総説

神経変性疾患における銅・亜鉛スーパーオキシド ディスムターゼのミスフォールディング

古川良明 慶應義塾大学理工学部

Mutations in the gene coding Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) are known to cause amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a neurodegenerative disease with no cures. SOD1 is a highly stable enzyme where copper and zinc ions bind and a disulfide bond forms, but is also known to accumulate as misfolded forms in spinal motoneurons of ALS. A key to understand such pathological changes in SOD1 is the contribution of metal binding as well as disulfide formation to the conformational stability of SOD1. In this review, I will summarize mechanisms of SOD1 misfolding in ALS where the metal binding and/or disulfide formation go awry.

SOD1 / ALS / protein misfolding / copper ion / disulfide bond

1. スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)

SOD は、スーパーオキシド (O_2^-) の不均化を行う酵素の総称で、活性中心として結合する金属元素 (Cu, Fe, Mn, Ni) に応じて、4つのタイプが存在する。本総説で取り上げる銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼ (SOD1) は、その名の通り銅イオンを活性中心とするタイプで、1969年に McCord と Fridovich によって発見された最初の SOD である。 O_2^- の生物学的な重要性が十分に認識されていなかった当時、SOD1 の発見はセレンディピティーの産物で、パズルのピースが突然に合わさるような出来事だったと、その歴史的経緯が彼ら自身によって述べられている¹⁾。地球上の好気性生物や通性嫌気性生物はいずれかの SOD を備えているのに対して、偏性嫌気性生物には SOD が見当たらないことから、 O_2 と共存することを選択した生命体にとっては、SOD が極めて重要な酵素であることが想像される。実際、SOD 活性の喪失は様々な表現型や病態を生み出すことが報告されている。

例えば、加齢性黄斑変性症や喘息などの疾患において、SOD1 活性の低下が報告されている。また、サルモネラ菌や大腸菌による食中毒といった感染症においても、細菌の SOD1 が極めて重要な役割を果たしている²⁾。細菌を取り込んだ貪食細胞は、NADPH オキシダーゼによって産生した O_2^- とともに、銅イオンを細菌に浴びせることで反応性の高い活性酸素を生み出

し、殺菌を試みる。一方の細菌は、その表層やペリプラズム空間に SOD1 (SodC や SOD5 など、細菌によって名前が変わる) を備えることで、貪食細胞から放出される銅イオンを捕捉するとともに、 O_2^- を除去する。SOD1 を欠損した細菌は感染性を失うことから、SOD1 を活用して感染をなんとかしてでも成立させようとする細菌の狡猾な戦略が窺える。

多くの生命現象に関与する SOD1 の酵素活性は、研究対象として十分に魅力的であるが、実はその構造形成過程についても、生命に関わる極めて重要なプロセスであることが知られている。そこで、筆者の研究室で得られた *in vitro/in vivo* での知見を中心に、SOD1 の構造形成過程の異常と神経変性疾患について紹介する。

2. SOD1 と神経変性疾患 ALS

1970, 80 年代に報告された SOD1 に関する論文では、SOD1 活性が低下すると各種の酸化ストレスマーカー値が増加し、組織が酸化的な障害を受けることで、様々な疾患 (肺疾患、虚血再灌流傷害、眼疾患など) に関与するといった議論が多く、活性型 SOD1 の投与がもたらす治療的効果の可能性に期待が集まっていたようである。しかし、1993 年、SOD1 遺伝子が筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の最初の原因遺伝子として報告されてからは、SOD1 に関する研究の方向性が一変した³⁾。ALS は運動皮質や脊髄などに存在する運

Misfolding of Cu/Zn-Superoxide Dismutase in Neurodegenerative Diseases

Yoshiaki FURUKAWA

Lab. for Mechanistic Chemistry of Biomolecules, Department of Chemistry, Keio University

動ニューロンの脱落が見られる遅発性の神経変性疾患で、筋力低下や重篤な筋萎縮を主症状とし、発症後数年で人工呼吸器による補助が必要となる難病である。日本国内ではおよそ一万人の患者が報告されているものの、すでに承認されている二種類の薬剤の効果は極めて限定的で、数ヶ月の延命効果が期待されるに過ぎない。

SOD1 変異が同定された当初は、変異に伴う SOD1 活性の低下が ALS 発症の原因ではないかと考えられた。実際、SOD1 遺伝子変異に伴う ALS (SOD1-ALS) のほとんどが優性 (顕性) の遺伝病で、SOD1-ALS 患者では変異型 SOD1 と野生型 SOD1 の両方が発現しており、SOD1 活性は健常者の半分程になっている症例が多く⁴⁾、変異による SOD1 活性の低下が発症要因として考えられた。しかし、必ずしも全ての変異型 SOD1 において活性の低下が見られるわけではない。また、変異型のヒト SOD1 を発現するトランスジェニックマウス (SOD1-ALS マウス) では、内在性のマウス SOD1 が活性を保持しているにも関わらず、加齢に伴い ALS 様の症状が再現することから⁵⁾、変異による SOD1 活性の低下は ALS 発症の直接的な要因ではないと現在では考えられている。

SOD1 活性に関する検討とともに、SOD1-ALS 患者の免疫組織化学的な病理検討も進められ、主要な病変部位である脊髄の運動ニューロンには、レビー小体様硝子様封入体と呼ばれる SOD1 陽性の異常な構造物が共通して認められることが明らかとなった⁶⁾。また、SOD1-ALS マウスにおいても、封入体の形成が再現されるとともに、変異型 SOD1 の一部が非イオン性界面活性剤に不溶の凝集体を形成することが示されている。よって、病理性変異に伴うアミノ酸置換によって SOD1 の天然構造に異常が生じ (ミスフォールディング)、疾患の発症に関わる毒性が発揮されるというのが、SOD1-ALS の病理機序としては現在のところ最も有力である。ただし、変異型 SOD1 のミスフォールディングが ALS 発症の真の要因なのか、それとも、病態の 1 つとして現れる結果なのかは明確な結論が出ていない。また、SOD1 は全身性に発現するタンパク質であるにも関わらず、ミスフォールディングが運動ニューロン限定的に進行する理由についても明らかとなっていない。しかし、ミスフォールドした SOD1 を認識する抗体 (misSOD1 抗体) を使った受動免疫や、変異型 SOD1 を使った能動免疫が、SOD1-ALS マウスの発症を遅延させることを考慮すると、SOD1 のフォールディングを正常に維持することが、疾患の発症を防ぐためには重要であると考えられる。

図 1

SOD1 の立体構造 (PDB ID: 1HL5)。ホモ二量体からなり、各サブユニットには銅イオンと亜鉛イオンが 1 つずつ結合し、4 つのシステインが存在する。

3. SOD1 のミスフォールディング機序

SOD1 はホモダイマーからなる天然構造を有し、それぞれのサブユニットには、活性中心である銅イオンと亜鉛イオンが結合している (図 1)。銅イオンは CCS と呼ばれる銅シャペロンタンパク質によって SOD1 に供給されるが⁷⁾、亜鉛イオンがどのように供給されるかはわかっていない。また、サブユニット内に形成するジスルフィド (S-S) 結合が活性の発現には必須で、CCS によって銅イオンが供給されるとともに S-S 結合が導入される。詳細な内容は筆者らの原著論文⁸⁾にゆずるが、mRNA から翻訳された SOD1 ポリペプチドは、CCS との相互作用・金属イオン結合・S-S 結合形成・二量体化が見事に連動して天然構造を構築し、酵素として成熟化する。銅・亜鉛イオンを結合して、分子内 S-S 結合を形成した野生型 SOD1 の天然構造は、 T_m が 90°C 以上という高い熱安定性を示すものの、金属イオンを結合できなかったり、S-S 結合が切断されたりすることで T_m は低下する。実際、金属イオンを結合していない「アポ型」で S-S 結合が切断された最も未成熟な SOD1 では、 T_m が 40°C 近くにまで低下する⁹⁾。よって、成熟化のプロセスに異常が生じると、SOD1 のミスフォールディングが進行すると考えられるが、筆者は特に、SOD1 への金属イオン結合の不全が、ALS に見られる SOD1 のミスフォールディングの原因ではないかと考えている。

例えば、図 2 左に示すように、分子内 S-S 結合が切断された SOD1 から金属イオンが解離すると、その構造が劇的に変化して、アミロイド様の線維状凝集体を形成することを初めて見出した¹⁰⁾。また、図 2 中に示すように、分子内 S-S 結合を有した SOD1 から金属イ

図 2

筆者が提案する SOD1 のミスフォールディング経路。いずれの経路においても、金属イオンの結合状態が重要な役割を果たす。

オンが解離すると、S-S結合の組み換えが関与したミスフォールディングが進行することも他のグループに先駆けて明らかにしている。具体的には、ヒト SOD1 は 4 つのシステイン残基 (Cys6, 57, 111, 146) を有し、通常はそのうちの 2 つ (Cys57, 146) がサブユニット内で S-S 結合を形成しているが (図 1)、アポ型の SOD1 では、二次構造含量が極度に低下して構造揺らぎが増大し、Cys6 や Cys111 が Cys57-Cys146 の S-S 結合を求核攻撃できるようになる (図 2 中)。その結果、サブユニット内・間での S-S 結合の組み換えが進行し、S-S 結合で互いにクロスリンクされた異常なオリゴマー (S-S オリゴマー) が形成する¹¹⁾。実際、病末期にある *SOD1*-ALS マウスの脊髄には S-S オリゴマーが蓄積していることを見出した¹²⁾。特に、S-S オリゴマーは運動ニューロン内のミトコンドリア膜間スペースに蓄積し、ミトコンドリアの機能を低下させることで神経を変性させる可能性を提案している。近年には、S-S オリゴマーを選択的に認識する抗体の作製にも成功し、*SOD1*-ALS 患者の運動皮質や脊髄にある運動ニューロンに S-S オリゴマーが形成していることを報告した¹³⁾。その他にも、図 2 右に示すように、SOD1 活性により生じる過酸化水素が Cys111 のチオレート基をスルフェン酸へと可逆的に酸化し、銅・亜鉛イオンの解離が引き金となって、Cys6 が Cys111 のスルフェン酸を求核攻撃できるようになり、サブユニット内に 2 つの S-S 結合 (Cys6-Cys111, Cys57-Cys146) を有した異常な SOD1 が形成する経路も提案している¹⁴⁾。

試験管内でのアポ型 SOD1 のミスフォールディング経路が明らかとなる一方で、ALS の病変部位である脊髄運動ニューロンにアポ型 SOD1 が本当に形成するのか、その肝心のメカニズムが実はよくわかって

いない。しかし、*SOD1*-ALS マウスにおいて、病変の見られない肝臓では、ほぼ全ての変異型 SOD1 が銅イオンと亜鉛イオンを結合して活性を有するのに対し、主要な病変部位である脳や脊髄といった中枢神経系における変異型 SOD1 の活性化率は低く、特に銅イオンが不足していることが指摘されている¹⁵⁾。筆者らも免疫化学的な手法を駆使することで、*SOD1*-ALS マウスの脊髄には銅イオンを結合していない SOD1 が発症前から形成し、それらが病期の進行に伴って減少するとともに、S-S オリゴマーが蓄積することを確認している¹⁶⁾。中枢神経系は、他の末梢組織とは異なり、血液脳関門によって隔てられた特殊な環境で、特に、脊髄における銅イオン濃度は他の組織に比べて低値に抑えられている¹⁷⁾。よって、脊髄運動ニューロンに発現した変異型 SOD1 は銅イオンが欠乏した状態にある傾向にあり、亜鉛イオンも解離したアポ型 SOD1 が形成しやすい環境にあるのではないかと筆者は考えている。

以上より、金属イオンの解離や結合不全によってアポ型の SOD1 が形成し、それらが凝集体やオリゴマーへとミスフォールディングすることで、疾患が発症するという病理学的機序が考えられる。よって、SOD1 への金属イオンの供給を促進することができれば、ミスフォールディングを抑制し、*SOD1*-ALS の発症を食い止めることができるかもしれない。実際、Cu^{II}(atsm) という銅錯体を *SOD1*-ALS マウスに投与することで、脊髄内の銅イオン濃度が上昇するとともに、変異型 SOD1 への銅イオン結合が促進し、発症を劇的に遅延できたという報告がある¹⁸⁾。現在は、Cu^{II}(atsm) の治験 (第 II/III 相試験) が進められており、その結果が待ち望まれる (今年末に終了予定)。

4. 野生型 SOD1 のミスフォールディングと ALS

変異型 SOD1 のミスフォールディング研究は、様々なグループで精力的に進められているが、*SOD1* 遺伝子に変異が認められる ALS は全症例のうちの 1 割に過ぎず、8 割ほどの症例では遺伝的な要因さえも明らかとなっていない。しかも、そのような原因不明の ALS (sALS) の運動ニューロンには、SOD1 陽性の封入体が観察されないことから、SOD1 は sALS の病理には関与しないといった指摘までである。しかし、SOD1 のミスフォールディングは、変異に伴うアミノ酸置換が発端となって進行するニッチな病理現象ではないと、筆者は考えている。

まず、精製した野生型 SOD1 であっても、実験条

件を制御することで、変異型 SOD1 と同じようにオリゴマーや凝集体が形成する。また、顕著な封入体は認められないものの、sALS の脊髄運動ニューロンは、misSOD1 抗体で染色されるという報告もある。よって、SOD1 のミスフォールディングは、全ての ALS に共通した重要な病理学的変化である可能性がある（詳細は筆者らの総説¹⁹⁾を参照のこと）。

しかし、sALS における SOD1 の変化を検討するには、動物モデルが存在しないため、患者の検体を用いた解析を進めるより他ない。また、ALS の主要な病変部位が脳・脊髄であることから、生検は困難で死後検体を利用することになるが、ALS の病末期では多くの運動ニューロンが脱落し、SOD1 に生じる変化を捉えられていない可能性がある。さらに、検体に含まれるタンパク質を検討するには、免疫組織化学による染色が一般的だが、ホルマリンによる架橋や抗原賦活化、脱パラフィン処理など、タンパク質を変性させるには充分すぎる処置の連続で、ミスフォールディングを研究するための適切な手法とは言えない。

その点、脳脊髄液は、侵襲的ではあるものの発症後から採取可能で、脳や脊髄における変化を反映し、タンパク質を変性させる化学的な処理をせずに解析できる。筆者らは最近、ミスフォールドした SOD1 を sALS 患者の脳脊髄液から初めて検出し、それらは運動ニューロン様の培養細胞である NSC-34 に対して pmol/L という極めて低い濃度で高い毒性を発揮することを見出した²⁰⁾。患者から単離した毒性の高い SOD1 は銅イオンを結合していないことが示唆されたものの、より詳細な構造的特徴を解き明かし、その形成メカニズムを検討することで、sALS の発症要因の特定や治療法開発への展開が期待される。

5. ミスフォールディング研究のこれから

ALS に限らず多くの神経変性疾患において、天然構造とは異なる構造にミスフォールドしたタンパク質が毒性を発揮すると提案されている。しかし、一口にミスフォールド構造と言っても、天然構造とは違ってその数は無限にある。つまり、疾患の病理を理解するには、患者に見られるミスフォールド構造を見極めることが肝要で、試験管やモデルマウスで作製されるミスフォールド構造とは全くの別物である可能性も十分にある。よって、患者から単離した極微量のミスフォールド型タンパク質の構造的特徴を明らかにすることが何より重要であり、それらを試験管内で忠実に再現する方法を模索することで、疾患の発症機序を検証しな

ければならない。そのためには、病気や患者をよく知る現場の神経内科医と、タンパク質の取り扱いに長けた生物物理系研究者とが、もっと「密に」になる必要があり、そうすることで新たなセレンディピティーがもたらされると私は信じている。

文 献

- McCord, J. M., Fridovich, I. (1988) *Free Radic. Biol. Med.* **5**, 363-369. DOI: 10.1016/0891-5849(88)90109-8.
- Broxton, C. N., Culotta, V. C. (2016) *PLoS Pathog.* **12**, e1005295. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005295.
- Rosen, D. R. *et al.* (1993) *Nature* **362**, 59-62. DOI: 10.1038/362059a0.
- Saccon, R. A. *et al.* (2013) *Brain* **136**, 2342-2358. DOI: 10.1093/brain/awt097.
- Gurney, M. E. *et al.* (1994) *Science* **264**, 1772-1775. DOI: 10.1126/science.8209258.
- Bruijn, L. I. *et al.* (1998) *Science* **281**, 1851-1854. DOI: 10.1126/science.281.5384.1851.
- Culotta, V. C. *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 23469-23472. DOI: 10.1074/jbc.272.38.23469.
- Furukawa, Y. *et al.* (2004) *EMBO J.* **23**, 2872-2881. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600276.
- Furukawa, Y., O'Halloran, T. V. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 17266-17274. DOI: 10.1074/jbc.M500482200.
- Furukawa, Y. *et al.* (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 24167-24176. DOI: 10.1074/jbc.M802083200.
- Anzai, I. *et al.* (2017) *Protein Sci.* **26**, 484-496. DOI: 10.1002/pro.3094.
- Furukawa, Y. *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 7148-7153. DOI: 10.1073/pnas.0602048103.
- Tokuda, E. *et al.* (2017) *Mol. Neurodegener.* **12**, 2. DOI: 10.1186/s13024-016-0145-9.
- Anzai, I. *et al.* (2020) *Free Radic. Biol. Med.* **147**, 187-199. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.017.
- Jonsson, P. A. *et al.* (2006) *Brain* **129**, 451-464. DOI: 10.1093/brain/awh704.
- Tokuda, E. *et al.* (2018) *Biochim. Biophys. Acta* **1864**, 2119-2130. DOI: 10.1016/j.bbdis.2018.03.015.
- Warren, P. J. *et al.* (1960) *Brain* **83**, 709-717. DOI: 10.1093/brain/83.4.709.
- Roberts, B. R. *et al.* (2014) *J. Neurosci.* **34**, 8021-8031. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4196-13.2014.
- Furukawa, Y., Tokuda, E. (2020) *Transl. Neurodegener.* **9**, 33. DOI: 10.1186/s40035-020-00209-y.
- Tokuda, E. *et al.* (2019) *Mol. Neurodegener.* **14**, 42. DOI: 10.1186/s13024-019-0341-5.

古川良明

古川良明 (ふるかわ よしあき)

慶應義塾大学理工学部教授

2002 年京都大学大学院工学研究科博士課程修了、博士 (工学)。2020 年より現職。

研究内容: SOD1 が制御する生命現象のメカニズム解明

連絡先: 〒 223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1

E-mail: furukawa@chem.keio.ac.jp

URL: <https://furukawa-lab.org>