

## イヌ変性性脊髄症の原因となる SOD1 タンパク質の 種特異的な凝集メカニズムを解明

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学 環境医学研究所の橋本慶 大学院生、渡邊征爾 講師、山中宏二 教授、同 岐阜大学 科学研究基盤センター 神志那弘明 特別協力研究員 兼 KyotoAR 動物高度医療センター センター長、慶應義塾大学 理工学部 古川良明 教授らの共同研究グループは、イヌの変性性脊髄症(DM)(※1)における原因タンパク質 SOD1 の種特異的な凝集メカニズムを解明しました。DM では、SOD1 タンパク質の 40 番目のグルタミン酸がリシンに変化する E40K 変異により、SOD1 タンパク質の異常な凝集が引き起こされて脊髄の運動神経細胞が傷害されると考えられています。一方、ヒトの神経難病である筋萎縮性側索硬化症(ALS)(※2)においても SOD1 タンパク質の異常な凝集によって運動神経細胞が傷害されますが、E40K 変異はヒト SOD1 には全く影響せず、E40K 変異によるイヌ SOD1 の凝集は種特異的なものであることが示唆されています。そこで、本研究グループでは E40K 変異によるイヌ SOD1 の種特異的な凝集のメカニズムを解明することを目的に研究を行い、イヌ SOD1 がもともと、タンパク質中心部の疎水性が高い領域に「隙間」があるためにヒト SOD1 よりも不安定で凝集しやすいことを発見しました。また、この「隙間」の有無を操作することによって、E40K 変異による種特異的な SOD1 タンパク質の凝集を再現することにも成功しました。このことから、中心部の「隙間」に伴うイヌ SOD1 固有の脆弱性が E40K 変異に伴う種特異的な凝集の要因になっていることが明らかとなりました。本研究成果は、今後 DM に対する新規治療法の開発につながることを期待されます。

本研究成果は 2023 年 5 月 6 日付で米科学誌 *Journal of Biological Chemistry* にオンライン掲載されました。

### ポイント

- イヌの変性性脊髄症(DM)の原因と考えられる E40K 変異はイヌ SOD1 を種特異的に凝集させますが、その分子メカニズムは不明なままでした。
- SOD1 タンパク質の 117 番目のアミノ酸残基をイヌ型(メチオニン)またはヒト型(ロイシン)にすることで、E40K 変異の種特異的な凝集が再現されることを発見しました。
- X 線結晶構造解析の結果、117 番目のアミノ酸残基がイヌ型(メチオニン)の場合、中心部の疎水性が高い領域に「隙間」が生じて、SOD1 タンパク質が E40K 変異に対して脆弱になることが判明しました。
- 以上の結果から、中心部の「隙間」に伴うイヌ SOD1 固有の脆弱性が種特異的な凝集の基盤となっていることが明らかになりました。

### 1. 背景

イヌの変性性脊髄症(DM)は、脊髄にある運動神経細胞が変性し、後肢を中心に全身の筋肉が進行性に麻痺していく難病です。DM の原因は長らく不明でしたが、ヒトの筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子でもある SOD1 遺伝子に変異が同定され(Awano et al. 2009 PNAS)、SOD1 遺伝子がコードする Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)(※3)タンパク質の 40 番目のグルタミン酸がリシンに置き換わる(E40K 変異)ことが主要な原因であると考えられています。

SOD1 遺伝子の変異を原因とする ALS と DM は臨床的および病理学的に多くの共通点が見られます。このため、DM は ALS のイヌにおける自然発症モデルとも呼ばれます。これまでの研究から、遺伝性 ALS では SOD1 タンパク質が変性して細胞内で凝集することが運動神経細胞の変性に重要と判明しています。一方でイヌ SOD1 も E40K 変異によって凝集しますが、ALS では E40K 変異を原因とするものが存在せず、またヒト SOD1 に E40K 変異を導入しても凝集が生じない(Crisp et al. 2013 Exp Neurol)ことから、イヌ SOD1 の E40K 変異に伴う凝集は種特異的なものであることが示唆されています。もし、E40K 変異がヒト SOD1 と全く異なる、イヌ SOD1 独自のメカニズムで凝集を引き起こすのであれば、E40K 変異に適した DM の治療法を開発する必要があります。そこで、本研究ではイヌ SOD1 の E40K 変異による種特異的な凝集の分子メカニズムを解明することを目的に研究を行いました。

## 2. 研究成果

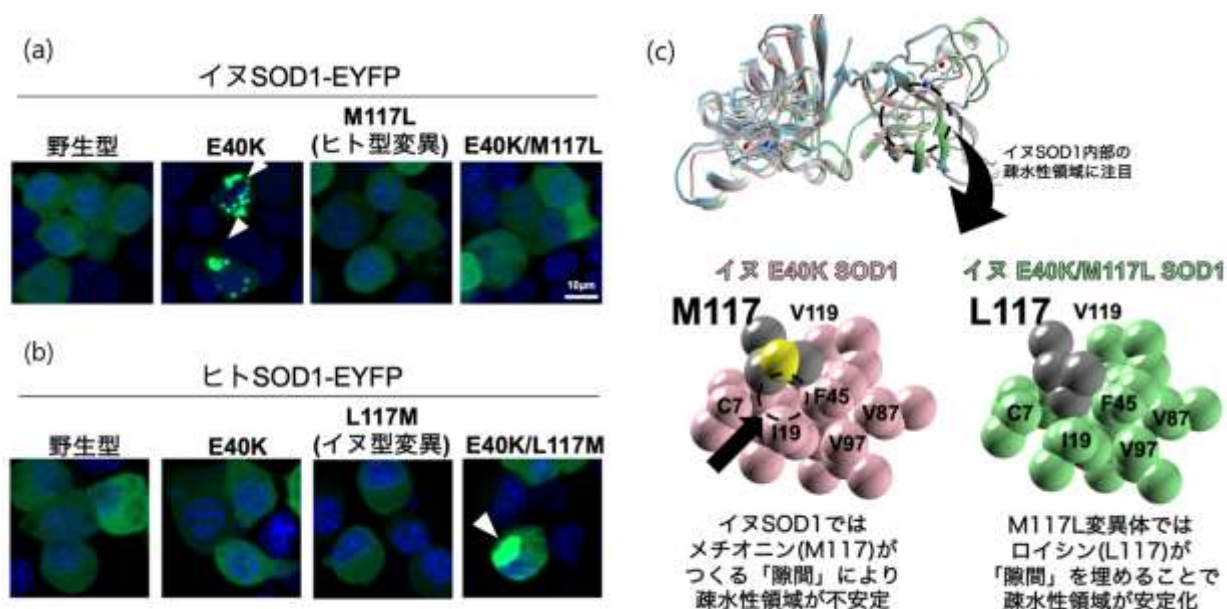


図. 本研究の概要

イヌとヒトの SOD1 には約 20%の異なるアミノ酸配列が存在していることから、本研究グループでは、これら種間で異なるアミノ酸残基の中にイヌ SOD1 特異的な凝集の原因となるアミノ酸残基が存在するのではないかと考え、その同定を目指しました。イヌ SOD1 とヒト SOD1 の一部をそれぞれ交換したキメラ(※4)SOD1 を作製し、イヌ SOD1 と同様に E40K 変異依存的に凝集するアミノ酸残基を絞り込んだ結果、117 番目のアミノ酸残基(イヌではメチオニン・ヒトではロイシン)が重要であることが明らかになりました。イヌ SOD1 の 117 番目のメチオニンをヒト SOD1 と同じロイシンに置換すると、イヌ SOD1 の E40K 変異に伴う凝集を顕著に抑制し(図(a)、矢頭のような凝集がみられない)、またこれとは逆にヒト SOD1 で 117 番目のロイシンをイヌ SOD1 と同じメチオニンにすると E40K 変異依存的なヒト SOD1 の凝集を引き起こしました(図(b)、矢頭)。

研究グループは引き続き、なぜ、この 117 番目のアミノ酸残基がイヌ SOD1 の種特異的な凝集に重要なのか、その分子メカニズムを解明するための実験を行いました。これまでの研究で、凝集性を持つタンパク質の多くは構造が不安定で、加熱により容易にタンパク質構造が壊れることが知られて

います。実際、イヌ SOD1 は変異をもたない野生型でもヒト SOD1 より熱に対して安定性が低いことがわかりました。これは、イヌ SOD1 がもともとヒト SOD1 に比べて凝集しやすい性質を持つことを示唆しています。興味深いことに、今回同定した 117 番目のメチオニンヒト SOD1 と同じロイシンに置換すると、イヌ SOD1 の熱安定性は劇的に改善され、一方で、ヒト SOD1 の 117 番目のロイシンをイヌ SOD1 と同じメチオニンに置換すると、今度は逆にヒト SOD1 の熱安定性が低下しました。神経培養細胞を用いた毒性評価においても、117 番目のアミノ酸残基がロイシンであるときに E40K 変異をもつイヌ SOD1 変異体の毒性が低下しました。これらの結果は、117 番目のロイシンがイヌとヒト、両方の SOD1 タンパク質の構造を安定化しており、E40K 変異による凝集や毒性を抑制するのに重要であることを示唆しています。

では、なぜイヌ SOD1 は 117 番目のメチオニンがロイシンになることで安定化されるのでしょうか。この疑問に答えるため、研究グループでは、さらに X 線結晶構造解析(※5)を行ってイヌ SOD1 の立体構造を解析しました。その結果、イヌ SOD1 の中心にある疎水性の高い領域においてメチオニンが「隙間」を作ることを見出しました(図(c))。さらに 117 番目のアミノ酸をメチオニンからロイシンに置換すると、この「隙間」が解消されることを発見しました。よって、イヌ SOD1 がヒト SOD1 よりも不安定なのは、この「隙間」の有無によることが示唆されました。

以上の結果から、イヌ SOD1 にはヒト SOD1 とは異なり、117 番目のメチオニンが作る「隙間」に由来した脆弱性が存在し、それが E40K 変異に伴う種特異的凝集の要因となっていると考えられます。

### 3. 今後の展開

本研究では、イヌ SOD1 の種特異的凝集の鍵となるメカニズムを解明しました。イヌ SOD1 はヒト SOD1 と異なるメカニズムで凝集しているのではなく、「隙間」に由来する E40K 変異に対する脆弱性の有無が種特異的凝集メカニズムの鍵となることが明らかとなりました。「隙間」をもたないヒト SOD1 で E40K 変異は凝集を引き起こさないことから、この疎水性が高い領域を安定化させればイヌ SOD1 の異常な凝集を抑制し、DM の発症や進行を抑制できる可能性が考えられます。

### 4. 研究助成

本研究は、日本学術振興会科研費(JP18H02740, JP19KK0214, JP22H00467 [山中]、JP22J15394 [橋本])、新学術領域研究「生命金属科学」(JP19H05765 [古川])、日本医療研究開発機構(JP21ek0109426 [山中])の支援を受けて行われました。

### 5. 用語説明

※1 変性性脊髄症(Degenerative Myelopathy; DM)

脊髄の運動神経細胞が変性、脱落することで、後肢を中心として全身に進行性の麻痺や筋萎縮を生じる、ヒト ALS に類似した難病で、イヌのウェルシュ・コーギー・ペンブローク、ボクサー、ジャーマン・シェパードなどに多い。ヒトの遺伝性 ALS の原因にもなっている SOD1 遺伝子上の変異が原因である。E40K 変異が最も多いが、一部に 18 番目のトレオニンがセリンに変異する T18S 変異も報告されている。

## ※2 筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic Lateral Sclerosis; ALS)

脊髄および脳の運動神経細胞に細胞死がおこる神経難病。遺伝的な背景をもたない孤発例が全体の約 9 割を占めるが、残りの 1 割は遺伝性に発症する。SOD1 遺伝子上の変異は、遺伝性 ALS の中でも約 2 割を占め、また本邦では最も多く、これまでに 100 以上の原因変異が同定されている。

## ※3 Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)

SOD1 遺伝子によってコードされる活性酸素の除去を担う酵素。これまでの研究から、SOD1 は機能喪失(loss-of-function)ではなく、SOD1 タンパク質が異常凝集して毒性を発揮する毒性獲得(gain-of-toxicity)のメカニズムで運動神経細胞を傷害することが明らかとなっている。

## ※4 キメラ

同一個体に遺伝学的由来の異なる細胞が混じっている状態を指す。本論文では、イヌ・ヒトの SOD1 遺伝子が混じったキメラ SOD1 遺伝子を作製して細胞での実験に用いた。

## ※5 X 線結晶構造解析

タンパク質の結晶に X 線をあてることでタンパク質の立体構造を明らかにする技術。本研究では、大腸菌でイヌ SOD1 タンパク質を大量に作製して結晶化させ、立体構造解析を行った。

## 6. 発表雑誌

掲雑誌名: *Journal of Biological Chemistry*

論文タイトル: Intrinsic structural vulnerability in the hydrophobic core induces species-specific aggregation of canine SOD1 with degenerative myelopathy-linked E40K mutation

著者・所属:

Kei Hashimoto<sup>1, 2</sup>, Seiji Watanabe<sup>1, 2</sup>, Masato Akutsu<sup>3</sup>, Norifumi Muraki<sup>3</sup>, Hiroaki Kamishina<sup>4, 5</sup>, Yoshiaki Furukawa<sup>3</sup>, Koji Yamanaka<sup>1, 2, 6, 7</sup>

<sup>1</sup>Department of Neuroscience and Pathobiology, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University, Nagoya, Aichi, Japan

<sup>2</sup>Department of Neuroscience and Pathobiology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Aichi, Japan

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Keio University, Yokohama, Kanagawa, Japan

<sup>4</sup>Life Science Research Center, Gifu University, Gifu, Japan

<sup>5</sup>Kyoto AR Advanced Veterinary Medical Center, Kyoto, Japan

<sup>6</sup>Institute for Glyco-core Research (iGCORE), Nagoya University, Aichi, Japan

<sup>7</sup>Center for One Medicine Innovative Translational Research (COMIT), Gifu University Institute for Advanced Study, Gifu, Japan

DOI:10.1016/j.jbc.2023.104798

English ver.

[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_E/research/pdf/Jou\\_230522en.pdf](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Jou_230522en.pdf)