

ALS 発症原因タンパク質 SOD1 の構造的不安定化に
伴うアミロイド線維形成機構に関する研究

2016 年 1 月

井田昌孝

略号

ALS : amyotrophic lateral sclerosis

API : Achromobacter lyticus protease I

Apo⁻ : Cu and Zn metal free form

CD : circular dichroism

Cy3 : Cy3 maleimide

DTT : dithiothreitol

fALS : familial form of amyotrophic lateral sclerosis

FITC : fluorescein 5-isothiocyanate

FM : fluorescence microscopy

Gdn-HCl : guanidine hydrochloride

G93ASOD1 : SOD1 with mutation of G93A

Holo⁻ : Cu and Zn metal bound form

MALDI-TOF : matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight

PK : proteinase K

Red⁻ : reduced form of intramolecular disulfide bond between Cys57 and Cys146

sALS : sporadic form of amyotrophic lateral sclerosis

SOD1 : Cu, Zn-superoxide dismutase

TCEP : tris(2-carboxyethyl)phosphine

TEM : transmission electron microscopy

ThioT : Thioflavin T

1,5-IAEDANS : N-(iodoacetyl)-N'-(5-sulfo-1-naphthyl)-ethylenediamine

ICP : Inductively Coupled Plasma

2SCAM-SOD1 : SOD1 derivative where the free thiols of Cys6 and Cys111 are carboxyamidated

2SCAMRed-SOD1 : SOD1 derivative in which the free thiols of Cys6 and Cys111 have

been carboxyamidated and the intra-disulfide bond of Cys57-Cys146 has been reduced
4SCAM-SOD1 : SOD1 derivative where all of the thiols in Cys6, Cys57, Cys111 and
Cys146 have been carboxyamidated

目次

第1章 序論.....	1
1-1. はじめに.....	1
1-2. タンパク質の構造異常により生じるアミロイド線維.....	2
1-3. ALS発症の原因タンパク質のSOD1.....	4
1-4. 本論文の目的および構成.....	6
第2章 野生型SOD1を用いたアミロイド線維形成.....	7
2-1. 緒言.....	7
2-2. 材料と方法.....	8
2-2-1. 野生型SOD1の培養.....	8
2-2-2. 野生型SOD1の精製.....	8
2-2-3. タンパク質の定量(紫外吸収法).....	11
2-2-4. Cu, Znの定量(誘導結合プラズマ分析).....	11
2-2-5. 各種野生型SOD1の作製方法.....	11
2-2-6. Gdn-HClを用いた野生型SOD1の構造安定性評価.....	12
2-2-7. 野生型SOD1のアミロイド線維形成.....	13
2-2-8. 0.4 M Gdn-HCl存在下での野生型SOD1アミロイド線維形成.....	14
2-3. 結果.....	16
2-3-1. 各種野生型SOD1の二次構造と構造安定性の解析.....	16
2-3-2. 野生型SOD1のアミロイド線維形成.....	19
2-3-3. 0.4 M Gdn-HCl存在下での野生型SOD1のアミロイド線維形成.....	22
2-4. 考察.....	25

第3章 野生型 SOD1 によるアミロイド線維を用いた核部位の同定	27
3-1. 緒言.....	27
3-2. 材料と方法.....	29
3-2-1. Red-SOD1, 4SCAM-SOD1 により形成されたアミロイド線維の酵素消化.....	29
3-2-2. 逆相 HPLC によるサンプルの分取.....	29
3-2-3. MALDI-TOF mass spectrometer による分子量の決定.....	30
3-2-4. プロテインシーケンサーによる分析.....	30
3-2-5. 核部位領域の同定.....	30
3-2-6. Red-SOD1 のアミロイド線維の消化後 Seed 実験.....	30
3-3. 結果.....	32
3-3-1. Red-SOD1 のアミロイド線維を用いた核部位同定.....	32
3-3-2. 4SCAM-SOD1 のアミロイド線維を用いた核部位同定.....	35
3-3-3. Red-SOD1 アミロイド線維の消化後の Seed 効果の評価.....	38
3-4. 考察.....	40
第4章 核部位合成ペプチドを用いたアミロイド線維形成	43
4-1. 緒言.....	43
4-2. 材料と方法.....	44
4-2-1. 合成ペプチドの決定と濃度定量.....	44
4-2-2. 合成ペプチドのアミロイド線維形成.....	46
4-2-3. 蛍光試薬でラベルした合成ペプチドのアミロイド線維形成.....	46
4-2-3-1. 合成ペプチドの単独でのアミロイド線維形成.....	47
4-2-3-2. 合成ペプチドの複数でのアミロイド線維形成.....	47
4-3. 結果.....	48
4-3-1. 合成ペプチドの単独でのアミロイド線維形成.....	48
4-3-2. 合成ペプチドの複数でのアミロイド線維形成.....	49
4-4. 考察.....	57

第5章 fALS変異体G93ASOD1を用いたアミロイド線維形成	58
5-1. 緒言.....	58
5-2. 材料と方法.....	61
5-2-1. G93ASOD1の培養.....	61
5-2-2. G93ASOD1の精製.....	61
5-2-3. タンパク質の定量.....	62
5-2-4. Cu, Znの定量(誘導結合プラズマ分析).....	63
5-2-5. 各種G93ASOD1の作製方法.....	63
5-2-6. Gdn-HClを用いたG93ASOD1の構造安定性評価.....	63
5-2-7. 2 mM DTT存在下におけるアミロイド線維形成.....	64
5-2-8. 異なるDTT濃度存在下におけるアミロイド線維形成.....	64
5-2-9. SOD1のSH基定量.....	64
5-3. 結果.....	67
5-3-1. G93ASOD1の二次構造と構造安定性の解析.....	67
5-3-2. 野生型SOD1, G93ASOD1の還元剤存在下でのアミロイド線維形成.....	69
5-3-3. 還元剤の濃度がアミロイド線維の形成に与える影響.....	71
5-4. 考察.....	73
第6章 総合考察	75
6-1. SOD1のアミロイド線維形成における金属イオンの役割.....	76
6-2. SOD1のアミロイド線維形成における分子内ジスルフィド結合の役割.....	78
6-3. 還元型SOD1の構造とアミロイド線維の形成との関係.....	79
6-4. SOD1のアミロイド線維形成における核部位の相互作用.....	80
第7章 結語	82
引用文献.....	83
謝辞.....	93

第1章 序論

1-1. はじめに

タンパク質は 20 種類のアミノ酸が鎖状につながった高分子であり、DNA の遺伝情報は転写と翻訳により、リボソーム上でポリペプチド鎖のアミノ酸配列に変換される。タンパク質は生理的条件下において、アミノ酸配列に応じて様々な立体構造をとり、性質もまた大きく異なる。1960 年代に Anfinsen らはリボヌクレアーゼ A の巻き戻し実験により、完全に立体構造を失った状態から自発的にまき戻ることを示し、タンパク質の天然立体構造はそのアミノ酸の一次配列により決定づけられるという Anfinsen のドグマを提唱した。しかしながら、精製したタンパク質は *in vitro* において元の天然状態にまき戻ることなく、凝集を生じることがある。それはほどけたポリペプチド鎖が疎水性アミノ酸の側鎖が表面に露出され、互いに分子間や分子内で会合することで生じるとされる。これらのタンパク質の凝集は、温度を下げる、refolding タンパク質の濃度を低くするなど条件を変更することで回避することができる。*In vitro* でタンパク質の凝集が見つかった当初は、refolding がうまく行えなかったためと考えられ、細胞内で起こる現象とは異なるものされた。しかし、細胞内での folding 中間体の凝集やほとんどすべての生物の熱ショックタンパク質はタンパク質の folding を助けるシャペロニンを持つこと、またタンパク質の folding はタンパク質の機能や酵素活性などを発揮するため必要であることが分かり、タンパク質の構造や凝集に注目されるようになった[1, 2]。タンパク質は動的平衡にあり、細胞内ではストレスなどの環境の変化により、unfolding や不適切に folding したタンパク質が生じる。小胞体はこのような異常なタンパク質を認識して、タンパク質の品質を管理する働きをしている[3]。異常タンパク質が蓄積することで生じる小胞体ストレスにより、うまく品質管理が機能しなくなった場合、細胞自身は新生タンパク質の翻訳のストップや misfold したタンパク質を分子シャペロンによる修復、misfold したタンパク質を選択的に分解するという修正機能（小胞体ストレス応答：UPR, unfolded protein response）を持っている。持続的なストレスや UPR の機能不全などによって小胞体内に不良タンパク質が過剰に蓄積し、小胞体の

恒常性を維持できない場合にはアポトーシスが誘導される[4]。タンパク質の構造異常による会合体は生体内で分解されると考えられているが、中には分解されることなく、組織に蓄積するアミロイド線維と呼ばれる不溶性線維を形成することも報告されている[2]。このように、*in vitro*や*in vivo*に関わらず、生命現象にとってとても大切な役割を果たしているタンパク質のfoldingやタンパク質の構造異常に対する細胞応答機構について研究が進められている。

1-2. タンパク質の構造異常により生じるアミロイド線維

近年、アルツハイマー病、プリオン病、パーキンソン病などの神経変性疾患において特定の原因タンパク質がアミロイド線維と呼ばれる凝集体を形成して組織に沈着することが報告されている。1854年にRudolph Virchowにより組織から取り出した凝集体がヨウ素でんぷん反応を示し、アミロイドと紹介されたことを始めに、1959年には電子顕微鏡の観察により組織に線維が存在することが明らかにされた[5]。これまでに、40種類ものタンパク質がアミロイド線維を形成することが報告されている[6]。一方で、病気と関係のないタンパク質やペプチドでも*in vitro*の特定条件下でアミロイド線維が形成することが報告されている[7]。そのため、アミロイド線維の形成はタンパク質の特性の一つであり、多くのタンパク質はアミロイド線維を形成する能力を有していると考えられる[8]。また、アミロイド線維により細胞毒性や炎症反応が生じることが報告されているが[9, 10]、アミロイド線維の形成初期に見られる可溶性の多量体（オリゴマー）に強い細胞毒性を示す報告もあり[11, 12]、毒性の獲得は最終形態のアミロイド線維によるものなのか、その前駆体によるものなのかは議論されている。

アミロイド線維は構造や性質にいくつかの共通点が見られ、Congo Red, Thioflavin Tなどの色素を用いることで観察され、直径は10-20 nm程度の枝分かれのない線維構造をとり、線維軸と直交する方向に β ストランドが並んでできているため（クロス β 構造）、 β シート構造に富んでいる（図1-1）[13, 14]。これらの共通点を元にアミロイド線維の形成メカニズムを解明するための研究が行われている[7, 15-18]。アミロイド線維にはこのような共通点が

見られる一方で、原因タンパク質によっては野生型、変異体、truncated proteinの状態であってもアミロイド線維を形成するため[19]、アミノ酸配列における決定的な共通点は未だ見つかっていない。しかしながら、これまでに本研究室でも芳香族アミノ酸のフェニルアラニン[15]やチロシン[18]とアミロイド線維との関わりを示してきた。芳香族アミノ酸による π - π 相互作用はアミロイド線維の形成につながる分子認識や自己凝集への影響が示唆されていることから[20]、アミロイド線維の形成メカニズムの解明への手がかりとなり得るかもしれない。

アミロイド線維の形成メカニズムは原因タンパク質によって異なり、Rebecca Nelsonらは大きく分けて3つのアミロイド線維の構造モデルを提唱している。1つ目に、Refoldingモデルである。InsulinやPrion proteinにみられるように、native構造を持つタンパク質が一旦unfoldし、 β -sheet構造に富んだ構造にrefoldingする。2つ目にNatively disorderedモデルである。Sup35や β -amyloid polypeptide (A β)に代表されるように、もともと構造をとらないポリペプチド鎖がアミロイド線維を形成する過程でcross- β spineの構造を獲得する。3つ目にGain-of-interactionモデルが挙げられる。構造変化により特定の領域が露出し、相互作用することでアミロイド線維を形成する。Gain-of-interactionモデルはDirect stackingモデルなどさらに細分化される[21]。これより、タンパク質の構造変化はアミロイド線維の形成メカニズムを知る上で重要な因子であることが分かる。

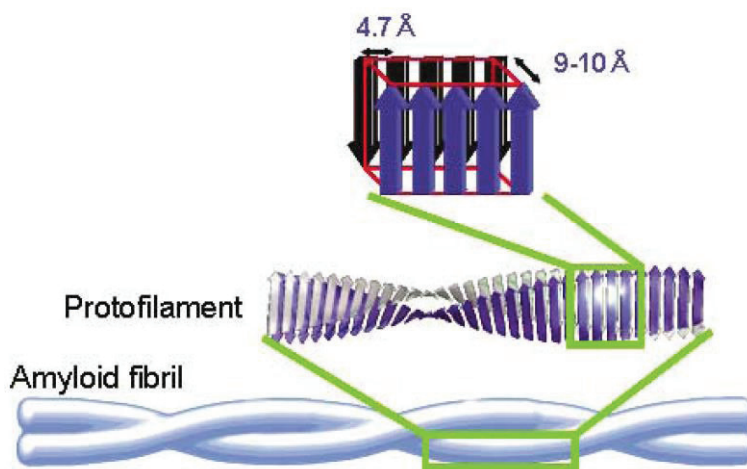


図1-1. クロス β 構造からなるアミロイド線維[22]

1-3. ALS 発症の原因タンパク質の SOD1

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) は神経変性疾患の一つであり、運動ニューロンが損傷され、極めて進行が早く、発症後 3 年から 5 年で死に至るとされる。約 90% は孤発性 ALS (sALS) である [23]。また、約 10% は家族性 ALS (fALS) であり、そのうち約 20% が Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD1) の変異によるものとされる。1993 年に SOD1 が ALS の原因遺伝子として見つかった以来 [24]、現在までに fALS に関して 160 種類以上の変異体が報告されているが (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>) [25]、未だに原因解明には至っていない。

SOD1 は 153 残基のポリペプチド鎖からなる 2 量体を形成している (図 1-2) [26]。SOD1 は 8 つの β ストランド、7 つのループと 1 つの短い α ヘリックスからなる [27]。各サブユニットに銅イオン、亜鉛イオンを 1 つずつ配位し、4 つの Cys (Cys6, 57, 111, 146) を持っている。銅イオンは酵素活性に関与し、亜鉛イオンは構造安定性に関与している [28-30]。Cys6, Cys111 はフリーのチオール状態で存在する一方で、Cys57, Cys146 は分子内ジスルフィド結合を形成している [31]。還元条件下である細胞質内においてジスルフィド結合を形成しているタンパク質は稀である。SOD1 は銅イオンを導入する働きを持つ CCS (Copper Chaperone for SOD1) により、分子内ジスルフィド結合は導入される [32]。SOD1 は様々な疾患や老化を引き起こすとされる活性酸素種スーパーオキシドラジカルに対して防御的に働き、酸素や過酸化水素に置換する抗酸化酵素である [33]。SOD1 の変異が同定された当初、変異により酵素機能が低下し、ALS の発症につながると考えられていた。しかしながら、多くの SOD1 変異体は正常な酵素活性を示し [34, 35]、また、SOD1 遺伝子をノックアウトしたマウスの運動ニューロンは正常であった [36]。一方で、fALS 変異を発現したトランスジェニックマウスは患者にみられる異常が報告された [37]。これより、ALS は SOD1 の酵素機能の損失によるものではなく、変異に伴い新たな異常が生じ、ALS の発症につながると考えられる。近年、SOD1 の構造異常により生じる凝集体が注目されている。inclusion body は fALS の患者 [38-40]、また fALS の変異を導入したトランスジェニックマウスの脊髄から見つかった [41-49]。その中には misfold した SOD1 が含まれることが

報告されている[38, 50]。さらに、sALS の患者にみられる inclusion body に野生型 SOD1 が見つかるとともに[38, 39, 51]、野生型 SOD1 を過剰発現させたトランスジェニックマウスは ALS に類似した症状を示し、脊髄や脳に凝集体が確認された[52]。これより、fALS 変異体、野生型 SOD1 とともに凝集体の形成と ALS の発症との関係性が示唆される。そのため、凝集体が生じるメカニズムを調べることで、fALS だけでなく sALS についても ALS 発症原因の解明につながると期待される。また、SOD1 の凝集体はアルツハイマー病やパーキンソン病のような神経変性疾患の患者の組織にみられるアミロイド線維[53, 54]と共通した特徴を持つことが報告されている[42, 55]。中には Gdn-HCl や有機溶媒を用いて意図的に変性した SOD1 はアミロイド線維を形成することが示されている[56-58]。しかし、これらの条件は細胞内環境とは異なっている。通常、SOD1 は還元状態にある細胞質内に存在する[59]。そのため、分子内ジスルフィド結合の還元は *in vivo* で起こりうる。実際に、fALS 変異を導入したトランスジェニックマウスでは分子内ジスルフィド結合が還元された SOD1 が確認されている[44, 46]。このように、生理的条件下で構造の特徴や構造安定性を評価することが重要である。これらの報告より、SOD1 の misfolding や凝集が生じるメカニズムの解明は ALS の発症を知る上では重要な課題であると言える。

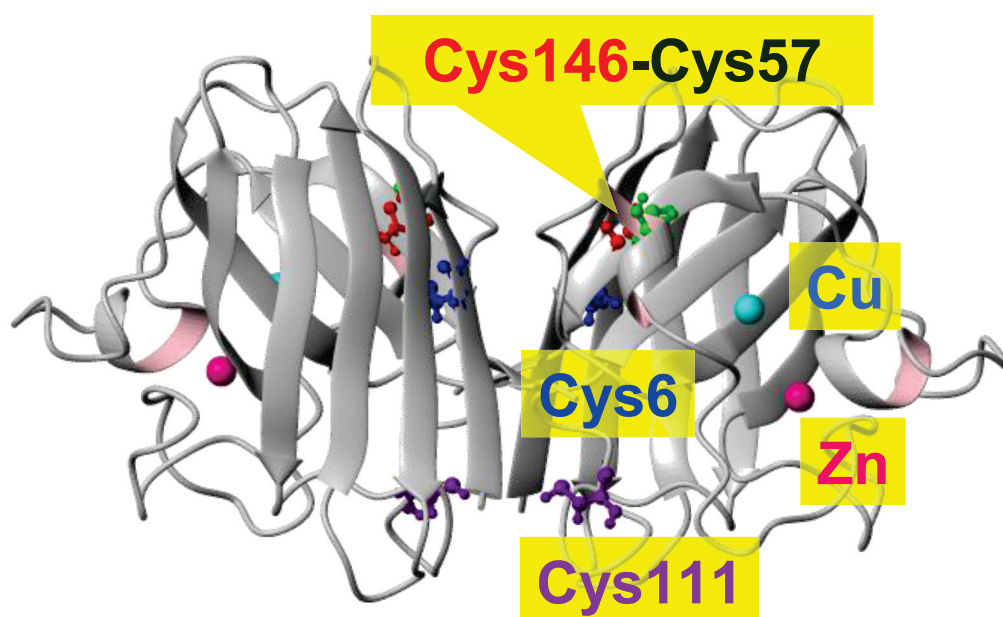


図1-2. SOD1の構造

1-4. 本論文の目的および構成

本研究では野生型 SOD1 また fALS の変異体である G93ASOD1 を用いて SOD1 のアミロイド線維形成メカニズムの解明を目的とした。

本学位論文は、7 章で構成される。

「第 1 章 序論」では、本研究の背景としてアミロイド線維や ALS 発症の原因タンパク質である SOD1、また本論文の目的および構成について述べた。

「第 2 章 野生型 SOD1 を用いたアミロイド線維形成の評価」では、野生型 SOD1 を用いて金属イオンの除去、分子内ジスルフィド結合 (Cys57-Cys146) の還元により生じる構造安定性について評価することで、構造不安定化がアミロイド線維の形成にどのように影響を与えているのかを調べた。

「第 3 章 野生型 SOD1 のアミロイド線維を用いた核部位の同定」では、野生型 SOD1 を用いて、どの領域が作用して線維核を形成しているのかを調べた。

「第 4 章 核部位合成ペプチドを用いたアミロイド線維形成能の評価」では、第 2 章、第 3 章より SOD1 はアミロイド線維を形成する過程で unfold することが示唆されたため、同定された核部位が相互作用し、アミロイド線維を形成するかどうかを調べた。

「第 5 章 fALS 変異体 G93ASOD1 を用いたアミロイド線維形成の評価」では、G93ASOD1 のアミロイド線維形成能を調べるとともに、野生型 SOD1 を用いてアミロイド線維の形成の違いについて評価した。

「第 6 章 総合考察」では、第 2 章～第 5 章によって示された野生型 SOD1 と G93ASOD1 の結果を総合考察するとともに、SOD1 のアミロイド線維形成メカニズムを示した。

「第 7 章 結語」では、本研究のまとめを述べた。

第2章 野生型 SOD1 を用いたアミロイド線維形成

2-1. 緒言

タンパク質は機能を維持するために安定した高次構造をとっている。構造の安定化には、ジスルフィド結合のような共有結合やイオン結合、水素結合、ファンデルワールス力、疎水結合のような非共有結合などが作用している。しかしながら、温度、pH、塩濃度、界面活性剤、変性剤などの外的な要因により変化することで、タンパク質の構造不安定化し、変性が生じる。第1章で述べたように、タンパク質の構造安定性とアミロイド線維の形成には密接な関係性が見られる。金属イオンはタンパク質に配位することで、構造を安定化させる働きを持っている。また、ジスルフィド結合についても構造安定性に大きく寄与する。Insulin[60]やhen egg white lysozyme (HEWL) [61]はジスルフィド結合の還元によって、構造の不安定化が生じ、アミロイド線維を形成することが報告されている。一方で、 β 2-microglobulinではジスルフィド結合を還元するとアミロイド線維の形成が抑制される[62]。そのため、ジスルフィド結合の還元は構造の不安定化や揺らぎに影響を与えるが、タンパク質の種類によってアミロイド線維の形成に与える影響は異なることが示唆される。SOD1の場合、銅イオンと亜鉛イオンを配位し、Cys57とCys146で分子内ジスルフィド結合を形成している。そこで、本章では、構造の安定化に寄与する金属イオン、分子内ジスルフィド結合に注目し、野生型SOD1を用いて金属イオンの除去 (apo化)、分子内ジスルフィド結合の還元により生じる構造安定性の変化を調べ、構造の不安定化に伴うアミロイド線維形成について評価した。そこで、SOD1の構造安定性とアミロイド線維形成の関係を議論する。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 野生型 SOD1 の培養

E. coli BLR (DE3) に 0.5 μ L の発現系プラスミド pET23a-SOD1 を入れ、30 min 氷中におき、恒温槽で 42°C, 45 sec ヒートショックし、氷中で 2 min インキュベートした。そして、全量 1 mL になるよう SOC 培地を入れ、37°C, 170 min⁻¹ (TAITEC, Personal-11 Water Bath Shaker) にて振とう培養を 1 h 行い、LB 培地にまき、37°C, 18 h (EYELA, Soft incubator SLI-450N) 静置培養した。その後、試験管に LB 培地を入れ、植菌し、37°C, 170 min⁻¹ で 17 h 振とうし、プレ培養を行った。950 mL 培地の入った坂口フラスコに、終濃度 50 μ g/mL のアンピシリンを入れ、プレ培養した菌体を 1 mL を添加した。8.55 L の培地を坂口フラスコ 9 本用いて、37°C で 24 h 振とう培養した。培養後、遠心分離 (4°C, 8,000 rpm, 20 min) し、菌体を回収し、-85°C で保存した。

2-2-2. 野生型 SOD1 の精製

E. coli BLR (DE3)/pET23a-SOD1 に対して 5 倍量の Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT) を加え懸濁させ、氷中にて超音波処理 (Amplitude 60, Pulser 1, 90 min) を行い、菌体を破碎した。破碎後、遠心分離 (14,000 rpm, 30 min, 4°C) により、沈殿物を除去した。得られた上清画分に氷中にて終濃度 2.5% になるようにストレプトマイシン溶液をゆっくりと滴下し 30 min 攪拌した後、遠心分離 (14,000 rpm, 30 min, 4°C) により、上清画分を回収し、核酸を除去した。上清を氷中で攪拌しながら終濃度が 55% になるまでゆっくりと硫酸アンモニウムを加え、30 min 攪拌した。その後、遠心分離 (14,000 rpm, 30 min, 4°C) し、さらに、その上清に氷中にて攪拌しながら終濃度 65% になるようにゆっくりと硫酸アンモニウムを加え、30 min 攪拌した後、遠心分離 (14,000 rpm, 30 min, 4°C) し、上清画分を回収した。Q-Sepharose column buffer (20 mM Potassium phosphate, 0.01 mM EDTA) にて透析し、脱塩を行った。室温にて、Q-Sepharose 陰イオン交換カラム (Amersham Biosciences) にアプライし、0 から 0.5 M KCl でグラジエントをかけてタンパク質を溶出させた。280 nm の吸光度と

SDS-PAGE により目的のタンパク質が含まれている画分を確認した。回収した画分に終濃度が 2 M になるように硫酸アンモニウムを添加し、室温にて Phenyl-Toyopearl 650 疎水性相互作用クロマトグラフィーにアプライし、2 から 0 M 硫酸アンモニウムの範囲でグラジエントを行い、タンパク質を溶出させた。280 nm の吸光度と SDS-PAGE により目的のタンパク質が含まれている画分を確認した。回収した画分に 2.5 mM 重炭酸アンモニウムを用いて透析し、脱塩を行い、EYELA 凍結乾燥機 FD-50 を用いて凍結乾燥した。乾燥した野生型 SOD1 は 4°C で保存した。以上の精製過程を図 2-1 に示した。

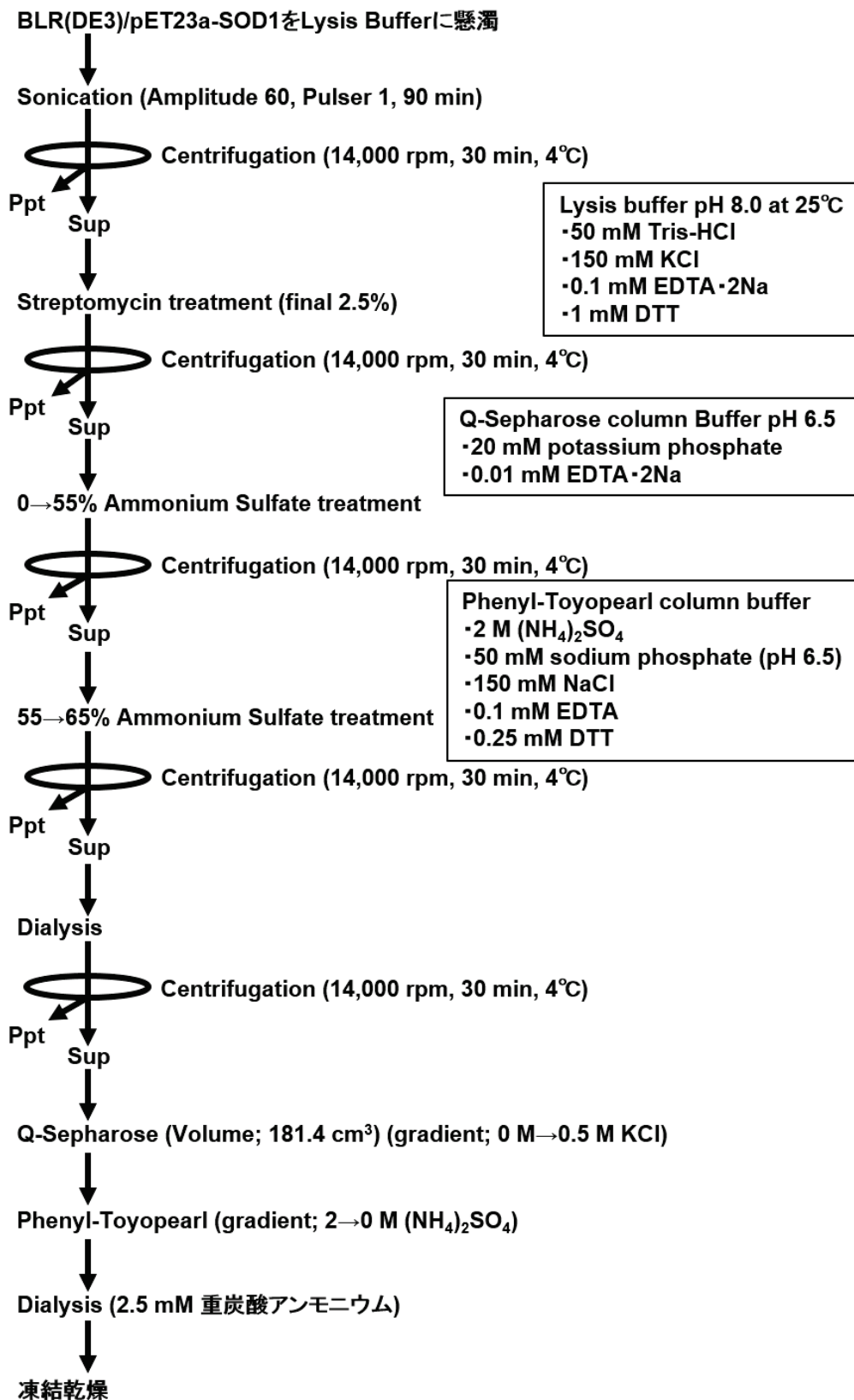


図 2-1. 野生型 SOD1 の精製過程

2-2-3. タンパク質の定量（紫外吸収法）

野生型 SOD1 の 280 nm におけるモル吸光定数 $10,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて[63], 吸光度式 (1)より, 計算値による SOD1 のタンパク質濃度を定量した。

$$(1): A = \epsilon_{412 \text{ nm}} lc$$

(ϵ : 吸光定数 ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), l : 光路長 (cm), c : 濃度 (mol/l))

2-2-4. Cu, Zn の定量（誘導結合プラズマ分析）

Cu, Zn の結合量を正確に確認するため, ICP 分析を行った。測定は鳥取大学ベンチャー・ラボラトリーの森本先生に依頼した。

2-2-5. 各種野生型 SOD1 の作製方法

各種野生型 SOD1 は以下のように作製した。

Holo-SOD1 は精製後の野生型 SOD1 をタンパク質濃度が 1 mg/mL になるように buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.0 at 25°C, 6 M urea, 0.1 mM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mM $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) で溶解させ, 25°C にて, 11 h インキュベートした。その後, 遠心分離 (12,000 rpm, 4°C, 5 min) を行い, PD-10 を用いて Milli-Q 水に置換し, 凍結乾燥した。Apo-SOD1 は精製後の野生型 SOD1 をタンパク質濃度が 1 mg/mL になるように buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.0 at 25°C, 10 mM EDTA \cdot 2Na, 3 M Gdn-HCl で溶解させ, 25°C にて 1 h インキュベートした。その後, PD-10 を用いて Milli-Q 水に置換し, 凍結乾燥した。2SCAM-SOD1 (Cys6, Cys111 をアルキル化) は Apo-SOD1 に終濃度 2 M Gdn-HCl, 10 mM $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ を添加し, 遮光しながら室温にて 30 min 静置し, 変性かつアルキル化反応をさせた。その後, PD-10 を用いて Milli-Q 水に置換し, 凍結乾燥した。2SCAMRed-SOD1 (apo 化, Cys6, Cys111 をアルキル化させ, 還元剤存在下で分子内ジスルフィド結合は還元された状態を維持) は Apo-SOD1 に終濃度 2 M Gdn-HCl, 10 mM $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ を添加し, 遮光しながら室温にて 30 min 静置し, 変性かつアルキル化反応をさせた。その後, PD-10 を用いて 50 mM Tris-HCl pH 7.0 at 25°C, 150 mM NaCl に置換し, 終濃度 5 mM になるように DTT を添加し, 30 min 静置し, 分子内ジスルフィド結合

を還元した。その後、50 mM Tris-HCl pH 7.0 at 37°C, 150 mM NaCl, 1mM TCEP に置換した。4SCAM-SOD1 (apo 化, Cys57, 146 のジスルフィド結合を還元し, すべての Cys をアルキル化) は Apo-SOD1 に終濃度 2 M Gdn-HCl, 5 mM DTT を添加し, 30 min 室温で静置し, 分子内ジスルフィド結合を還元させた。さらに, 10 mM ICH₂CONH₂ を添加し, 30 min 室温で遮光しながら静置し, アルキル化反応をさせた。その後, PD-10 を用いて 50 mM Tris-HCl pH 7.0 at 37°C, 150 mM NaCl に置換した。Red-SOD1 (apo 化, 還元剤存在下で分子内ジスルフィド結合の還元状態を維持) は Apo-SOD1 に終濃度 2 M Gdn-HCl, 5 mM DTT を添加し, 30 min 室温で静置し, 分子内ジスルフィド結合を還元させた。さらに, PD-10 を用いて 50 mM Tris-HCl pH 7.0 at 37°C, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP に置換した。

2-2-6. Gdn-HCl を用いた野生型 SOD1 の構造安定性評価

Holo-SOD1, Apo-SOD1, Red-SOD1 の構造安定性を調べるため, 変性剤として Gdn-HCl を用いて構造安定性を評価した。

Holo-SOD1, Apo-SOD1 は 0.15 mg/mL (50 mM Tris-HCl pH 7.0 at 25°C, 150 mM NaCl, 0~5.7 M Gdn-HCl), Red-SOD1 は 0.15 mg/mL (50 mM Tris-HCl pH 7.0 at 25°C, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, 0~5.7 M Gdn-HCl) の終濃度になるように調製した。その後, 25°C で一晩静置し, 構造の変化を評価するため, CD スペクトル測定, Tryptophan 蛍光スペクトル測定を行った。

SOD1 の二次構造変化を調べるため, JASCO J-720 Spectrophotometer または JASCO J-820 Spectrophotometer を用い, 円二色性 (CD) スペクトル測定した。

調製したサンプルは, 光路長 1 mm の石英セルを用い, 窒素ガス流速 2 L/min, 25°C で以下に示す測定条件で測定した。

(測定条件) 感度: Low (1000 mdeg), 開始波長: 250 nm, 終了波長: 200 nm, データ取込間隔: 0.1 nm, 走査モード: continuous, 走査速度: 50 nm/min, レスポンス: 0.25 sec, バンド幅: 1.0 nm, 積算回数: 16

Tryptophan は 295 nm で励起させると 350 nm 付近で最大蛍光波長を示す。また,

Tyrosine は 280 nm で励起させると 310 nm 付近で最大蛍光波長を示す。SOD1 は Tyrosine を持たないため、Tryptophan 付近の環境を調べることで、SOD1 の変性の様子を調べた。Tryptophan 蛍光スペクトル測定は、JASCO FP-6300 Fluorescence Spectrophotometer, 光路長 1 cm の石英セルを用いて、以下の測定条件で行った。

(測定条件) 測定モード: Emission, 励起バンド幅: 5 nm, 蛍光バンド幅: 5 nm, レスポンズ: Medium, 感度: Medium, 励起波長: 295 nm, 開始波長: 300 nm, 終了波長: 450 nm, 取込間隔: 0.5 nm, 速さ: 50 nm/min, 積算なし

解析は CD スペクトル測定の 216 nm, Tryptophan 蛍光スペクトル測定の 295 nm 励起時の 350 nm の測定データを用いた。変性曲線は次の式 (2) を用いて算出した。さらに、 C_m (変性中点) は $f_b=0.5$ の CD スペクトル測定と Tryptophan 蛍光スペクトル測定により得られた Gdn-HCl 濃度の平均値より算出した。

$$(2): f_b = (N - M) / (N_u - M)$$

(u は上部で一定になる領域, l は下部で一定になる領域を指し, N は測定した Gdn-HCl での測定データを指す。)

2-2-7. 野生型 SOD1 のアミロイド線維形成

各種野生型 SOD1 のアミロイド線維形成能を調べた。評価方法は Thioflavin T assay, CD スペクトル測定, 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を用いた。

アミロイド線維形成サンプルは, Holo-SOD1, Apo-SOD1, 2SCAM-SOD1, 4SCAM-SOD1 は 50 mM Tris-HCl pH 7.0 at 37°C, 150 mM NaCl, また, Red-SOD1, 2SCAMRed-SOD1 は 50 mM Tris-HCl pH 7.0 at 37°C, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP の buffer を用いて SOD1 濃度 1 mg/mL (62.5 μ M), 1 mL に調製し, ϕ 10 mm のテストチューブに入れ, パラフィルムにて密封し, 37°C, 170 min⁻¹ (TAITEC, Personal-11 Water Bath Shaker) にて振とうした。Thioflavin T はアミロイド線維と特異的に結合し, 440 nm で励起させると 480 nm の最大蛍光波長を観察することができるという特性を持つことを利用し, 振とう中のサンプルを一部抜き取りアミロイド線維の経時変化測定を行うために Thioflavin T assay を行った。測定方法は Thioflavin T Buffer (5 mM Sodium phosphate, 150 mM NaCl, 25 μ M

Thioflavin T) を 2 mL に対し, アミロイド線維形成サンプル 15 μ L (SOD1 終濃度 0.0075 mg/mL) 添加し, 30 sec ボルテックスし, 光路長 1 cm の石英セルに入れ, HITACHI F-4500 Fluorescence Spectrophotometer を用いて測定した。測定条件は以下のように行った。データは 60 sec 測定し, その平均値を用いた。

(測定条件設定) データモード: 蛍光, 時間単位: sec, 励起波長: 440 nm, 蛍光波長: 480 nm, 測定時間: 60 sec, 初期待ち時間: 0

(光度計条件) 励起側スリット: 5 nm, 蛍光側スリット 5 nm, ホトマル電圧(V): 700, レスポンス(sec): 0.1, シャッタ制御: ON

CD スペクトル測定は振とう前後にサンプルを採取し, SOD1 濃度 0.1 mg/mL になるように各種溶媒にて希釈した後, 2-2-6 の方法と同様に測定した。振とう後のサンプルは沈殿の様子を確認しながら超音波処理 (Amplitude 10~20, Pulser 1, 1~10 sec) を行い, 測定した。

TEM 観察用のサンプルは振とう後のサンプルを Milli-Q 水で 5-10 倍希釈し, コロジオン膜張付メッシュにサンプルを 5 または 10 μ L のせて, 60~90 sec 静置した。ろ紙でサンプルを吸い取った後, 2%ウラニル酢酸を 5 μ L のせて 30~50 sec 静置し, ろ紙で吸い取り (各静置時間はサンプルによって調整した), 風乾させた。TEM 観察は, 80 kV で作動させた JEOL-100CX または JEOL-1400 plus Transmission Electron Microscope を用いた。倍率は 27,000~50,000 倍で行った。また, TEM 画像より線維の 3 点の幅を測り, その平均の長さを線維幅とした。

2-2-8. 0.4 M Gdn-HCl 存在下での野生型 SOD1 アミロイド線維形成

Red-SOD1 の変性中点である 0.4 M Gdn-HCl 存在下でアミロイド線維形成実験を行うことで, 構造がアミロイド線維の形成に与える影響を調べた。

アミロイド線維形成用サンプルは, Holo-SOD1, Apo-SOD1, 2SCAM-SOD1, 4SCAM-SOD1 は 50 mM Tris-HCl pH 7.0 at 37°C, 150 mM NaCl, 0.4 M Gdn-HCl, また, Red-SOD1, 2SCAMRed-SOD1 は 50 mM Tris-HCl pH 7.0 at 37°C, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, 0.4 M Gdn-HCl の buffer を用いて SOD1 濃度 1 mg/mL (62.5 μ M), 1 mL

に調製し、 $\phi 10$ mm のテストチューブに入れ、パラフィルムにて密封し、 37°C 、 170 min^{-1} の条件で TAITEC, Personal-11 Water Bath Shaker にて振とうした。2-2-7 と同様にして、Thioflavin T assay, CD スペクトル測定を行った。

2-3. 結果

2-3-1. 各種野生型 SOD1 の二次構造と構造安定性の解析

まず、Holo-SOD1, Apo-SOD1, Red-SOD1, 2SCAM-SOD1, 2SCAMRed-SOD1, 4SCAM-SOD1 を用いて金属イオンと分子内ジスルフィド結合が SOD1 の二次構造に与える影響を CD スペクトル測定にて調べた。

図 2-2 に各種野生型 SOD1 の二次構造を示した。Holo-SOD1 は β シート構造特有の 208 nm 付近に負の極大が見られた[64]。また、Apo-SOD1 と Red-SOD1 はともに Holo-SOD1 と類似した二次構造であった。つまり、野生型 SOD1 は apo 化、さらに分子内ジスルフィド結合が還元されていても、Holo-SOD1 と類似した二次構造を維持していることが示された。一方で、すべての Cys をアルキル化した 4SCAM-SOD1 は完全に変性し、また Cys6, Cys111 をアルキル化した 2SACM-SOD1 と 2SCAMRed-SOD1 は部分的に変性しており、2SCAMRed-SOD1 は 2SACM-SOD1 に比べ、わずかに変性の程度が大きかった。修飾部位は構造上障害となるため、特に 4SCAM-SOD1 は Cys57 と Cys146 の修飾部位の影響を受け、完全に変性したと考えられる。

さらに、二次構造を維持していた Holo-SOD1, Apo-SOD1, Red-SOD1 を用いて Gdn-HCl に対する構造安定性を評価した。0~5.7 M Gdn-HCl 存在下における CD スペクトル測定と Tryptophan 蛍光スペクトル測定を行った。

Gdn-HCl 濃度による構造安定性の結果を図 2-3 に示した。また、表 2-1 は図 2-3 より算出された変性中点 (C_m) を示した。Holo-SOD1, Apo-SOD1, Red-SOD1 の C_m はそれぞれ 4.37 M, 0.90 M, 0.42 M Gdn-HCl であった。Holo-SOD1 は最も安定しており、apo 化した Apo-SOD1 は著しく構造が不安定化していた。さらに、分子内ジスルフィド結合を還元した Red-SOD1 はさらに構造が不安定化した。変性曲線より、Red-SOD1 と Apo-SOD1 は 0 M Gdn-HCl 中では安定性を維持していることが示された。今回は 2 状態転移あるいは 3 状態転移のどちらかで近似できるかの検討は行っていない。

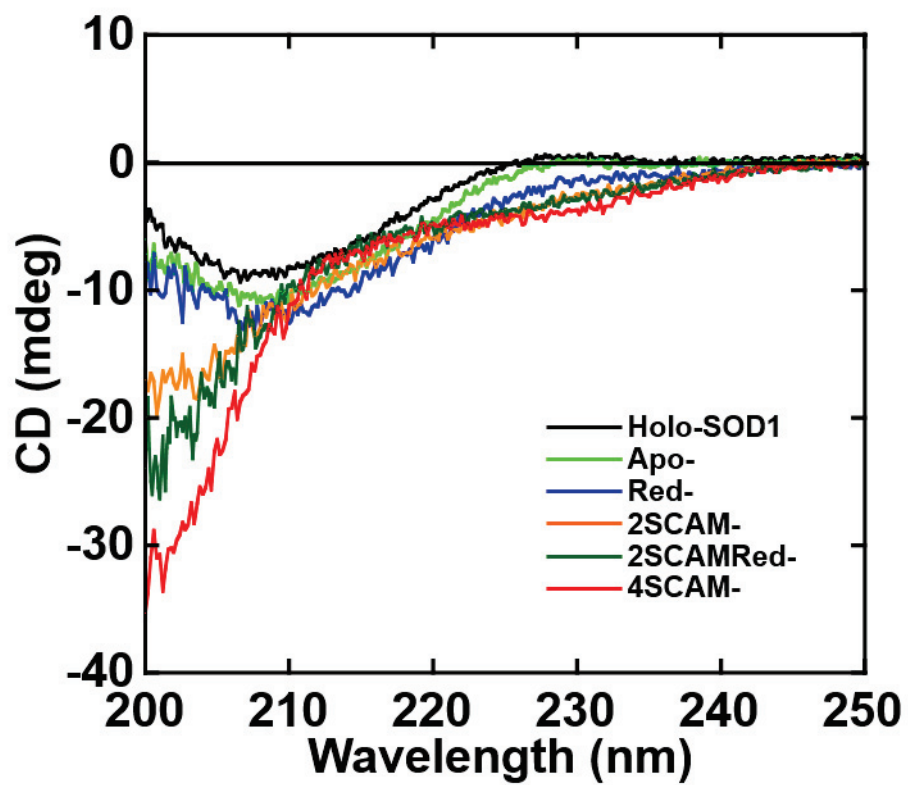


図 2-2. 各種野生型 SOD1 (Holo-SOD1, Apo-SOD1, Red-SOD1, 2SCAM-SOD1, 2SCAMRed-SOD1, 4SCAM-SOD1) の CD スペクトル測定

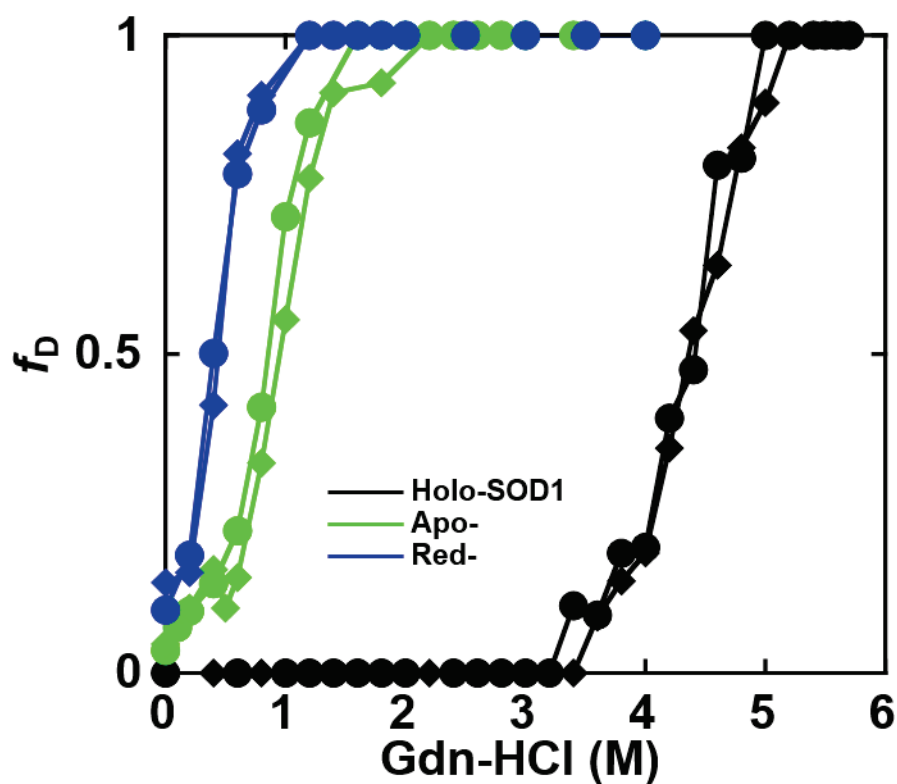


図 2-3. Holo-SOD1, Apo-SOD1, Red-SOD1 の Gdn-HCl に対する構造安定性の評価
 CD スペクトル測定は 216 nm における測定データ, Tryptophan 蛍光スペクトル測定は
 295 nm 励起時の 350 nm の測定データを f_D に置換し, Gdn-HCl 濃度に対してプロットし
 た。(●)は CD スペクトル測定, (◆)は蛍光スペクトル測定を示す。

表 2-1. Holo-SOD1, Apo-SOD1, Red-SOD1 の変性中点 (C_m) *

	Holo- (M)	Apo- (M)	Red- (M)
野生型 SOD1	4.37	0.90	0.42

* C_m は図 2-3 の変性曲線より算出している。

2-3-2. 野生型 SOD1 のアミロイド線維形成

野生型 SOD1 の apo 化や分子内ジスルフィド結合の還元により生じた構造の不安定化が、アミロイド線維の形成にどのように影響するのかを調べるため、Holo-SOD1, Apo-SOD1, Red-SOD1, 2SCAM-SOD1, 2SCAMRed-SOD1, 4SCAM-SOD1 を用いてアミロイド線維形成を Thioflavin T assay, CD スペクトル測定, TEM 観察にて評価した。

図 2-4 に Thioflavin T assay の結果を示した。4SCAM-SOD1, 2SCAMRed-SOD1, Red-SOD1 は著しい蛍光強度の増加が見られた。一方で, Holo-SOD1, Apo-SOD1, 2SCAM-SOD1 は 300 h 振とう実験を行ったが, 蛍光強度の増加が見られなかった。面白いことに, 前者の蛍光強度の増加が見られた SOD1 は apo 化し, 分子内ジスルフィド結合が切断され, 後者は分子内ジスルフィド結合を形成している SOD1 であった。また, 蛍光強度の増加が見られた SOD1 の中でも, 4SCAM-SOD1, 2SCAMRed-SOD1, Red-SOD1 の順に蛍光強度の増加の立ち上がりの早いことが分かった。さらに, Thioflavin T assay にて蛍光強度の増加が見られなくなったところで, CD スペクトル測定, TEM 観察を行った。

図 2-5 に 4SCAM-SOD1, 2SCAMRed-SOD1, Red-SOD1 のアミロイド線維形成実験前後の CD スペクトル測定の比較とアミロイド線維形成後の TEM 観察の結果を示した。アミロイド線維形成実験後, CD スペクトルは 218 nm 付近に負のピークが観察され, 典型的な β シート構造を示した。また, TEM 観察より, 枝分かれのない線維構造が確認された。線維幅はそれぞれ, 4SCAM-SOD1 は 13.2 ± 0.6 nm, 2SCAMRed-SOD1 は 13.6 ± 2.4 nm, Red-SOD1 は 10.9 ± 0.6 nm であった (表 2-2)。以上の結果より, 4SCAM-SOD1, 2SCAMRed-SOD1, Red-SOD1 は典型的なアミロイド線維を形成していることが示された。

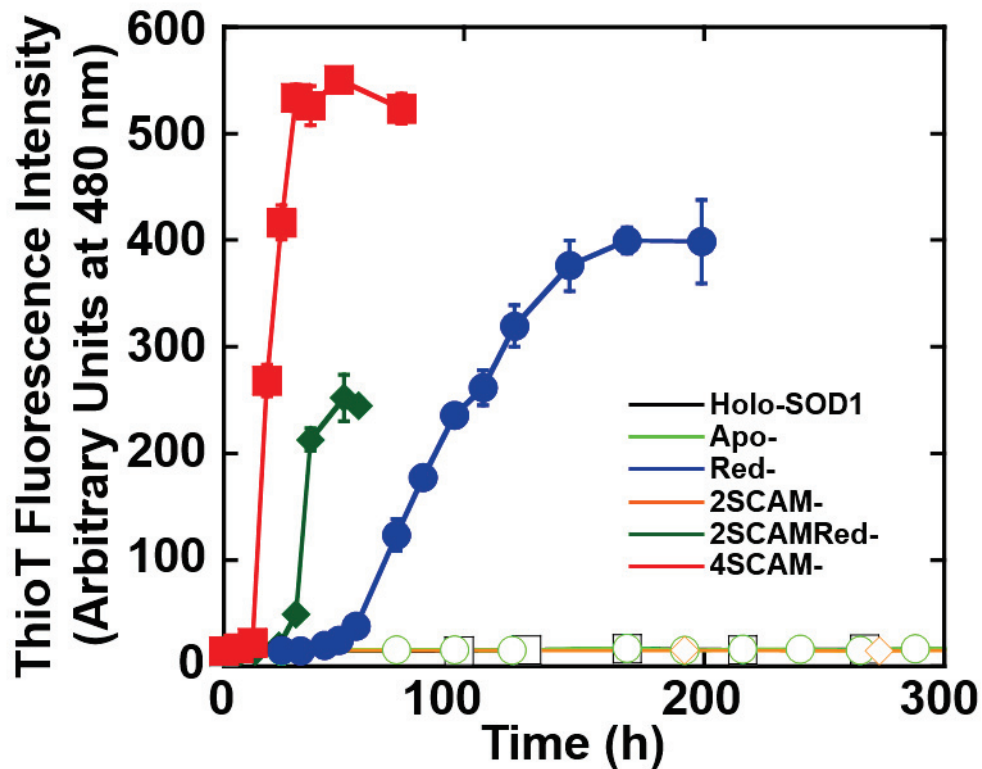


図 2-4. 各種野生型 SOD1 の Thioflavin T assay

(□)は Holo-SOD1, (○)は Apo-SOD1, (●) は Red-SOD1, (◇)は 2SCAM-SOD1,

(◆)は 2SCAMRed-SOD1, (■)は 4SCAM-SOD1 を示し,

平均値をプロットし, エラーバーは 3 回測定 of 標準偏差を示す。

表 2-2. アミロイド線維幅

	線維幅* (nm)
4SCAM-SOD1	13.2±0.6
2SCAMRed-SOD1	13.6±2.4
Red-SOD1	10.9±0.6

*線維幅は図 2-5 の TEM 画像より, 線維の 3 か所における平均値±標準偏差を示す。

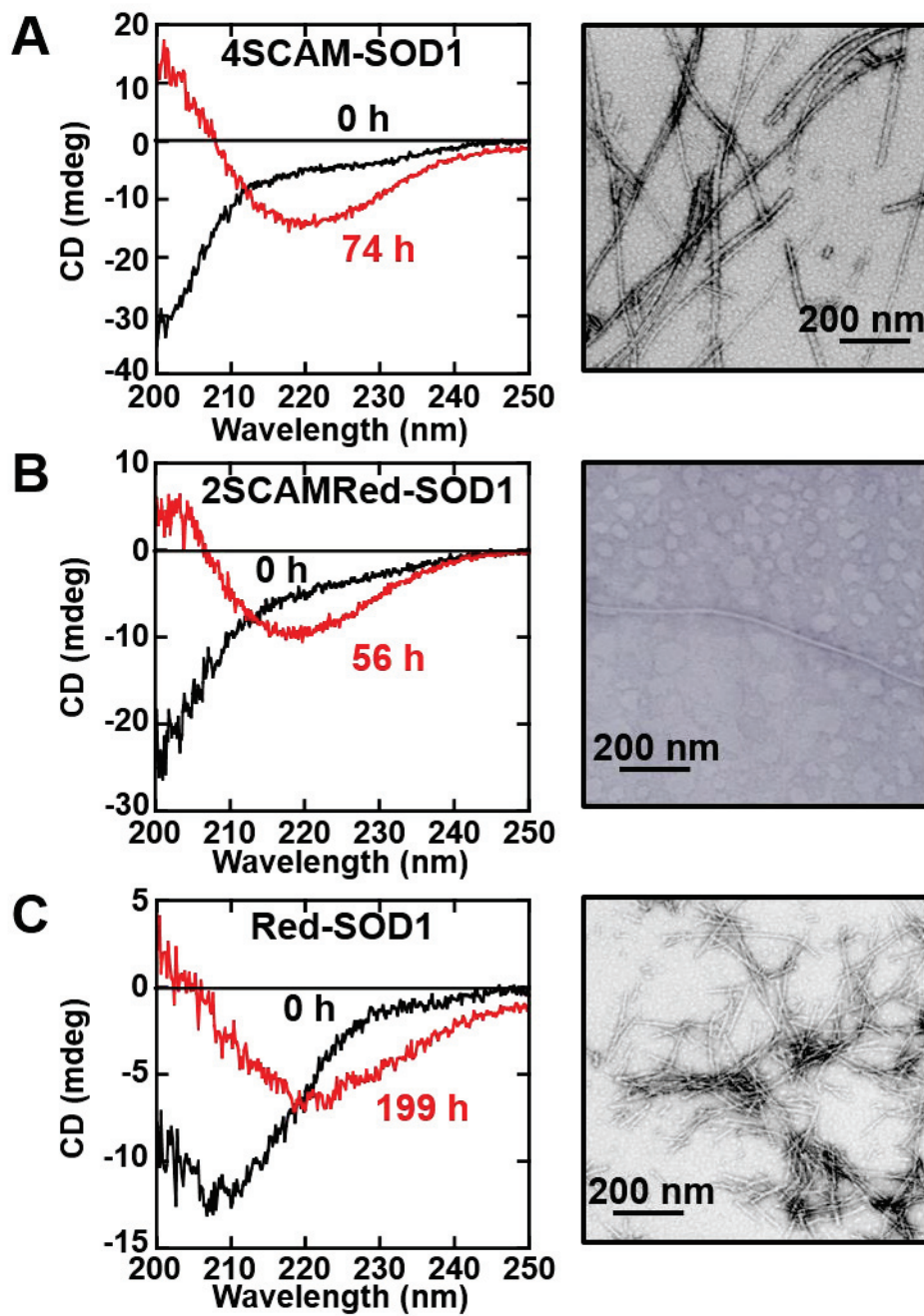


図 2-5. 4SCAM-SOD1, 2SCAMRed-SOD1, Red-SOD1 の

CD のスペクトル測定と TEM 観察

A は 4SCAM-SOD1, B は 2SCAMRed-SOD1, C は Red-SOD1 を示し, 左図は CD スペクトル測定, 右図は TEM 画像を示す。また, CD スペクトル測定の黒字はアミロイド線維形成実験前, 赤字はアミロイド線維形成実験後の測定結果を示す。TEM 観察のスケールバー

は 200 nm を示す。

2-3-3. 0.4 M Gdn-HCl 存在下での野生型 SOD1 のアミロイド線維形成

apo 化, 分子内ジスルフィド結合の還元後, 構造の不安定化がアミロイド線維の形成に与える影響を調べるため, Red-SOD1, 2SCAMRed-SOD1, 4SCAM-SOD1 を用いて Red-SOD1 の C_m である 0.4 M Gdn-HCl 存在下でのアミロイド線維の形成を Thioflavin T assay, CD スペクトル測定にて評価した。

図 2-6 に Thioflavin T assay の結果を示した。4SCAM-SOD1, 2SCAMRed-SOD1, Red-SOD1 は著しい蛍光強度の増加が見られた。さらに, 4SCAM-SOD1, 2SCAMRed-SOD1, Red-SOD1 の蛍光強度の増加が 18 h で見られた。変性剤を用いない結果に比べ (図 2-4), 0.4 M Gdn-HCl 中での Red-SOD1 と 2SCAMRed-SOD1 のアミロイド線維を形成スピードは早くなった。Thioflavin T assay で蛍光強度の増加が見られなくなったところで, CD スペクトル測定を行った。図 2-7 に 4SCAM-SOD1, 2SCAMRed-SOD1, Red-SOD1 のアミロイド線維形成実験前後の CD スペクトル測定の比較の結果を示した。0.4 M Gdn-HCl 存在下では Red-SOD1 はアミロイド線維形成実験前に変性していたが, 実験後には 218 nm 付近に負のピークが観察され, 典型的な β シート構造を示した。4SCAM-SOD1, 2SCAMRed-SOD1 についても同様な結果であった。以上の結果から, Red-SOD1 は構造が変性すると, 速やかにアミロイド線維を形成することが示された。

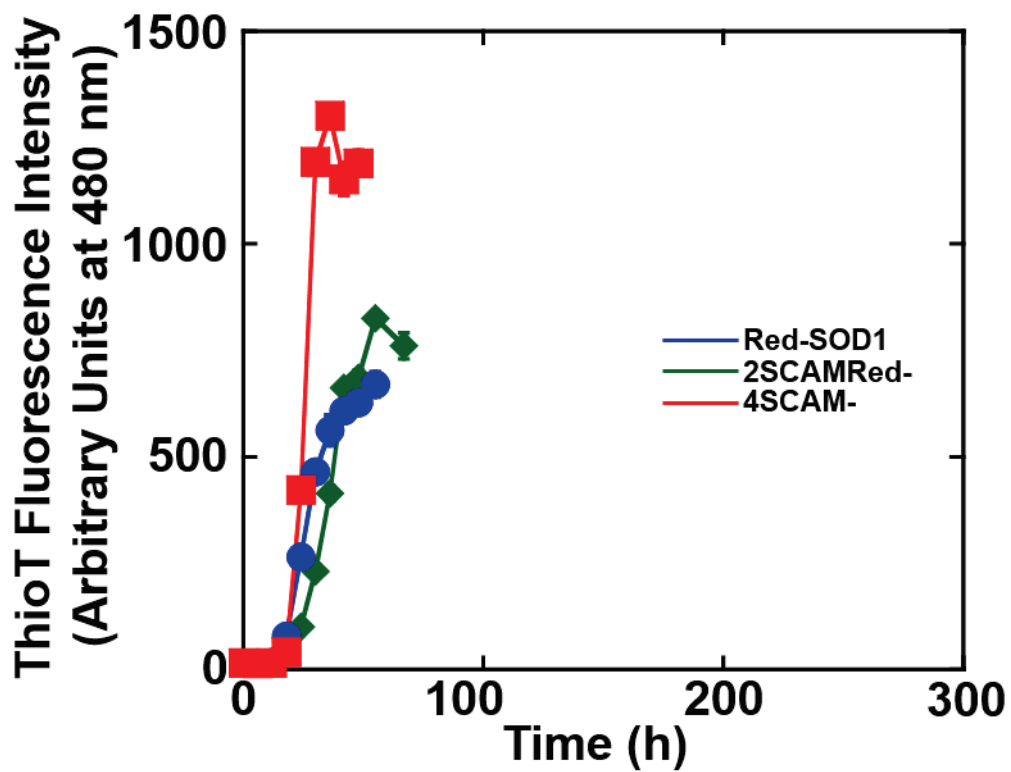


図 2-6. 0.4 M Gdn-HCl 存在下での Red-SOD1, 2SCAMRed-SOD1, 4SCAM-SOD1 の Thioflavin T assay

(●)は Red-SOD1, (◆)は 2SCAMRed-SOD1, (■)は 4SCAM-SOD1 を示す。平均値をプロットし、エラーバーは 3 回測定標準偏差を示す。

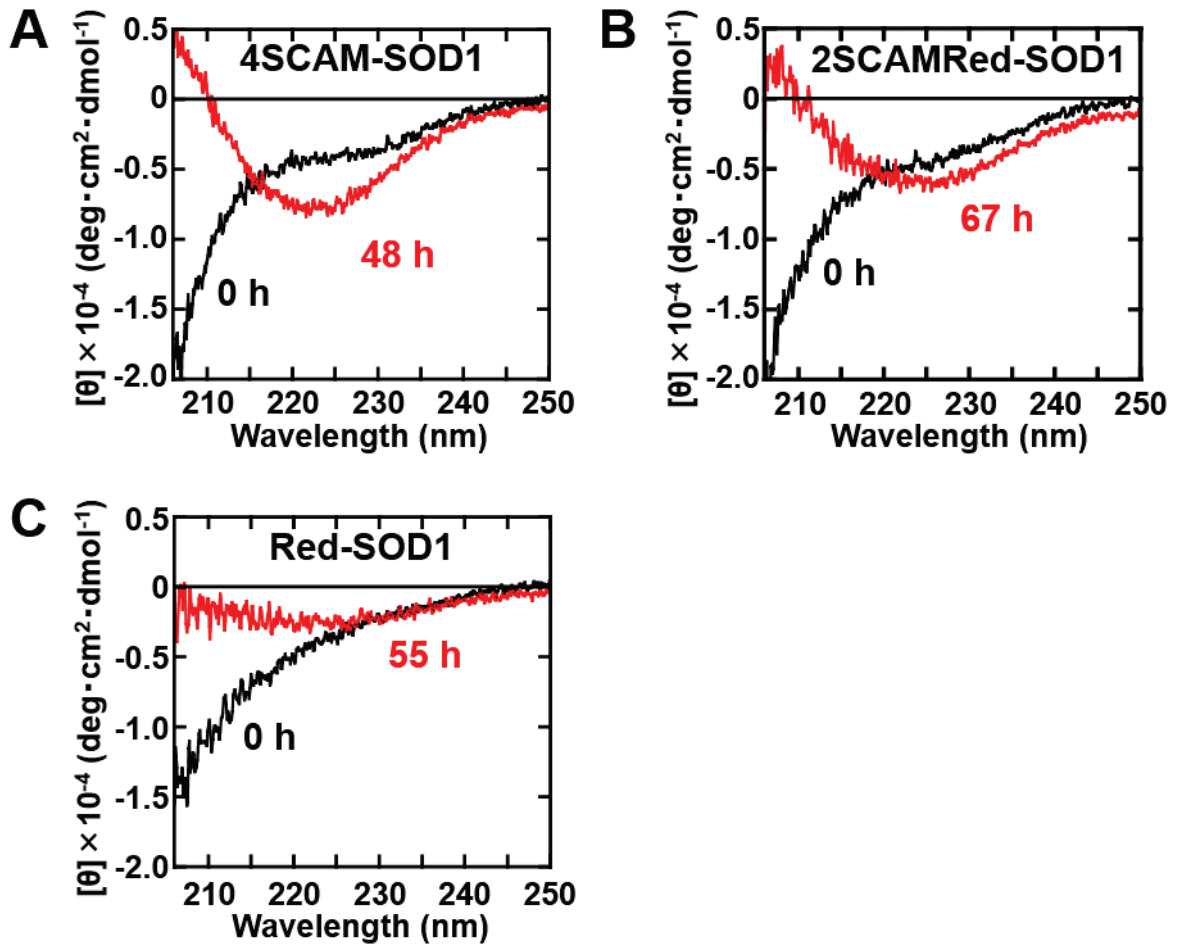


図 2-7. 0.4 M Gdn-HCl 存在下での 4SCAM-SOD1, 2SCAMRed-SOD1, Red-SOD1 の CD スペクトル測定

A は 4SCAM-SOD1, B は 2SCAMRed-SOD1, C は Red-SOD1 を示す。また、黒字はアミロイド線維形成実験前、赤字はアミロイド線維形成実験後の測定結果を示す。

2-4. 考察

本章では、野生型 SOD1 を用いて、apo 化や分子内ジスルフィド結合の還元により生じる構造安定性とアミロイド線維形成を評価した。

apo 化により野生型 SOD1 は構造の不安定化が確認された (図 2-3, 表 2-1)。これまでに、SOD1 は apo 化により、亜鉛イオンのリガンドが位置する loop Phe50-Gly82 に揺らぎが生じることが報告されている[65, 66]。しかしながら、apo 化のみではアミロイド線維を形成しなかった。そこで、さらに分子内ジスルフィド結合を還元した SOD1 を作製した。Red-SOD1 は Apo-SOD1 に比べ、さらに構造が不安定化し、37°C でインキュベートしながら振とうすると典型的なアミロイド線維を形成した。分子内ジスルフィド結合は金属イオンに比べ、構造安定性に寄与していないが[30, 65], apo 化, 分子内ジスルフィド結合の還元がともに生じることでダイマーの解離[29, 65, 67]や Cys57 の露出[68]が生じることが報告されている。これは分子内ジスルフィド結合が loop Glu49-Asn53 を固定しており, apo 化や分子内ジスルフィド結合の還元により loop Phe50-Gly82 の揺らぎがさらに大きくなることが影響していると考えられる[65]。つまり、野生型 SOD1 の金属イオンと分子内ジスルフィド結合は構造の揺らぎに大きく関与し、アミロイド線維の形成に重要な役割を持っていることが明らかとなった。さらに, apo 化, 分子内ジスルフィド結合の還元が生じた後, SOD1 の構造がアミロイド線維の形成に与える影響を評価した。Thioflavin T assay より, 4SCAM-SOD1, 2SCAMRed-SOD1, Red-SOD1 の順にアミロイド線維を形成するスピードが早かった (図 2-4)。この順番はアミロイド線維を形成する前の二次構造の変性の程度と一致した (図 2-2)。さらに, 0.4 M Gdn-HCl 存在下で Red-SOD1 を意図的に変性させると, アミロイド線維の形成が著しく早くなり, 完全変性している 4SCAM-SOD1 と同様な線維形成スピードを示した (図 2-6)。つまり, Red-SOD1 は Holo-SOD1 と類似した二次構造をとっているが, 完全変性している 4SCAM-SOD1 と同じ線維形成メカニズムをとる考えられる。Red-SOD1 は構造安定性が低いため, 構造が揺らぐことで最終的に unfold し, アミロイド線維を形成することが示唆された。そのため, 第 1 章で述べた Rebecca Nelson らの提唱する Refolding モデルと同様なアミロイド線維形成メカニズムをとること

が示唆された[21]。以上より，apo化，分子内ジスルフィド結合の還元がアミロイド線維形成の重要な因子であり，一旦2つの因子が除かれるとSOD1の構造に大きな揺らぎが生じ，最終的にunfoldすることでアミロイド線維を形成することが示された。

アミロイド線維は核形成反応が生じ，核を鋳型として伸長反応が生じることで線維が形成されることが知られている。そこで，SOD1は構造が揺らぎ，unfoldし，核部位が露出し，相互作用することでアミロイド線維を形成すると考えられる。そのため，第3章では野生型SOD1を用いてアミロイド線維形成の元となる核部位領域の同定を行う。

第3章 野生型 SOD1 のアミロイド線維を用いた核部位の同定

3-1. 緒言

第2章では野生型 SOD1 は金属イオンの除去 (apo 化), 分子内ジスルフィド結合の還元により, 構造が不安定化し, アミロイド線維を形成することを示した。一般的に, アミロイド線維は核形成反応, 伸長反応の2つの過程で形成されることが知られている (図 3-1)。核形成反応は自発的に生じにくく, 酸性条件下や第2章のように変性剤の添加など, native 構造の不安定化や, 部分的に unfold することで速やかに核が形成される。アミロイド線維は核形成反応が律速となっているが, 一旦, 核が形成されると, それを鋳型として伸長する。また, 核となる Seed (超音波処理により, アミロイド線維を断片化させた線維など) の添加により, 核形成過程を経ずに, 伸長反応が生じるため, アミロイド線維の形成スピードが著しく早くなる (Seed 効果) [69]。つまり, 核部位領域はアミロイド線維の形成初期に関わる非常に重要な領域であることが示唆される。線維核の構造の特徴として, クロスβ構造を形成しており, 堅く安定しているため, プロテアーゼ耐性を持っている。これまでに, 線維核がプロテアーゼ耐性を持つという特徴を利用し, α-synuclein[15], Aβ (1-40) [70], β2-microglobulin[71]のような病気の原因タンパク質により形成されるアミロイド線維だけでなく, GroES[7]のような直接病気と関係のないタンパク質により形成されるアミロイド線維でも核部位の同定が行われている。核となる領域を探索することは線維形成メカニズムを理解する上でとても重要なことである。近年では, 核部位を予測するプログラムも開発されており, Waltz (<http://waltz.switchlab.org/>) が知られている。

本章では, 野生型 SOD1 の Red-SOD1 より形成されたアミロイド線維に対して, リシン残基を特異的に切断する *Achromobacter lyticus* Protease I (API) と疎水性の高い脂肪族および芳香族アミノ酸を分解する proteinase K (PK) の2種類の酵素を用いて, 核部位の同定を行った。また, 完全変性モデルの 4SCAM-SOD1 についても同様に核部位の同定を行い, Red-SOD1 の核部位と対比し, 野生型 SOD1 のアミロイド線維形成メカニズムにつ

いて議論する。

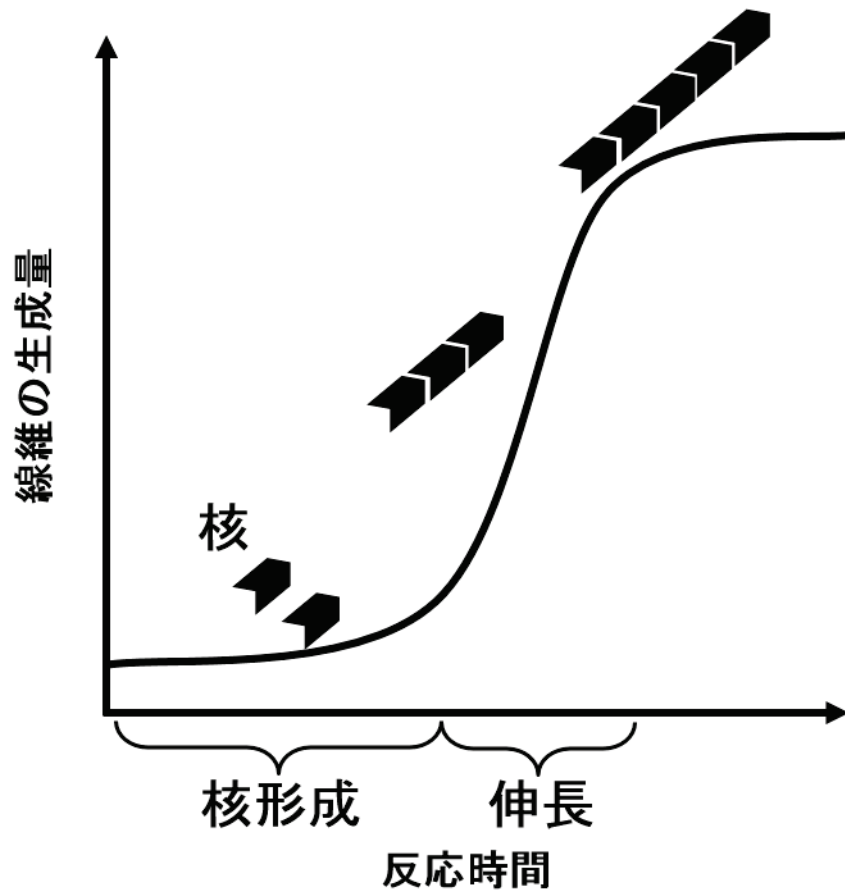


図 3-1. アミロイド線維形成モデル

核が形成し、それを鋳型として伸長することでアミロイド線維を形成する。

3-2. 材料と方法

3-2-1. Red-SOD1, 4SCAM-SOD1 により形成されたアミロイド線維の酵素消化

第2章の2-2-7と同様に Red-SOD1, 4SCAM-SOD1 を用いて 1 mg/mL, 1 mL をテストチューブに入れ, 37°C, 170 min⁻¹にて振とうし, アミロイド線維を形成させた。HITACHI himac CS 150 GXL Micro Ultracentrifuge を用いて, 形成したアミロイド線維を超遠心分離 (4°C, 150,000×g, 1 h) し, 沈殿を回収した。また, 回収した沈殿は, buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5 at 37°C) を 200 μL 加え, 再び超遠心分離 (4°C, 150,000×g, 1 h) し, 沈殿の洗浄を行った。その後, タンパク質濃度が 10 mg/mL になるように buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5 at 37°C) で懸濁させ, 2~3 sec 超音波処理 (Amplitude 20, Pulser 1) により, 沈殿をほぐした。超音波処理後の溶液をエッペンドルフチューブに 200 μL ずつ分注した。分注した各々のエッペンに, 1 mg/mL に調製した *Achromobactor lyticus* Protease I (API), Proteinase K (PK) をモル比で 1/100 になるように添加した。その後, 37°C で, 各時間で消化し, 反応はサンプル 100 μL に対して 25%酢酸 4 μL の割合で混合し, pH 3 にすることで停止した。

3-2-2. 逆相 HPLC によるサンプルの分取

消化後サンプルを超遠心分離 (4°C, 233,000×g, 1 h) し, 上清と沈殿を回収した。沈殿は wash buffer を添加し, 超遠心分離 (4°C, 233,000×g, 1 h) し, 洗浄を行った。Wash buffer として 25%酢酸 4 μL に対し, 25 mM Tris-HCl pH 7.5 at 25°C 100 μL の割合で混合したものを使用した。その後, 上清, また 7.5 M Gdn-HCl 50 μL で可溶化させた沈殿を, 逆相 HPLC (CAPCELL PAK C18 カラム: SHISEIDO) にアプライした。検出されたピーク画分をエッペンドルフチューブに回収した。逆相 HPLC の条件は, 流速 1 mL/min, 検出 UV 215 nm, buffer A: 0.05% TFA in Milli-Q, buffer B: 0.05% TFA in Acetonitrile とし, Acetonitrile 直線グラジエント 0~80% (30 min) で行った。

3-2-3. MALDI-TOF mass spectrometer による分子量の決定

逆相 HPLC で回収したペプチド溶液の Acetonitrile, TFA などの溶媒を, エバポレーターを用いて除いた。エッペンドルフチューブに TA buffer (0.1% TFA in Milli-Q : Acetonitrile=2 : 1) 50 μ L を加え溶解し, これをサンプル溶液とした。Mass spectrometer のキャリブレーション標準試料として Peptide Calibration Standard, 及びサンプル溶液を Matrix (α -Cyano-4-hydroxy-cinnamic acid/ TA) 飽和溶液と 1 : 1 の割合で混合させ, ターゲット上に各々 (キャリブレーション 0.5 μ L, サンプル 1 μ L ずつ) のせ, 常温で乾燥させた。測定はプロトコールに従い, サンプル分子量の測定を BRUKER DALTONICS autoflex MALDI-TOF mass spectrometer を用い, 得られた分子量から SOD1 のアミノ酸配列に相当する領域を解析した。

3-2-4. プロテインシーケンサーによる分析

逆相 HPLC で回収したサンプルの Acetonitrile, TFA などの溶媒を, エバポレーターを用いて除いた後, エッペンドルフチューブに 1 本当たり逆相 HPLC の buffer A (0.05% TFA in Milli-Q) 30 μ L に溶かし, これをサンプル溶液とした。まず, ポリブレン溶液をガラスファイバーディスクに 30 μ L のせ, 5 分間乾燥させた後, プロトコールに従いポリブレン処理した。次に, サンプル溶液もガラスファイバーディスクに 30 μ L ずつのせ, それぞれ 5 分間乾燥させた後, プロトコールに従い, SHIMADZU PPSQ-10 Protein Sequencer を用いた。解析は各々のアミノ酸残基の N 末端から 5 または 10 残基の決定を行った。

3-2-5. 核部位領域の同定

各々のアミロイド線維核構造部位と考えられるアミノ酸配列は, MALDI-TOF mass spectrometer とプロテインシーケンサーによる分析結果, アミロイド線維核予測プログラムである Waltz (<http://waltz.switchlab.org/>) を用いて判断した。

3-2-6. Red-SOD1 のアミロイド線維の消化後 Seed 実験

Red-SOD1 のアミロイド線維に対し、モル比 1/100 の PK を添加し、10 h 消化後のサンプル (Red-SOD1-PK)、モル比 1/100 の API を添加し、20 h 消化後のサンプル (Red-SOD1-API) を作製し、超音波処理 (Amplitude 20, Pulser 1, 10 sec) した。一方で、超音波処理 (Amplitude 20, Pulser 1, 40 sec) した Red-SOD1 のアミロイド線維 (Red-SOD1-full length) も Seed 効果を比較するために用いた。これらのサンプルを Thioflavin T assay による蛍光強度を約 20 に希釈し、Seed サンプルを作製した。これを第 2 章の 2-2-7 と同様に 1 mg/mL, 1 mL に調製した Red-SOD1 をテストチューブに入れ、調製した Seed サンプルを 1% または 5% 添加し、37°C, 170 min⁻¹ にて振とうし、それぞれの Seed 効果について調べた。

3-3. 結果

3-3-1. Red-SOD1 のアミロイド線維を用いた核部位同定

Red-SOD1 から形成したアミロイド線維に対して、API 消化、PK 消化後の TEM 観察を図 3-2, また, 線維幅を表 3-1 に示した。TEM 観察より, 線維幅が細く, 線維長が短くなっており, 酵素消化されていることが確認された。

さらに, 消化後サンプルを 7.5 M Gdn-HCl を用いて溶解し, 逆相 HPLC にてペプチド断片の回収を行った。その結果を図 3-3 に示した。API 消化 (20 h) 後, 溶出時間 16-20 分間に 3 つの Peak (Peak 1, 2, 3) を得た。さらに, 分取した Peak 1 を MALDI-TOF mass spectrometer にて測定すると質量は 1587.6 であった。一方, プロテインシーケンサーによる分析より, N 末端配列として Thr-Gly-Asn-Ala-Gly が得られた。SOD1 のアミノ酸配列上で N 末端が Thr-Gly-Asn-Ala-Gly の配列かつ分子量が 1587.6 に相当するアミノ酸配列は $^{137}\text{Thr-Gly-Asn-Ala-Gly-Ser-Arg-Leu-Ala-Cys-Gly-Val-Ile-Gly-Ile-Ala-Gln}^{153}$ (理論値 1587.7) であった。同様に解析を行うと, Peak 2 は $^{10}\text{Gly-Asp-Gly-Pro-Val-Gln-Gly-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Gln-Lys}^{23}$, Peak 3 は $^{92}\text{Asp-Gly-Val-Ala-Asp-Val-Ser-Ile-Glu-Asp-Ser-Val-Ile-Ser-Leu-Ser-Gly-Asp-His-Cys-Ile-Ile-Gly-Arg-Thr-Leu-Val-Val-His-Glu-Lys}^{122}$ であった。一方で, PK 消化 (10 h) 後, 単一の Peak 4 を得た。また, PK 消化 2 h を行い, Peak 5 を得た。これらの結果に相当するアミノ酸配列の Peak 4 は $^{16}\text{Gly-Ile-Ile-Asn-Phe}^{20}$, Peak 5 は $^1\text{Ala-Thr-Lys-Ala-Val-Cys-Val-Leu-Lys-Gly-Asp-Gly-Pro-Val-Gln-Gly-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Gln-Lys-Glu-Ser-Asn-Gly-Pro-Val-Lys-Val-Trp}^{32}$ と $^{89}\text{Ala-Asp-Lys-Asp-Gly-Val-Ala-Asp-Val-Ser-Ile-Glu-Asp-Ser-Val-Ile-Ser-Leu-Ser-Gly-Asp-His-Cys-Ile-Ile-Gly-Arg-Thr-Leu-Val-Val-His-Glu-Lys-Ala-Asp-Asp-Leu-Gly-Lys-Gly-Gly}^{130}$ の 2 つのペプチドが混合していた。以上の解析した結果を, 表 3-2 に示した。

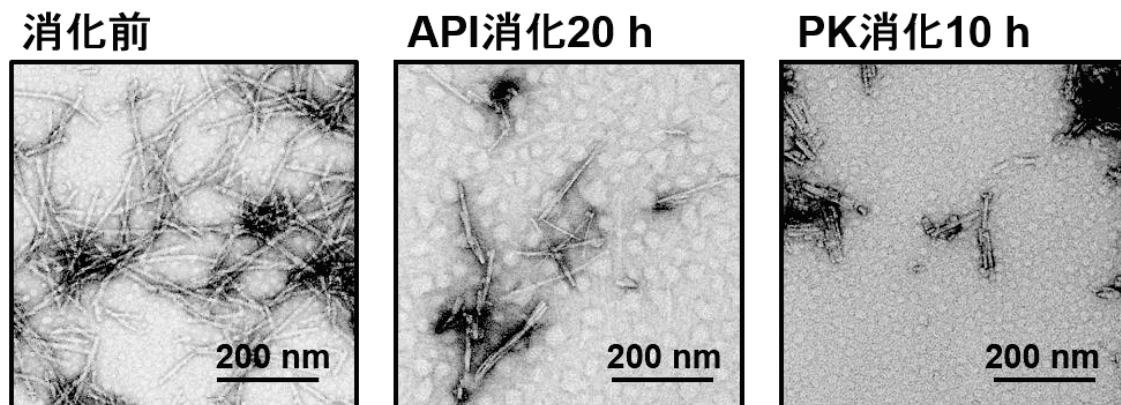


図 3-2. Red-SOD1 アミロイド線維の酵素消化前後の TEM 画像

左図は酵素消化前のアミロイド線維，中央図は API 消化 20 h 消化後，
右図は PK 消化 10 h 消化後の TEM 観察を示す。スケールバーは 200 nm を示す。

表 3-1. Red-SOD1 の酵素消化前後の線維幅

	線維幅* (nm)
酵素消化前	10.9±0.6
API 消化 20 h	5.2±1.0
PK 消化 10 h	10.3±0.1

*線維幅は図 3-2 の TEM 画像より，
線維の 3 か所における平均値±標準偏差を示している。

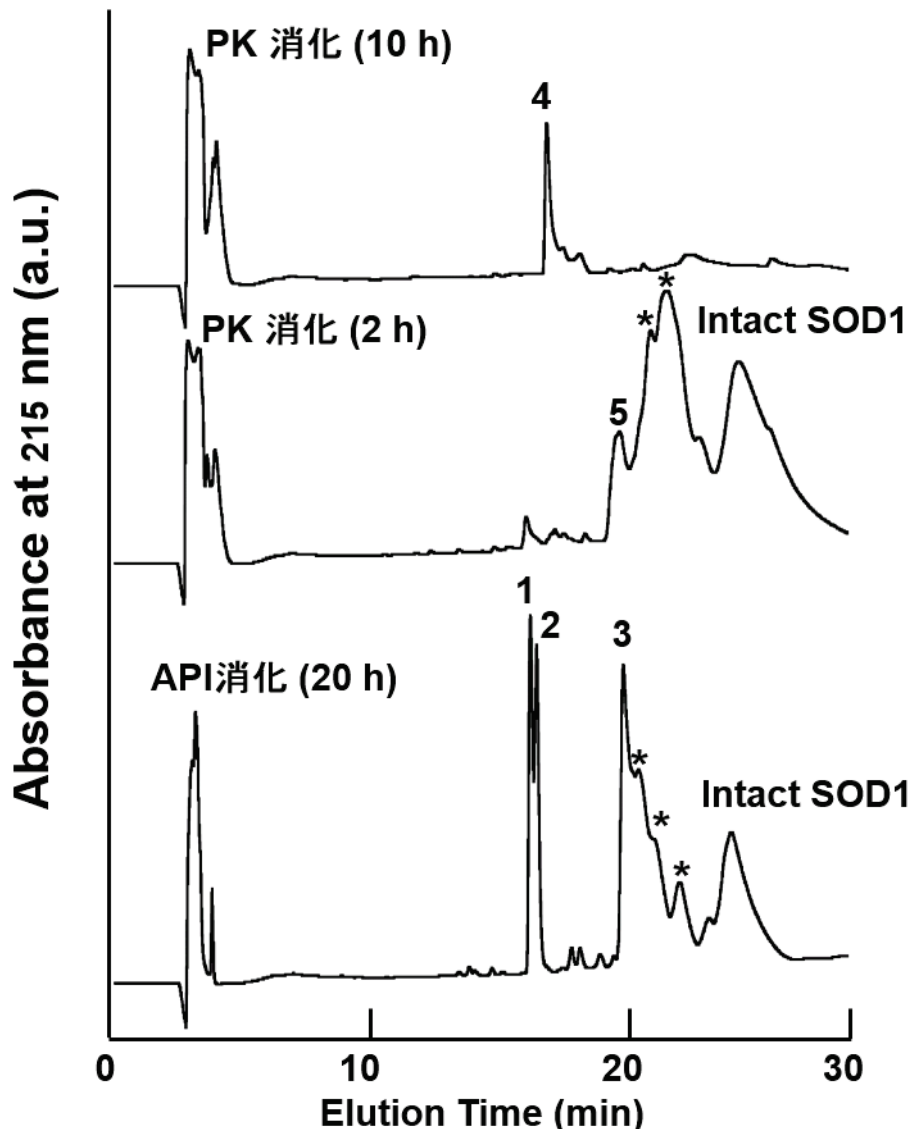


図 3-3. Red-SOD1 の消化サンプルの HPLC 溶出パターン

*は部分的に消化された中間体を示す。

表 3-2. Red-SOD1 アミロイド線維の核部位ペプチドの解析

Peak No.	Detected		Assignment (理論値)
	mass number	API 消化 PK 消化	
1	1587.6		¹³⁷ TGNAGSRLACGVIGIAQ ¹⁵³ (1587.7)
2	1501.6		¹⁰ GDGPVQGIINFEQK ²³ (1501.5)
3	3264.4		⁹² DGVADVSIEDSVISLSGDHCCIIGRTLTVVHEK ¹²² (3264.6)
4		563.7	¹⁶ GIINF ²⁰ (562.7)
5		3412.2	¹ ATKAVCVLKGDPVQGIINFEQKESNGPVK ³² (3412.8)
		4292.4	⁸⁹ ADKDGADVSIEDSVISLSGDHCCIIGRTLTVVHEKADDLGKGG ¹³⁰ (4293.7)

3-3-2. 4SCAM-SOD1 のアミロイド線維を用いた核部位同定

4SCAM-SOD1 より形成したアミロイド線維に対して、API 消化、PK 消化後の TEM 観察を図 3-4、また、線維幅を表 3-3 に示した。TEM 観察により、Red-SOD1 と同様に線維幅が細く、線維長が短くなっており、酵素消化されていることが確認された。

さらに、消化後サンプルを 7.5 M Gdn-HCl で溶解し、逆相 HPLC にてペプチド断片を回収した。その結果を図 3-5 に示した。API 消化 (20 h) 後、溶出時間 16-21 分の間に 3 つの Peak (Peak 6, 7, 8) を得た。Red-SOD1 と同様にプロテインシーケンサーと MALDI-TOF mass spectrometer にて得られた分析結果より SOD1 のアミノ酸配列に相当する配列の同定を行った。ただし、4SCAM-SOD1 は Cys をアルキル化しているため、Peak 6, 8, 10 は SOD1 のアミノ酸配列より算出される分子量に 57 を付加した。これらの結果に相当するアミノ酸配列の Peak 6 は ¹³⁷Thr-Gly-Asn-Ala-Gly-Ser-Arg-Leu-Ala-Cys-Gly-Val-Ile-Gly-Ile-Ala-Gln¹⁵³, Peak 7 は ¹⁰Gly-Asp-Gly-Pro-Val-Gln-Gly-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Gln-Lys²³, Peak 8 は ⁹²Asp-Gly-Val-Ala-Asp-Val-Ser-Ile-Glu-Asp-Ser-Val-Ile-Ser-Leu-Ser-Gly-Asp-His-Cys-Ile-Ile-Gly-Arg-Thr-Leu-Val-Val-His-Glu-Lys¹²² であった。一方で、PK 消化 (15 h) 後、単一の Peak 9 を得た。また、PK 消化 2 h を行い、Peak 9, 10 を得た。

これらの結果に相当するアミノ酸配列の Peak 9 は $^{16}\text{Gly-Ile-Ile-Asn-Phe}^{20}$, Peak 10 は $^{1}\text{Ala-Thr-Lys-Ala-Val-Cys-Val-Leu-Lys-Gly-Asp-Gly-Pro-Val-Gln-Gly-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Gln-Lys-Glu-Ser-Asn-Gly-Pro-Val-Lys-Val-Trp}^{32}$ と $^{89}\text{Ala-Asp-Lys-Asp-Gly-Val-Ala-Asp-Val-Ser-Ile-Glu-Asp-Ser-Val-Ile-Ser-Leu-Ser-Gly-Asp-His-Cys-Ile-Ile-Gly-Arg-Thr-Leu-Val-Val-His-Glu-Lys-Ala-Asp-Asp-Leu-Gly-Lys-Gly-Gly}^{130}$ の 2 つのペプチドが混合していた。以上の解析した結果を、表 3-4 に示した。

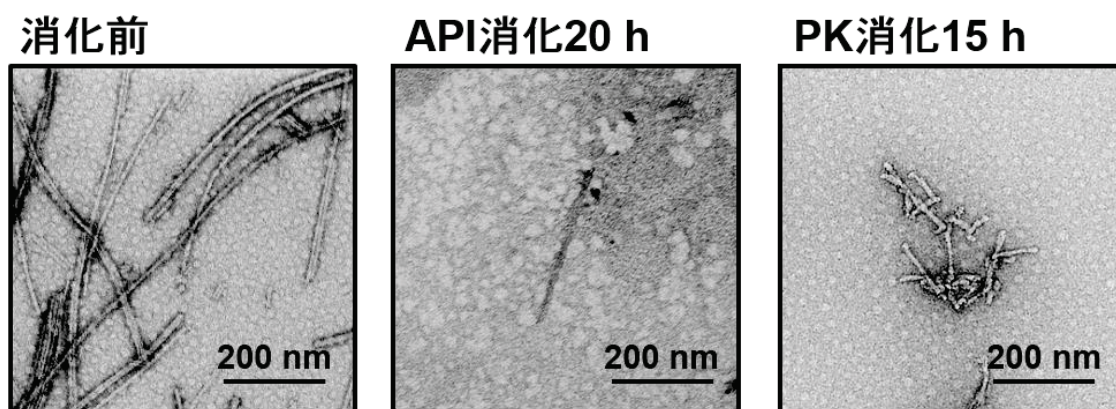


図 3-4. 4SCAM-SOD1 アミロイド線維の酵素消化前後の TEM 画像

左図は酵素消化前のアミロイド線維，中央図は API 消化 20 h 消化後，右図は PK 消化 15 h 消化後の TEM 観察を示す。スケールバーは 200 nm を示す。

表 3-3. 4SCAM-SOD1 の酵素消化前後の線維幅

	線維幅* (nm)
酵素消化前	13.2±0.6
API 消化 20 h	10.3±0.1
PK 消化 15 h	9.2±1.1

*線維幅は図 3-4 の TEM 画像より，

線維の 3 か所における平均値±標準偏差を示している。

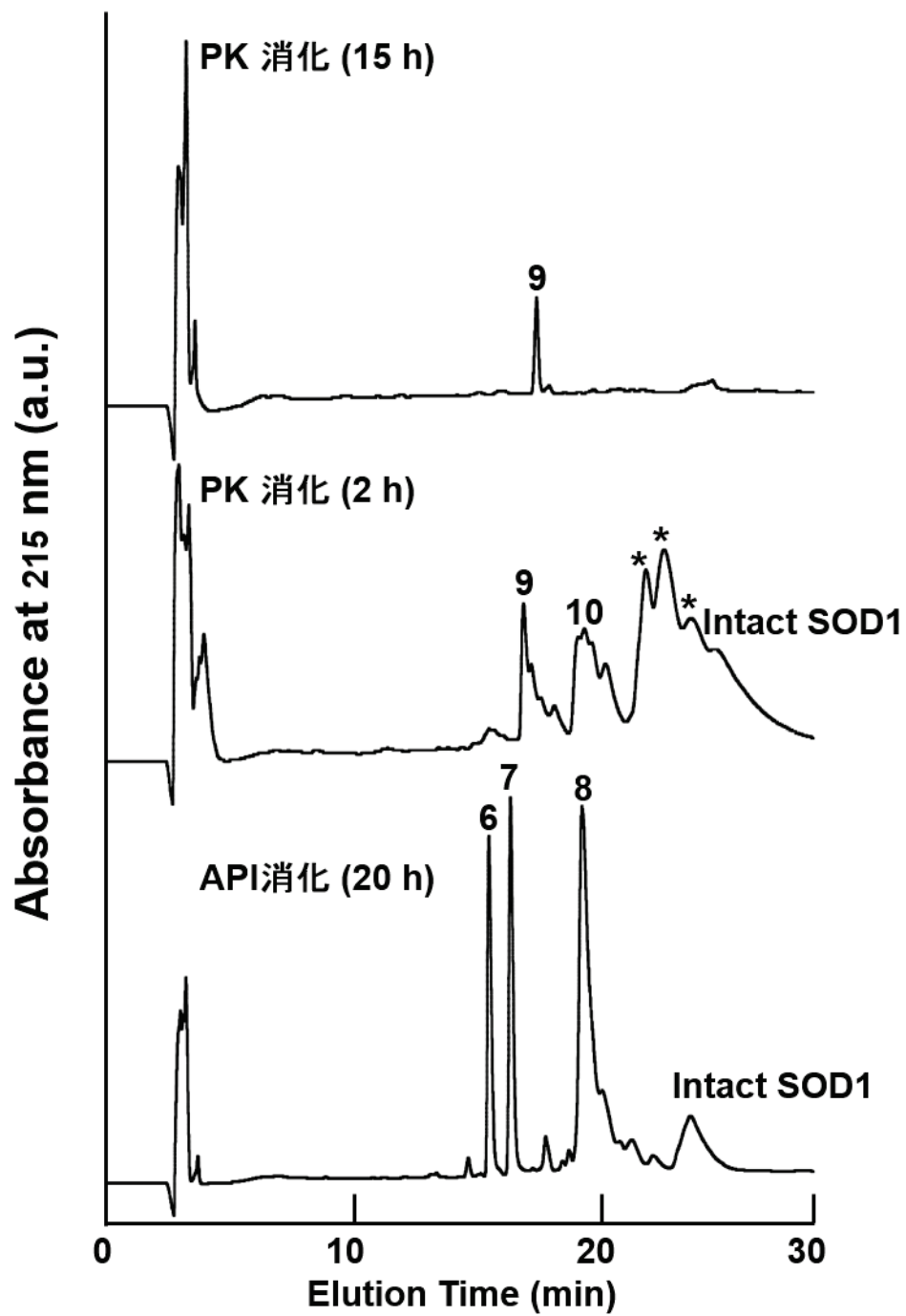


図 3-5. 4SCAM-SOD1 の HPLC 溶出パターン

*は部分的に消化された中間体を示す。

表 3-4. 4SCAM-SOD1 アミロイド線維の核部位ペプチドの解析

Peak No.	Detected		Assignment (理論値)
	API 消化	PK 消化	
6	1644.8		¹³⁷ TGNAGSRLACGVIGIAQ ¹⁵³ (1644.7)
7	1501.8		¹⁰ GDGPVQGIINFEQK ²³ (1501.5)
8	3321.1		⁹² DGVADVSIEDSVISLSGDHCHIGRTLTVVHEK ¹²² (3321.6)
9		563.2	¹⁶ GIINF ²⁰ (562.7)
10		3470.2	¹ ATKAVCVLKGDPVQGIINFEQKESNGPVK ³² (3469.8)
		4351.8	⁸⁹ ADKDGADVSIEDSVISLSGDHCHIGRTLTVVHEKADDLGKGG ¹³⁰ (4350.7)

3-3-3. Red-SOD1 アミロイド線維の消化後の Seed 効果の評価

API, PK 酵素消化後サンプルはそれぞれ異なるペプチド断片が含まれていた。それら断片をアミロイド線維形成前の Red-SOD1 に添加し, Thioflavin T assay により Seed 効果を評価した。

結果を図 3-6 に示した。Full length, API 消化後, PK 消化後を Seed として添加することで, no seed に比べ, 蛍光強度の増加が早く見られた。面白いことに, API 消化の添加は full length と類似した蛍光強度を示した。以上の結果より, 消化後サンプルは seed 効果を持っていることが示された。

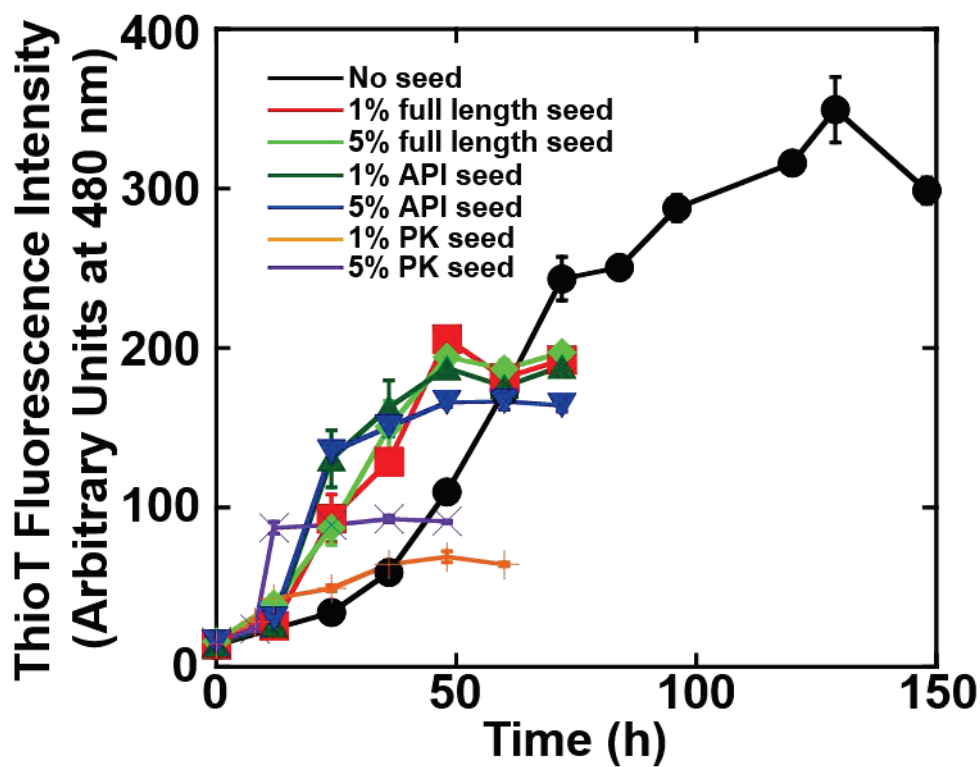


図 3-6. 酵素消化後 Red-SOD1 の Seed 効果確認のための Thioflavin T assay

(●)は No seed, (■)は 1% full length seed, (◆)は 5% full length seed, (▲)は 1% API seed, (◆)は 5% API seed, (+)は 1% PK seed, (×)は 5% PK seed を示す。

平均値をプロットし、エラーバーは 3 回測定 of 標準偏差を示す。

3-4. 考察

本章では、野生型 SOD1 の Red-SOD1, 4SCAM-SOD1 のアミロイド線維を用いて、核部位の同定を行った。

Red-SOD1, 4SCAM-SOD1 のアミロイド線維は 3 か所のプロテアーゼ耐性領域が存在した。3 つの領域は SOD1 のアミノ酸配列では全体に広がっており、N 末端領域、セントラル領域、C 末端領域に存在していた (図 3-7)。特に、C 末端領域には Cys57 と分子内ジスルフィド結合を形成している Cys146 が存在していたため、分子内ジスルフィド結合が還元されることで C 末端領域は揺らぎ、線維形成に作用していることが示唆された。また、Waltz により予測される核部位領域は $^{14}\text{Val-Gln-Gly-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Gln}^{22}$, $^{95}\text{Ala-Asp-Val-Ser-Ile-Glu-Asp-Ser-Val-Ile-Ser-Leu-Ser-Gly-Asp-His-Cys-Ile-Ile-Gly}^{114}$, $^{145}\text{Ala-Cys-Gly-Val-Ile-Gly-Ile-Ala-Gln}^{153}$ であった。これらの領域はプロテアーゼ耐性領域と重なった。また、面白いことに、4SCAM-SOD1 の線維核は Red-SOD1 と完全に一致した (図 3-7)。4SCAM-SOD1 はアルキル化の影響を受け、完全に変性しておりアミロイド線維の形成が早かった (図 2-2, 図 2-4)。一方で、Red-SOD1 の構造は不安定であるが、二次構造をとり、アミロイド線維の形成は 4SCAM-SOD1 に比べ遅かった。今回の結果より、両者の核部位領域は重なったため、同じ領域が相互作用し核を形成することが示唆された。Red-SOD1 と 4SCAM-SOD1 の核形成時間の差は Red-SOD1 の構造が揺らぎ、unfold し、核部位が露出するまでにかかった時間であると考えられる。つまり、SOD1 は一旦、unfold することで核部位が露出し、核部位が相互作用し、アミロイド線維を形成することが明らかとなった。また、酵素消化後サンプルは seed 効果を示した (図 3-6)。特に、API seed については full length seed と類似した蛍光強度の増加が見られた。API seed は 20 h 消化後サンプルを使用した。含有ペプチドは $^{10}\text{Gly-Asp-Gly-Pro-Val-Gln-Gly-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Gln-Lys}^{23}$, $^{92}\text{Asp-Gly-Val-Ala-Asp-Val-Ser-Ile-Glu-Asp-Ser-Val-Ile-Ser-Leu-Ser-Gly-Asp-His-Cys-Ile-Ile-Gly-Arg-Thr-Leu-Val-Val-His-Glu-Lys}^{122}$, $^{137}\text{Thr-Gly-Asn-Ala-Gly-Ser-Arg-Leu-Ala-Cys-Gly-Val-Ile-Gly-Ile-Ala-Gln}^{153}$ の 3 つのペプチド断片の混合物である。full length seed はアミロイド線維の全長を用いているため、核部位領域は 3 か所含まれている。

そのため、API seed は full length seed と類似した蛍光強度の増加を示したと考えられる。一方で、PK seed は蛍光強度の増加が full length seed に比べ、少なかった。PK seed は 10 h 消化することで、N 末端領域の一か所 ($^{16}\text{Gly-Ile-Ile-Asn-Phe}^{20}$) のみ含まれていた。しかし、no seed に比べ、蛍光強度の増加が早く見られたため、N 末端領域だけでも、Seed 効果を持ち、蛍光強度の違いはセントラル領域、C 末端領域が影響している可能性が示唆された。一方で、PK 消化で得られたペプチドが 5 残基と短かったため、アミロイド線維の核として作用するのかが懸念された。しかし、これまでに human islet amyloid polypeptide (hIAPP) の 5 残基のペプチド[72]や Sup 35 の 7 残基のペプチド[73]は典型的なアミロイド線維を形成することが報告されている。特に、Sup 35 の 7 残基からなるペプチドは X 線結晶構造解析より、steric zipper 構造によるコア構造を形成し、Sup35 にはアミロイド線維形成能の高いペプチド領域が含まれていることが示唆される[73]。そのため、今回同定された 5 残基の消化後ペプチドにおいても同様に、SOD1 の線維核として機能すると考えられる。以上より、SOD1 はプロテアーゼ耐性を持つ核部位を 3 か所持っており、酵素消化後ペプチドは Seed 効果を持っていることを示した。これらの領域は核としての機能を持っていることが明らかになった。そこで、第 4 章では同定された核部位領域が、アミロイド線維を形成するのか、また、どのようにアミロイド線維形成に作用しているのかを評価する。

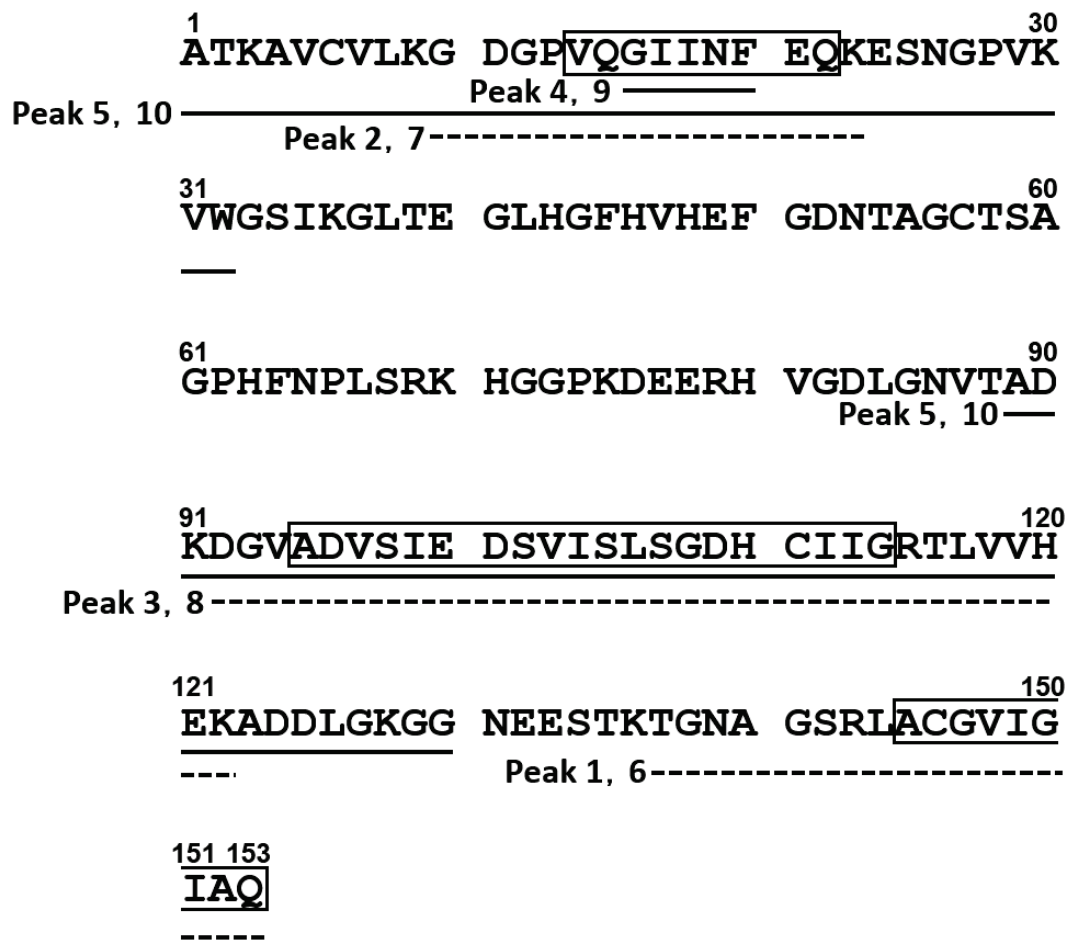


図 3-7. Red-SOD1, 4SCAM-SOD1 のアミロイド線維の酵素消化と Waltz の結果
 SOD1 のアミノ酸配列上に Red-SOD1 (図 3-3) と 4SCAM-SOD1 (図 3-5) の
 PK 消化によるペプチド断片は実線, API 消化によるペプチド断片は破線で示す。

さらに, Waltz の結果は実線の枠で示す。

第4章 核部位合成ペプチドを用いたアミロイド線維形成

4-1. 緒言

第3章では野生型 SOD1 により形成されたアミロイド線維の核部位の同定を行った。これまでに、他のタンパク質の核部位を同定した後、核部位を元にした合成ペプチドでアミロイド線維の形成を検証し、線維核としての機能を評価している[7, 15, 74]。面白いことに SOD1 は相当性のないアミノ酸配列からなる核部位が 3 か所存在した。アミノ酸配列の異なるタンパク質や合成ペプチドが相互作用してアミロイド線維を形成することが報告されているため[16, 75, 76]、相当性のないアミノ酸配列同士であっても相互作用し、核を形成し、アミロイド線維を形成することが示唆される。そこで、本章では、同定された野生型 SOD1 の核部位に相当する合成ペプチドを用いて、アミロイド線維の形成能を評価した。さらに、同一の核部位領域のみでアミロイド線維を形成するのか、またすべての核部位領域が相互作用しアミロイド線維を形成するのかを調べるために、合成ペプチドを蛍光色素でラベルした後、それぞれを混合し、アミロイド線維を形成させ、蛍光顕微鏡で観察を行った。詳細な SOD1 のアミロイド線維形成メカニズムの解明につながることを期待される。

4-2. 材料と方法

4-2-1. 合成ペプチドの決定と濃度定量

API 消化や PK 消化より得られてペプチドのアミノ酸配列, アミロイド線維核予測プログラムである Waltz (<http://waltz.switchlab.org/>) により予測されたアミノ酸配列の重なる領域を線維核とした。そこで, 合成しにくい配列を除いた P1 (Gly-Pro-Val-Gln-Gly-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Gln-Lys) と P2 (Gly-Val-Ala-Asp-Val-Ser-Ile-Glu-Asp-Ser-Val-Ile-Ser-Leu-Ser-Gly-Asp-His-Cys-Ile-Ile-Gly-Arg), P3 (Thr-Gly-Asn-Ala-Gly-Ser-Arg-Leu-Ala-Cys-Gly-Val-Ile-Gly-Ile-Ala-Gln) のペプチドを設計した (図 4-1)。ペプチドの合成は P1 が PEPTIDE 2.0 (米国), P2 と P3 はスクラム (東京) に依頼した。ペプチドの純度は HPLC や electrospray mass spectrometry により ~>95% であった。ペプチドの濃度定量は Excellence XS205Du 電子天秤 (METTLER TOLEDO) ではかりとった重量を正確とみなし, 計算により濃度決定を行った。

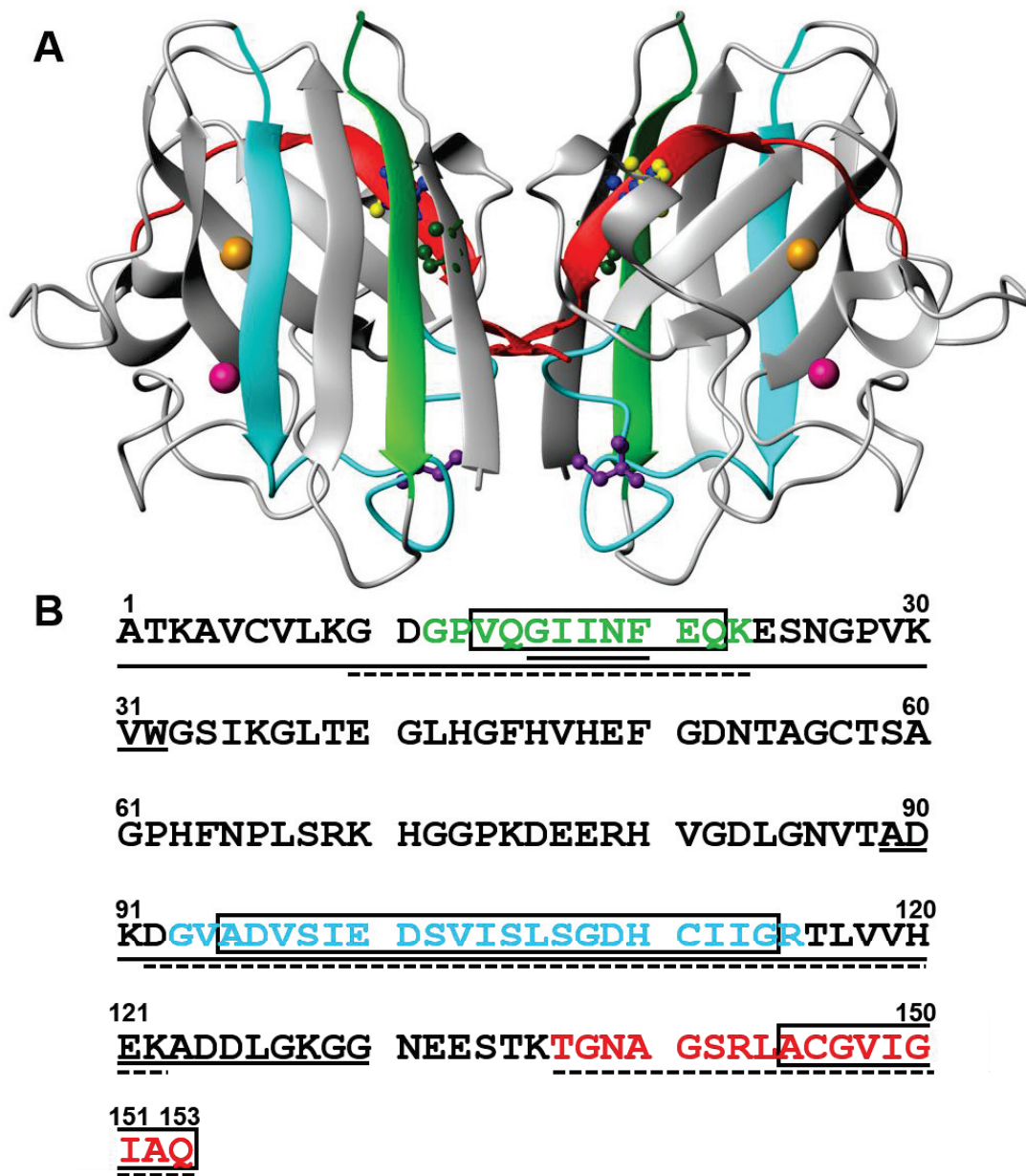


図 4-1. 3つの合成ペプチドの SOD1 の構造上の位置

A は SOD1 の構造を示す。Cys57 (黄) と Cys146 (青) は分子内ジスルフィド結合を形成し、Cys6 (緑) と Cys111 (紫) はフリーのチオール基の状態で存在している。銅イオンは橙、亜鉛イオンはピンクにて示す。合成ペプチドは P1 (Gly-Pro-Val-Gln-Gly-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Gln-Lys) は黄緑, P2 (Gly-Val-Ala-Asp-Val-Ser-Ile-Glu-Asp-Ser-Val-Ile-Ser-Leu-Ser-Gly-Asp-His-Cys-Ile-Ile-Gly-Arg) は青緑, P3 (Thr-Gly-Asn-Ala-Gly-Ser-Arg-Leu-Ala-Cys-Gly-Val-Ile-Gly-Ile-Ala-Gln) は赤で示す。

BはSOD1のアミノ酸配列を示す。合成ペプチドP1は黄緑、P2は青緑、P3は赤で示す。Waltz program (<http://waltz.switchlab.org/>)により予測された領域を実線の枠で示す。実線はPK消化により得られたペプチド断片、破線はAPIにより得られたペプチド断片を示す(図4-1の続き)。

4-2-2. 合成ペプチドのアミロイド線維形成

合成ペプチド濃度 0.2 mg/mL (P1: 150 μ M, P2: 85.4 μ M, P3: 126 μ M) になるように, buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.0 at 37°C, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, 0.4 M Gdn-HCl) で溶解させ, ϕ 10 mm のシリコナイズドしたテストチューブに入れ, パラフィルムにて密封し, 37°C, 170 min⁻¹ の条件で TAITEC, Personal-11 Water Bath Shaker にて振とうした。その間, 振とう中のサンプルを一部抜き取りアミロイド線維の経時変化測定を行うために Thioflavin T assay を行った。以下の点を変更し, 2-2-7 の方法を用いた。Thioflavin T Buffer (5 mM Sodium phosphate, 150 mM NaCl, 25 μ M Thioflavin T) を 2 mL に対し, アミロイド線維形成サンプル 40 μ L 添加し, 30 sec ボルテックスした。CD スペクトル測定は 2-2-7 から以下の点を変更した。JASCO J-820 Spectrophotometer を用い, 合成ペプチド濃度 0.2 mg/mL, 積算回数 8 で測定を行った。アミロイド線維形成実験後は超音波処理 (Amplitude 20, Pulser 1, 2~3 sec) し, 測定を行った。TEM 観察は 2-2-7 から以下の点を変更した。合成ペプチドを用いたアミロイド線維形成実験後サンプルの原液を使用した。

4-2-3. 蛍光試薬でラベルした合成ペプチドのアミロイド線維形成

P1はペプチド内のアミノ基と反応する Fluorescein-5-isothiocyanate(以下 FITC と示す), P2はペプチド内に Cys を含んでいるため, チオール基に反応する 5-(((2-iodoacetyl) amino) ethyl) amino) naphthalene-1-sulfonic acid AEDANS (1, 5-IAEDANS) (以下 AEDANS と示す), P3はペプチド内に Cys を含んでいるため, チオール基に反応する Cy3TM Maleimide (以下 Cy3 と示す) を使用した。

4-2-3-1. 合成ペプチドの単独でのアミロイド線維形成

各種合成ペプチド 0.2 mg/mL (P1 ペプチド: 150 μ M, P2 ペプチド: 85.4 μ M, P3 ペプチド: 126 μ M) になるように Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.0 at 37°C, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, 0.4 M Gdn-HCl) にて溶解し, 蛍光試薬を以下の割合 (P1-FITC は P1 に対し, FITC はモル比 0.7, P2-AEDANS は P2 に対し, AEDANS はモル比 0.7~0.8, P3-Cy3 は Cy3 の一パック全量を 500 倍に希釈したサンプルを 1 μ L) で用い, エッペンドルフチューブ内で混合し, 25°C, 30 min 遮光しながら, インキュベートすることでラベルした。そして, シリコナイズドしたテストチューブに入れ, パラフィルムにて密封し, 37°C, 170 min⁻¹の条件で TAITEC, Personal-11 Water Bath Shaker にて振とうした。その間, 振とう前後のサンプルを一部抜き取り CD スペクトル測定, TEM 観察は 4-2-2 と同様に測定した。蛍光顕微鏡の観察用サンプルは, 振とう前のサンプルから 10 μ L をスライドガラス (MATSUNAMI NEO Micro Cover Glass 25×60 mm) 上に載せ, 気泡が入らないように丁寧にカバーガラス (MATSUNAMI NEO Micro Cover Glass 18×18 mm) を置き, 余分な溶液をクリーンワイプで吸い取り周りをマニキュアで固めた。その後, 遮光した状態で 37°C, 静置で 24 h インキュベートした。観察には ZEISS Axiovert 200, EC プランネオフルアール 20×Pha 対物レンズ, P1-FITC には GFP 用#38 蛍光フィルタ, P2-AEDANS には DAPI 用#49 蛍光フィルタ, P3-Cy3 には Cy3 用#49 蛍光フィルタを用い, 画像解析には Axio Vision Release 4.5 を用いた。

4-2-3-2. 合成ペプチドの複数でのアミロイド線維形成

P1-FITC, P2-AEDANS, P3-Cy3 の混合実験は各種合成ペプチド 50 μ M に対し, 蛍光試薬は 4-2-3-1 と同様な割合で用い, エッペンドルフチューブ内で混合し, 25°C, 30 min 遮光しながら, インキュベートしラベルした。そして, シリコナイズドしたテストチューブに等量で混合し (P1-FITC と P2-AEDANS, P2-AEDANS と P3-Cy3, P1-FITC と P3-Cy3, P1-FITC と P2-AEDANS と P3-Cy3), パラフィルムにて密封し, 37°C, 170 min⁻¹の条件で TAITEC, Personal-11 Water Bath Shaker にて振とうした。その間, サンプルを一部抜き取り CD スペクトル測定, TEM 観察, 蛍光顕微鏡観察は 4-2-3-1 と同様に測定した。

4-3. 結果

4-3-1. 合成ペプチドの単独でのアミロイド線維形成

合成ペプチド (P1, P2, P3) がそれぞれアミロイド線維を形成する能力を持っているのかを評価するため, Thioflavin T assay, CD スペクトル測定, TEM 観察を行った。

図 4-2 に CD スペクトル測定, TEM 観察の結果を示した。CD スペクトル測定より短時間で β シート構造への変化が確認された。また, TEM 観察よりアミロイド線維の形成が確認された。それぞれの線維幅は P1 が 15.0 ± 1.1 nm, P2 が 10.9 ± 0.6 nm, P3 が 13.2 ± 0.6 nm であった。Thioflavin T assay による P1, P3 の蛍光強度の増加はわずかであったが, P2 は著しく蛍光強度が短時間で増加していることが確認された。以上より, 合成ペプチド P1, P2, P3 は単独でアミロイド線維を形成することが明らかになった。

表 4-1. 合成ペプチドで形成されたアミロイド線維の線維幅

	線維幅* (nm)
P1	15.0 ± 1.1
P2	10.9 ± 0.6
P3	13.2 ± 0.6

*線維幅は図 4-2 の TEM 画像より, 線維の 3 か所における平均値 \pm 標準偏差を示している。

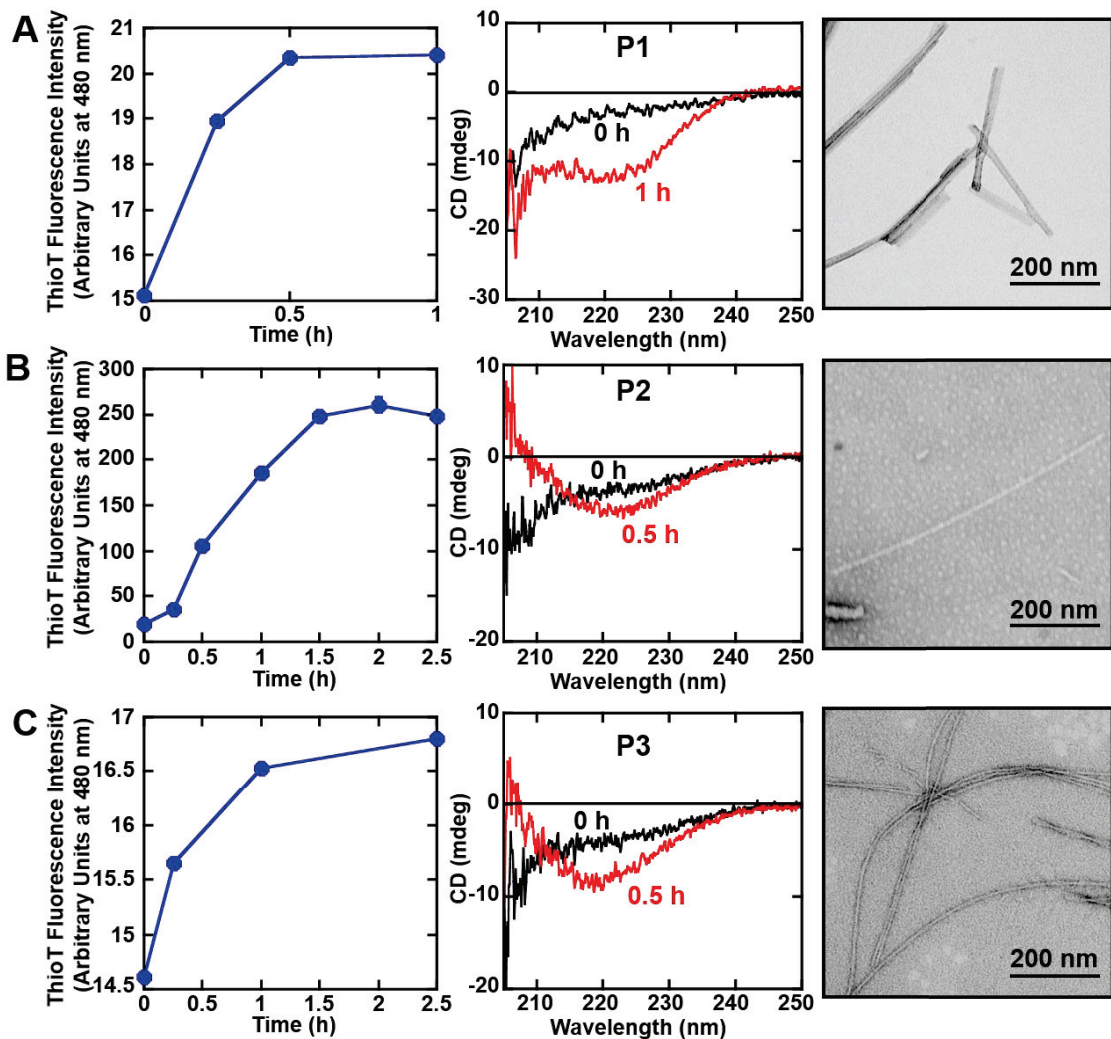


図 4-2. 合成ペプチド P1, P2, P3 によるアミロイド線維形成実験

A は P1, B は P2, C は P3 を示す。

左図は Thioflavin T assay (平均値をプロットし, エラーバーは 3 回測定の標準偏差を示す), 中央図は CD スペクトル測定, 右図は TEM 観察 (スケールバーは 200 nm) を示す。

4-3-2. 合成ペプチドの複数でのアミロイド線維形成

3 か所の核部位が SOD1 のアミロイド線維形成にどのように関与しているのかを調べるために, 2 つまたは 3 つの合成ペプチドが相互作用し, アミロイド線維を形成するかどうかを合成ペプチドを蛍光色素で修飾し, 蛍光顕微鏡観察し, 蛍光色素でラベルされたペプチドがアミロイド線維に取り込まれているのかを確認した。

初めに蛍光色素が合成ペプチドのアミロイド線維形成に与える影響を評価した。図 4-3 の CD スペクトル測定では 218 nm 付近に負のピークが確認され、 β シート構造が確認された。TEM 観察より典型的なアミロイド線維が確認された。線維幅は P1-FITC が 20.1 ± 0.6 nm, P2-AEDANS が 20.7 ± 2.0 nm, P3-Cy3 が 13.8 ± 0.1 nm であった (表 4-2)。また、図 4-4 の蛍光顕微鏡観察より、蛍光色素でラベルされたアミロイド線維を観察された。これより、合成ペプチドのアミロイド線維形成は蛍光色素により阻害されないことが確認された。

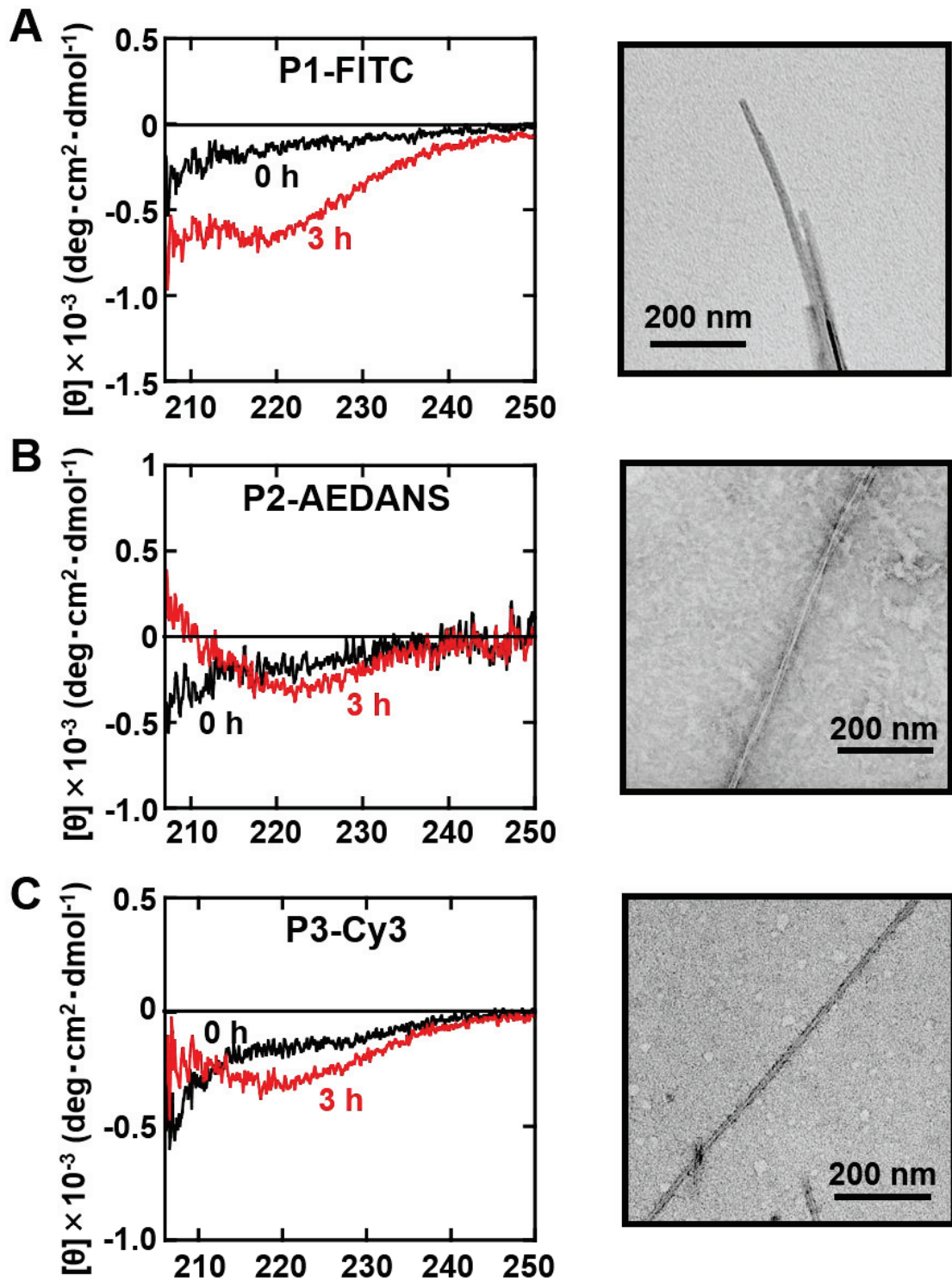


図 4-3. 蛍光色素でラベルされた合成ペプチド P1, P2, P3 のアミロイド線維形成実験

左図は CD スペクトル測定, 右図は TEM 観察,

A は P1-FITC, B は P2-AEDANS, C は P3-Cy3 を示す。スケールバーは 200 nm を示す。

表 4-2. アミロイド線維の線維幅

	線維幅* (nm)
P1-FITC	20.1±0.6
P2-AEDANS	20.7±2.0
P3-Cy3	13.8±0.1

*線維幅は図 4-3 の TEM 画像より、
線維の 3 か所における平均値±標準偏差を示す。

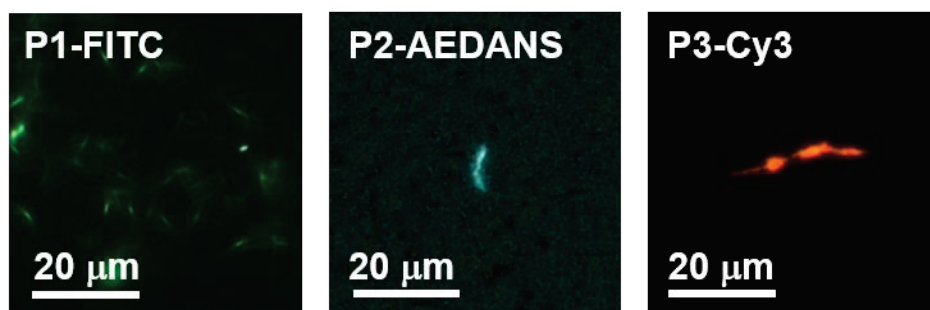


図 4-4. 蛍光色素によりラベルされた合成ペプチドの蛍光顕微鏡観察
左図は P1-FITC, 中央図は P2-AEDANS, 右図は P3-Cy3 を示す。

スケールバーは 20 μm を示す。

さらに蛍光色素でラベルされた合成ペプチド P1-FITC, P2-AEDANS, P3-Cy3 を P1-FITC と P2-AEDANS, P2-AEDANS と P3-Cy3, P1-FITC と P3-Cy3, P1-FITC と P2-AEDANS と P3-Cy3 のすべての組み合わせで等モル数になるように混合し、アミロイド線維形成を評価した。

図 4-5 より、2 種類、3 種類の合成ペプチドはすべての組み合わせにおいて、CD スペクトル測定よりβシート構造への構造変化が見られた。また、TEM 観察から典型的なアミロイド線維が確認された。線維幅は P1-FITC と P2-AEDANS の組み合わせは、13.2±0.6 nm, P2-AEDANS と P3-Cy3 の組み合わせは 20.7±2.0 nm, P1-FITC と P3-Cy3 の組み合わせは 9.8±0.6 nm, P1-FITC と P2-AEDANS と P3-Cy3 の組み合わせは 11.5±1.1 nm であった (表 4-3)。さらに、図 4-6 の蛍光顕微鏡観察より、FITC, AEDANS, Cy3 のすべての

蛍光色素が観察された。つまり、3つの合成ペプチドが含まれていることが確認された。以上の結果より、合成ペプチドはすべての組み合わせで相互作用し、寄り集まりアミロイド線維を形成していることが明らかになった。

表 4-3. アミロイド線維の線維幅

	線維幅* (nm)
P1-FITC, P2-AEDANS	13.2±0.6
P2-AEDANS, P3-Cy3	20.7±2.0
P1-FITC, P3-Cy3	9.8±0.6
P1-FITC, P2-AEDANS, P3-Cy3	11.5±1.1

*線維幅は図 4-5 の TEM 画像より、
線維の 3 か所における平均値±標準偏差を示す。

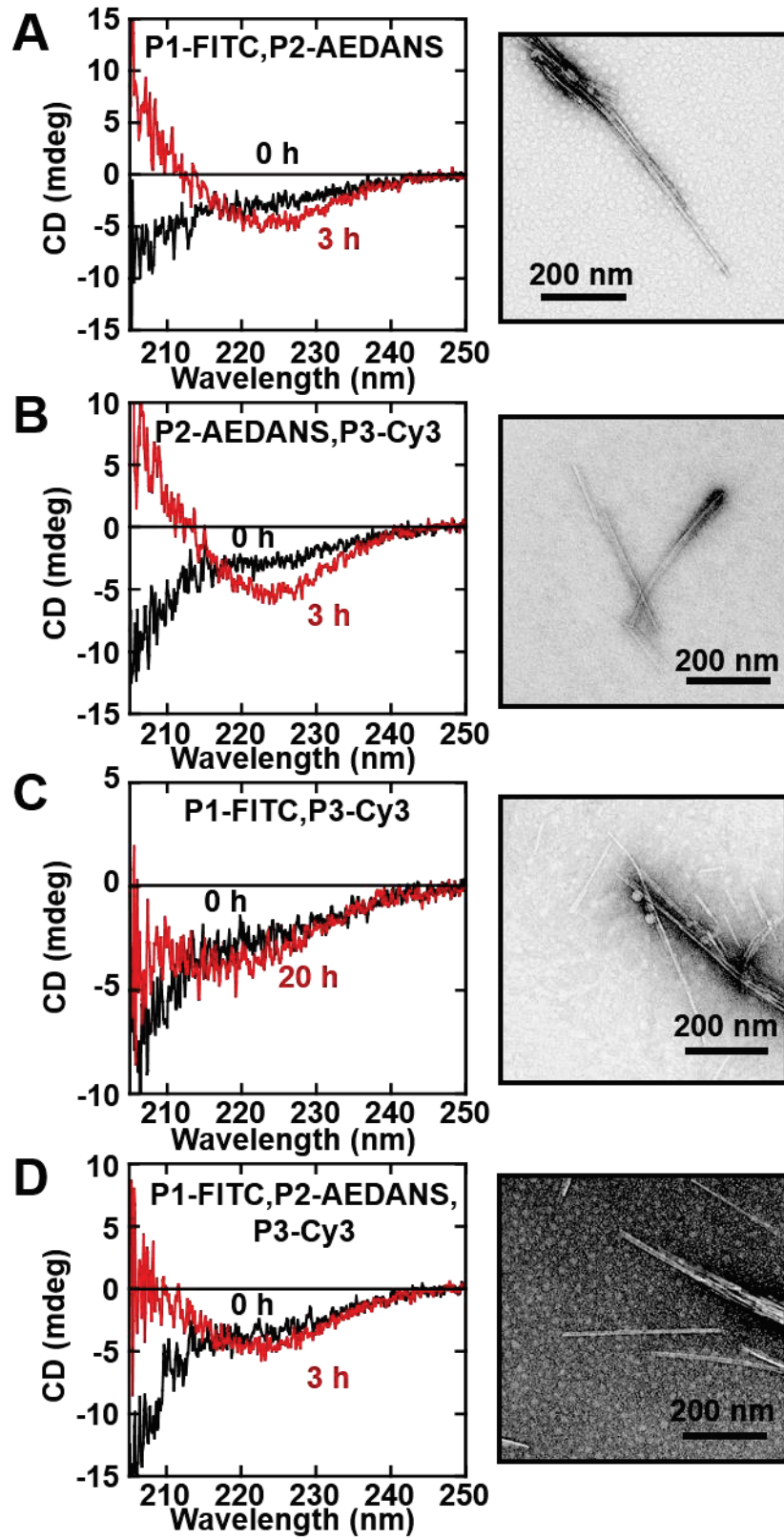


図 4-5. 蛍光色素でラベルし、複数で混合した合成ペプチドによるアミロイド線維形成

左図は CD スペクトル測定, 右図は TEM 観察(スケールバーは 200 nm)を示す。
A は P1-FITC と P2-AEDANS, B は P2-AEDANS と P3-Cy3, C は P1-FITC と P3-Cy3,
D は P1-FITC と P2-AEDANS と P3-Cy3 を混合した結果を示す (図 4-5 の続き)。

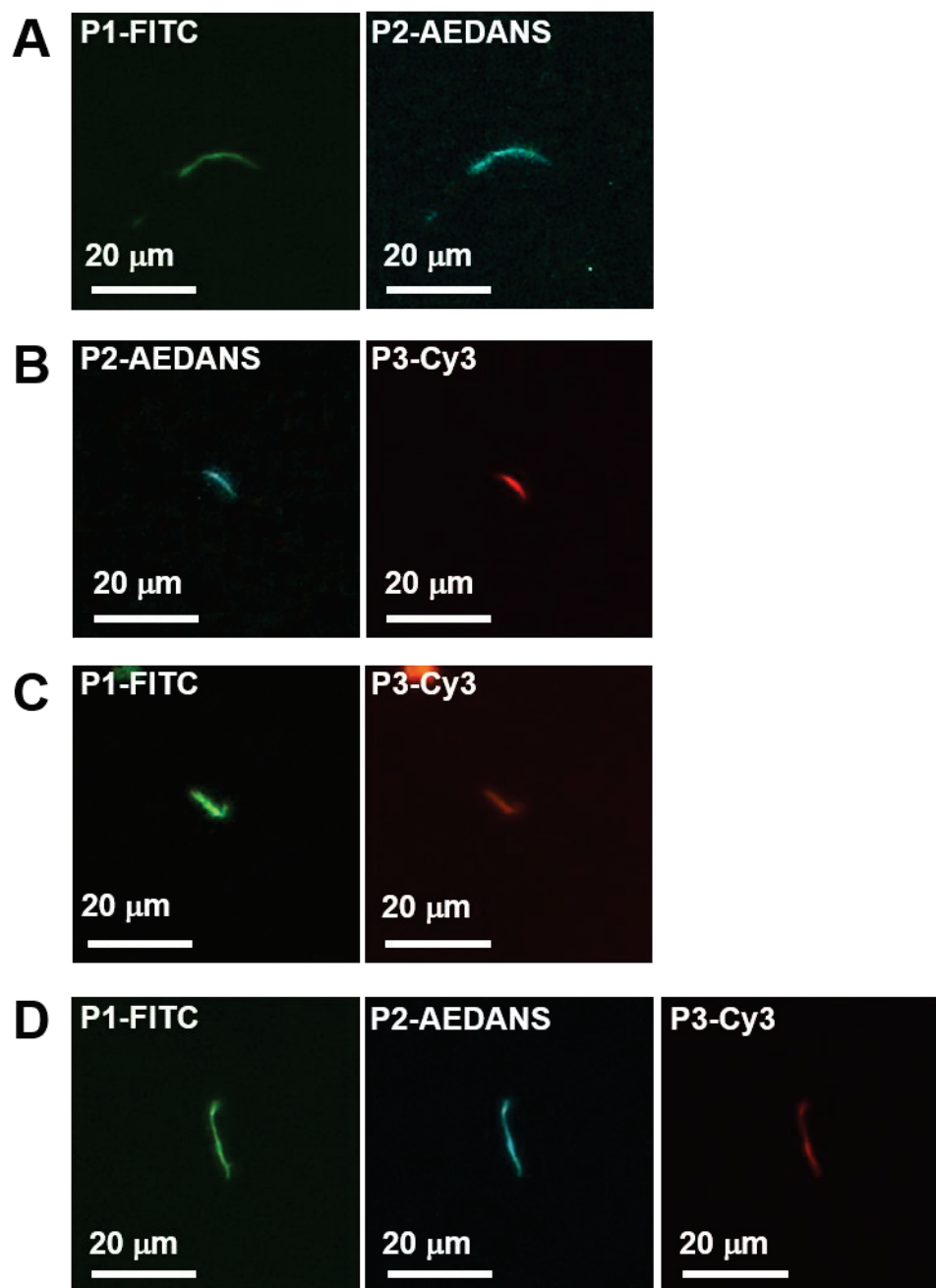


図 4-6. 蛍光色素でラベルし, 複数で混合した合成ペプチドによる
アミロイド線維形成の蛍光顕微鏡観察

AはP1-FITCとP2-AEDANS, BはP2-AEDANSとP3-Cy3, CはP1-FITCとP3-Cy3,
DはP1-FITCとP2-AEDANSとP3-Cy3を混合し, アミロイド線維を形成した結果を示す。

スケールバーは20 μm を示す(図4-6の続き)。

4-4. 考察

本章では核部位合成ペプチドを用いたアミロイド線維形成を評価した。まず、核部位合成ペプチドの単独でのアミロイド線維形成を評価した。SOD1 の 3 つの核部位ペプチドはそれぞれアミロイド線維を形成する能力を持っていた。これは、His-tagged halophilic protein が複数の核部位領域を持ち、それぞれの核部位領域はアミロイド線維を形成する能力を持っていることと類似する[74]。図 4-2 より、それぞれの合成ペプチドの Thioflavin T assay は蛍光強度の増加がわずかであった。この現象は合成ペプチドを用いると見られ、合成ペプチドに対して Thioflavin T の結合力が低いことが影響していると考えられる[7]。第 3 章の図 3-6 で確認された、API 消化 seed と PK 消化 seed の Thioflavin T assay による蛍光強度の違いは、P2 との関係が示唆された。API 消化 seed は P1, P2, P3 に相当するペプチド断片を含んでおり、full length seed と類似し、蛍光強度が高かった。一方で、PK 消化 seed は P1 に相当するペプチド断片のみ含んでいた。そのため、図 4-2 の Thioflavin T assay より、P2 が影響していると考えられる。さらに、核部位合成ペプチドを様々な組み合わせで混合し、合成ペプチド同士で相互作用するのかどうかを検証した。蛍光顕微鏡にて観察したところ、すべての組み合わせで、最終的に合成ペプチドがアミロイド線維に取り込まれていたため、すべての核部位ペプチドは相互作用し、アミロイド線維を形成することが明らかになった。合成ペプチド P1, P2, P3 のアミノ酸配列に共通点は見られなかった。しかしながら、Transthyretin や Insulin[75]や α -synuclein と GroES[16]や Lysozyme と Ovalbumin[76]にみられる異種タンパク質同士の相互作用により、アミロイド線維を形成することが報告されていることから、アミノ酸配列に相当性が見られない場合であっても、相互作用しアミロイド線維を形成すると考えられる。以上より、SOD1 は 3 つの核部位を持ち、それらが相互作用し、アミロイド線維を形成することが明らかになった。第 2 章から第 4 章では、野生型 SOD1 を用いてアミロイド線維の形成メカニズムを示した。そこで、第 5 章では fALS 変異体の代表例である G93ASOD1 を用いてアミロイド線維の形成メカニズムを検証する。

第5章 fALS 変異体 G93ASOD1 を用いたアミロイド線維形成

5-1. 緒言

第2章から第4章までは野生型 SOD1 のアミロイド線維形成メカニズムについて検証した。第2章では野生型 SOD1 を用いて金属イオンの除去 (apo 化), 分子内ジスルフィド結合の還元による構造の不安定化によりアミロイド線維を形成することを示し, 第3章では野生型 SOD1 のアミロイド線維の3か所ある核部位を同定し, 第4章では3か所の核部位領域が組み合わさりアミロイド線維を形成することを示した。つまり, 野生型 SOD1 の apo 化, 分子内ジスルフィド結合の還元により構造が不安定化し, 核部位が露出し, アミロイド線維を形成するという, 野生型 SOD1 の一連のアミロイド線維の形成メカニズムを述べた。しかしながら, 第1章で述べたように, fALS 患者の約20%は SOD1 に160を超える変異が見つかっており, その変異は SOD1 のアミノ酸配列の全体に散らばっている(表5-1) (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>) [25]。これまでに, fALS の患者や fALS の変異を導入したトランスジェニックマウスの脊髄から inclusion body が見つかった [38-49]。fALS 変異体においても同様にアミロイド線維の形成メカニズムを調べることで, SOD1 の misfolding や aggregation による ALS 発症の原因解明につながることを期待される。本研究では fALS 変異体モデルとしてよく用いられる G93A に注目した [43-45, 49, 56, 63, 77]。また, G93A は5番目と6番目のβストランドをつなぐ短い loop V に位置している (図5-1)。Gly から Ala に置換されることで, 側鎖の炭素が Leu38 のカルボニル酸素と立体的衝突を起こし, βバレルを不安定化すると考えられている [78]。G93A の変異を導入したトランスジェニックマウスの脊髄に Thioflavin S に染色された凝集体が見つかった [49]。

本章では, G93ASOD1 の apo 化, 分子内ジスルフィド結合の還元を行うことで生じる構造安定性を評価し, さらにアミロイド線維形成を評価した。また, G93ASOD1 だけでなく, 野生型 SOD1 を用いて還元剤存在下におけるアミロイド線維の形成能を評価し, 議論することで, 原因タンパク質 SOD1 の野生型, 変異型に関わらず生じるアミロイド線維の形成

メカニズムを解明につながることを期待される。

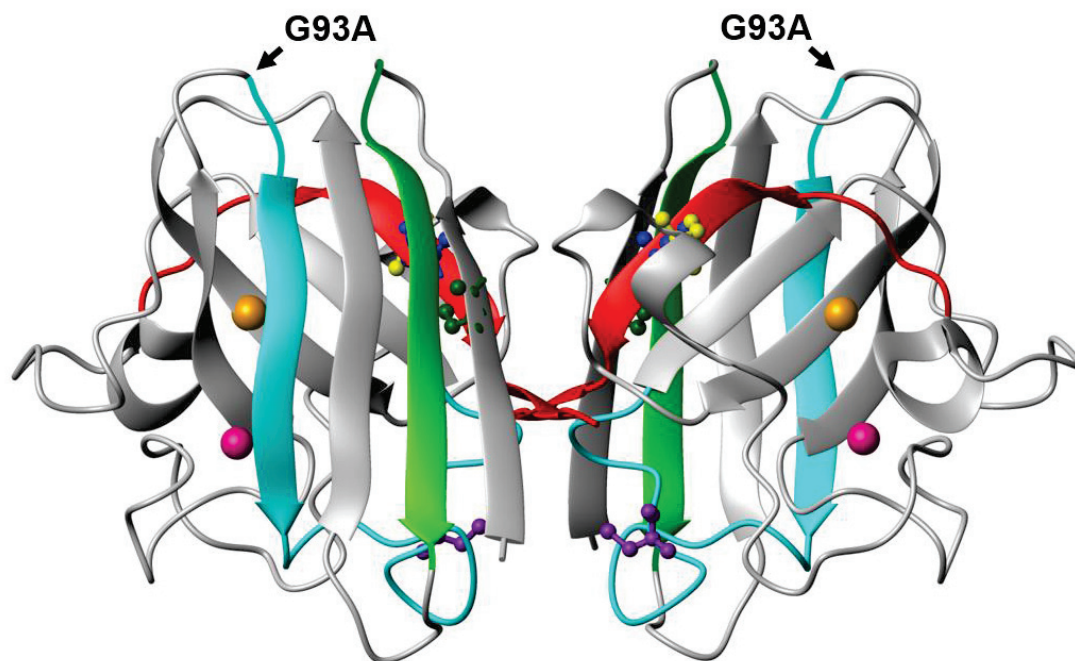


図 5-1. G93ASOD1 の変異の位置

表 5-1. fALS に見出された SOD1 の変異の一部[79]

アミノ酸 No.	塩基配列	アミノ酸置換	アミノ酸 No.	塩基配列	アミノ酸置換
エキソン1			100	GAA→GGA	Glu→Gly
4	GGC→GTC	Ala→Val	101	GAT→GGT	Asp→Gly
4	GCC→ACC	Ala→Thr	101	GAT→AAT	Asp→Asn
6	TGC→GGC	Cys→Gly	104	ATC→TTC	Ile→Phe
6	TGC→TTT	Cys→Phe	106	CTC→GTC	Leu→Val
7	GTG→GAG	Val→Glu	108	GGA→GTA	Gly→Val
8	CTG→CAG	Leu→Gln	109	GAC→AAC	Asp→Asn
14	GTG→ATG	Val→Met	112	ATC→ACC	Ile→Thr
14	GTG→GGG	Val→Gly	113	ATT→ACT	Ile→Thr
16	GGC→AGC	Gly→Ser	115	CGC→GGC	Arg→Gly
21	GAG→AAG	Glu→Lys	118	GTG→AAA	Val→Lys, Thr,
21	GAG→GGG	Glu→Gly	イントロン4		Gly, Pro, 終止
イントロン1			-11 bp	A→G	Phe, Phe, Thr,
-108bp	T→A				Gly, Pro, 終止
エキソン2					が加わる
37	GGA→AGA	Gly→Arg	-10 bp	T→G	Phe, Leu, Gln
38	CTG→GTG	Leu→Val			が加わる
41	GGC→AGC	Gly→Ser	エキソン5		
41	GGC→GAC	Gly→Asp	124	GAT→GTT	Asp→Val
43	CAT→CGT	His→Arg	125	GAC→CAC	Asp→His
46	CAT→CGT	His→Arg	126	TTG→G	Leu→Gly, Gln
48	CAT→CAG	His→Glu			Arg, Trp, Lys,
エキソン3					終止
72	GGT→AGT	Gly→Ser	126	TTG→TAG	Leu→終止
76	GAT→TAT	Asp→Tyr	127	TGGG挿入	Gly→Gly, Gly,
エキソン4					Gln, Arg, Trp,
84	TTG→TTC	Leu→Phe			Lys, 終止
84	TTG→GTG	Leu→Val	132	TT挿入	Glu→Asp,
					終止
85	GGC→CGC	Gly→Arg	133	GAA欠失	Glu欠失
86	AAT→AGT	Asn→Ser	134	AGT→AAT	Ser→Asn
90	GAC→GGC	Asp→Ala	139	AAC→AAA	Asn→Lys
90	GAC→GTC	Asp→Val	141	GGA→GCA	Gly→Ala
93	GGT→AGT	Gly→Ser	144	TTG→TCG	Leu→Ser
93	GGT→TGT	Gly→Cys	144	TTG→TTC	Leu→Phe
93	GGT→CGT	Gly→Arg	145	GCT→ACT	Ala→Thr
93	GGT→GAT	Gly→Asp	146	TGT→CGT	Cys→Arg
93	GGT→GCT	Gly→Ala	148	GTA→ATA	Val→Gly
93	GGT→GTT	Gly→Val	149	ATT→ACT	Ile→Thr
100	GAA→AAA	Glu→Lys	151	ACC→ATC	Thr→Ile

5-2. 材料と方法

5-2-1. G93ASOD1 の培養

E. coli BLR (DE3) に 2 μ L の発現系プラスミド pET23a-SOD1G93A を入れ、30 min 氷中におき、恒温槽で 42°C、45 sec ヒートショックし、氷中で 2 min インキュベートした。そして、全量 1 mL になるよう SOC 培地を入れ、37°C、170 min⁻¹ (TAITEC, Personal-11 Water Bath Shaker) にて振とう培養を 80 min 行い、LB 培地にまき、37°C、一晚 (EYELA, Soft Incubator SLI-450N) 静置培養した。その後、試験管に LB 培地を入れ、植菌し、37°C、170 min⁻¹ で 17 h 振とうし、プレ培養を行った。950 mL 培地の入った坂口フラスコに、終濃度 50 μ g/mL のアンピシリンを入れ、プレ培養した菌体を 1 mL を添加した。37°C で 15 h 振とう培養した。培養後、遠心分離 (4°C、8,000 rpm、20 min) し、菌体を回収し、-85°C で保存した。

5-2-2. G93ASOD1 の精製

E. coli BLR (DE3)/pET23a-SOD1G93A に対して 5 倍量の Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0 at 25°C, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT) を加え懸濁させ、氷中にて超音波処理 (Amplitude 60, Pulser 1, 100 min) を行い、菌体を破砕した。破砕後、遠心分離 (14,500 rpm, 30 min, 4°C) により、沈殿を回収した。Lysis buffer と等量の Lysis buffer-Gdn-HCl (50 mM Tris-HCl pH 8.0 at 25°C, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 4 M Gdn-HCl) で溶解し、半量を Q-Sepharose column buffer 塩なし (20 mM potassium phosphate pH 6.5, 0.01 mM EDTA) で透析を行い、遠心分離 (14,500 rpm, 30 min, 4°C) し、上清を回収した。上清画分を Q-Sepharose 陰イオン交換クロマトグラフィープライシ、0→0.7 M KCl のグラジエントでタンパク質を溶出させた。280 nm の吸光度と SDS-PAGE により目的のタンパク質が含まれている画分を確認し、回収した。2.5 mM 重炭酸アンモニウムで透析し、EYELA 凍結乾燥機 FD-50 を用いて凍結乾燥を行った。乾燥した G93ASOD1 は 4°C で保存した (図 5-2)。

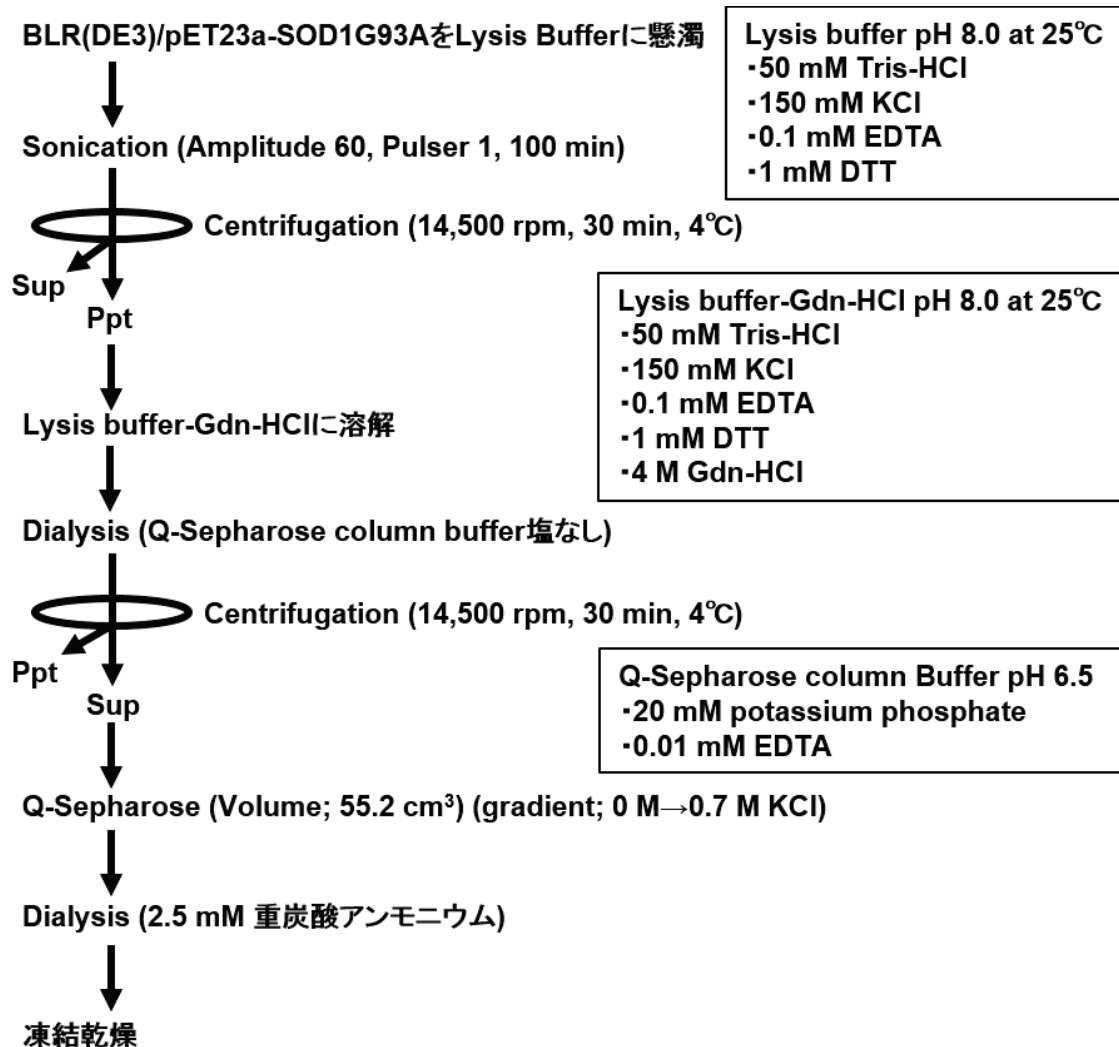


図 5-2. G93A SOD1 の精製過程

5-2-3. タンパク質の定量

Bradford 法と紫外吸光度法を用いてタンパク質の定量を行った。

Bradford 法は Bio-rad protein assay dye reagent (Bio-Rad) を 5 倍希釈し、試験管に 2 mL ずつ分注し、BSA (0.5 mg/mL) と Milli-Q 水を以下のように加え、検量線を作成した。続いて、サンプルを希釈し、0~0.5 mg/mL の範囲になるように Protein Assay 溶液に加え、サンプル全量が 40 μ L になるように Milli-Q 水を添加した。その後、595 nm での吸光度を測定し、比色定量法によって濃度を算出した。一方で、紫外吸光度法は 2-2-3 と同様に行った。

表 5-2. 検量線作成組成

濃度 (mg/mL)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
BSA (μ L)	0.0	8.0	16	24	32	40
Milli-Q (μ L)	40	32	24	16	8.0	0.0

5-2-4. Cu, Zn の定量 (誘導結合プラズマ (inductively Coupled Plasma: ICP) 分析)

2-2-4 と同様に行った。

5-2-5. 各種 G93ASOD1 の作製方法

Holo-G93ASOD1 (G93ASOD1 の holo 化) は精製後の G93ASOD1 は活性測定および金属イオンの定量より, apo 型であったため (Apo-G93ASOD1), 均一に holo 化させた。凍結乾燥後の G93ASOD1 をタンパク質濃度が 1 mg/mL になるように buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.0 at 25°C, 1 M urea, 0.1 mM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mM $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) で調製し, 25°C で 16 h インキュベートした。その後, 遠心 (12,000 rpm, 4°C, 5 min) を行い, PD-10 にかかけ, Milli-Q 水に置換した。Apo-G93ASOD1 (G93ASOD1 の apo 化) は精製後の G93ASOD1 は apo 化されていることが確認されたので, Apo-G93ASOD1 は精製後のものをそのまま使用した。Red-G93ASOD1 (apo 化, 還元剤存在下で分子内ジスルフィド結合の還元状態を維持) は Apo-G93ASOD1 を 50 mM Tris-HCl pH 7 at 25°C で溶解し, 終濃度 2 M Gdn-HCl, 5 mM DTT を添加し, 30 min 室温で静置し, 分子内ジスルフィド結合を還元させた。さらに, PD-10 を用いて 50 mM Tris-HCl pH 7.0 at 37°C, 150 mM NaCl, 2 mM DTT に置換した。

5-2-6. Gdn-HCl を用いた G93ASOD1 の構造安定性評価

Holo-G93ASOD1, Apo-G93ASOD1 の構造安定性を調べるため, 変性剤として Gdn-HCl を用いて構造安定性を評価した。

Holo-G93ASOD1, Apo-G93ASOD1 は, 0.15 mg/mL (50 mM Tris-HCl pH 7.0 at 25°C,

150 mM NaCl, 0~5 M Gdn-HCl) の終濃度になるように調製した。その後, 25°C で一晩静置し, 構造の変化を評価するため, 2-2-6 と同様に CD スペクトル測定, Tryptophan 蛍光スペクトル測定を行った。

5-2-7. 2 mM DTT 存在下におけるアミロイド線維形成

Holo-SOD1, Apo-SOD1, Holo-G93ASOD1, Apo-G93ASOD1, Red-G93ASOD1 を用いて, 2 mM DTT 存在下におけるアミロイド線維形成を評価した。

アミロイド線維形成サンプルは, SOD1 濃度 1 mg/mL (62.5 μ M), Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.0 at 37°C, 150 mM NaCl, 2 mM DTT) にて溶解し, 1 mL に調製し, ϕ 10 mm のテストチューブに入れ, 37°C, 160 min⁻¹ の条件 (TAITEC, Personal-11 Water Bath Shaker) で振とうした。Thioflavin T assay, TEM 観察の方法は 2-2-7 と同様に行った。

5-2-8. 異なる DTT 濃度存在下におけるアミロイド線維形成

還元剤存在下 (DTT 濃度 0, 0.5, 2, 5 mM) に Holo-SOD1, Apo-SOD1, Holo-G93ASOD1, Apo-G93ASOD1 を置くことで還元剤による影響を評価した。

各種サンプルを buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.0 at 37°C, 150 mM NaCl, 0~5 mM DTT, 20 μ M Thioflavin-T) に溶解させ, エッペンに各種サンプルが 1 mg/mL (62.5 μ M) になるようアミロイド線維形成 buffer を調製した。これを 1 サンプルにつき 3 well, 150 μ L/well となるようにプレートに添加し, 1 well につき 3/32 インチのアフロンビーズ (伊藤製作所) を 1 つ入れた。プレートをプレートリーダー Perkin Elmer, ARVOx 内にセットし, 以下に示した測定条件で Thioflavin T assay を行った。

(測定条件) 励起波長: 450 nm, 蛍光波長: 486 nm, 測定時間: 0.1 sec, 蛍光開口: Normal, 励起開口: N/A, 振とう継続時間: 820.0 sec, 振とう速度: Fast, 振とうタイプ: Orbital, 振とう温度: 37°C

5-2-9. SOD1 の SH 基定量

SOD1 はサブユニット内に 4 つのシステイン残基を持ち, その内 2 つは分子内ジスルフ

イド結合を形成している。還元剤存在下で野生型 SOD1, G93ASOD1 ともに還元されているかどうかを調べるために, DTNB を用いて SH 基を定量した。

活性測定 の原理を以下に示す。DTNB は, SH 基 1 mol から 1 mol の 2-nitro-5-mercaptobenzoic acid を生じる。この 2-nitro-5-mercaptobenzoic acid は黄色に発色し, チオール基の吸光度である 412 nm から SH 基を定量することができる (モル吸光度定数: $\epsilon_{412 \text{ nm}}=13,600$)。

アミロイド線維形成前の SH 基定量は次の通りに行った。凍結乾燥サンプル (Apo-SOD1, Apo-G93ASOD1) を buffer③に溶解し, 遠心 (14,000 rpm, 2 min, 4°C) 後, 表 5-3 の組成で調製し, タンパク定量および 412 nm の吸光度を測定した。さらに, 吸光度の式(3)より計算値による SH 基 1 mol あたりの吸光度を求め, 先に得られた実験値との比によって SH 基の個数を定量した。

$$\text{式(3)} \quad A = \epsilon_{412 \text{ nm}} l c \quad (\epsilon: \text{吸光定数}(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}), l: \text{光路長}(\text{cm}), c: \text{濃度}(\text{mol/L}))$$

表 5-3. 反応液組成

Buffer	コントロール	サンプル
①*1	2 mL	2 mL
②*2	500 μ L	500 μ L
③*3	500 μ L (Buffer のみ)	500 μ L (SOD1 入り)
Total	3 mL	3 mL

※1 0.2 M Tris-HCl pH 8.5 at 25°C, 1 mM EDTA, 7.5 M Gdn-HCl

※2 10 mM Tris-HCl pH 8.5 at 25°C, 1 mM EDTA, 0.4 mM DTNB

※3 10 mM Tris-HCl pH 8.5 at 25°C, 1 mM EDTA

アミロイド線維形成後の SH 基定量は次の通りに行った。5-2-7 で作製したアミロイド線維を用いて, 遠心 (14,500 rpm, 5 min, 4°C) し, 沈殿を回収した。沈殿を Milli-Q 水を用いて水洗し, DTT を除去した。さらに, 遠心 (14,500 rpm, 5 min, 4°C) し, 沈殿を回収し, Buffer③を添加し, 溶解させた。表 5-4 の組成で調製し, タンパク定量および 412 nm

の吸光度を測定した。

表 5-4. 反応液組成

Buffer	コントロール	サンプル
① ^{※1}	500 μ L	500 μ L
② ^{※2}	500 μ L	500 μ L
③ ^{※3}	2 mL (Buffer のみ)	2 mL (SOD1 入り)
Total	3 mL	3 mL

※1 0.55 M Tris-HCl pH 8.5 at 25°C, 1 mM EDTA

※2 50 mM Tris-HCl pH 7.6 at 25°C, 1 mM EDTA, 0.4 mM DTNB

※3 50 mM Tris-HCl pH 7.5 at 25°C, 1 mM EDTA, 6 M Gdn-HCl

5-3. 結果

5-3-1. G93ASOD1 の二次構造と構造安定性の解析

まず初めに G93ASOD1 の holo 型, apo 型, 還元型の二次構造を解析した (図 5-3)。

Holo-G93ASOD1 は β シート構造特有の 208 nm 付近に負の極大が見られた。一方で, Apo-G93ASOD1 はわずかに unfold しており, さらに Red-G93ASOD1 はランダム構造をとっていた。以上より, G93ASOD1 は apo 化により構造がわずかに変性し, さらに分子内ジスルフィド結合の還元により著しく構造が変性していることが示された。

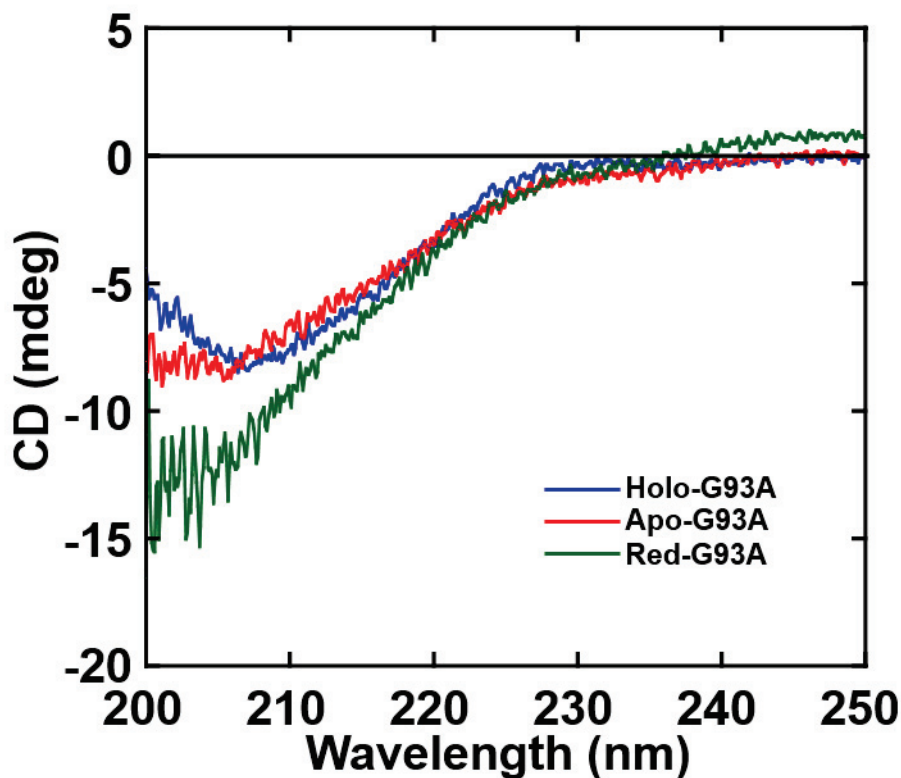


図 5-3. G93ASOD1 の CD スペクトル測定

続いて, Holo-G93ASOD1, Apo-G93ASOD1 を用いて Gdn-HCl に対する構造安定性を評価した。0~5 M Gdn-HCl 存在下における CD スペクトル測定と Tryptophan 蛍光スペクトル測定を行った。

図 5-4 に構造安定性評価の結果を示した。Holo-G93ASOD1 の構造は安定しているが、Apo-G93ASOD1 は著しく不安定化していることが分かった。Holo-G93ASOD1, Apo-G93ASOD1 の C_m はそれぞれ 2.85 M, 0.27 M Gdn-HCl であった (表 5-5)。以上から、G93ASOD1 は apo 化により著しく構造が不安定化することが示された。

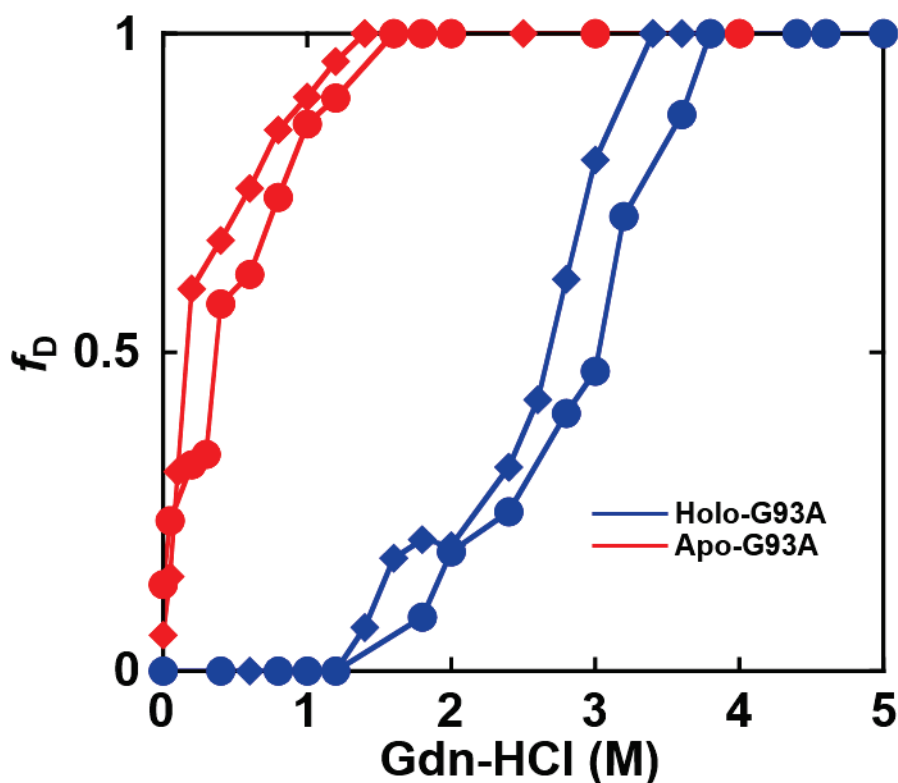


図 5-4. Holo-G93ASOD1, Apo-G93ASOD1 の Gdn-HCl に対する構造安定性の評価
 CD スペクトル測定は 216 nm における測定データ, Tryptophan 蛍光スペクトル測定は
 295 nm 励起時の 350 nm の測定データを f_D に置換し, Gdn-HCl 濃度に対してプロットし
 た。(●)は CD スペクトル測定, (◆)は蛍光スペクトル測定を示す。

表 5-5. G93ASOD1 の変性中点 (C_m) *

	Holo-(M)	Apo-(M)
G93ASOD1	2.85	0.27

* C_m は図 5-4 の変性曲線より算出している。

5-3-2. 野生型 SOD1, G93ASOD1 の還元剤存在下でのアミロイド線維形成

還元剤存在下において、野生型 SOD1, G93ASOD1 がアミロイド線維を形成するのかわかについて調べた。Holo-SOD1, Apo-SOD1, Holo-G93ASOD1, Apo-G93ASOD1, Red-G93ASOD1を用いて 2 mM DTT 存在下でのアミロイド線維形成を Thioflavin T assay, TEM 観察により評価した。

図 5-5 に Thioflavin T assay, TEM 観察の結果を示した。2 mM DTT 存在下では Red-G93ASOD1, Apo-SOD1, Apo-G93ASOD1 の蛍光強度の増加が見られた。また, Apo-SOD1, Apo-G93ASOD1 を TEM 観察すると, 典型的なアミロイド線維が見られた。線維幅は Apo-SOD1 が 12.0 ± 1.6 nm, Apo-G93ASOD1 が 14.8 ± 1.6 nm であった(表 5-6)。apo 型 SOD1 がアミロイド線維の形成過程で, 2 mM DTT により分子内ジスルフィド結合が還元されているかどうかを確認するため, アミロイド線維形成前とアミロイド線維形成後のフリーなチオール基を測定した。アミロイド線維形成前の Apo-SOD1 と Apo-G93ASOD1 はそれぞれ溶液中で 1.46 mole SH/mole と 1.47 mole SH/mole であり, SOD1 のサブユニット当たり約 2 つのフリーのチオール基の存在が確認された。一方で, アミロイド線維形成後の Apo-SOD1 と Apo-G93ASOD1 を可溶化させ解析すると, ともに 2.97 mole SH/mole であった。同様な方法で還元型 SOD1 中のフリーのチオール基を測定すると, 3.0 mol SH/mole であったことから, アミロイド線維中では分子内ジスルフィド結合のほとんどが還元されていた。つまり, DTT 存在下で形成されたアミロイド線維は分子内ジスルフィド結合が還元され, アミロイド線維を形成することが示された。一方で, Holo-SOD1, Holo-G93ASOD1 は還元剤存在下または非存在下でも, 蛍光強度の増加が見られず, アミロイド線維の形成が見られなかった。さらに, Apo-G93ASOD1 は非存在下ではアミロイド線維を形成しなかった (data not shown)。以上より, G93ASOD1 においても, 野生型 SOD1 と同様に apo 化, 分子内ジスルフィド結合の還元によってアミロイド線維が形成されることが明らかになった。

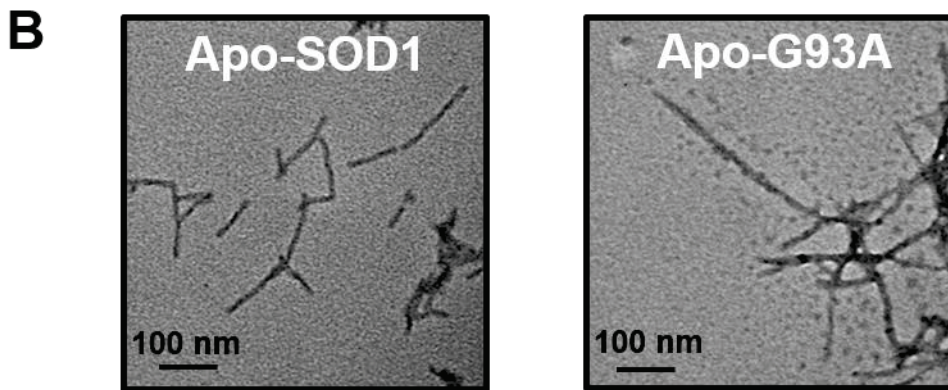
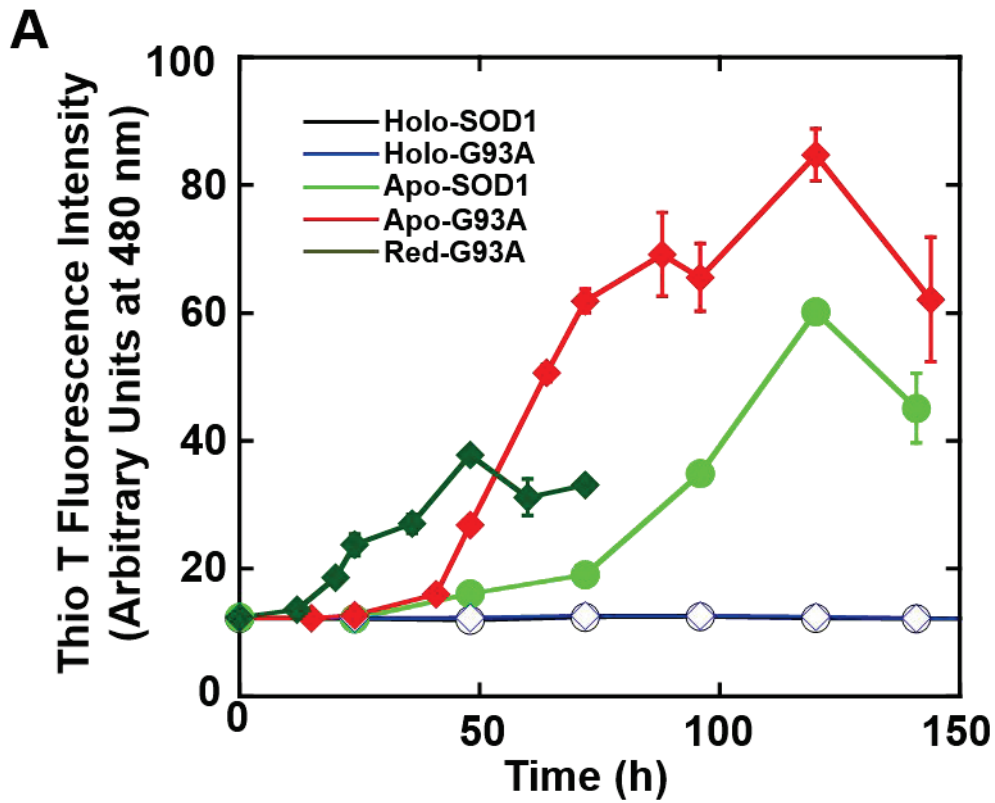


図 5-5. 2mM DTT 存在下での野生型 SOD1, G93ASOD1 のアミロイド線維形成
 A は Thioflavin T assay の結果であり, (○)は Holo-SOD1, (◇)は Holo-G93ASOD1,

(●)は Apo-SOD1, (◆)は Apo-G93ASOD1, (◆)は Red-G93ASOD1 を示す。

平均値をプロットし, エラーバーは 3 回測定 of 標準偏差を示す。

B は TEM 観察であり, 左図は Apo-SOD1, 右図は Apo-G93ASOD1 を示す。

スケールバーは 100 nm を示す。

表 5-6. アミロイド線維の線維幅

	線維幅* (nm)
Apo-SOD1	12.0±1.6
Apo-G93ASOD1	14.8±1.6

*線維幅は図 5-5 の TEM 画像より，線維の 3 か所における平均値±標準偏差を示す。

5-3-3. 還元剤の濃度がアミロイド線維の形成に与える影響

5-3-2 より apo 化 SOD1 (Apo-SOD1, Apo-G93ASOD1) は還元剤存在下にて，最終的に分子内ジスルフィド結合が還元され，アミロイド線維が形成することを示した。そこで，DTT の濃度の違いにより，Apo-SOD1, Apo-G93ASOD1 のアミロイド線維の形成に与える影響を Thioflavin T assay にて評価した。

Thioflavin T assay 4 h 後の結果を図 5-6 に示した。Apo-G93ASOD1 は Apo-SOD1 に比べ，DTT の濃度が増加するにつれて，Thioflavin T の蛍光の増加が確認された。これより，Apo-G93ASOD1 は Apo-SOD1 に比べ，分子内ジスルフィド結合は還元されやすく，DTT の濃度が高くなるほど，より早くアミロイド線維を形成することが示された。

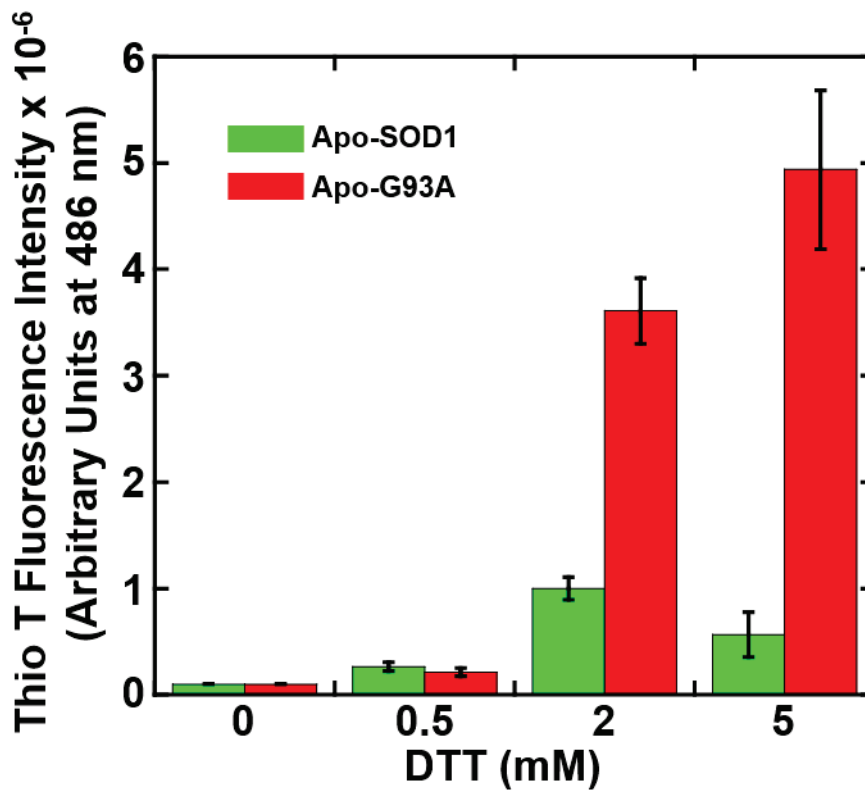


図 5-6. DTT 濃度変化によるアミロイド線維形成

Perkin Elmer ARVO x を用いた Thioflavin T assay の 4 h,

37°C インキュベート時の結果を示す。エラーバーは 3 回測定した際の標準偏差を示す。

5-4. 考察

本章では野生型 SOD1 に加え、fALS 変異体である G93ASOD1 を用いてアミロイド線維の形成を評価した。さらに、野生型 SOD1 と G93ASOD1 の還元剤による影響を検証した。

まず、G93ASOD1 の apo 化や分子内ジスルフィド結合の還元による構造安定性の変化とアミロイド線維の形成を評価した。G93ASOD1 は apo 化により、野生型 SOD1 よりも著しく構造が不安定化し (図 2-3, 図 5-4), さらに、分子内ジスルフィド結合を還元することで、二次構造が unfold した。そのため、G93ASOD1 においても金属イオン、分子内ジスルフィド結合は構造安定性に関与していることが示された。しかしながら、Apo-G93ASOD1 は構造が不安定であるにもかかわらず、アミロイド線維を形成しなかった。つまり、G93ASOD1 においても野生型 SOD1 と同様に apo 化による構造の不安定化とアミロイド線維の形成は一致しないことが分かった。一方、分子内ジスルフィド結合を還元した Red-G93ASOD1 は速やかにアミロイド線維を形成した。また、2 mM DTT の還元剤存在下において、Apo-G93ASOD1 はアミロイド線維を形成した。Apo-G93ASOD1 のアミロイド線維形成後のチオール基を確認すると、分子内ジスルフィド結合のほとんど還元されていたことから、Apo-G93ASOD1 は DTT により分子内ジスルフィド結合が還元され、アミロイド線維を形成していることが示された。そのため、G93ASOD1 においても、野生型 SOD1 と同様にアミロイド線維の形成には apo 化、分子内ジスルフィド結合の還元は重要な因子であることが明らかになった。また、還元剤存在下では、Red-G93ASOD1 は Apo-G93ASOD1 に比べ、アミロイド線維を形成するスピードが早かった。これは、Apo-G93ASOD1 の分子内ジスルフィド結合が還元されるまでに時間を要したことが原因であると考えられる。面白いことに、野生型 SOD1 と G93ASOD1 には分子内ジスルフィド結合の還元のされやすさに違いが見られた。還元剤存在下で、Apo-G93ASOD1 は Apo-SOD1 よりもアミロイド線維の形成が早く、さらに Apo-G93ASOD1 は DTT の濃度が増加するにつれ、アミロイド線維の形成は著しく早くなった。これは、Apo-G93ASOD1 は部分的に変性し、構造安定性が低いこと (Apo-G93ASOD1 は $C_m=0.27$ M, Apo-SOD1 は $C_m=0.90$ M) が影響していると考えられる。これまでに $\beta 2$ -microglobulin のジスルフィド

結合は分子内部に埋もれているが[80], 部分的に unfold することで還元されやすくなるという報告がある[62, 81, 82]。Apo-G93ASOD1 は Apo-SOD1 に比べ構造が不安定なため, 還元剤である DTT が内部に埋もれている分子内ジスルフィド結合[68, 83]に, よりアクセスしやすいことが考えられる。対照的に holo 型 SOD1 は DTT 存在下であっても, アミロイド線維を形成しなかった。holo 型 SOD1 は金属イオンを配位しているため, 構造が安定で揺らぎが少ないため[27, 29, 65, 66], 内部に埋もれている分子内ジスルフィド結合に DTT がアクセスしにくいと考えられる。揺らぎと分子内部に位置する分子内ジスルフィド結合の還元は immunoglobulin light chain にも見られる[84-87]。つまり, タンパク質の構造安定性と分子内部に位置する分子内ジスルフィド結合の還元されやすさには関係性が見られ, 構造が不安定なものほど分子内ジスルフィド結合の還元は生じやすいことが示唆された。本研究より, G93ASOD1 は野生型と同様に apo 化, 分子内ジスルフィド結合の還元によりアミロイド線維を形成することを示した。さらに, G93ASOD1 は特に apo 化すると, 構造が極めて不安定なため, 還元剤存在下において, 分子内ジスルフィド結合が還元され, アミロイド線維を形成しやすいことが新たに分かった。

第6章 総合考察

本研究では第2章で野生型 SOD1 を用いたアミロイド線維形成, 第3章で野生型 SOD1 のアミロイド線維を用いた核部位の同定, 第4章で核部位合成ペプチドを用いたアミロイド線維形成にて野生型 SOD1 のアミロイド線維の形成メカニズムを評価した。さらに, 第5章で fALS 変異体である G93ASOD1 を用いたアミロイド線維形成を行った。本章では, 以上の結果をふまえて, 野生型 SOD1 と G93ASOD1 を含めた fALS 変異体の SOD1 のアミロイド線維形成メカニズムについて述べる (図 6-1)。

第2章, 第5章より, 野生型 SOD1, G93ASOD1 のアミロイド線維の形成には翻訳後修飾である金属イオンと分子内ジスルフィド結合が影響を与えていることを示した。そこで, 6-1 にて SOD1 のアミロイド線維形成における金属イオンの役割, 6-2 にて分子内ジスルフィド結合の役割について述べる。さらに, 第2章より, apo 化, 分子内ジスルフィド結合の還元後の二次構造の違いによりアミロイド線維の形成のスピードが異なることを示した。そのため, 6-3 にて還元型 SOD1 の構造とアミロイド線維の形成との関係について述べる。また, 第3章より, 野生型 SOD1 のアミロイド線維の3つの核部位を同定し, 第4章より, その3つの核部位領域が相互作用しアミロイド線維を形成することを示した。そこで, 6-4 にて核部位の相互作用について述べる。

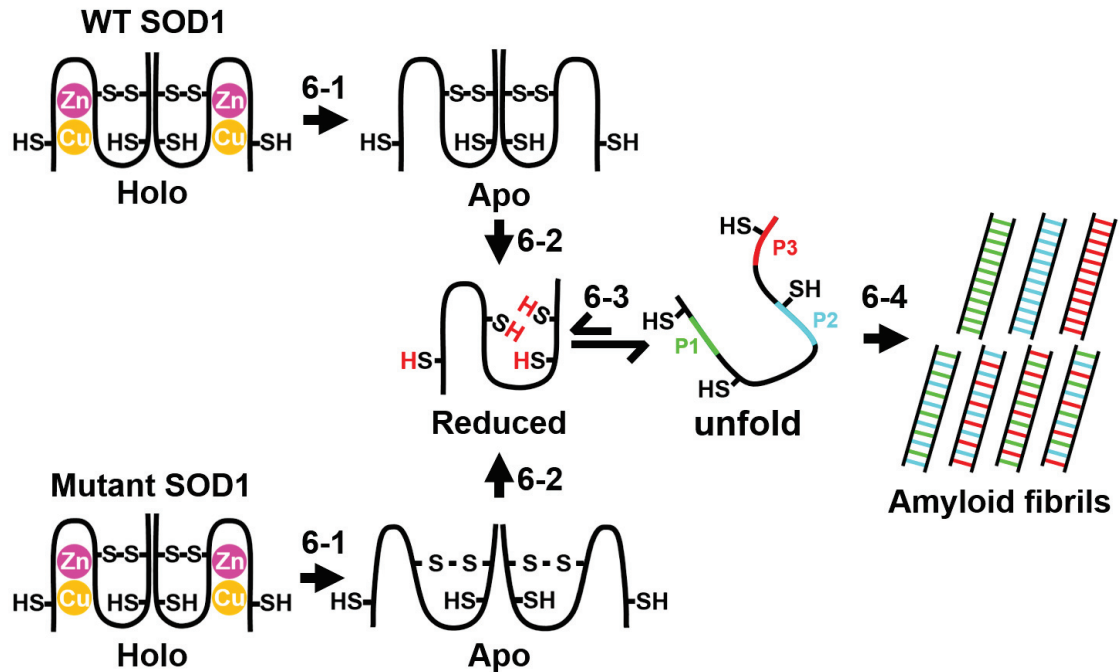


図 6-1. SOD1 のアミロイド線維形成メカニズム

図中の 6-1 は apo 化について、6-2 は分子内ジスルフィド結合の還元について、6-3 は unfold について、6-4 は核部位の相互作用により、形成されるアミロイド線維について示す。詳細はそれぞれ 6-1. SOD1 のアミロイド線維形成における金属イオンの役割, 6-2. SOD1 のアミロイド線維形成における分子内ジスルフィド結合の役割, 6-3. 還元型 SOD1 の構造とアミロイド線維の関係, 6-4. SOD1 のアミロイド線維形成における核部位の相互作用について示す。

6-1. SOD1 のアミロイド線維形成における金属イオンの役割

還元剤存在下では apo 化された野生型 SOD1 と G93ASOD1 は分子内ジスルフィド結合が還元され、アミロイド線維を形成した。一方で、還元剤存在下であっても holo 型 SOD1 は分子内ジスルフィド結合を維持し、アミロイド線維を形成しなかった (図 5-5)。SOD1 が存在する細胞質内は還元状態であるため[88, 89], 配位している金属イオンは細胞質内において分子内ジスルフィド結合の還元を抑制していることが示唆された。金属イオンのな

い SOD1 は野生型や fALS 変異を導入したトランスジェニックマウスの凝集体内に見つかっていることから[90], *in vivo* でも apo 化は野生型 SOD1, fALS 変異体ともに生じ得る。しかしながら, 本研究で用いた G93ASOD1 は holo 化により, mol サブユニット当たり, 銅イオンは 0.84 mol, 亜鉛イオンは 1.28 mol を配位したが, 複数の fALS 変異体で金属イオンの親和性が著しく低下することが報告されている[34, 55]。また, fALS 変異体は構造安定性が低く, 一旦 unfold すると, 金属イオンが外れやすいため[91], 特に, fALS 変異体は apo 化されやすいと考えられる。さらに, 細胞質内ではグルタチオンや他の金属結合性タンパク質などが存在し, 金属のキレート能力が高いため, 銅イオンや亜鉛イオンは低い濃度に保たれており, 一旦外れた金属イオンは再結合しにくいと考えられる[91, 92]。

SOD1 は各サブユニットに銅イオン, 亜鉛イオンを 1 つずつ配位している。本研究ではそれぞれの金属イオンがアミロイド線維の形成に与える影響について評価していないが, これまでの報告について以下に述べる。銅イオンは主に酵素活性に関与している[28, 30]。銅イオンのリガンドは His46, 48, 63, 120 に位置しており[93], これまでに, His46, 48, 120 の変異体は fALS 患者から見つかっている (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>) [42]。また, 銅イオンのリガンドに変異を入れた H46R/H48Q は銅イオンだけでなく, 亜鉛イオンの親和性も低下することが報告されている [94]。また, H46R/H48Q[49] や H46R/H48Q/H63G/H120G の変異を導入したトランスジェニックマウスは fALS と同様に運動ニューロンに障害を示し, さらには thioflavin S の色素で染色される凝集体が見つかっている[42]。 *In vitro* の実験でも, SOD1 は銅イオンを配位することで, アミロイド線維の形成は抑制されることが示されている[56]。一方, 亜鉛イオンは構造安定化に関与し[29, 30], 亜鉛イオンのリガンドは His63, 71, 80, Asp83 に位置し[93], これまでに, His71, 80, Asp83 の変異体は fALS 患者から見つかっている (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>)。さらに, SOD1 は亜鉛イオンの添加により, アミロイド線維の形成は抑制される[55]。このように, 銅イオン, 亜鉛イオンともに SOD1 のアミロイド線維の形成に重要な因子あることが示唆される。

6-2. SOD1 のアミロイド線維形成における分子内ジスルフィド結合の役割

apo 化し、分子内ジスルフィド結合を還元した SOD1 (Red-SOD1, 2SCAMRed-SOD1, 4SCAM-SOD1, Red-G93ASOD1) は *in vitro* で典型的なアミロイド線維を形成した (図 2-4, 図 5-5)。一方で, 2SCAM-SOD1 は部分的に変性し, Apo-G93ASOD1 は部分的に変性し (図 5-3), さらに Red-SOD1 に比べ構造安定性が低かったが (Apo-G93ASOD1 は $C_m=0.27$ M, Red-SOD1 は $C_m=0.42$ M), 2SCAM-SOD1 や Apo-G93ASOD1 はともにアミロイド線維を形成しなかった。つまり, 分子内ジスルフィド結合を有している SOD1 モデルは構造の部分的な変性や不安定化が見られても, アミロイド線維を形成しなかった。これより, SOD1 のアミロイド線維形成には分子構造や構造安定性よりも分子内ジスルフィド結合の還元が影響していることが示唆された。また, fALS 変異体は還元作用を受けやすいため[63], Apo-G93ASOD1 は Apo-SOD1 よりも還元剤により分子内ジスルフィド結合が還元し, 速やかにアミロイド線維を形成したと考えられる (図 5-5, 図 5-6)。特に, fALS 変異体は細胞質内では還元型になりやすいと考えられる。これまで, fALS 変異体である G85R を発現したトランスジェニックマウスの脊髄から 100%の還元型 SOD1 からなる凝集体が見つかっており[44, 46], 分子内ジスルフィド結合の還元は生体内で起こり得ると考えられる [59, 89, 95]。また, Cys をアルキル化した SOD1 や還元条件下で作製した SOD1 (図 2-4, 5-5, 5-6) や C57R, C146R また C 末端が欠損した fALS 変異体を用いた結果より[55], SOD1 のアミロイド線維の形成にはジスルフィド結合を必要としないことが示唆される。一方で, 野生型や fALS 変異体である D90A を発現したトランスジェニックマウスの脊髄から 14%の還元型 SOD1 が見られたことから[44], 必ずしも SOD1 はすべて還元型になるとは限らない。しかしながら, *in vitro* で Apo-SOD1 に対して, 5%の割合の Red-SOD1 の添加により, アミロイド線維を形成し, さらに Apo-SOD1 に対して, 5%の割合の fALS 変異体の還元型 SOD1 の添加により, アミロイド線維の形成が速くなることが報告されており[56], 還元型 SOD1 は少量でも非還元型 SOD1 に作用し, アミロイド線維を形成することが示唆される。これより, 分子内ジスルフィド結合についても SOD1 のアミロイド線

維の形成に重要な役割を持っていることが分かる。特に、fALS 変異体では構造の不安定化や揺らぎが生じるため[8, 96], *in vitro* [63]だけでなく *in vivo*においても分子内ジスルフィド結合の還元を受けやすいことが考えられる。

6-3. 還元型 SOD1 の構造とアミロイド線維の形成との関係

apo 化, 分子内ジスルフィド結合の還元が生じた後, 構造の違いはアミロイド線維の形成に影響した。Red-SOD1 は Holo-SOD1 と類似した二次構造を示したが, 4SCAM-SOD1 は完全に変性し (図 2-2), アミロイド線維を形成するスピードは 4SCAM-SOD1 に比べ遅かった (図 2-4)。しかし, Red-SOD1 の C_m である 0.4 M Gdn-HCl 存在下では Red-SOD1 のアミロイド線維を形成するスピードが著しく早くなり, 4SCAM-SOD1 と大きな違いが見られなかった (図 2-6)。Red-SOD1 はアミロイド線維を形成する過程で, フリーになったチオール基を介してジスルフィド結合を形成せず, Red-SOD1 と 4SCAM-SOD1 の核部位領域は完全に一致したため (表 3-2, 表 3-4, 図 3-7), Red-SOD1 はアミロイド線維を形成する過程で **unfold** していることが明らかになった。他のタンパク質においても構造が変性することでアミロイド線維は形成され, Insulin[83, 97]や GroES [17]は Gdn-HCl や Urea のような変性剤により変性され, アミロイド線維の形成が促進される。これらは, 変性することで構造内部に位置している疎水性領域が露出し, アミロイド線維を形成するという報告もあるように[14], 構造が変化することで核部位の露出が起これと考えられる。apo 化や分子内ジスルフィド結合の還元により, SOD1 の構造が大きく揺らぐことが報告されている[29, 65, 67, 68]。また, inclusion body には misfold した SOD1 が見つかっており[38], misfold した SOD1 に反応する抗体が凝集体に反応したことから[50], SOD1 は **unfold** し, アミロイド線維を形成していると考えられる。特に, G93ASOD1 は apo 化し, 分子内ジスルフィド結合が還元された状態では, すでに構造が変性しているため, 速やかに核部位の露出が生じ, アミロイド線維を形成したと考えられる。つまり, SOD1 は分子内ジスルフィド結合が還元された後, **unfold** し, アミロイド線維形成の元になる線維核となる領域の露出が生じ, アミロイド線維を形成することが分かったが, 特に構造が不安定な fALS 変異体

はその現象が起きやすく、アミロイド線維を形成しやすいと考えられる。

6-4. SOD1 のアミロイド線維形成における核部位の相互作用

核部位に相当する合成ペプチドはすべて素早くアミロイド線維を形成したが、それぞれの合成ペプチドの線維形成のスピードに大きな差が見られなかった。SOD1 は unfold し、最終的に 3 つの線維核は露出すると考えられるが、どの領域が早く露出し、アミロイド線維形成の初期に作用しているかは分からないままである。また、合成ペプチドのすべての組み合わせでアミロイド線維を形成したため、形成されたアミロイド線維に 3 つの核部位領域がどの割合で含まれているのかは不明である。アミロイド線維によっては P1, P2, P3 の含有する割合、また、単独または複数の線維核によりアミロイド線維を形成する可能性も考えられる。今後、どの領域がアミロイド線維形成の初期に作用しているのか、線維核がどの割合で構成されているのかを調べることはアミロイド線維形成のメカニズムを示すためには重要な点であると考えられる。

アミロイド線維構造のモデルとして、Direct stacking モデルが挙げられる [21]。Transthyretin (TTR) は 8 つの β ストランドを持っており、構造変化により、 β ストランドの B と異なるサブユニットにある β ストランドの B' が相互作用し、 $(BEFF'E'B')$ n のように規則正しく配置しアミロイド線維を形成することが報告されている [21, 98]。同様に、SOD1 もダイマーが相互作用し、direct stacking が生じ、凝集体を形成すると報告されている [21]。SOD1 は 8 つの β ストランドを持ち、核部位合成ペプチド P1 は β ストランド 2 (A.A.16-21)、P2 は β ストランド 6 (A.A.95-103)、P3 は β ストランド 8 (A.A.143-151) に位置する (図 4-1) [99]。しかし、本研究より SOD1 は unfold し、アミロイド線維を形成すること、さらにすべての核部位は単独やそれぞれ相互作用し、アミロイド線維を形成することから、Direct stacking モデルではなく、Refolding モデル [21] をとると考えられる。

これまで fALS は 160 を超える変異体が見つかっており、その多くは点変異によるもので SOD1 のアミノ酸配列の全体に広がっている (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>) [25]。また、

線維形成の特徴や ALS の発症に関して、変異体によって異なることが報告されている[57, 100]。一方で、アミロイド線維を形成する合成ペプチドは一部異なるアミノ酸に置換されるとアミロイド線維形成が変化するという報告もあり[101]、野生型 SOD1 で同定した核部位に点変異が入ると核部位のアミロイド線維形成が変化する可能性がある。しかしながら、3つの核部位領域はすべてアミロイド線維を形成する能力が極めて高いため、仮に1つの核部位領域に変異や欠損が生じ、線維核としての機能がなくなった場合でも、構造的不安定化により、残り2つの領域が露出することで、1つまたは2つの線維核同士で相互作用し、アミロイド線維を形成すると考えられる。

第7章 結語

第2章から第6章の結果より、SOD1は以下のようなアミロイド線維形成メカニズムをとることが明らかになった。

金属イオンと分子内ジスルフィド結合を持っている holo 型 SOD1 はダイマーを形成し、安定した構造をとっている。しかし、apo 化され、金属イオンがリガンドから外れることで、apo 型 SOD1 の構造が著しく不安定化する。野生型 Apo-SOD1 は分子内ジスルフィド結合が還元されても、二次構造は維持しているが、構造環境は大きく変わり、モノマーへの解離や構造の揺らぎが生じ、徐々に、unfold した SOD1 が産生される。すると、分子内部に埋まっていたアミロイド線維の核となる3つの領域 (P1, P2, P3) が露出し、3つの領域が相互作用し線維核を形成し、それを鋳型として伸長することでアミロイド線維を形成する。一方、G93ASOD1 においても、野生型 SOD1 と同様に apo 化、分子内ジスルフィド結合が還元され、アミロイド線維を形成する。しかしながら、G93ASOD1 は野生型 SOD1 よりも構造が不安定であり、一旦、apo 化されると、還元剤が分子内部に埋まっている分子内ジスルフィド結合にアクセスしやすくなり、還元剤存在下ではアミロイド線維形成が早いことが示された。つまり、fALS 変異体は構造が不安定で、金属イオンの親和性の低下が見られるため、細胞質の還元条件下では、分子内ジスルフィド結合が還元されやすく、ALS の発症を促進させる可能性が考えられる。本研究における SOD1 の基礎的なアミロイド線維の形成メカニズムの解明は野生型 SOD1, fALS 変異体により得られた結果であり、fALS だけでなく sALS の発症の治療や予防に役立つことが期待される。

引用文献

1. 中村春木, 有坂文雄. *タンパク質のかたちと物性* 共立出版株式会社. 1997.
2. R.H., Pain 編集, 崎山文夫 監訳, 河田康志, 桑島邦博 訳. *タンパク質のフォールディング*[第2版]. シュプリンガー・ジャパン株式会社. 2012, 丸善出版株式会社.
3. 小椋光, 遠藤斗志也, 森正敬, 吉田賢右, *細胞における蛋白質の一生*. 共立出版株式会社, 2004. **49**.
4. 圓谷奈保美, 本間謙吾, 西頭英起, 一條秀憲, *筋萎縮性側索硬化症における亜鉛と小胞体ストレスの役割*. *Biomed Res Trace Elements*, 2012. **23**(1): p. 14-23.
5. Sipe, J.D. and A.S. Cohen, *Review: history of the amyloid fibril*. *J Struct Biol*, 2000. **130**(2-3): p. 88-98.
6. Chiti, F. and C.M. Dobson, *Amyloid formation by globular proteins under native conditions*. *Nat Chem Biol*, 2009. **5**(1): p. 15-22.
7. Yagi, H., et al., *Fibril formation of hsp10 homologue proteins and determination of fibril core regions: differences in fibril core regions dependent on subtle differences in amino acid sequence*. *J Mol Biol*, 2008. **377**(5): p. 1593-606.
8. Uversky, V.N. and A.L. Fink, *Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1698**(2): p. 131-53.
9. Berthelot, K., C. Cullin, and S. Lecomte, *What does make an amyloid toxic: morphology, structure or interaction with membrane?* *Biochimie*, 2013. **95**(1): p. 12-9.
10. Cecchi, C. and M. Stefani, *The amyloid-cell membrane system. The interplay between the biophysical features of oligomers/fibrils and cell membrane defines amyloid toxicity*. *Biophys Chem*, 2013. **182**: p. 30-43.
11. Avidan-Shpalter, C. and E. Gazit, *The early stages of amyloid formation: biophysical and structural characterization of human calcitonin pre-fibrillar assemblies*.

- Amyloid, 2006. **13**(4): p. 216-25.
12. Glabe, C.G., *Structural classification of toxic amyloid oligomers*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29639-43.
 13. Westermarck, G.T., K.H. Johnson, and P. Westermarck, *Staining methods for identification of amyloid in tissue*. Methods Enzymol, 1999. **309**: p. 3-25.
 14. Dobson, C.M., *Protein folding and misfolding*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 884-90.
 15. Yagi, H., et al., *Isolation of short peptide fragments from alpha-synuclein fibril core identifies a residue important for fibril nucleation: a possible implication for diagnostic applications*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(10): p. 2077-87.
 16. Yagi, H., et al., *Amyloid fibril formation of alpha-synuclein is accelerated by preformed amyloid seeds of other proteins: implications for the mechanism of transmissible conformational diseases*. J Biol Chem, 2005. **280**(46): p. 38609-16.
 17. Higurashi, T., et al., *Amyloid-like fibril formation of co-chaperonin GroES: nucleation and extension prefer different degrees of molecular compactness*. J Mol Biol, 2005. **351**(5): p. 1057-69.
 18. Izawa, Y., et al., *Role of C-terminal negative charges and tyrosine residues in fibril formation of alpha-synuclein*. Brain Behav, 2012. **2**(5): p. 595-605.
 19. Sunde, M., et al., *Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction*. J Mol Biol, 1997. **273**(3): p. 729-39.
 20. Gazit, E., *A possible role for pi-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils*. FASEB J, 2002. **16**(1): p. 77-83.
 21. Nelson, R. and D. Eisenberg, *Recent atomic models of amyloid fibril structure*. Curr Opin Struct Biol, 2006. **16**(2): p. 260-5.
 22. 後藤祐児, *アミロイド線維形成とタンパク質科学*. 高分子, 2009. **58**(2): p. 92-96.
 23. Pasinelli, P. and R.H. Brown, *Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(9): p. 710-23.
 24. Rosen, D.R., et al., *Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated*

- with familial amyotrophic lateral sclerosis*. Nature, 1993. **362**(6415): p. 59-62.
25. Li, J., et al., *Human superoxide dismutase 1 overexpression in motor neurons of Caenorhabditis elegans causes axon guidance defect and neurodegeneration*. Neurobiol Aging, 2014. **35**(4): p. 837-46.
 26. Barra, D., et al., *The complete amino acid sequence of human Cu/Zn superoxide dismutase*. FEBS Lett, 1980. **120**(1): p. 53-6.
 27. Hornberg, A., et al., *The coupling between disulphide status, metallation and dimer interface strength in Cu/Zn superoxide dismutase*. J Mol Biol, 2007. **365**(2): p. 333-42.
 28. Beckman, J.S., et al., *ALS, SOD and peroxynitrite*. Nature, 1993. **364**(6438): p. 584.
 29. Arnesano, F., et al., *The unusually stable quaternary structure of human Cu,Zn-superoxide dismutase 1 is controlled by both metal occupancy and disulfide status*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 47998-8003.
 30. Furukawa, Y. and T.V. O'Halloran, *Amyotrophic lateral sclerosis mutations have the greatest destabilizing effect on the apo- and reduced form of SOD1, leading to unfolding and oxidative aggregation*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17266-74.
 31. Briggs, R.G. and J.A. Fee, *Further characterization of human erythrocyte superoxide dismutase*. Biochim Biophys Acta, 1978. **537**(1): p. 86-99.
 32. Seetharaman, S.V., et al., *Immature copper-zinc superoxide dismutase and familial amyotrophic lateral sclerosis*. Exp Biol Med (Maywood), 2009. **234**(10): p. 1140-54.
 33. Rakhit, R. and A. Chakrabartty, *Structure, folding, and misfolding of Cu,Zn superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1762**(11-12): p. 1025-37.
 34. Hayward, L.J., et al., *Decreased metallation and activity in subsets of mutant superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 15923-31.
 35. Borchelt, D.R., et al., *Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial*

- amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(17): p. 8292-6.
36. Reaume, A.G., et al., *Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury.* Nat Genet, 1996. **13**(1): p. 43-7.
37. Wang, J., et al., *Somatodendritic accumulation of misfolded SOD1-L126Z in motor neurons mediates degeneration: alphaB-crystallin modulates aggregation.* Hum Mol Genet, 2005. **14**(16): p. 2335-47.
38. Forsberg, K., et al., *Novel antibodies reveal inclusions containing non-native SOD1 in sporadic ALS patients.* PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11552.
39. Grad, L.I., et al., *Intercellular propagated misfolding of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase occurs via exosome-dependent and -independent mechanisms.* Proc Natl Acad Sci USA, 2014. **111**: p. 3620-3625.
40. Shibata, N., et al., *Immunohistochemical demonstration of Cu/Zn superoxide dismutase in the spinal cord of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis.* Acta Histochem. Cytochem., 1993. **26**: p. 619-622.
41. Watanabe, M., et al., *Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues.* Neurobiol Dis, 2001. **8**(6): p. 933-41.
42. Wang, J., et al., *Copper-binding-site-null SOD1 causes ALS in transgenic mice: aggregates of non-native SOD1 delineate a common feature.* Hum Mol Genet, 2003. **12**(21): p. 2753-64.
43. Basso, M., et al., *Insoluble mutant SOD1 is partly oligoubiquitinated in amyotrophic lateral sclerosis mice.* J Biol Chem, 2006. **281**(44): p. 33325-35.
44. Jonsson, P.A., et al., *Disulphide-reduced superoxide dismutase-1 in CNS of transgenic amyotrophic lateral sclerosis models.* Brain, 2006. **129**(Pt 2): p. 451-64.
45. Rakhit, R., et al., *An immunological epitope selective for pathological*

- monomer-misfolded SOD1 in ALS*. Nat Med, 2007. **13**(6): p. 754-9.
46. Zetterstrom, P., et al., *Soluble misfolded subfractions of mutant superoxide dismutase-1s are enriched in spinal cords throughout life in murine ALS models*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(35): p. 14157-62.
 47. Jaarsma, D., et al., *Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice*. J Neurosci, 2008. **28**(9): p. 2075-88.
 48. Karch, C.M., et al., *Role of mutant SOD1 disulfide oxidation and aggregation in the pathogenesis of familial ALS*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(19): p. 7774-9.
 49. Wang, J., et al., *Fibrillar inclusions and motor neuron degeneration in transgenic mice expressing superoxide dismutase 1 with a disrupted copper-binding site*. Neurobiol Dis, 2002. **10**(2): p. 128-38.
 50. Bosco, D.A., et al., *Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS*. Nat Neurosci, 2010. **13**(11): p. 1396-403.
 51. Noriyuki Shibata, A.H., Maiko Kobayashi, Shoichi Sasaki, Takeo Kato, Sadayuki Matsumoto, Zenji Shiozawa, Takashi Komori, Akito Ikemoto, Takahiko Umahara, Kohtaro Asayama, *Cu/Zn superoxide dismutase-like immunoreactivity in Lewy body-like inclusions of sporadic amyotrophic lateral sclerosis*. Neuroscience Letters, 1994. **179**: p. 149-152.
 52. Graffmo, K.S., et al., *Expression of wild-type human superoxide dismutase-1 in mice causes amyotrophic lateral sclerosis*. Hum Mol Genet, 2013. **22**(1): p. 51-60.
 53. Selkoe, D.J., *Folding proteins in fatal ways*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 900-4.
 54. Shastri, B.S., *Neurodegenerative disorders of protein aggregation*. Neurochem. Int., 2003. **43**(1): p. 1-7.
 55. Furukawa, Y., et al., *Complete loss of post-translational modifications triggers fibrillar aggregation of SOD1 in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis*. J Biol Chem, 2008. **283**(35): p. 24167-76.

56. Chattopadhyay, M., et al., *Initiation and elongation in fibrillation of ALS-linked superoxide dismutase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(48): p. 18663-8.
57. Oztug Durer, Z.A., et al., *Loss of metal ions, disulfide reduction and mutations related to familial ALS promote formation of amyloid-like aggregates from superoxide dismutase*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e5004.
58. Toichi, K., K. Yamanaka, and Y. Furukawa, *Disulfide scrambling describes the oligomer formation of superoxide dismutase (SOD1) proteins in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis*. J Biol Chem, 2013. **288**(7): p. 4970-80.
59. Schafer, F.Q. and G.R. Buettner, *Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple*. Free Radic Biol Med, 2001. **30**(11): p. 1191-212.
60. Li, Y., et al., *Dissecting the role of disulfide bonds on the amyloid formation of insulin*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **423**(2): p. 373-8.
61. Cao, A., D. Hu, and L. Lai, *Formation of amyloid fibrils from fully reduced hen egg white lysozyme*. Protein Sci, 2004. **13**(2): p. 319-24.
62. Yamamoto, K., et al., *Thiol compounds inhibit the formation of amyloid fibrils by beta 2-microglobulin at neutral pH*. J Mol Biol, 2008. **376**(1): p. 258-68.
63. Tiwari, A. and L.J. Hayward, *Familial amyotrophic lateral sclerosis mutants of copper/zinc superoxide dismutase are susceptible to disulfide reduction*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5984-92.
64. Higurashi, T., et al., *Unfolding and refolding of Escherichia coli chaperonin GroES is expressed by a three-state model*. J Mol Biol, 1999. **291**(3): p. 703-13.
65. Ding, F. and N.V. Dokholyan, *Dynamical roles of metal ions and the disulfide bond in Cu, Zn superoxide dismutase folding and aggregation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(50): p. 19696-701.
66. Teilum, K., et al., *Transient structural distortion of metal-free Cu/Zn superoxide dismutase triggers aberrant oligomerization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009.

- 106(43): p. 18273-8.
67. Doucette, P.A., et al., *Dissociation of human copper-zinc superoxide dismutase dimers using chaotrope and reductant. Insights into the molecular basis for dimer stability.* J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54558-66.
68. Banci, L., et al., *Human SOD1 before harboring the catalytic metal: solution structure of copper-depleted, disulfide-reduced form.* J Biol Chem, 2006. **281**(4): p. 2333-7.
69. Merlini, G. and V. Bellotti, *Molecular mechanisms of amyloidosis.* N Engl J Med, 2003. **349**(6): p. 583-96.
70. Kheterpal, I., et al., *Structural features of the Abeta amyloid fibril elucidated by limited proteolysis.* Biochemistry, 2001. **40**(39): p. 11757-67.
71. Monti, M., et al., *Topological investigation of amyloid fibrils obtained from beta2-microglobulin.* Protein Sci, 2002. **11**(10): p. 2362-9.
72. Tenidis, K., et al., *Identification of a penta- and hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties.* J Mol Biol, 2000. **295**(4): p. 1055-71.
73. Nelson, R., et al., *Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils.* Nature, 2005. **435**(7043): p. 773-8.
74. Tokunaga, Y., et al., *Amyloid fibril formation in vitro from halophilic metal binding protein: its high solubility and reversibility minimized formation of amorphous protein aggregations.* Protein Sci, 2013. **22**(11): p. 1582-91.
75. Dobson, C.E.M.a.C.M., *Formation of Mixed Fibrils Demonstrates the Generic Nature and Potential Utility of Amyloid Nanostructures.* J. Am. Chem. Soc., 2000. **122**: p. 12707-12713.
76. Sugimoto, Y., et al., *Aggregates with lysozyme and ovalbumin show features of amyloid-like fibrils.* Biochem Cell Biol, 2011. **89**(6): p. 533-44.
77. Lindberg, M.J., L. Tibell, and M. Oliveberg, *Common denominator of Cu/Zn*

- superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis: decreased stability of the apo state.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16607-12.
78. Hart, P.J., et al., *Subunit asymmetry in the three-dimensional structure of a human CuZnSOD mutant found in familial amyotrophic lateral sclerosis.* Protein Sci, 1998. **7**(3): p. 545-55.
79. 石浦章一, *神経難病の分子機構 タンパク質のコンフォメーション異常による疾患.* シュプリンガー・フェアラーク東京, 2000.
80. Hong, D.P., et al., *Conformation of beta 2-microglobulin amyloid fibrils analyzed by reduction of the disulfide bond.* J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21554-60.
81. Yamamoto, S., et al., *Low concentrations of sodium dodecyl sulfate induce the extension of beta 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH.* Biochemistry, 2004. **43**(34): p. 11075-82.
82. Yamamoto, S., et al., *Glycosaminoglycans enhance the trifluoroethanol-induced extension of beta 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH.* J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(1): p. 126-33.
83. Ahmad, S., et al., *ASAView: database and tool for solvent accessibility representation in proteins.* BMC Bioinformatics, 2004. **5**: p. 51.
84. Goto, Y. and K. Hamaguchi, *Formation of the intrachain disulfide bond in the constant fragment of the immunoglobulin light chain.* J Mol Biol, 1981. **146**(3): p. 321-40.
85. Goto, Y. and K. Hamaguchi, *Unfolding and refolding of the reduced constant fragment of the immunoglobulin light chain. Kinetic role of the intrachain disulfide bond.* J Mol Biol, 1982. **156**(4): p. 911-26.
86. Kawata, Y., et al., *Hydrogen-exchange kinetics of the indole NH proton of the buried tryptophan in the constant fragment of the immunoglobulin light chain.* Biochemistry, 1988. **27**(1): p. 346-50.

87. Kawata, Y. and K. Hamaguchi, *Global fluctuations of the immunoglobulin domains under physiological conditions*. Biopolymers, 1990. **30**(3-4): p. 389-94.
88. Crapo, J.D., et al., *Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10405-9.
89. Hwang, C., A.J. Sinskey, and H.F. Lodish, *Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum*. Science, 1992. **257**(5076): p. 1496-502.
90. Lelie, H.L., et al., *Copper and zinc metallation status of copper-zinc superoxide dismutase from amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice*. J Biol Chem, 2011. **286**(4): p. 2795-806.
91. Ip, P., V.K. Mulligan, and A. Chakrabartty, *ALS-causing SOD1 mutations promote production of copper-deficient misfolded species*. J Mol Biol, 2011. **409**(5): p. 839-52.
92. Rae, T.D., et al., *Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase*. Science, 1999. **284**(5415): p. 805-8.
93. Parge, H.E., R.A. Hallewell, and J.A. Tainer, *Atomic structures of wild-type and thermostable mutant recombinant human Cu,Zn superoxide dismutase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 6109-13.
94. Winkler, D.D., et al., *Structural and biophysical properties of the pathogenic SOD1 variant H46R/H48Q*. Biochemistry, 2009. **48**(15): p. 3436-47.
95. Sevier, C.S. and C.A. Kaiser, *Formation and transfer of disulphide bonds in living cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(11): p. 836-47.
96. Molnar, K.S., et al., *A common property of amyotrophic lateral sclerosis-associated variants: destabilization of the copper/zinc superoxide dismutase electrostatic loop*. J Biol Chem, 2009. **284**(45): p. 30965-73.
97. Ahmad, A., et al., *Partially folded intermediates in insulin fibrillation*. Biochemistry, 2003. **42**(39): p. 11404-16.
98. Serag, A.A., et al., *Arrangement of subunits and ordering of beta-strands in an amyloid sheet*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(10): p. 734-9.

99. Khare, S.D., et al., *Sequence and structural determinants of Cu, Zn superoxide dismutase aggregation*. *Proteins*, 2005. **61**(3): p. 617-32.
100. Wang, Q., et al., *Protein aggregation and protein instability govern familial amyotrophic lateral sclerosis patient survival*. *PLoS Biol*, 2008. **6**(7): p. e170.
101. Tokunaga, Y., et al., *Analysis of core region from egg white lysozyme forming amyloid fibrils*. *Int J Biol Sci*, 2013. **9**(2): p. 219-27.

謝辞

本研究を進めるにあたり，長期にわたり終始ご指導，ご助言を頂きました，河田 康志 教授，溝端 知宏 准教授，本郷 邦広 助教に心より感謝いたします。また，共同研究者である安藤 瑞歩 氏をはじめ，蛋白質工学研究室の先輩・同期・後輩の皆様を重ねて御礼申し上げます。さらに，社会人入学に関し，ご理解いただき，様々なご助言くださいました新田ゼラチン株式会社 経営企画部ライフサイエンス室 山下 栄一 前室長，平岡 陽介 室長をはじめ，様々な面で支えてくださった新田ゼラチン株式会社の同僚・同期に心より御礼申し上げます。

最後に，長年にわたり支えてくださった家族に心より感謝申し上げます。

