



2022 年 7 月 21 日

報道機関 各位

東北大学大学院薬学研究科

ALS の発症に関与する SOD1 が毒性を発現するしくみ 硫黄原子間の結合・開裂で抗酸化・酸化作用がスイッチする

【発表のポイント】

- 筋萎縮性側索硬化症（ALS）との関連が指摘されているタンパク質 SOD1 の凝集物前駆体（オリゴマー）の酸化作用を明らかにしました。
- SOD1 の酸化作用は、分子内にある硫黄原子間の結合の開裂によって生じること示しました。
- ALS の発症機序の解明や治療法の開発に繋がることが期待されます。

【概要】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は進行性神経変性疾患の一つであり、発症原因が不明であることから治療法の開発が進んでいません。ALS の病変部位にタンパク質 SOD1 の凝集物が見いだされたことから、SOD1 の毒性と ALS の発症との関係について長く研究されてきました。近年では凝集物ではなく、凝集物の前駆体である SOD1 が数分子集まったオリゴマーが毒性を持つことが報告されましたが、毒性発現の詳細なメカニズムは不明でした。

東北大学大学院薬学研究科の中林孝和教授、田原進也助教、山崎公介氏（大学院修士課程在学中）らは、ALS の発症に関与する SOD1 の毒性獲得の新たな分子機構を明らかにしました。

SOD1 は本来抗酸化作用を示すのですが、本研究では分子内にある硫黄原子間の結合（ジスルフィド結合）が切れるのみで、抗酸化作用から酸化作用^(注1)に変化することを示すことができました。またジスルフィド結合の切断によってオリゴマーが生成すること、さらに凝集物よりオリゴマーの方が酸化作用が強いことを示しました。本研究によって、オリゴマーの毒性の原因の一つが酸化作用であり、分子内のジスルフィド結合の切断が原因で生じることを明らかにしました。

本研究成果は 2022 年 7 月 11 日付で Scientific Reports 誌に掲載されました。

【詳細な説明】

研究の背景

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動神経を障害し、全身の筋肉麻痺を引き起こす、発症原因の解明されていない進行性の神経変性疾患です。日本では ALS 患者は約 1 万人と言われており、早急な発症原因の解明や治療薬の開発が求められています。

SOD1 は銅イオンと亜鉛イオンが結合する金属タンパク質であり、反応性の高い活性酸素であるスーパーオキシドを反応性の低い過酸化水素と酸素分子に変換する抗酸化酵素の一種です。この SOD1 の遺伝子変異が、遺伝性 ALS の患者内で同定され、SOD1 と ALS の発症について数多くの報告がされてきました。これまでは ALS の病変部位に SOD1 の凝集体が見いだされたことから、SOD1 の凝集体が ALS の発症と関係するのではないかとされてきました。一方で凝集体ではなく、数分子の SOD1 からなる凝集体前駆体であるオリゴマーが、細胞毒性を持つとする結果が近年報告され、注目を集めています。しかしそのオリゴマーの毒性発現機構は不明でした。

当研究室ではこれまで SOD1 が熱変性すると抗酸化ではなく逆の酸化機能を示すことを明らかにしてきました。そこでオリゴマーの毒性は酸化作用に由来するという仮説を立て、オリゴマーの毒性を酸化作用の観点から検討しました。

研究の概要

本研究の仮説を検証するため、オリゴマー形成能がある変異体とそうでない変異体を用意する必要がありました。SOD1 はシステイン残基（Cys）間の分子間ジスルフィド結合によってオリゴマーを形成すると言われていています。SOD1 には 4 つの Cys が存在し、Cys6 と Cys111 が還元型のフリーのチオール基（-SH 基）として存在し、Cys57 と Cys146 が分子内でジスルフィド結合（-S-S-結合）を形成しています。タンパク質の熱変性時にフリーの Cys6 と Cys111 が分子内ジスルフィド結合を攻撃し、分子間ジスルフィド結合を形成することで SOD1 オリゴマーが生じることが報告されています。そこで Cys6 と Cys111 を Ser に置換（C6S / C111S）して分子間でのジスルフィド結合形成能を失わせ、オリゴマー化しない変異体を調製しました。オリゴマーを形成する通常の SOD1 と、オリゴマーを形成しない変異体を用いて、熱変性に伴うオリゴマー化と酸化作用の関係を検討しました。

DCF 蛍光法^(注2)を用いた熱変性前後の酸化作用の定量結果を図 1A に示します。オリゴマー形成能のある通常の SOD1 では、熱変性するとオリゴマーの形成と酸化作用の増大が観測されました。一方、フリーの Cys を置換した C6S / C111S 変異体ではオリゴマー形成が観測されないだけでなく、酸化作用も生じませんでした。そこで C6S / C111S 変異体の分子内ジスルフィド結合を還元剤によって切断し、フリーの還元型 Cys を形成させました。分子内ジスルフィド結合が切れ、還元型 Cys が生じると、C6S / C111S 変異体でも熱変性によってオリゴマーが形成され、酸化作用も獲得しました。明らかとなった熱変性と酸化作用の関係を図 2 に示します。これらの結果から、オリゴマー形成時に分子内ジスルフィド結合が切断されることが酸化作用獲得の分子機構であると考え

られます。実際、4℃の低温下で熱変性が生じないようにし、通常の SOD1 に還元剤を加えて、分子内ジスルフィド結合を切断させると、完全に変性やオリゴマー化をしなくても酸化作用を獲得することがわかりました (図 1B)。オリゴマーの毒性として、オリゴマー形成に伴う分子内ジスルフィド結合の切断によって生じる酸化作用があることが示されました。

酸化作用の獲得は熱変性やオリゴマー化が必要ではなく、分子内のジスルフィド結合の切断のみによって生じます。SOD1 は、体を守る抗酸化作用が分子内のジスルフィド結合が切れるのみで悪玉の酸化作用へと酵素活性がスイッチすることがわかりました。分子内ジスルフィド結合付近には酵素の選択性を決定するアミノ酸残基が多数あります。分子内ジスルフィド結合が切断されることで、周辺のタンパク質構造が乱れ、本来の酵素活性を失い、酸化作用を獲得すると考えられます。

研究の意義と今後の展望

ALS 関連タンパク質である SOD1 がオリゴマー化の際に分子内ジスルフィド結合を開裂し、酸化作用を獲得することを明らかにしました。分子内ジスルフィド結合をターゲットとした治療・予防薬の開発へと繋がることが期待されます。さらに私達は SOD1 の分子内ジスルフィド結合をトリスルフィド (-S-S-S-) などに変換し、SOD1 の酵素活性変化を調べています。

本研究は科学研究費補助金学術変革領域研究(A)「新興硫黄生物学が拓く生命原理変革」、戦略的創造研究推進事業「超硫黄フラックス解析基盤の創出による筋頑健性構築」の支援を受けて行われました。

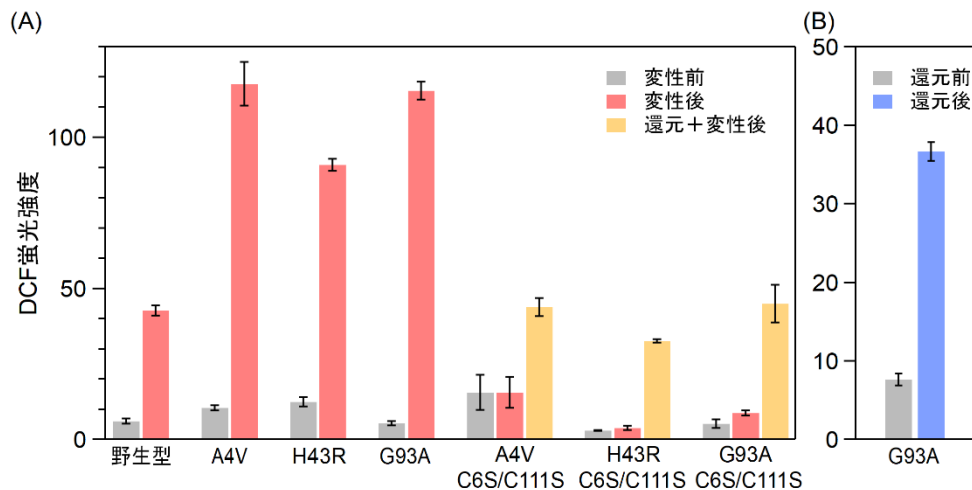


図 1. DCF 蛍光法^(注2)による SOD1 の酸化作用の評価。(A) 野生型 SOD1 および ALS 発症に関連付けられている変異体 (A4V, H43T, G93A 変異体) の熱変性前後の酸化作用の強さ。C6S/C111S 変異体 (A4V/C6S/C111S, H43R/C6S/C111S, G93A/C6S/C111S) については、熱変性前後および還元剤存在化で熱変性後の酸化作用。(B) SOD1 変異体を 4℃ の低温下還元前後の酸化作用。

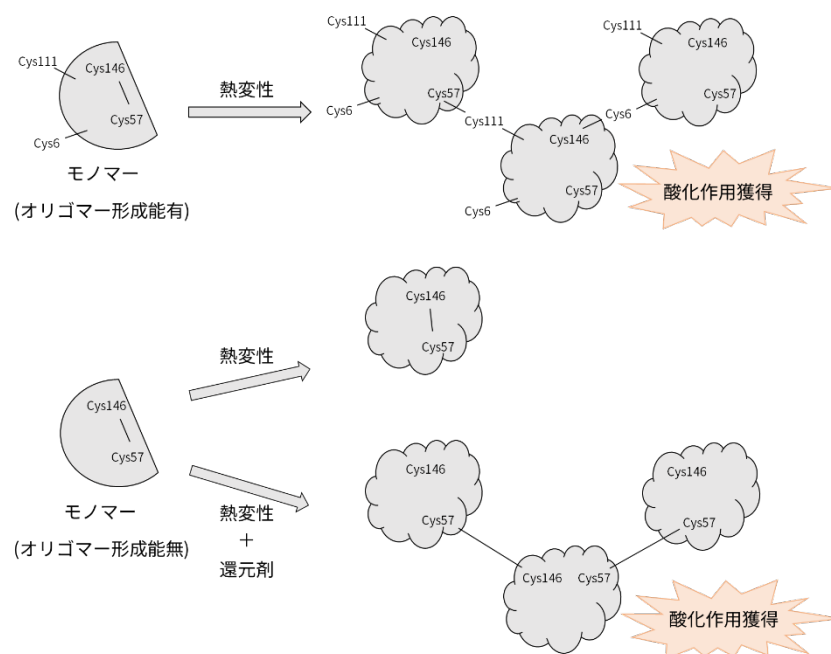


図 2. SOD1 のオリゴマー化に伴う分子内ジスルフィド結合の開裂と酸化作用獲得の模式図。オリゴマー化に伴い分子内ジスルフィド結合が開裂すると酸化作用を獲得します。

【用語説明】

（注 1）酸化作用

SOD1 は熱によって変性すると、酵素活性中心である Cu イオン付近の構造が変化し、元々の抗酸化活性ではなく、過酸化水素から強い酸化力を持つヒドロキシラジカルを生成するフェントン反応様の酸化活性を示します。本研究ではこのような活性を SOD1 が獲得した酸化作用と定義しました。

（注 2）DCF 蛍光法

ジクロロフルオレセイン (DCF) 分子の蛍光強度を用いて活性酸素種の発生量を評価する方法。DCF の蛍光強度が高いほど、測定分子の酸化作用が高いことになる。

【論文情報】

Title: SOD1 gains pro-oxidant activity upon aberrant oligomerization: change in enzymatic activity by intramolecular disulfide bond cleavage

Authors: Kosuke Yamazaki, Shinya Tahara, Takumi Ohyama, Kunisato Kuroi, Takakazu Nakabayashi

日本語タイトル「SOD1 の異常なオリゴマー化に伴う酸化促進性の獲得：分子内ジスルフィド結合の開裂に伴う酵素活性の変化」

著者名 山崎公介、田原進也、大山拓実、黒井邦巧、中林孝和

Journal : Scientific Reports, 2022 年, 12 巻, 11750.

DOI: 10.1038/s41598-022-15701-w

【問い合わせ先】

東北大学大学院 薬学研究科 生物構造化学分野

中林 孝和 TEL : 020-795-6855

E-mail : takakazu.nakabayashi.e7@tohoku.ac.jp