans*) をモデル動物として用い、以下の実験を遂行した。

### (1) 線虫体内への SOD1 シードの導入

線虫が大腸菌をエサとして食する特徴に着目し、大腸菌内に不溶性 SOD1 凝集体を形成させ、大腸菌とともに凝集体を摂取させることで、線虫体内にシードを導入させる方法を構想した。

ヒト野生型 SOD1 またはヒト変異型 SOD1 遺伝子を含むベクターを BL21 大腸菌にトランスフォームし、菌内に不溶性 SOD1 凝集体を形成させた。大腸菌内に形成した SOD1 凝集体が不溶化していることを確認するため、界面活性剤 Triton X-100 で溶菌後、不溶性画分をウェスタンブロット法で解析した。

さらに、大腸菌内に形成した SOD1 凝集体

を、精製 SOD1 タンパク質を含む溶液に添加し、溶液濁度の増加を指標とすることで、シードとしての機能も評価した。

### (2) ヒト SOD1 を発現した線虫の作製

線虫は大腸菌を経口的に摂取し、腸管で消化・吸収する。すなわち、シード (大腸菌内に形成させた不溶性 SOD1 凝集体) は、まず初めに腸管に到達することが想定される。そこで、腸管特異的にヒト SOD1 発現させたトランスジェニック線虫の作製し、シードにより腸管のヒト SOD1 の不溶性凝集化が引き起こるか検証した。具体的には、腸管特異的な発現を可能にするため *ges-1* プロモーターを利用し、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合させたヒト野生型 SOD1 またはヒト変異型 SOD1 遺伝子を線虫にマイクロインジェクションした。プラスミド DNA インジェクション後、線虫寒天培地に移し、線虫が産卵するまで 2-3 日間飼育した。蛍光顕微鏡を用いて、次世代 (F1) の線虫から GFP-SOD1 を発現している線虫を探索した。このような線虫を *ges-1::GFP-SOD1* 線虫と名付けた。

### (3) 線虫の ALS 様症状の解析

シーディングによる凝集体形成に伴って、線虫に ALS 様の表現型が出現するのかを検討した。具体的には、不溶性 SOD1 凝集体を形成した大腸菌を食餌として与えることで、線虫の生存期間や運動機能に現れる変化を解析した。運動機能の指標としては、スラッシング運動 (線虫のクネクネとした全身運動の回数) の回数を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 大腸菌内に形成される不溶性 SOD1 凝集体

まず、ヒト野生型 SOD1 またはヒト変異型 SOD1 を導入した大腸菌内に不溶性 SOD1 凝集体が形成されるか明らかにするために、抗ヒト SOD1 抗体を用いたウェスタンブロット法を行った。ヒト SOD1 を導入した大腸菌を界面活性剤で溶菌し、可溶性および不溶性画分を得た。各画分に発現するヒト SOD1 タンパク質のパターンを解析したところ、野生型 SOD1 は可溶性および不溶性 SOD1 の存在比がほぼ等量であった。一方、変異型 SOD1 は、可溶性には存在せず、すべて不溶性 SOD1 凝集体として観察された。

### (2) 線虫生体内の SOD1 シーディング現象

次に、不溶性 SOD1 凝集体を形成した大腸菌をシードとして、*ges-1::GFP-SOD1* 線虫の体内に導入し、腸管内のヒト SOD1 の不溶性凝集化が引き起こるかどうかが検討した。

SOD1 凝集体をまたはコントロールベクターを発現した大腸菌を *ges-1::GFP-SOD1* 線虫に給餌し、1 週間、飼育した。回収した線虫から可溶性および不溶性タンパク質を抽出し、抗 SOD1 抗体を用いたウェスタンブロット法で解析した。その結果、*ges-1::GFP*-野生型 SOD1 線虫および *ges-1::GFP*-変異型 SOD1 線虫のどちらにおいても、腸管 SOD1 の不溶化は観察されなかった。

### (3) 線虫の生存期間および運動機能への影響

不溶性 SOD1 凝集体を形成した大腸菌を食した *ges-1::GFP-SOD1* 線虫の生存期間を解析した。不溶性 SOD1 凝集体を食しても、コントロールベクターのみを発現した大腸菌を食した線虫の生存期間と同程度であった。さらに、スラッシング運動の回数にも変化は観察されず、運動機能の低下も認められなかった。

### 今後の展望

不溶性 SOD1 凝集体の運動ニューロン内への蓄積は、ALS の主要な病理学的特徴である。ALS における SOD1 凝集体の蓄積が初めて報告されてから約 25 年経過するが、その間、不溶性 SOD1 凝集体は運動ニューロンに対して、有毒であると考えられてきた。しかしながら、本課題で得られた成果は、これまでの概念を覆すものであると考えられ、非常にインパクトのある結果であると自負している。すなわち、不溶性 SOD1 凝集体は、ALS 病理における毒性の本体ではなく、むしろ毒性を緩和させるために運動ニューロン内に蓄積している可能性が示唆された。

*In vitro* の実験系において、不溶性 SOD1 凝集体は、未成熟な SOD1 を前駆体として調製することができる。おそらく、この未成熟な SOD1こそが SOD1 毒性の本体であると考えている。今後は不溶性 SOD1 の前駆体である未成熟な SOD1 を線虫の体内に導入し、毒性の有無を検証する予定である。

## 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 6 件)

Ishiguro T, Sato N, Ueyama M, Fujikake N, Sellier C, Kanegami A, Tokuda E, Zamiri B, Gall-Duncan T, Mirceta M, Furukawa Y, Yokota T, Wada K, Taylor JP, Pearson CE, Charlet-Berguerand N, Mizusawa H, Nagai Y, Ishikawa K.

Regulatory role of RNA chaperone TDP-43 for RNA misfolding and repeat-associated

translation in SCA31.

*Neuron*. Peer-reviewed. 94, 2017, 108-124.  
DOI: 10.1016/j.neuron.2017.02.046.

Tokuda E, Anzai I, Nomura T, Toichi K, Watanabe M, Ohara S, Watanabe S, Yamanaka K, Morisaki Y, Misawa H, Furukawa Y.

Immunochemical characterization on pathological oligomers of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis.

*Molecular Neurodegeneration*.

Peer-reviewed. 12, 2017, 2.

DOI: 10.1186/s13024-016-0145-9.

Anzai I, Tokuda E, Mukaiyama A, Akiyama S, Endo F, Yamanaka K, Misawa H, Furukawa Y.

A misfolded dimer of Cu/Zn-superoxide dismutase leading to pathological oligomerization in amyotrophic lateral sclerosis.

*Protein Science*. Peer-reviewed. 26, 2017, 484-496.

DOI: 1002/pro.3094.

Anzai I, Toichi K, Tokuda E, Mukaiyama A, Akiyama S, Furukawa Y.

Screening of drugs inhibiting *in vitro* oligomerization of Cu/Zn-superoxide dismutase with a mutation causing amyotrophic lateral sclerosis.

*Frontiers in Molecular Bioscience*. Peer-reviewed. 3, 2016, 40.

DOI: 10.3389/fmolb.2016.00040.

Tokuda E, Furukawa Y.

Copper homeostasis as a therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations.

*International Journal of Molecular Science*. Peer-reviewed. 17, 2016, E636.

DOI: 10.3390/ijms17050636.

Tokuda E, Brännström T, Andersen PM, Marklund SL.

Low autophagy capacity implicated in motor system vulnerability to mutant superoxide dismutase.

*Acta Neuropathologica Communications*.  
Peer-reviewed. 4, 2016, 6.  
DOI: 10.1186/s40478-016-0274-y.

〔学会発表〕(計 7 件)

**徳田栄一**、森崎祐太、三澤日出巳、渡邊  
征爾、山中宏二、大原慎司、古川良明

筋萎縮性側索硬化症における変異 SOD1  
オリゴマーの免疫化学的な検出

日本薬学会第 137 年会 2017 年 3 月 27 日  
仙台国際センター(宮城県・仙台市)

半田純夏、**徳田栄一**、古川良明

神経変性疾患の発症に関わるタンパク質  
のミスフォールディングを抑制する化合  
物の探索

日本化学会第 97 春季年会 2017 年 3 月 18  
日 慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川  
県・横浜市)

中村滉平、**徳田栄一**、古川良明

神経変性疾患に関連したタンパク質の線  
維化を抑制する化合物の探索

日本化学会第 97 春季年会 2017 年 3 月 18  
日 慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川  
県・横浜市)

Anzai I, **Tokuda E**, Mukaiyama A, Akiyama  
S, Furukawa Y.

A folding intermediate of Cu/Zn-superoxide  
dismutase is susceptible to abnormal  
oligomerization implicated in amyotrophic  
lateral sclerosis.

8th Asian Biological Inorganic Chemistry  
Conference. December 8, 2016. Auckland  
(New Zealand).

**Tokuda E**, Anzai I, Nomura T, Ohara S,  
Watanabe S, Yamanaka K, Morisaki Y,  
Misawa H, Furukawa Y.

*In vivo* and *in vitro* characterization of SOD1  
in early stages of ALS as a precursor to  
insoluble aggregates.

27th International Symposium on ALS/MND.  
December 7, 2016. Dublin (Ireland).

**徳田栄一**、森崎祐太、三澤日出巳、渡邊  
征爾、山中宏二、大原慎司、古川良明

銅・亜鉛スーパーオキシドディスムター  
ゼの金属イオン結合状態を識別できる  
新規抗体の開発と筋萎縮性側索硬化症の  
病理解明への応用

日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月 28 日  
パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

**徳田栄一**、大川枝里子、渡辺俊輔, Stefan L.  
Marklund, 小野真一

細胞内 Cu 恒常性破綻は ALS 関連 SOD1  
変異に共通した病態機序である

メタルバイオサイエンス研究会 2015  
2015 年 8 月 27 日 名古屋国際センターホ  
ール(愛知県・名古屋市)

〔図書〕(計 1 件)

Furukawa Y, **Tokuda E**.

Aggregation of FET proteins as a  
pathological change in amyotrophic lateral  
sclerosis.

Springer Singapore. Protein Reviews  
(Advanced in Experimental Medicine and  
Biology). 925, 2017, pp161 (1-12).  
DOI: 10.1007/5584\_2016\_32.

〔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://www.chem.keio.ac.jp/~furukawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
徳田 栄一 (Eiichi Tokuda)  
慶應義塾大学・理工学部・助教  
研究者番号: 00757510

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし