

家族性 ALS 変異型スーパーオキシドディスムターゼの SDS 可溶性単量体と2量体は、プロテアソーム分解系と熱ショック 70/40 によって影響を受ける初期の折りたたみ異常中間体である。

Sodium Dodecyl Sulfate-Soluble Monomer and Dimer of Familial ALS-linked Mutant Cu/Zn Superoxide Dismutase are Early Misfolded Intermediates Modulated by the Proteasome and Hsp70

ランニングタイトル: fALS における SOD1 可溶性変化

荒若 繁樹、小山 信吾、加藤 丈夫

**山形大学医学部生命情報内科
山形市飯田西2 - 2 - 2、990-9585
電話:023-628-5316、Fax:023-628-5318**

要旨

スーパーオキシドディスムターゼ(SOD1)変異を原因とする家族性筋萎縮性側索硬化症(fALS)では、異常に折りたたまれた SOD1 が不溶性凝集体として蓄積される。正常では可溶性である SOD1 が疾患発症と関連してどのように不溶性凝集体へと変換していくのかを検討するために、加齢に伴う fALS 関連 H46R SOD1 トランスジェニックマウス中の SOD1 可溶性変化について調べた。変異型 SOD1 は変異特異的に不溶性分子種へと変化し、それらはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、蟻酸によって可溶化される SOD1 単量体、2量体、高分子分子種に分離された。野生型 SOD1 トランスジェニックマウスや非トランスジェニックマウスでは、これらの画分に回収される SOD1 を認めなかった。H46R SOD1 トランスジェニックマウス脊髄において、SDS 可溶性 SOD1 単量体と2量体の発現は運動機能低下前より有意に増加していた。一方、SDS 可溶性高分子分子種や蟻酸可溶性分子種は発症後よりみられる形態的な SOD1 陽性封入体の増加と平行して増えていた。また、熱ショックプロテイン(Hsp)70 とその補シャペロンである Hsp40 は、SDS 可溶性画分で発症前より増加していた。変異型 SOD1 を発現させた COS-7 細胞では、プロテアソーム阻害剤処理により H46R SOD1 トランスジェニックマウスの加齢変化と同様の SOD1 可溶性変化が、内因性 Hsp70 と Hsp40 レベルの上昇に関わらず再現された。対照的に、過剰発現させた Hsp70 は、正常な可溶性 SOD1 の細胞内プール中の量を変化させずに、SDS 可溶性 SOD1 単量体と2量体を減少させた。これらの結果より、SDS 可溶性 SOD1 単量体と2量体は、より高度に不溶化した凝集対形成における初期の異常折りたたみ中間体であり、プロテアソーム分解系や分子シャペロンの処理能力を超えた時に増加することが示唆された。

緒言

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、上位と下位運動ニューロンを選択的に障害することを特徴とする神経変性疾患である。ALS の全体の約 90% は孤発性で、約 10% が家族性である。さらに、家族性 ALS (fALS) の中の約 20% にスーパーオキシドディスムターゼ (SOD1) 遺伝子の変異が認められる (1-3)。SOD1 は、主に細胞内では、細胞質中にあり、一部は核内、ミトコンドリア内膜内に分布する抗酸化酵素である (4,5)。酵素活性を持った SOD1 は、分子量 32 kDa のホモ二量体を形成し、内部にひとつの銅とひとつの亜鉛を含み、分子内にひとつの S-S 結合を持っている。fALS において、SOD1 変異が同定された当初は、SOD1 の抗酸化活性の減少によって ALS が発症するのではないかと推測された。しかし、その後の研究によって、SOD1 のノックアウトマウスは ALS 様の症状を発現しないことが示された (6)。一方、変異型 SOD1 を過剰発現したトランスジェニックマウスは、SOD1 の酵素活性とは無関係に、ALS 様の運動機能低下を示し、さらにヒト fALS の脊髄全角細胞に見られる特徴的な SOD1 封入体と類似した構造物が見られることが示された (7-10)。これらの重要な事実より、現在では変異型 SOD1 は、その変異に伴って新たに何らかの異常機能を獲得すると考えられている (7)。これまで同定されている 100 個以上の SOD1 変異は、SOD1 遺伝子の全てのエクソンにわたって認められることから、変異は何らかの立体構造異常を SOD1 タンパク質に与えるのではないかと推測されている。しかし、fALS を引き起こす変異型 SOD1 の本当のメカニズムは解明されていない。

SOD1 変異に関連する fALS は、病理学的に運動ニューロン内に SOD1 の異常封入体を認めることを特徴としている (11-13)。培養細胞やマウスモデルにおいて、変異型 SOD1 を過剰発現させると、類似した SOD1 封入体が形成され (13-16)、神経細胞死が生じることから、SOD1 の異常凝集物の蓄積、重合体の形成が、fALS の病因に重要な役割を担っているという仮説 (重合化仮説) が提唱されている。SOD1 凝集物の蓄積に関して、これまで幾つかの論文より、細胞内でタンパク質の品質管理を担っているプロテアソーム分解系と熱ショックタンパク質との密接な関係が報告されている。変異型 SOD1 を過剰発現した培養細胞において、プロテアソーム活性の阻害は、不溶性 SOD1 の蓄積と不溶性 SOD1 高分子量複合体の形成をもたらす (17-21)。変異型 SOD1 トランスジェニックマウスでは、プロテアソーム活性が、胸髄や肝臓に比し、最も障害されている腰髄で発症前より低下していることより、プロテアソームの障害が、病初期の重要な変化であることが示されている (22)。一方、培養細胞中に、熱ショックタンパク質 (Hsp) 70 を過剰発現させると SOD1 凝集体の形成と細胞死が抑制されることが報告されている (23)。また、Hsp70 の発現量は、変異型 SOD1 を発現した培養細胞で、界面活性剤可溶性と不溶性画分において増加し、界面活性剤不溶性画分中で変異型 SOD1 と Hsp70 が結合していることが知られている (24)。これらのデータは、本来、可溶性蛋白質である SOD1 が不溶性蛋白質へと変化する過程で、折りたたみ異常タンパク質の蓄積、その結果として生じる重合化を抑制するプロテアソーム分解系と Hsp のような分子シャペロンの働きの

低下が関与していることを示唆している。しかし、タンパク質の凝集過程は、いくつもの異なった性質をもつ折りたたみ異常タンパク質中間体を含みながら、異なった線維や無定形の凝集物からなる複合体を形成する複雑なものである(25)。どのように SOD1 がプロテアソーム分解系や Hsp と関連しながら、この複雑な過程を経ていくのかについての基礎的な情報は少ない。

私たちは、fALS で同定されている SOD1 の46番目のヒスチジンがアルギニンへ置換(H46R)した SOD1 変異体を過剰発現したトランスジェニックマウスを用いて、このトランスジェニックマウスの加齢変化と変異型 SOD1 の可溶性変化に焦点をあて解析した。また、H46R SOD1 を過剰発現させた培養細胞を、プロテアソーム阻害剤で処理した場合、さらに Hsp70 を共発現させた場合で、どのように変異型 SOD1 の可溶性変化が出現するのかを検討した。その結果、私たちは、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)と呼ばれる界面活性剤で可溶化される SOD1 の単量体と2量体が、高度に不溶化した凝集物の形成において、初期の折りたたみ異常中間体であること、この SDS 可溶性 SOD1 の発現は、プロテアソーム分解系と Hsp によって協調的に調節されていること、Hsp は主に不溶性 SOD1 タンパク質を分解系へ促進させる働きをもつことを明らかにしたので報告する。

方法

抗体とプラスミド 本研究では次の抗体を使用した。抗 SOD1 ポリクローナル抗体 (SOD1-100, Stressgen, カナダ; SOD1-100 はマウスとヒトの SOD1 と反応する); 抗 SOD1 モノクローナル抗体 (MBL, 日本); 抗 Hsp70 抗体 (SPA-757, Stressgen); 抗 Hsp40 抗体 (SPA-400, Stressgen); 抗ユビキチン抗体 (Dako, デンマーク)。C 末端に FLAG タグを連結した全長の SOD1 cDNA は、pcDNA3.1 ベクター (Invitrogen, USA) と pEF-BOS ベクターにサブクローニングした。H46R と G93A SOD1 は、部位特異的変異体作成法を用いて作成し、DNA 配列をシーケンスして確認した。pCMV-Hsp70 と pRC-Hsp40 は、名古屋大学医学部 神経内科の祖父江 元 教授より供与いただいた(26,27)。

細胞培養とトランスフェクション COS-7 細胞は、10%胎児牛血清を含有したダルベッコ改変イーグルメディウム (DMEM) 中で培養した。ヒト神経芽細胞種由来 SH-SY5Y 細胞は、10%胎児牛血清を含有した F-12/DMEM 中で培養した。cDNA は、リポフェクトアミン 2000 (Invitrogen) を用いて細胞にトランスフェクションした(28)。トランスフェクション後、48時間で培養細胞を回収して実験に使用した。プロテアソーム活性阻害実験には、MG132 またはラクタスタチン (Sigma, USA) を図に示したような濃度で、トランスフェクション後24時間で細胞に添加し、さらに24時間インキュベーションした。Hsp を用いた実験では、Hsp70 と Hsp40 を単独または共に SOD1-FLAG pEF-BOS と、4:1 のモル比で COS-7 細胞にトランスフェクションした。

トランスジェニックマウスと運動機能評価 ヒト内在性のプロモーターによってコントロールされた H46R 変異を持つヒト SOD1 を遺伝子導入した C57BL/6 マウスを東北大学神経内科系山教授より供与していただいた。ヒト野生型 SOD1 のトランスジェニックマウスは、スタンフォード大学の Dr. H. C. Chan より供与された(29)。全てのマウスは、山形大学動物実験施設規約に従い飼育、実験に使用した。マウスの運動機能は、Rotarod(室町工業)を用いて評価した。Rotarod は、一定速度で回転する回転棒の上にマウスを乗せて運動機能を評価する装置で、生後 6 週目より毎週、5 回転/分と 15 回転/分の 2 つの回転速度で、運動をそれぞれ 600 秒間行わせて解析した(30)。

マウス脊髄および培養細胞のタンパク質分画 マウス脊髄に 3 倍量のプロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche、ドイツ)を含む PBS バッファーを加えてフロン型ホモジナイザーによりホモジネートした(31,32)。ホモジネートを 4℃ で 100,000 × g、20 分間遠心し、得られた上清を PBS 可溶性画分(PBS sup)とした。残った沈渣を超音波破碎し、同様の条件で遠心、上清を除く洗浄を 3 回繰り返した。次に、1% Triton-X100 を含む PBS バッファー(Tx バッファー)中で沈渣を超音波破碎し、4℃ で 30 分静置した後、100,000 × g、20 分間の遠心操作を行い、得られた上清を Triton-X100 可溶性画分(Tx sup)とした。Tx バッファーで洗浄作業を 3 回繰り返した後、5%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含む PBS バッファー(SDS バッファー)中で沈渣を超音波破碎した。室温で 30 分静置した後、100,000 × g、20 分、20℃ の遠心を行い、得られた上清を SDS 可溶性画分(SDS sup)とした。SDS バッファーで洗浄行程を 3 回繰り返し 8M 尿素を含む PBS バッファー(Urea バッファー)中で沈渣を超音波破碎した。室温で 30 分静置した後、20℃ で 100,000 × g、20 分間遠心を行い、得られた上清を尿素可溶性画分(urea sup)とした。urea バッファーで 1 回洗浄し、88% 蟻酸(FA)中で沈渣を超音波破碎した。室温で 30 分静置した後、20℃ で 100,000 × g、20 分間遠心を行い、得られた上清を蟻酸可溶性画分(FA sup)とした。

回収した培養細胞は上述したように PBS 可溶性画分、Tx 可溶性画分、SDS 可溶性画分に分画した。SDS 不溶性沈渣は、Laemmli サンプルバッファー中に懸濁し、SDS 不溶性画分(SDS ppt)とした。

ウエスタンブロット PBS 可溶性画分、Tx 可溶性画分、SDS 可溶性画分、尿素可溶性画分のタンパク濃度はウシ血清アルブミンを標準として、BCA 法(Pierce, USA)で測定した。これらの画分は各レーンに 10 μg ずつ、蟻酸可溶性画分は等量を 15% SDS ポリアクリルアミドゲルに添加し電気泳動後、ゲルを PVDF 膜(Millipore, USA)に転写した。5%スキムミルクと 0.05% Tween20 を含む PBS バッファーでブロッキングした後、各 1 次抗体で反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識された 2 次抗体で反応させた。免疫反応は enhanced chemiluminescence(ECL; Amersham, スウェーデン)を用いて検出した。

免疫組織化学 マウスをジエチルエーテルにより麻酔し、左心室より0.9%生理食塩水、続いて4%パラホルムアルデヒド0.1 M リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、pH 7.4を環流させた後、脊髄を摘出し、4%パラホルムアルデヒド0.1%PBSで固定した。パラフィン包埋後、4 μ mの切片を作成した。切片はキシレン、メタノールによる脱パラフィン処理、0.3%過酸化水素処理、ブロッキングの後、各1次抗体で反応させた。PBSで洗浄後、2次抗体で1時間、室温で反応させ、続いてVectastain ABC Kit(Vector, USA)で30分、室温で反応させた。呈色反応はdiaminobenzidine (DAB)で行った。

結 果

加齢に伴う H46R SOD1 トランスジェニックマウスの運動機能低下と SOD1 封入体の出現

本実験で使用した H46R SOD1 トランスジェニックマウス(H46R SOD1-Tg)の平均生存期間は、 163.5 ± 9.2 日(平均 \pm 標準偏差, $n=10$)であった。非トランスジェニックマウス(Non-Tg)は観察期間においてすべて生存していた($n=10$) (図1A)。マウスの運動機能低下を病期毎に評価するため、運動機能をRotarodで測定した。H46R SOD1-Tgは、5回転/分の運動負荷で 148.6 ± 6.9 日より、15回転/分の運動負荷で 142.7 ± 7.9 日より運動機能の低下を認めた(図1B)。運動負荷の大きい15回転/分での測定では、21週前後で観察される四肢脱力の出現より早い、軽微な運動機能低下の出現を捉えられた。一方、Non-Tgでは、観察期間中運動機能の低下を認めなかった。Rotarodの測定より、私たちは、H46R SOD1-Tgの週齢13週を未発症早期(early presymptomatic stage: EP)、17週を未発症後期(late presymptomatic stage: LP)、21週を発症期(symptomatic stage: SS)、23週以降を末期(end stage: ES)とそれぞれ病期を定義して、各病期の標本を採集した。

各病期の H46R SOD1-Tg 脊髄で、経時的に形態上どのような変化が起きているか免疫染色を行い検討した。はじめに ES では、H46RSOD1-Tg の脊髄前角の大型神経細胞質内およびニューロピルに抗 SOD1 抗体で染色される SOD1 陽性封入体を認めた(図2A)。既報告に一致して、SOD1 陽性封入体は、ユビキチン、分子シャペロンの一種である Hsp70 に対する抗体で明瞭に免疫染色され、抗 Hsp40 抗体では抗 Hsp70 抗体に比べ染色性は弱いものの免疫染色されていた(図2A)。次に、H46R SOD1-Tg 脊髄における封入体の加齢に伴う変化を検討した(図2B)。SOD1 陽性封入体は、EP では観察されず、SS でニューロピルに出現していた。SOD1 陽性封入体の数は、SS と ES の間で増加していた。小数の抗ユビキチン抗体及び抗 Hsp70 抗体陽性構造物が、ニューロピルに LP において認められ、SOD1 の免疫反応性より早期に出現していた。しかし、抗ユビキチン抗体と抗 Hsp70 抗体陽性の SOD1 封入体の顕著な増加は、SS 以降に認められた。抗 Hsp40 抗体では抗 Hsp70 抗体と比べ各病期で染色性は低かったが、SS 以降に陽性封入体が観察された。免疫組織学的に観察される封入体は、EP では全く観察されず、H46R SOD1-Tg の運動機能が明らかとなる LP でわずかに認められはじめ、運動機能の低下と共に封入体数が増加していた。一方、ES と同じ年齢のマウス

Non-Tg では、全く病理学的な変化を認めなかった。

H46R SOD1 トランスジェニックマウスにおける SOD1 変異特異的、並びに加齢依存性の SOD1 可溶性変化

fALS で認められる SOD1 変異依存性の SOD1 可溶性変化を調べるために、ES における H46R SOD1-Tg の脊髄を各種界面活性剤と変性剤を用いて Fig. 3A 示すように順次分画した。この分画法は、細胞質と膜に存在するタンパク質全体から、不溶性 SOD1 を分離するものである。ウエスタンブロット上、24週齢の Non-Tg と38週齢の Wt SOD1-Tg における内因性 SOD1 とヒト野生型 SOD1 単量体は、PBS 可溶性画分と Tx 可溶性画分において、それぞれ 16-kDa と 22-kDa に検出された (Fig. 3B)。これらのコントロールマウスでは、SDS 可溶性画分以降には SOD1 は検出されなかった。この所見は、正常の SOD1 が細胞質内の可溶性タンパク質として存在し、一部ミトコンドリアなどの細胞内器官にも存在していることと合致していると考えられた(4,5)。対照的に、ES の H46R-Tg では、H46R 変異 SOD1 は SDS 画分でも検出された。SDS 可溶性画分では、単量体に加え、44-kDa のバンド(分子量的に SOD1₂量体に相当)(18)と 44-kDa より分子量の大きい多数のバンド(高分子分子種)が観察された。また、28 と 36-kDa のバンドも観察されたが、これらのバンドの由来については、高分子分子種の切断断片の可能性が考えられるも正確な由来は、今回の研究では明らかでなかった。SOD1 単量体、2量体、高分子分子種は、さらに蟻酸可溶性画分中にも観察された。しかし、尿素可溶性画分では単量体のみが認められたことから、蟻酸可溶性画分中の SOD1₂量体と高分子分子種は、単に前のステップから持ち越されたものではないことが示された (Fig. 3B)。

次に、SOD1 可溶性が加齢と共に H46R-Tg においてどのように変化するかを検索するために、各種界面活性剤と変性剤の使用により細分した各画分に回収される SOD1 を病期毎に比較した。PBS 可溶性画分、Tx 可溶性画分における H46R 変異 SOD1 単量体の発現量は、加齢によって統計学的には有意差を示さなかったが減少傾向にあった (Fig. 4)。SDS 可溶性画分では、変異型 SOD1 の単量体と2量体が、明らかに EP で検出された。この画分において、SOD1 単量体の変化を、ES に対する EP と LP の比でみると、それぞれ $20.52 \pm 6.41\%$ と $45.88 \pm 2.30\%$ であった。加えて、SOD1₂量体の変化は、ES に対する EP と LP の比でみると、それぞれ $29.38 \pm 21.20\%$ と $68.47 \pm 10.27\%$ であった。一方、SOD1 高分子分子種の変化は、より遅れて LP と SS の間で起こっていた。これらの所見より、SDS 可溶性かつ SDS に安定した SOD1 単量体と2量体の増加は、発症前の EP と LP の間で生じ ($n=10$, それぞれ $p=0.017$, $p=0.005$)、高分子分子種の増加に先行していることが示された (Fig. 4)。より不可溶化した蟻酸可溶性画分においては、少量の SOD1 単量体が EP で見られたが、単量体の発現量は EP と LP の期間で有意な増加を認めなかった。この画分において、SOD1 単量体の変化を、ES に対する LP と SS の比でみると、それぞれ $32.31 \pm 12.99\%$ と $68.30 \pm 17.03\%$ であった。SOD1₂量体の変化は、ES に対する LP と SS の比でみると、それぞれ $12.73 \pm 6.27\%$ 、 $41.42 \pm 4.50\%$ であった。蟻酸可溶性の SOD1 単量体と2量体は、有意に LP と SS の期間で増加し (各 $p=0.036$,

$p < 0.001$)、一方、高分子分子種は、さらに遅れて SS と ES の間に増加していた。以上より、SDS 可溶性の SOD1 単量体と 2 量体の発現量は、SDS 可溶性高分子分子種と蟻酸可溶性分子種より早く増加していた。この結果は、変異型 SOD1 は生化学的に異なる可溶性を示す分子種の複合体であり、SDS 可溶性の SOD1 単量体と 2 量体はより高度に不溶化して凝集していく過程の初期変化として認められることを示している。

どのように変異特異的な SOD1 の可溶性変化が分子シャペロン系と関係しているのかについて、H46R-Tg から上述したように分画したサンプルを用いてウエスタンブロットングで解析した。Hsp70 と Hsp40 は、PBS と Tx 可溶性画分中に豊富に認められ、それらの発現量はどの病期でも一定しており、24 週齢の Non-Tg や 38 週齢の Wt SOD1-Tg と比し同様であった (Fig. 5)。SDS 可溶性画分において、H46R-Tg の Hsp70 と Hsp40 は、LP の時点で、24 週齢の Non-Tg より増加し、EP と LP の間で上昇していた (Fig. 5)。SDS 可溶性画分中の Hsp70 と Hsp40 は、SDS 可溶性 SOD1 単量体と 2 量体の増加と平行して増えていた。このことから、Hsp70 と Hsp40 の増加は、SDS 可溶性 SOD1 分子種の出現に対して保護的な反応として生じているが、その反応は不溶性 SOD1 の蓄積を抑制するには不十分である可能性が示唆された。

H46RSOD1 を発現した培養細胞におけるプロテアソーム活性阻害による変異 SOD1 の可溶性変化

fALS に関連した変異型 SOD1 は折りたたみ異常を示し、プロテアソーム分解系によって分解されることが知られている (17-20)。どのようにプロテアソーム分解系の阻害が変異型 SOD1 の可溶性に影響を及ぼすかを見るために、私たちは野生型 SOD1 または H46R SOD1 cDNA を一過性発現させた COS-7 細胞をプロテアソーム阻害剤である MG132 で処理した。回収した細胞を順次 PBS、1% Tx、5% SDS を含むバッファーで生化学的に分画した。PBS と Tx 可溶性画分において、野生型 SOD1 と同様に変異型 SOD1 の発現量はわずかに MG132 濃度依存性に増加していた (Fig. 6A)。SDS 可溶性画分では、少量の野生型 SOD1 単量体が、MG132 処理のない条件で認められた。10 μ l の MG132 を添加した条件で、野生型 SOD1 単量体の発現量は増加していたが、明らかな高分子分子種の産生は伴わなかった。一方、SDS 可溶性の変異型 SOD1 単量体と 2 量体は、野生型 SOD1 とは異なり明瞭に MG132 処理のない条件下で検出された。SDS 可溶性の変異型 SOD1 単量体、2 量体、そして高分子分子種が、MG132 濃度依存性に有意に出現、増加していた (Fig. 6A)。同様に、SDS 不溶性画分では、単量体、2 量体、高分子分子種を含む変異型 SOD1 の発現量は、MG132 濃度依存性に増加していた。一方、野生型 SOD1 では、MG132 濃度依存性変化は認められなかった (Fig. 6A)。さらに、MG132 濃度を变化させた処理において、SDS 可溶性の SOD1 単量体と 2 量体の増加は、SDS 可溶性高分子分子種の増加に先行していた。別のプロテアソーム阻害剤であるラクタスタチン処理においても、より程度は軽微であるが SDS 可溶性並びに SDS 不溶性変異型 SOD1 分子種の蓄積を引き起こした (Fig. 6A)。MG132 処理による変異型 SOD1 の可溶性変

化は、ヒト神経芽細胞腫由来の SH-SY5Y 細胞でも確認された。MG132 処理により、SDS 可溶性、SDS 不溶性の SOD1 単量体、2 量体、高分子分子種は、濃度依存性に COS-7 細胞の場合と同様に SH-SY5Y 細胞においても増加していた。また、SDS 可溶性の単量体と 2 量体は、SDS 可溶性高分子分子種並びに SDS 不溶性分子種に先行して増加していた。SH-SY5Y 細胞では、大部分の内因性 SOD1 は、PBS と Tx 可溶性画分で検出されたが、少量の内因性 SOD1 は SDS 可溶性画分に認められた。変異型 SOD1 を発現させた SH-SY5Y 細胞において、Hsp70 と Hsp40 の発現量は、SDS 可溶性画分において、MG132 濃度依存性に増加していた (Fig. 6B)。しかし、SDS 可溶性画分における内因性の Hsp70 と Hsp40 の発現量の増加は、野生型 SOD1 を発現させた細胞においても同様に認められた。これらの結果は、変異型 SOD1 を発現させた培養細胞においてプロテアソーム活性を阻害することにより、トランスジェニックマウスの加齢に伴う SOD1 可溶性変化を再現できることを示していた。プロテアソーム活性の阻害は、内因性 Hsp70 と Hsp40 の増加にかかわらず、SDS 可溶性高分子分子種と SDS 不溶性分子種の増加に先行して、始めに SDS 可溶性 SOD1 単量体と 2 量体の蓄積をもたらしていた。

SDS 可溶性と SDS 不溶性 SOD1 の蓄積における Hsp70 過剰発現の効果

Hsp70 と Hsp40 を培養細胞に過剰発現させると SOD1 凝集物の形成と細胞死が抑制されることが報告されている(32)。どのように Hsp70 と Hsp40 が SOD1 の可溶性変化に影響を与えるのかをみるために、連続的に界面活性剤で分画される SOD1 の発現量に対する、Hsp70 と Hsp40 の効果を検討した (Fig. 7A)。以前私たちが報告(20)したように、変異型 SOD1 を pEF-BOS ベクターに組み込んだ cDNA を COS-7 細胞に過剰発現させると、pcDNA3.1 に組み込んだものに比べて SOD1 は高発現し、プロテアソーム阻害剤の使用なしで SDS 不溶性 SOD1 を産生させることができる。この高発現系の利点を使用して、H46R SOD1 と、モル比で 4 倍過剰になるように Hsp cDNA を共発現させた細胞を用いて検討した。Hsp70 の過剰発現は、空のベクターをトランスフェクションさせたものに比べ、明らかに SDS 可溶性 SOD1 単量体、2 量体、高分子分子種の発現量を減少させた (Fig. 7A)。Hsp40 の過剰発現は、Hsp70 に比べ、SDS 可溶性 SOD1 分子種のレベルをより弱く減少させた。Hsp70 と Hsp40 を共に発現させると、SDS 可溶性 SOD1 2 量体、高分子分子種の発現量をより強く減少させる効果を示した (Fig. 7A)。SDS 不溶性画分においても、Hsp70 の過剰発現は、SDS 可溶性 SOD1 単量体、2 量体、高分子分子種の発現量を減少させたが、Hsp40 を共発現させた場合の減少効果はわずかなものであった (Fig. 7A)。この所見は、異なる変異型である G93A SOD1 を発現させた場合でも同様であった(資料提示せず)。さらに Hsp70 の過剰発現による不溶性 SOD1 の減少効果の分子メカニズムを検索するために、H46R SOD1 と共にトランスフェクションする Hsp70 cDNA の量を変化させてみてみた (Fig. 7B)。SDS 可溶性画分中の SOD1 単量体、2 量体、高分子分子種の発現量は、SDS 不溶性画分中と同様に、トランスフェクションする Hsp70 cDNA の量と負の相関を示していた (Fig. 7B)。一方、PBS と Tx 画分中の SOD1 単量体のレベルは、SDS

可溶性画分中の SOD1 が明瞭に減少するのと対照的に、ほとんど変化がなかった (Fig. 7B)。これらの所見は、過剰発現された Hsp70 は、少なくとも SDS 可溶性の SOD1 単量体と 2 量体を折りたたみ異常分子として認識し、これら異常な不溶性 SOD1 分子種を再度折りたたみなおす (リフォールディング) よりむしろ分解系へと促進させていることを示していた。

考 察

本研究では、正常型 SOD1 のもつ性質から、変異型 SOD1 の病態に関連した性質への変化をみるために、SOD1 の生化学的な可溶性の変化に焦点をあてた。その目的のために、病期毎に H46R 変異 SOD1 遺伝子を発現したトランスジェニックマウスの脊髄を採取し、異なる幾つかの界面活性剤と変性剤を用いて連続的に分画したものを検索した。私たちは、野生型並びに内因性の SOD1 はほとんど PBS と Tx 可溶性画分に回収されるのに対して、変異型 SOD1 は、より強い可溶化条件を必要とし、SDS、尿素、蟻酸可溶性分子種に分離されることを明らかにした。SDS 可溶性分子種は、野生型 SOD1 と変異型 SOD1 を生化学的に区別する始めの可溶性変化として特徴づけられた。さらに、SDS 可溶性変異型 SOD1 単量体と 2 量体は、発症前より、そして SDS 可溶性高分子分子種とより不溶性分子種の蓄積に先行して増加していた。よって、トランスジェニックマウス脊髄中の H46R 変異 SOD1 は、運動機能低下前より生じている中間的な不溶性分子種の出現を経て、より高度な不溶性分子種複合体へと変換していることが示された。

野生型 SOD1 は原則的に可溶性の細胞質タンパク質であり、その一部はミトコンドリア内膜内に分布している(4,5)。fALS 関連変異型 SOD1 は高分子量の不溶性凝集体として重合する傾向をもっている。その凝集体は、免疫組織化学的に fALS の脊髄、そして fALS 関連変異型 SOD1 トランスジェニックマウスの脊髄に細胞質内封入体として観察される(11)。これまでの多くの変異型 SOD1 に関する研究では、この封入体が神経細胞死の原因であるのか、または単に神経細胞の変性の結果生じたものであるのか相反する議論、結果が報告されている。この点に関して、免疫組織化学的解析は、SOD1 陽性封入体は、fALS 関連変異型 SOD1 トランスジェニックマウスの脊髄において、病気が進行してからの比較的遅い段階より形成され出現してくると報告されている(3)。しかし、このような免疫組織化学的解析では、たとえ病初期の段階で顕微鏡的な封入体の存在が確認できなくても、高度に不溶化した凝集体を含んでいる非常に小さい封入体が、運動ニューロンにダメージを与えている可能性を排除できない。今回の研究結果は、先行論文の報告(3)と一致して、SOD1 陽性封入体は発症後より増加すること、この増加は運動機能の低下並びに蟻酸可溶性画分に回収される最も不溶性の SOD1 分子種の増加と平行していることを明らかにした。さらに、SOD1 陽性封入体の出現前から、変異型 SOD1 は本来の可溶性タンパク質から、SDS 可溶性の単量体と 2 量体として変換し始めていることを示した。これらの所見は、SDS 可溶性 SOD1 単量体と 2 量体からなる複合体は可視的な封入体として観察されず、高度に不溶化した分子種から形成される封入体の出現

は初期の病態により寄与するところが少ないものと考えられる。

私たちの所見は、fALS 関連変異型 SOD1 トランスジェニックマウスにおいて、界面活性剤可溶性の2量体や高分子分子種が、運動機能低下並びに SOD1 陽性封入体の出現前から認められることを報告した論文(17,18)に直接的に関連する。しかし、これらの先行論文では、変異型 SOD1 の可溶性変化は、単一の界面活性剤によって分画されたものを用いて評価されている。私達の実験では、変異特異的な SOD1 の可溶性変化を、数種の界面活性剤と変性剤を使用することにより、3つの異なる種類の分子種に分離し、その結果、不溶性 SOD1 は同じ生化学的性質をもつ均一な分子種からなるものではないことを認めた。加えて、SDS 可溶性 SOD1 は、時間的出現の点で、明らかに蟻酸可溶性 SOD1 とは異なっていた。先行論文との所見の差異は、タンパク質分画法の違いに起因するかもしれない。例えば、私たちは、fALS 関連変異型トランスジェニックマウスの脊髄を連続的に PBS、Tx バッファーで抽出することによって、細胞質内並びにミトコンドリア内に存在する正常の野生型 SOD1 と等価な可溶性を示す SOD1 を除去することにより、その後、変異特異的な不溶性変化を観察し得たためかもしれない。詳細に検討することにより、SDS 可溶性分子種においても、高分子分子種の増加より、単量体や2量体が発症前より早く増加していることを認めた。封入体形成過程の仮説として、最初の段階は、変異タンパク質のランダムコイル構造から β -シート構造への立体構造変化であり、引き続いて顕微鏡的に認められる封入体として検出されるアミロイド様線維への重合化が起ると考えられている(34)。この仮説に従って、SDS 可溶性単量体と2量体が高分子分子種やより不溶性分子種を形成する中間体であるのかどうかについて検討するために、私たちは培養細胞を用いて SOD1 の可溶性変化を解析した。プロテアソーム阻害剤で培養細胞を処理すると、SDS 可溶性 SOD1 単量体と2量体が、高分子分子種やより不溶性分子種の出現より早く現れた。この所見は、変異型 SOD1 トランスジェニックマウスにおける加齢に伴う SOD1 可溶性変化と酷似していた。対照的に、Hsp70 を過剰発現させると、PBS と Tx 可溶性 SOD1 単量体の量を変えずに、SDS 可溶性単量体と2量体の量が減少していた。これらの実験結果は、SDS 可溶性の SOD1 単量体と2量体は、折りたたみに異常をもつ中間体として、プロテアソーム系で分解され、分子シャペロンの影響を受けることを示している。以前報告されてる *in vivo* 実験では、酸化によって SOD1 の正常なホモダイマーは、凝集に先立ち、単量体に解離し、酸化された単量体は SOD1 凝集体形成の核となることが示されている(35)。よって、どのように凝集傾向を促す翻訳後修飾、例えば酸化、カルボニル化、糖化、ニトロ化といったものが、SOD1 可溶性変化に影響を及ぼすのかについて、さらなる検討が必要である。

Hsp70 と Hsp40 が SOD1 の凝集や分解過程に関係していることがいくつか報告されている(12,24)。そして、Hsp70 とその補シャペロンである Hsp40 が SOD1 凝集を抑制し、神経突起の成長を改善させることが知られている(36)。これまでの報告では、変異型 SOD1 を発現した培養細胞と異なり変異型 SOD1 トランスジェニックマウスにおいて、Hsp70 発現の増加は認められていない(23)。私たちの実験では、変異型 SOD1 トランスジェニックマウスで、Hsp70 と

Hsp40 の発現量は、SDS 可溶性画分において、発症前から徐々に増加していることを認めた。初期の段階で、変異型 SOD1 トランスジェニックマウスの Hsp70 と Hsp40 の発現量は、より年長いた非トランスジェニックマウスや野生型 SOD1 トランスジェニックマウスより明らかに高くなっていた。この観察は、Hsp70 は界面活性剤不溶性の SOD1 と相互作用するという既報告と矛盾しない(24)。Hsp は、構造の乱れたタンパク質をリフォールディングすることによって、またはユビキチン・プロテアソーム系に折りたたみ異常タンパク質を促すことにより、タンパク質の凝集を防いでいる(37)。今回の実験では変異型 SOD1 と Hsp70 を共発現させた細胞において、Hsp70 の過剰発現が、SDS 可溶性、SDS 不溶性 SOD1 発現量を減少させていた。この変化は、PBS、Tx 可溶性 SOD1 の増加を伴っていなかった。この結果は、Hsp70 は、変異特異的な不溶性 SOD1 分子種の発現量を、リフォールディングするよりこれらを分解系に送ることによって、維持している可能性が示唆された。私たちの結果は、Hsp70 がパーキンソン病のモデルである α -シヌクレイントランスジェニックマウスにおいて、界面活性剤不溶性の α -シヌクレイン量に影響しているという報告に合致する(38)。また、遺伝性球脊髄性筋萎縮症のモデルである変異アンドロゲンレセプタートランスジェニックマウスに Hsp70 を共発現させた研究において、Hsp70 の過剰発現により可溶性のアンドロゲンレセプター単量体と高分子分子種が減少し、Hsp70 が変異アンドロゲンレセプターの分解を強めていることが示唆された報告と一致する(39)。別の報告では、ユビキチン化された Hsp70 が、プロテアソームに向かう SOD1 でリクルートされているということも示されている(40)。一方、今回私たちが示したように、変異型 SOD1 トランスジェニックマウスにおいて、変異型 SOD1 は内因性 Hsp70 と Hsp40 の発現量の増加に関わらず、可溶性を変化させていく点に注意しないといけない。この現象は、培養細胞においても、プロテアソーム活性を抑制させると、内因性 Hsp70 と Hsp40 の発現増加を伴いつつ、強い不溶性 SOD1 の出現をもたらすことから、ひとつの可能性として、プロテアソーム活性の減少が、内因性 Hsp70 の処理能力を超えて、多量の折りたたみ異常タンパク質を産生することによるものが考えられる。第二の可能性として、Hsp の主な働きがプロテアソーム系へ異常に折りたたまれた SOD1 の処理を促進させることにあるためかもしれない。また、第三の可能性として、不溶性 SOD1 分子種の蓄積が、直接的に Hsp のシャペロン機能を阻害するのかもしれない。最近の報告では、Hsp を増加させる物質である arimocloamol を、fALS 関連変異型 SOD1 トランスジェニックマウスに投与すると、発病が有意に遅れることが報告された(41)。実際、この報告では、arimocloamol の投与により、Hsp70 の発現量は約 5 から 6 倍増加していることが示されている。この所見は、自然な反応よりもより高い Hsp 発現レベルの誘導が、異常折りたたみタンパク質の蓄積を抑制するには必要であることを示唆している。以上のことをまとめると、今回の研究結果は、SDS 可溶性 SOD1 単量体と 2 量体が初期の異常折りたたみ中間体であることを示し、その量が分子シャペロンやプロテアソーム系の能力を超えた場合に、異常折りたたみ中間体が発現することを示唆している。SDS 可溶性 SOD1 単量体と 2 量体は、さらなる毒性をもつ可能性がある異常折りたたみタンパク質の蓄積を防ぐ点で、fALS の治療ターゲットとして重要なもののひとつと考えられる。

文献

1. Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X., and et al. (1993) *Nature* 362, 59-62
2. Cudkowicz, M. E., McKenna-Yasek, D., Sapp, P. E., Chin, W., Geller, B., Hayden, D. L., Schoenfeld, D. A., Hosler, B. A., Horvitz, H. R., and Brown, R. H. (1997) *Ann Neurol* 41, 210-221
3. Valentine, J. S., and Hart, P. J. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3617-3622
4. Sturtz, L. A., Diekert, K., Jensen, L. T., Lill, R., and Culotta, V. C. (2001) *J Biol Chem* 276, 38084-38089
5. Okado-Matsumoto, A., and Fridovich, I. (2001) *J Biol Chem* 276, 38388-38393
6. Reaume, A. G., Elliott, J. L., Hoffman, E. K., Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Siwek, D. F., Wilcox, H. M., Flood, D. G., Beal, M. F., Brown, R. H., Jr., Scott, R. W., and Snider, W. D. (1996) *Nat Genet* 13, 43-47
7. Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H. X., and et al. (1994) *Science* 264, 1772-1775
8. Ripps, M. E., Huntley, G. W., Hof, P. R., Morrison, J. H., and Gordon, J. W. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 689-693
9. Wong, P. C., Pardo, C. A., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Sisodia, S. S., Cleveland, D. W., and Price, D. L. (1995) *Neuron* 14, 1105-1116
10. Bruijn, L. I., Becher, M. W., Lee, M. K., Anderson, K. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Sisodia, S. S., Rothstein, J. D., Borchelt, D. R., Price, D. L., and Cleveland, D. W. (1997) *Neuron* 18, 327-338
11. Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Siddique, T., Deng, H. X., Hung, W. Y., Kato, T., and Asayama, K. (1996) *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 481-490
12. Watanabe, M., Dykes-Hoberg, M., Culotta, V. C., Price, D. L., Wong, P. C., and Rothstein, J. D. (2001) *Neurobiol Dis* 8, 933-941
13. Jonsson, P. A., Ernhill, K., Andersen, P. M., Bergemalm, D., Brannstrom, T., Gredal, O., Nilsson, P., and Marklund, S. L. (2004) *Brain* 127, 73-88
14. Durham, H. D., Roy, J., Dong, L., and Figlewicz, D. A. (1997) *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 523-530
15. Koide, T., Igarashi, S., Kikugawa, K., Nakano, R., Inuzuka, T., Yamada, M., Takahashi, H., and Tsuji, S. (1998) *Neurosci Lett* 257, 29-32
16. Nagai, M., Aoki, M., Miyoshi, I., Kato, M., Pasinelli, P., Kasai, N., Brown, R. H., Jr., and Itoyama, Y. (2001) *J Neurosci* 21, 9246-9254
17. Johnston, J. A., Dalton, M. J., Gurney, M. E., and Kopito, R. R. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12571-12576

18. Urushitani, M., Kurisu, J., Tsukita, K., and Takahashi, R. (2002) *J Neurochem* 83, 1030-1042
19. Puttapparthi, K., Wojcik, C., Rajendran, B., DeMartino, G N., and Elliott, J. L. (2003) *J Neurochem* 87, 851-860
20. Tobisawa, S., Hozumi, Y., Arawaka, S., Koyama, S., Wada, M., Nagai, M., Aoki, M., Itoyama, Y., Goto, K., and Kato, T. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 303, 496-503
21. Hyun, D. H., Lee, M., Halliwell, B., and Jenner, P. (2003) *J Neurochem* 86, 363-373
22. Kabashi, E., Agar, J. N., Taylor, D. M., Minotti, S., and Durham, H. D. (2004) *J Neurochem* 89, 1325-1335
23. Bruening, W., Roy, J., Giasson, B., Figlewicz, D. A., Mushynski, W. E., and Durham, H. D. (1999) *J Neurochem* 72, 693-699
24. Shinder, G A., Lacourse, M. C., Minotti, S., and Durham, H. D. (2001) *J Biol Chem* 276, 12791-12796
25. Ross, C. A., and Poirier, M. A. (2004) *Nat Med* 10 Suppl, S10-17
26. Michels, A. A., Kanon, B., Konings, A. W., Ohtsuka, K., Bensaude, O., and Kampinga, H. H. (1997) *J Biol Chem* 272, 33283-33289
27. Kobayashi, Y., Kume, A., Li, M., Doyu, M., Hata, M., Ohtsuka, K., and Sobue, G (2000) *J Biol Chem* 275, 8772-8778
28. Arawaka, S., Hasegawa, H., Tandon, A., Janus, C., Chen, F., Yu, G, Kikuchi, K., Koyama, S., Kato, T., Fraser, P. E., and St George-Hyslop, P. (2002) *J Neurochem* 83, 1065-1071
29. Epstein, C. J., Avraham, K. B., Lovett, M., Smith, S., Elroy-Stein, O., Rotman, G, Bry, C., and Groner, Y. (1987) *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8044-8048
30. Li, M., Ona, V. O., Guegan, C., Chen, M., Jackson-Lewis, V., Andrews, L. J., Olszewski, A. J., Stieg, P. E., Lee, J. P., Przedborski, S., and Friedlander, R. M. (2000) *Science* 288, 335-339
31. Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M. S., Shen, J., Takio, K., and Iwatsubo, T. (2002) *Nat Cell Biol* 4, 160-164
32. Kahle, P. J., Neumann, M., Ozmen, L., Muller, V., Odoy, S., Okamoto, N., Jacobsen, H., Iwatsubo, T., Trojanowski, J. Q., Takahashi, H., Wakabayashi, K., Bogdanovic, N., Riederer, P., Kretzschmar, H. A., and Haass, C. (2001) *Am J Pathol* 159, 2215-2225
33. Bowling, A. C., Barkowski, E. E., McKenna-Yasek, D., Sapp, P., Horvitz, H. R., Beal, M. F., and Brown, R. H., Jr. (1995) *J Neurochem* 64, 2366-2369
34. Sakahira, H., Breuer, P., Hayer-Hartl, M. K., and Hartl, F. U. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 Suppl 4, 16412-16418
35. Rakhit, R., Crow, J. P., Lepock, J. R., Kondejewski, L. H., Cashman, N. R., and Chakrabartty, A. (2004) *J Biol Chem* 279, 15499-15504
36. Takeuchi, H., Kobayashi, Y., Yoshihara, T., Niwa, J., Doyu, M., Ohtsuka, K., and Sobue, G (2002) *Brain Res* 949, 11-22

37. Sherman, M. Y., and Goldberg, A. L. (2001) *Neuron* 29, 15-32
38. Klucken, J., Shin, Y., Masliah, E., Hyman, B. T., and McLean, P. J. (2004) *J Biol Chem* 279, 25497-25502
39. Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Sang, C., Pagoulatos, G., Angelidis, C., Kusakabe, M., Yoshiki, A., Kobayashi, Y., Doyu, M., and Sobue, G. (2003) *J Neurosci* 23, 2203-2211
40. Urushitani, M., Kurisu, J., Tateno, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kato, S., and Takahashi, R. (2004) *J Neurochem* 90, 231-244
41. Kieran, D., Kalmar, B., Dick, J. R., Riddoch-Contreras, J., Burnstock, G., and Greensmith, L. (2004) *Nat Med* 10, 402-405

図の説明

Fig. 1. fALS関連H46R SOD1 トランスジェニックマウスの生存と運動機能低下。(A) H46R SOD1 トランスジェニックマウス (H46R) と非トランスジェニックマウス (Non) の生存率を示す Kaplan-Meier 曲線。(B) Rotarod を用いた運動機能の評価。回転速度を 5 と 15 rpm で運動負荷をかけ、マウスが回転棒から落下する時点、または 600 秒までテストを施行した。運動機能評価より、H46R SOD1 トランスジェニックマウスの病期を、週齢 13 週の未発症早期 (early presymptomatic stage: EP)、17 週の未発症後期 (late presymptomatic stage: LP)、21 週の発症期 (symptomatic stage: SS)、23 週以降の末期 (end stage: ES) に設定した。

Fig. 2. 加齢に伴う H46R SOD1 トランスジェニックマウス (第 4 - 5 腰髄) の免疫組織化学的解析。(A) ES の H46R SOD1 トランスジェニックマウスの ES において、抗 SOD1 モノクローナル抗体は、前角細胞の細胞質中に円形の封入体 (矢印)、ニューロピル中に棒状 (黒矢印頭) と小さな円形封入体 (白矢印頭) を免疫染色する。(B) 連続切片上、SOD1 陽性封入体は、ユビキチン抗体陽性である。また連続切片上 (星印は、連続切片上の同一の神経細胞群を示す)、SOD1 陽性封入体 (C) は、Hsp40 (D)、Hsp70 (E) に対する抗体で免疫染色 (矢印頭) される。スケールバー = 50 μ m。(F) 24 週齢の非トランスジェニックマウス (Non) と各病期の H46R SOD1 トランスジェニックマウス (H46R) 脊髄 (第 4 - 5 腰髄) を用いた免疫組織化学的解析。これらの切片は、それぞれ抗 SOD1 抗体 (最上段のパネル)、抗ユビキチン抗体 (2 段目のパネル)、抗 Hsp70 抗体 (3 段目のパネル)、抗 Hsp40 抗体 (最下段のパネル) で染色されたものを示す。スケールバー = 50 μ m。

Fig. 3. H46R SOD1 トランスジェニックマウス脊髄における変異特異的な SOD1 可溶性の変化。(A) 連続分画各ステップの概略図。(B) 24 週齢の非トランスジェニックマウス (左上段のパネル)、と 38 週齢の野生型 SOD1 トランスジェニックマウス (左下段のパネル)、ES の H46R SOD1 トランスジェニックマウス (右上段のパネル) のウエスタンプロットを示す。PBS 可溶性画

分 (PBS-sol)、Tx可溶性画分 (Tx-sol)、SDS可溶性画分 (SDS-sol)、尿素可溶性画分 (urea-sol) からそれぞれ 10 μ g のタンパク質、同量の蟻酸可溶性画分 (FA-sol) のタンパク質を 15%ゲルに添加して電気泳動した。泳動後のゲルをPVDF膜に転写し、ヒトSOD1 (h-SOD1) とマウスSOD1 (m-SOD1) の両者を認識するSOD1-100 抗体で免疫染色した。右下方のパネルは、右上方のパネルの露光時間を長くして現像したものである。SOD1 単量体、2量体、高分子分子種は、それぞれ (SOD1)₁、(SOD1)₂、(SOD1)_n として表記されている。

Fig. 4. H46R SOD1 トランスジェニックマウス脊髄における加齢依存的なSOD1 可溶性変化。24週齢の非トランスジェニックマウス (Non)、と38週齢の野生型SOD1 トランスジェニックマウス (Wt)、各病期のH46R SOD1 トランスジェニックマウス (H46R) のウエスタンブロットを示す。PBS可溶性画分 (A)、Tx可溶性画分 (B)、SDS可溶性画分 (C) からそれぞれ10 μ g のタンパク質、同量の蟻酸可溶性画分 (D) のタンパク質を 15%ゲルに添加して電気泳動した。泳動後のゲルをPVDF膜に転写し、SOD1-100 抗体で免疫染色した。(E) グラフは、各病期のSOD1 バンドの相対的染色強度を示す (n=3, バーは平均 \pm 標準偏差を示す)。バンド強度は、デンスitrometryで定量され、ESの値に対して相対化されている。

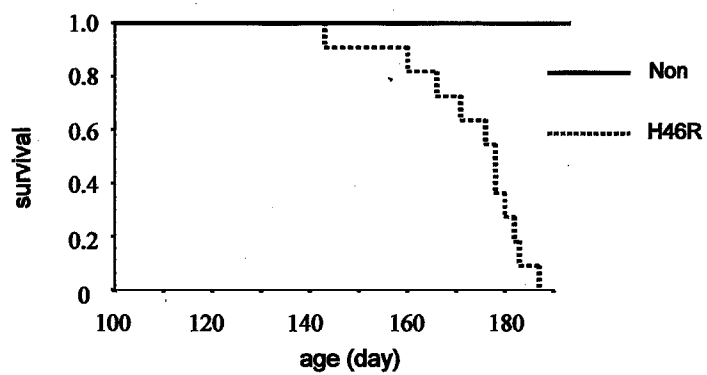
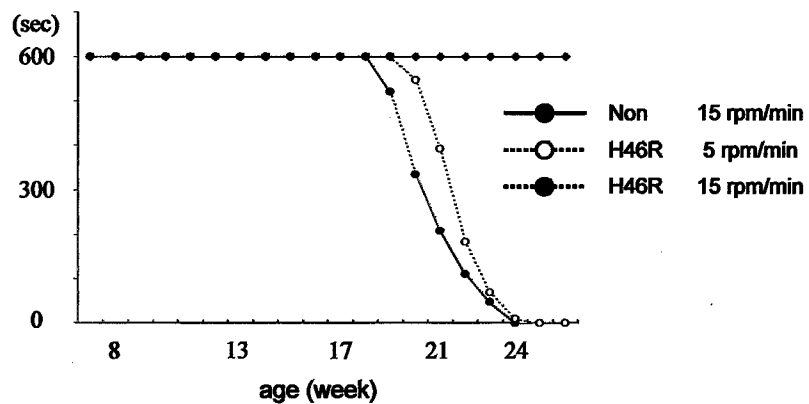
Fig. 5. H46R SOD1 トランスジェニックマウス脊髄におけるHsp70 とHsp40 の発現。Fig. 4 と同じように分画した脊髄を電気泳動し、抗Hsp70 抗体 (上方のパネル) と抗Hsp40 抗体 (下段のパネル) を用いてウエスタンブロットした。PBS可溶性画分 (A)、Tx可溶性画分 (B)、SDS可溶性画分 (C) からそれぞれ10 μ g のタンパク質を 15%ゲルに添加して電気泳動した。対照として、非トランスジェニックマウス (Non)、と38週齢の野生型SOD1 トランスジェニックマウス (Wt) を電気泳動した。

Fig. 6. プロテアソーム阻害剤処理によるCOS-7 細胞とSH-SY5Y細胞におけるH46R SOD1 可溶性変化。COS-7 細胞 (A) とSH-SY5Y細胞 (B) は、野生型SOD1 pcDNA3.1 またはH46R SOD1 pcDNA3.1 cDNAをトランスフェクションした。トランスフェクション後、24時間の時点で、培養液にプロテアソーム阻害剤であるMG132 (AとBの左パネル)、またはラクタシスチン (Aの右パネル) を図に示した濃度で添加した。細胞はさらに24時間インキュベートした。回収した細胞を連続的に分画し、PBS可溶性画分 (PBS-sol)、Tx可溶性画分 (Tx-sol)、SDS可溶性画分 (SDS-sol)、SDS不溶性画分 (SDS-insol) を得た。PBS可溶性画分、Tx可溶性画分、SDS可溶性画分、の10 μ g のタンパク質、同量のSDS不溶性画分のタンパク質を 15%ゲルに添加して電気泳動した。泳動後のゲルをPVDF膜に転写し、SOD1-100 抗体で免疫染色した (AとBの左パネル)。また、抗Hsp70 抗体と抗Hsp40 抗体 (Bの右パネル) でも免疫染色した。

Fig. 7. 培養細胞における可溶性変化した変異型SOD1 の発現に及ぼすHsp70 とHsp40 過剰発現の効果。(A) H46R SOD1 pEF-BOSとpCMV-Hsp70 またはpRC-Hsp40 cDNA (SOD1 に対

fALS における SOD1 可溶性変化

するHspモル比は、1:4)をCOS-7細胞にトランスフェクションした。SDS可溶性画分(SDS-sol)とSDS不溶性画分(SDS-insol)を15%ゲルに添加して電気泳動し、SOD1-100抗体でウエスタンブロットした。(B)H46R SOD1 pEF-BOSとともに図に示すようにHsp70 cDNAの量を変化させてCOS-7細胞にトランスフェクションした。PBS可溶性画分(PBS-sol)(左上段のパネル)、Tx可溶性画分(Tx-sol)(左下段のパネル)、SDS可溶性画分(SDS-sol)(右上段のパネル)、SDS不溶性画分(SDS-insol)(右下段のパネル)をSOD1-100抗体で免疫染色した。(C)グラフは、各病期のSOD1単量体と2量体のバンドの相対的染色強度を示す(n=3,バーは平均±標準偏差を示す)。バンド強度は、デンストメトリーで定量され、空のベクターをトランスフェクションした細胞から得られたバンドに対して相対化されている(n=3,バーは平均±標準偏差を示す)。

A**B****Fig. 1**

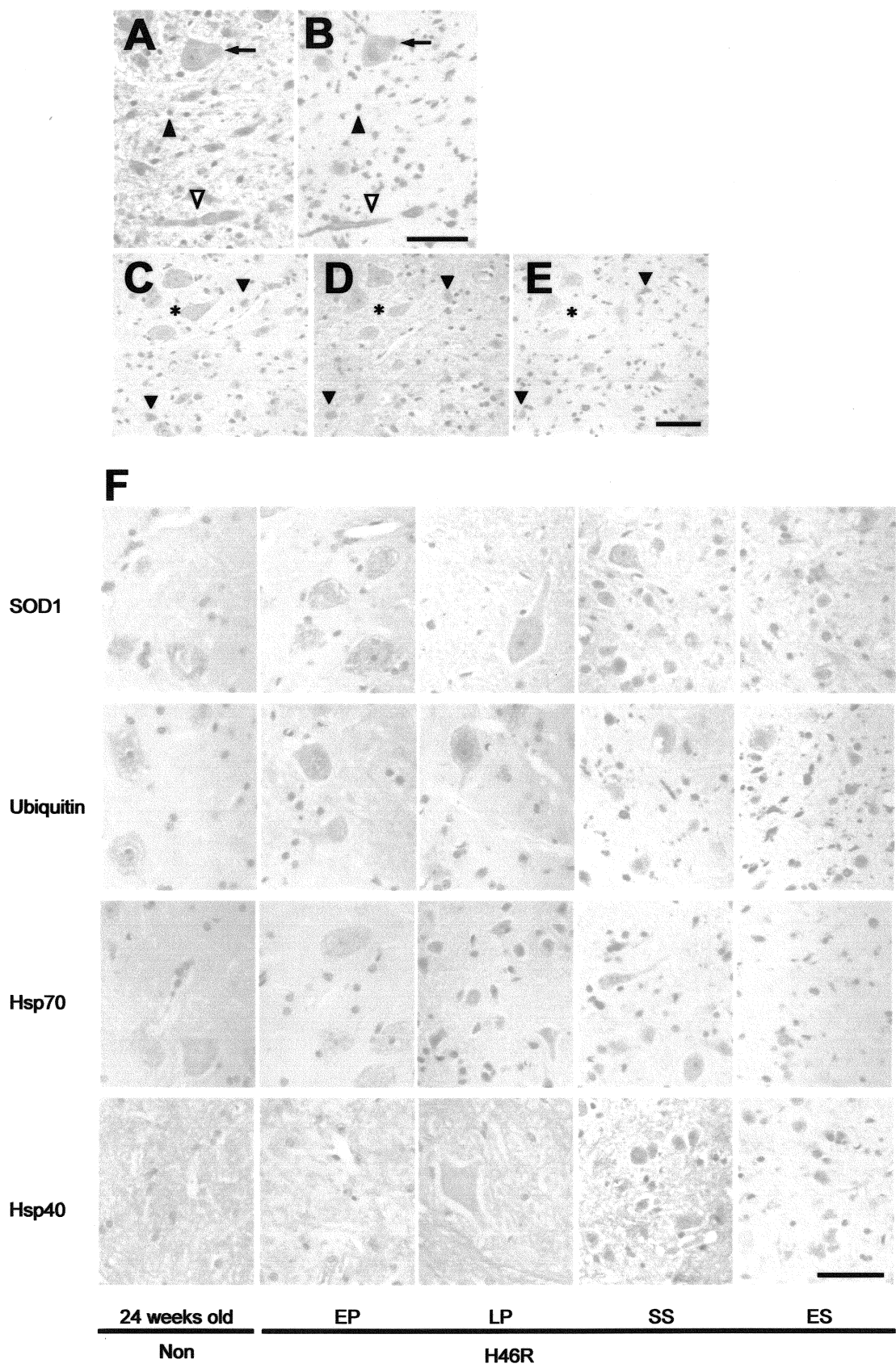


Fig. 2

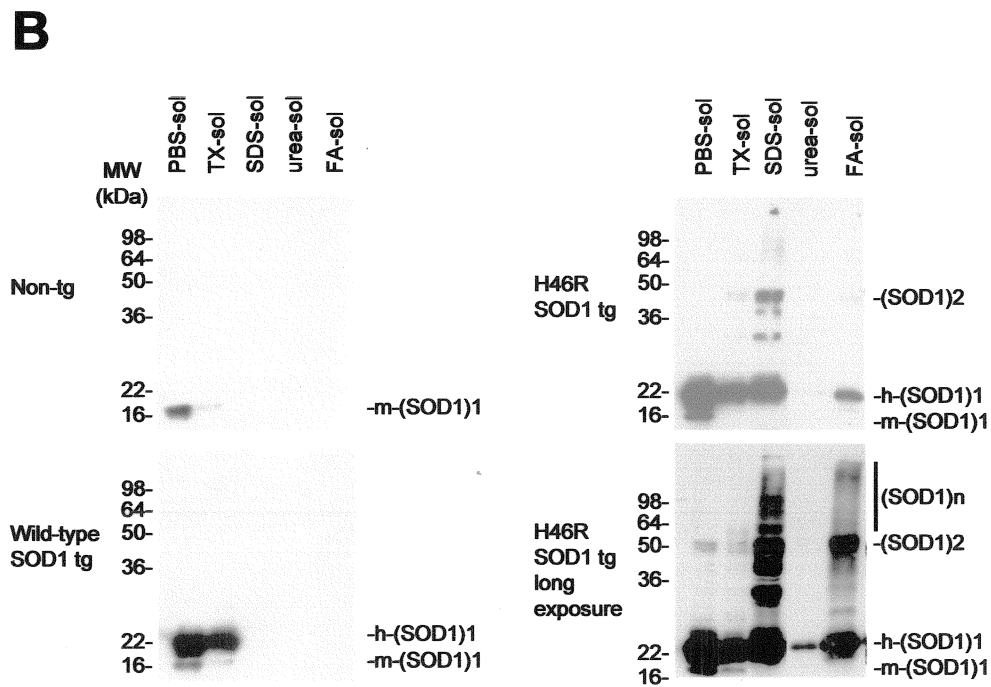
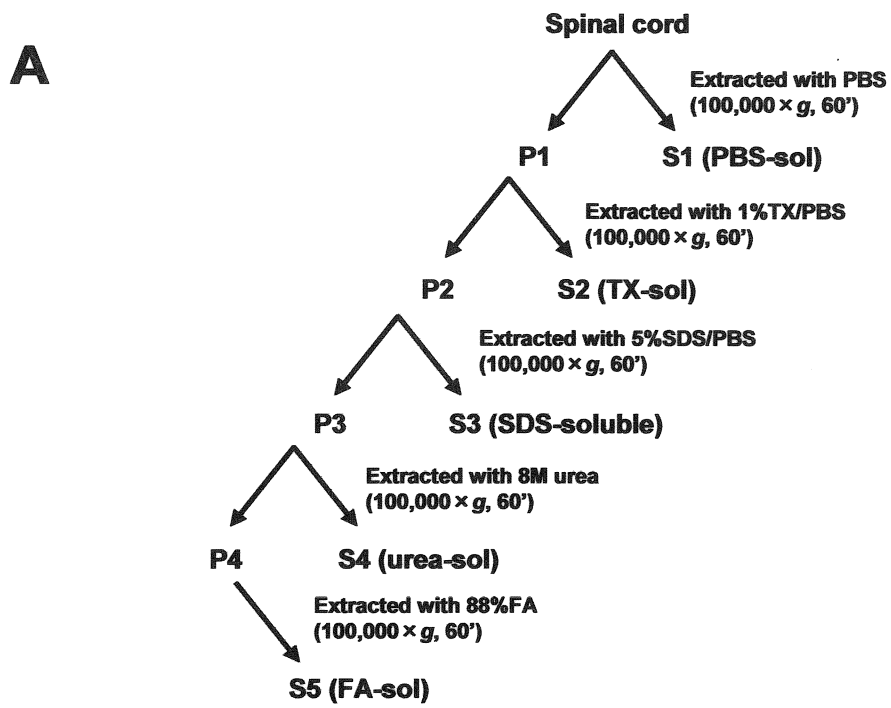
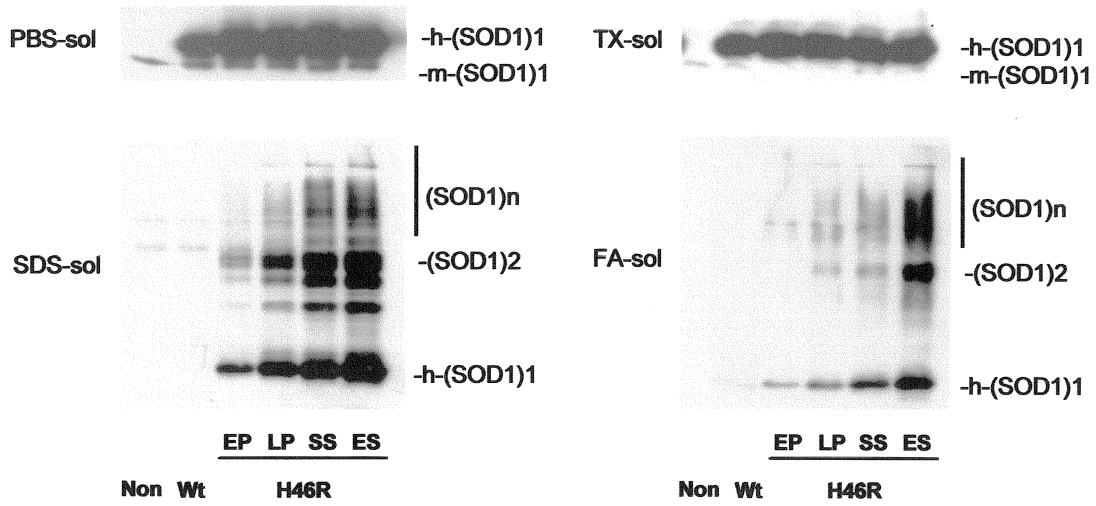
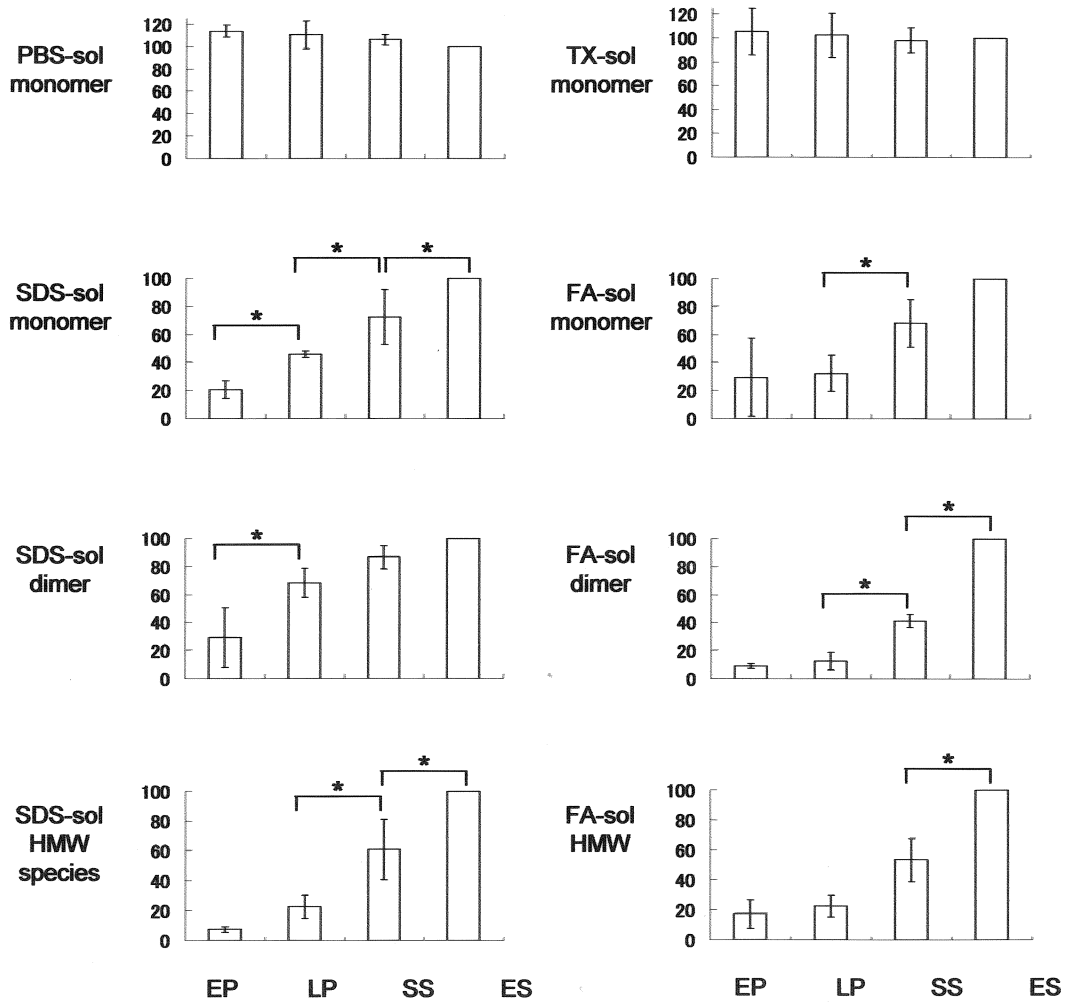
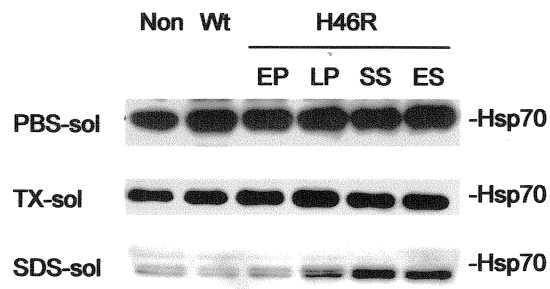


Fig. 3

A**B****Fig. 4**

A



B

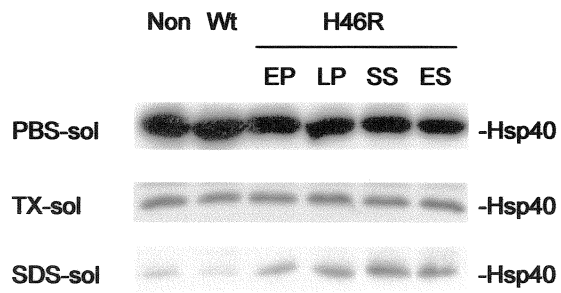
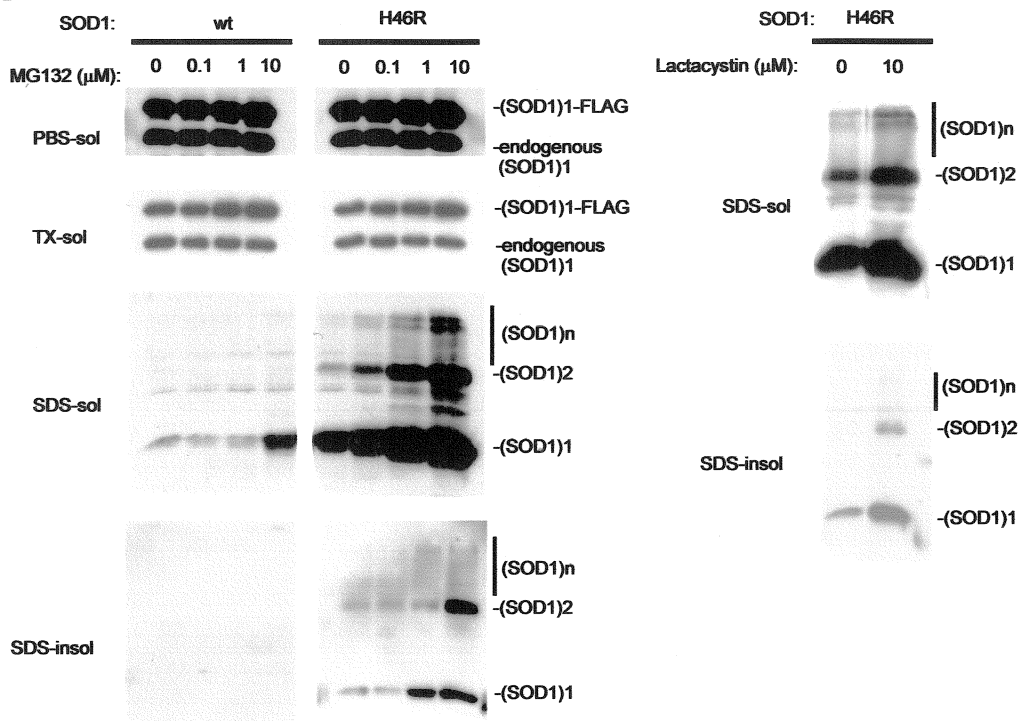
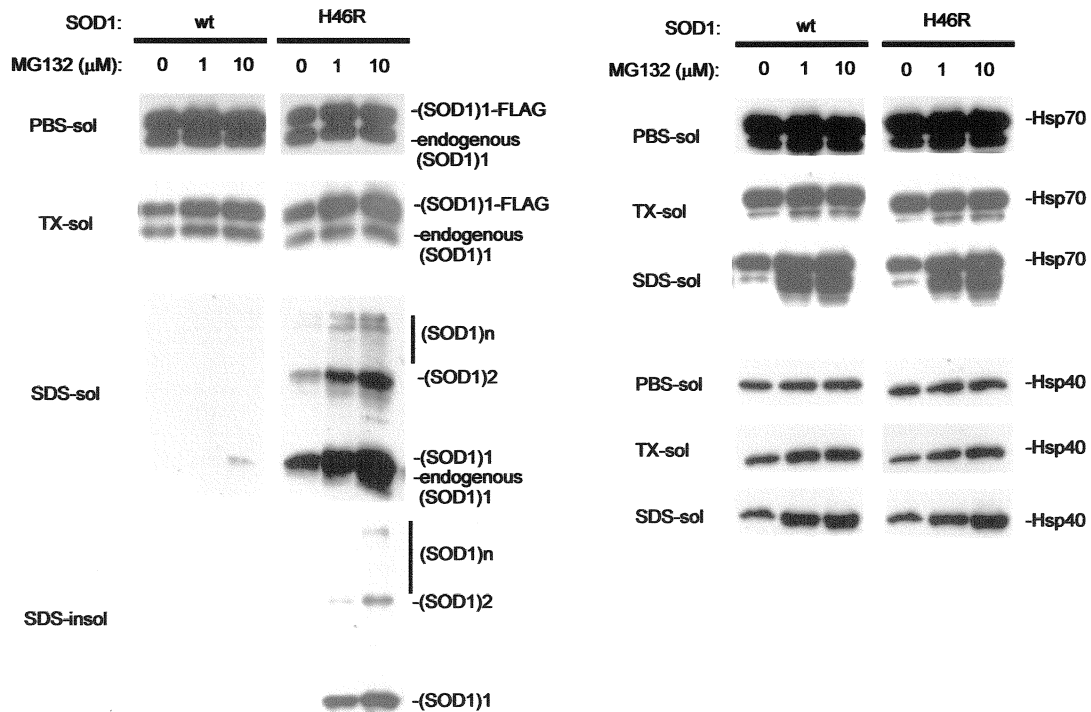


Fig. 5

A**B****Fig. 6**

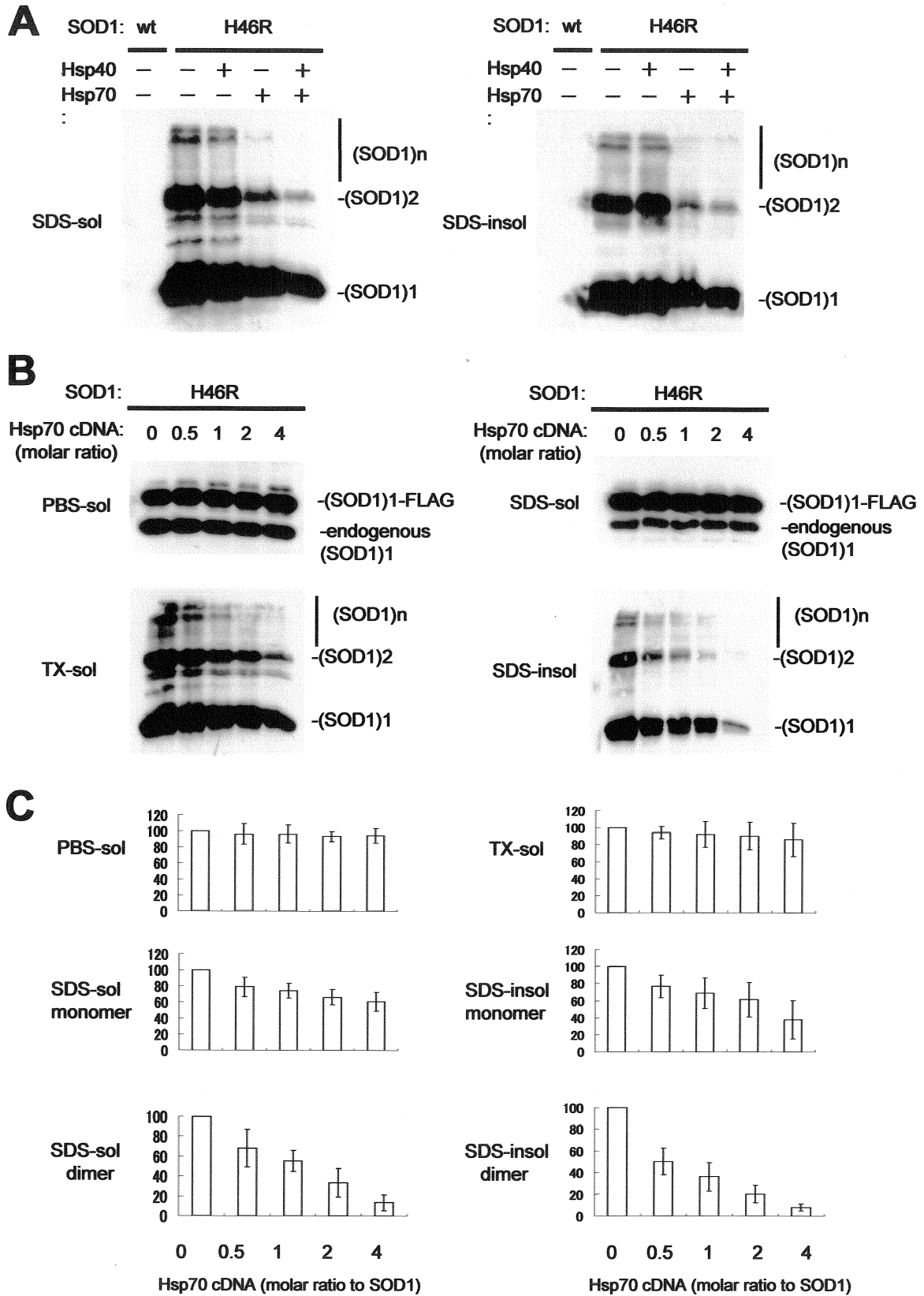


Fig. 7