

(様式 2)

## 学位論文の概要及び要旨

氏 名 井田 昌孝 印

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

### 学位論文の概要及び要旨

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, 特に運動ニューロンが損傷され, 最終的に死に至る。ALSの約90%は孤発性ALSである。約10%は家族性ALSであり, そのうち約20%がCu, Zn-superoxide dismutase (SOD1) の変異による。しかしながら, 未だに発症原因の解明には至っていない。これまでの研究より, 家族性ALSの患者や家族性変異体を導入したトランスジェニックマウスからmisfoldした変異型SOD1からなる凝集体が見つかっている。さらに, 孤発性ALSの患者からも野生型SOD1からなる凝集体が見つかっており, 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, 凝集体が確認されている。これより, 家族性変異型SOD1と野生型SOD1ともに凝集体の形成が示唆される。そのため, 凝集体が生じるメカニズムを調べることで, 家族性ALSだけでなく孤発性ALSについても発症原因の解明につながると期待される。SOD1は153残基のポリペプチド鎖からなる二量体を形成している。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。また, Cys6, Cys111はフリーのチオール状態で存在し, Cys57, Cys146は分子内ジスルフィド結合を形成している。近年, SOD1はアミロイド線維を形成することが報告されている。そこで, 本研究ではALSの発症原因タンパク質であるSOD1の野生型SOD1と家族性変異体であるG93ASOD1を用いて, 構造の揺らぎにより生じるアミロイド線維形成メカニズムを蛋白質化学的に明らかにすることを目的とした。

まず, 本研究ではタンパク質の構造安定性に関与する金属イオンと分子内ジスルフィド結合に注目し, 野生型SOD1のアミロイド線維形成について評価した。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著しく不安定化し, 最終的に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が形成され (核形成反応), それを鋳型として伸長する (伸長反応)。核部位は線維形成の初期に関わる重要な領域であるため, 野生型SOD1より形成されたアミロイド線維に対し, 酵素消化 (API, PK) により得られた断片をMALDI-TOF Massやプロテインシークエンサーを用いて核部位の同定を行った。その結果, 野生型SOD1の核部位はSOD1のアミノ酸配列中のN末端領

域，中央領域，C末端領域の3か所に存在することが明らかになった。複数の核部位が同定されたため，核部位に相当する合成ペプチドを用いて，それぞれのペプチドが単独，またすべての組み合わせで混合し，アミロイド線維形成について評価したところ，それぞれのペプチドは単独だけでなく，2つ，3つのすべての組み合わせでもアミロイド線維を形成することが明らかになった。さらに，G93ASOD1のアミロイド線維形成についても評価した。その結果，G93ASOD1は野生型SOD1に比べ，構造安定性が極めて低く，apo化し，分子内ジスルフィド結合の還元により，素早くアミロイド線維を形成することを示した。

以上の結果より，SOD1のアミロイド線維形成メカニズムを明らかにした。すなわち，金属イオンを配位する野生型SOD1の構造は安定であるが，apo化されると構造安定性は著しく低下する。さらに，分子内ジスルフィド結合が還元されると，構造の揺らぎが生じ，最終的にunfoldし，3つの核部位領域が露出する。そして，核部位同士が相互作用することで，核を形成し，アミロイド線維が形成される。一方，G93ASOD1もまたapo化，分子内ジスルフィド結合の還元により，アミロイド線維が形成される。野生型SOD1とG93ASOD1は，構造安定性に違いはあるが，同じ線維形成メカニズムであることを明らかにした。特に，多くの家族性変異体は金属イオンの親和性の低下や構造の不安定化が見られることから，apo化されやすく，細胞質内の還元条件下で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やすいため，ALSの発症が促進されると考えられる。本研究で明らかになったSOD1のアミロイド線維形成メカニズムはALSの病気の早期診断や予防に寄与することが期待される。