# 新規の線虫モデルを利用した ALS 病態伝播メカニズムの検証

Investigation on the roles of protein aggregation in ALS

徳田 栄一

慶應義塾大学理工学部 化学科 生命機構化学研究室

## 要旨

Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 変異を伴う筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では、首座である運動ニューロン内に SOD1 タンパク質が不溶性凝集体として異常蓄 積している。しかしながら、不溶性 SOD1 凝集体が ALS の病態にどのように寄与し ているのか不明な点が多い。本課題では、マウス、及び、線虫をモデルとして用いる ことで、生体内での不溶性 SOD1 凝集体の形成メカニズムを明らかにし、SOD1 凝集 体が ALS 病態に果たす役割を理解することを目的とした。まず、タンパク質凝集体 の一般的な分解経路であるオートファジーについて、運動ニューロンが発現する脊髄 前角では、その機能が他の中枢神経系組織と比べて著しく低いことが分かった。実際、 ALS 患者の脊髄前角のオートファジーは、オートファジー誘導を担うタンパク質の 増加が認められたが、同時に機能不全の指標も増加しており、オートファジー流動の 伝達障害が示唆された。次に、ALS マウスの SOD1 凝集体の量を増加させるために、 オートファジー誘導の必須因子である Beclin 1 を欠損したヒト変異型 SOD1 マウス (SOD1<sup>G127X</sup>)を作製した。オートファジー機能の低下により、SOD1<sup>G127X</sup>マウスの SOD1 凝集体が著しく増加し、ALS 様の表現型は劇的に悪化した。さらに、SOD1 凝 集体の形成が細胞間・細胞内を伝播する可能性について、変異 SOD1 を発現するモデ ル線虫を作製し、SOD1 凝集体を有する大腸菌を摂取させることで検討を行った。本 課題を通じて、SOD1 凝集体の形成が ALS 病態を憎悪させる因子であることが示唆 されたものの、SOD1 凝集体の伝播が病態悪化の因子であるのかについてはさらなる 検討を現在進めている。

## 緒言

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、上位および下位運動ニューロンが選択的に 変性・脱落する神経変性疾患である (Ravits and La Spada, 2009)。症状は四肢の筋力低 下・筋萎縮に始まり、嚥下および構音障害も生じる。末期には呼吸筋麻痺・球麻痺が 出現する。発病後の全経過は平均3年と極めて予後不良である。本症の90%は遺伝的 素因のない孤発性であるが、残り10%は遺伝的素因を認める家族性である。現在まで に21種類の家族性 ALS 関連責任遺伝子が同定されている(ALS genetic database ALSoD; http://alsod.iop.kcl.ac.uk/)。家族性 ALS で最も多い遺伝子変異は、*C9orf72*遺 伝子の非翻訳領域内における GGGGCC リピート増幅で全家族性 ALS の約 30%を占 め (Rohrer et al., 2015)、次いで SOD1 (Cu,Zn-superoxide dismutase)遺伝子の変異が占 める (Rosen et al., 1993)。SOD1 変異を伴う家族性 ALS は、他の遺伝子変異を有する 家族性 ALS と異なり、臨床症状が孤発性 ALS に非常に酷似している (Andersen and Al-Chalabi, 2011)。このため、SOD1 変異に起因する ALS の発症機序を明らかにする ことで、原因不明の孤発性 ALS 解明の突破口になると考えられている。

SOD1 は銅および亜鉛イオン結合のホモ二量体タンパク質であり(Fig. 1)、 スーパーオキシドアニオンを過酸化水素へ不均化する生理作用を有する(McCord and Fridovich, 1969)。SOD1 変異が報告された当初、変異 SOD1 による運動ニューロン死 は、変異に伴う機能低下(loss-of-function)であると考えられていた。しかしながら、 現在では、変異 SOD1 が新たに獲得した未知の細胞毒性(gain-of-function)によると 考えられている。その理由として、ALS 変異に応じて SOD1 活性が 0 - 100%と変化し (Saccon et al., 2013)、SOD1 活性と患者の生存期間に相関性がないことが挙げられる (Cudkowicz et al., 1997)。また、SOD1 遺伝子をノックアウトしたマウスは ALS 様の運 動ニューロン症状が生じないものの(Reaume et al., 1996)、変異型ヒト SOD1 を発現 させたトランスジェニックマウスは ALS 様の臨床症状および病理像を呈することも SOD1 の"gain-of-function"を裏付ける実験的な証拠として考えられている (Gurney et al., 1994; Jonsson et al., 2004)。

運動ニューロンの変性・脱落の他に、SOD1 変異を伴う家族性 ALS の神経病 理学的な特徴として、運動ニューロン内への不溶性 SOD1 凝集体の蓄積が知られてい る (Bruijn et al., 1998)。野生型 SOD1 は構造的に非常に安定なタンパク質であるが (Fig. 1)、ALS に関連した変異型 SOD1 では、タンパク質構造の安定性が低下し、異常な 構造 (ミスフォールド) を呈する (Lang et al., 2012)。実際、精製タンパク質を用い ることで、可溶性のミスフォールド型 SOD1 が不溶性の SOD1 凝集体の前駆体となり うることが報告されている (Furukawa et al., 2008)。さらに、ミスフォールド型 SOD1 を特異的に認識する抗体で *SOD1* 変異を伴う ALS 患者の脊髄切片を染色すると、ミ スフォールド型 SOD1 と不溶性の SOD1 凝集体は共局在することも報告されている (Rakhit et al., 2007)。

SOD1 のミスフォールディングについて多くの研究がなされているものの、 運動ニューロン内に蓄積する不溶性 SOD1 凝集体が ALS の病態に果たす役割は未だ 解明されていない。不溶性凝集体の形成が変異に伴って獲得する毒性であり、運動ニ ューロンを死に至らしめていると提案する研究者がいる。しかし一方で、不溶性凝集 体の形成は、毒性を発揮する SOD1 を無毒化していると考えるものもいる (Liu et al., 2012; Brotherton et al., 2013)。私は、不溶性 SOD1 凝集体が ALS の病態に果たす役割 を明らかにするために、生体内のタンパク質分解経路のひとつであるオートファジ ー・リソソーム系(以下、オートファジーと呼ぶ)に注目している(Fig. 2)(Choi et al., 2013)。オートファジーでは、標的タンパク質がオートファゴソームと呼ばれる直 径約 1,000 nm の巨大な膜小胞に包まれた後、酸性プロテアーゼを含有するリソソー ムと融合することで、標的タンパク質が分解される。このため、オートファジーによ るタンパク質分解はバルク分解とも呼ばれており、直径 200 nm 程度のタンパク質凝 集体のような巨大な集合体でも分解可能で、タンパク質の種類・状態によらず非特異 的に行われると考えられている (Mizushima and Komatsu, 2011)。さらに、オートファ ジーは半減期の長いタンパク質の分解も担っていると考えられている (Mizushima and Komatsu, 2011)。オートファジーの他にも、ユビキチン・プロテアソーム経路が 生体内の主要なタンパク質分解経路として知られているが、タンパク質凝集体の分解 には適していないと考えられている (Korolchuk et al., 2009)。標的タンパク質をプロ テアソーム内へ運び込み、内部に存在するプロテアーゼにより分解する必要があるが、 プロテアソーム内腔の直径はわずか2nmであるため、サイズの大きなタンパク質凝 集体の分解には不適であると考えられる。

そこで本課題では、不溶性 SOD1 凝集体が ALS の病態に果たす役割をオート ファジー機能の観点から明らかにすることを目的とした。具体的には、ヒト中枢神経 系組織におけるオートファジー機能を測定し、オートファジー機能を低下させた ALS モデルマウスを作製することで、SOD 凝集体の蓄積量や ALS 様症状に及ぼす影響を 検討した。さらに、ALS モデル線虫に SOD1 凝集体を暴露させ、SOD1 凝集体が ALS 病態の拡大に果たす役割を検討した。

4

## 方法

#### ヒト臨床検体

ヒト臨床検体については、私が前任のスウェーデン王立ウメオ大学に設置され ている倫理委員会の承認を得た後に使用した。患者本人、あるいは、親族からインフ オームド・コンセントを受け取った後に、前頭葉(前帯状回)、側頭葉(上側頭回)、 小脳虫部、運動野を含む中心前回(上位運動ニューロンが発現)、および、脊髄の計 6か所の中枢神経系灰白質の剖検を行った。脊髄に関しては、頸髄、及び、腰髄を採 取し、前角のラミナ IX(下位運動ニューロンが発現)、及び、後角を使用した。

本研究にて使用した 28 名の臨床検体の内訳は以下のとおりである:(i) 神経疾 患歴のないコントロール (5 症例、平均死亡年齢 60±14 歳、年齢幅 43-80)、(ii) 孤発 性 ALS 患者 (4 症例、70±10 歳、年齢幅 62-83)、(iii) SOD1 変異を伴わない家族性 ALS 患者 (5 症例、58±8 歳、年齢幅 49-68、5 症例のうち 4 症例は C9orf72 遺伝子 内に GGGGCC リピート増幅を有する)、(iv) SOD1 変異を伴う家族性 ALS (9 症例、 60±11歳、年齢幅 43-75:A4V 1 症例、G72C 1 症例、D90A 5 症例、G127<sup>insTGGG</sup>(G127X) 2 症例)。なお、SOD1 変異を伴わない家族性 ALS、及び、孤発性 ALS 患者は、SOD1 および C9orf72 以外の ALS 責任遺伝子 (ANG、FUS、OPTN、SQSTM1/p62、TARDBP、 TBK1、UBQLN2、あるいは、VAPB)を保有していないことを確認した。すべての ALS 患者は改訂版 El Escorial 診断基準を満たしており (Brooks et al., 2000)、臨床的に definite または probable ALS であった。

#### オートファジー機能低下 ALS モデルマウスの作製

マウスを使用した全ての研究は、スウェーデン王立ウメオ大学の実験動物使用 ガイドラインに従い、実験動物倫理委員会の承諾を得て行われた。ALS モデルマウ スとして、ヒト変異型 SOD1 トランスジェニックマウス(SOD1G127X, line 716)を 使用し (Jonsson et al., 2004)、C57BL/6J マウスと 30 世代以上にわたり戻し交配を行う ことで、遺伝的背景を純粋な C57BL/6J にした。また、*Becn1* ヘテロ欠損マウスは Beth Levine 教授(Center for Autophagy Research, University of Texas Southwestern Medical Center, USA)より供与を受け (Qu et al., 2003)、CBA バックグラウンドとして維持し た。雄性の SOD1<sup>G127X</sup> マウスを雌性の *Becn1* ヘテロ欠損マウスと交配させることで、 オートファジー機能を低下させた ALS マウスを作製し、遺伝子型を PCR 法により確 認した。

#### マウス ALS 様症状の解析

マウスの ALS 様症状は、体重の変動をもとに評価した (Boillee et al., 2006)。 具体的には、マウスの体重がピーク値を示した時点を症状の発症とし、エンドポイン ト(生存期間)は、マウスを強制的に横転させ、5 秒以内に起き上がれない時点と定 義した。罹病期間は、発症した日齢と生存期間の差として算出した。

#### マウス脊髄組織からタンパク質の抽出

*Becn1* ヘテロ欠損 SOD1<sup>G127X</sup> マウスとその同腹仔から脊髄組織を摘出した。 *Becn1* ヘテロ欠損 SOD1<sup>G127X</sup> マウスは、麻痺発症前(150日齢)、発症後(ピーク体重 から 10%減少した時点)、及び、病末期を使用した。脊髄重量を測量後、その 25 倍量 に相当する 1% (v/v) Nonidet P-40 と EDTA-free Complete<sup>®</sup> protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science)を含む phosphate buffered saline (PBS、pH 7.0)で脊髄をホ モジェナイズした。超音波処理後、ホモジェネートの一部を遠心分離で処理し (20,000 × g、30 min、4 °C)、可溶性および不溶性画分を得た。

#### <u>ウェスタンブロッティング</u>

ヒト中枢神経系ホモジェネート (20 µg/lane)、あるいは、マウス脊髄可溶性 タンパク質 (20 µg/lane)を Criterion<sup>®</sup> TGX ゲル (Bio-Rad) で還元的に電気泳動し (200 V、45 min)、polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (GE Healthcare) に転写し た(100 V、1 h)。メンブレンを 0.5% (w/v) ELC Advance Blocking Reagent (GE Healthcare) でブロッキング後、抗 SOD1<sup>G127X</sup> 抗体 (0.01 µg/mL) (Jonsson et al., 2004)、 抗 SOD1 抗体 (0.001 µg/mL、human SOD1 選択的、抗原: 24-39 番アミノ酸) (Forsberg et al., 2010)、 あるいは、抗マウス SOD1 抗体 (0.1 µg/mL、マウス SOD1 選択的、抗原: 24-36 アミ ノ酸) (Jonsson et al., 2006)を、一次抗体として SOD1 の検出に使用した。二次抗体と して、horseradish peroxidase (HRP) 結合抗ウサギ IgG 抗体、あるいは、抗マウス IgG 抗体(1:25,000; Dako)を使用した。シグナルの可視化は ECL Select 試薬(GE Healthcare) により行い、シグナルの検出は Chemidoc (Bio-Rad)で行った。シグナル強度の定量は Quantity One software (Bio-Rad) によった。ヒト中枢神経系組織のオートファジー因 子の解析では、異なるゲル間のシグナルでの比較を可能にするため、神経疾患罹患歴 のないコントロール患者の側頭葉ホモジェネートを標準物質として使用した。

#### フィルタートラップ法による SOD1 凝集体の検出

マウス脊髄ホモジェネート(遠心分離を施していない可溶性、及び、不溶性画

分)を、1% (v/v) NP-40, 1.8 mM EDTA, 1 mM DTT を含む PBS (pH 7.0)で 20 倍希釈し た。超音波処理を施した後、ホモジェネートを遠心分離し (200 × g、10 min、4°C)、 上清を回収した。酢酸セルロース・メンブレン (ポアサイズ: 0.22 µm、GE Healthcare) を 96 ウェルドットブロット装置 (Whatman GmbH) に設置し、回収した上清を減圧 下で添加した。ウェル内を 1.8 mM EDTA と 1 mM DTT を含む PBS (pH 7.0) で洗浄 した後、酢酸セルロース・メンブレンを 5% (w/v)のスキムミルクでブロッキング処理 した (1.5 h、室温)。抗 SOD1<sup>G127X</sup> 抗体 (0.03 µg/mL) を 1 次抗体として反応させた 後 (4°C、overnight)、HRP 結合抗ウサギ IgG 抗体 (1:10,000、Dako) を 2 次抗体とし て反応させた (1 h、室温)。シグナルの可視化は ECL Select 試薬 (GE Healthcare) に より行い、シグナルの検出は Chemidoc (Bio-Rad) で行った。シグナル強度の定量は Quantity One software (Bio-Rad) によった。異なる酢酸セルロース・メンブレン間で のシグナル強度を比較するために、SOD1 凝集体の標準物質として末期の SOD1<sup>G93A</sup> マウスの脊髄ホモジネートを同様に処理し、抗 SOD1 抗体 (0.03 µg/mL、抗原: 57-72 アミノ酸) (Forsberg et al., 2010)と反応させた。

#### 免疫組織化学

マウスの血液を生理食塩水で除いた後、4% (w/v)パラホルムアルデヒド溶液 (pH 7.4) で灌流固定を行い、腰髄を摘出してパラフィン中に包埋した。ミクロトー ムで薄切した腰髄切片(厚さ6µm)の抗原をクエン酸バッファー(pH 6.0) で処理す ることにより賦活化した。マウス腰髄中の内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害するた めに、腰髄切片を0.3% (v/v)過酸化水素/メタノール溶液で処理した後(15 min、室温)、 抗体の非特異的な反応を最小限にするために、10% (v/v)ヤギ正常血清でブロッキング した。また、内因性マウス IgG のブロッキングには、Mouse Ig Blocking Reagent (Vector Laboratories)を用いた(1h、室温)。抗原抗体反応を増強させるために、VECTASTAIN® ABC Kit (Vector Laboratories)を使用し、シグナルの可視化は 3,3'-diaminobenzidine (Dako)で行った。腰髄切片を封入後、Pannoramic 250 Flash II scanner (3D Histech Ltd.) で画像を撮影した。

#### α-運動ニューロン数の定量

同一のニューロンをカウントすることを避けるために、α-運動ニューロンの立体解析学的特徴を考慮して、腰髄パラフィンブロック(L1-L3)から厚さ6 μm 幅の切片を 10 切片ごとに 1 切片だけ回収した。免疫組織化学により、腰髄のα-運動ニューロンを抗 NeuN 抗体 (1 μg/mL、Millipore)で染色し、脊髄前角に発現している NeuN

陽性運動ニューロンの細胞体面積を Pannoramic Viewer software (3D Histech Ltd.) で 測定した。なお、細胞体の面積が 400  $\mu$ m<sup>2</sup>以上のニューロンを $\alpha$ -運動ニューロンと定 義し (Friese et al., 2009)、マウス1匹あたり 10 切片分をカウントした。

#### プロテアソーム活性の測定

マウス脊髄可溶性タンパク質中のプロテアソーム活性(キモトリプシン様、ト リプシン様およびカスパーゼ様活性)は、Proteasome-GloTM Cell-Based Assay Kit (Promega)により測定した。本キットはプロテアソーム活性以外に、わずかではあ るが非特異的なペプチダーゼ活性を検出することが知られている。そこで、マウス脊 髄に含まれる可溶性タンパク質にプロテアソーム阻害剤(Bortezomib、キモトリプシ ン様活性の阻害剤、0.1 µg/mL、Calbiochem、または、AdaAhx3L3VS、トリプシン様 およびカスパーゼ様活性の阻害剤)、30 µg/mL、Calbiochem)を添加し、バックグラ ンド値を求めた。プロテアソーム活性は、阻害剤未添加時の活性(総ペプチダーゼ活 性)から阻害剤添加時の活性(非特異的なペプチダーゼ活性)を減して算出した。

#### 不溶性ユビキンチン化タンパク質の検出

マウス脊髄から抽出した不溶性画分(5 µg の可溶性タンパク質に相当する量) を、4–15% Criterion® TGX ゲル(Bio-Rad)を用いて還元的条件下で電気泳動を行い (200 V、45 min)、Lys48、及び、Lys63 の両ユビキチン鎖を認識する抗ユビキチン抗 体(1:25,000、Dako)を用いてウェスタンブロットを行った。なお、脊髄ホモジネー ト中の actin (1:50,000, Millipore)を内部標準物質として利用した。

#### 統計学的解析

すべての結果は、平均値±標準偏差で表記した。統計学的解析は Statcel 3 ソフ トウェア(OMS Publishing Inc.) で行った。統計学的有意差は P<0.05 と定義した。マ ウス体重の経時的変化の解析は、repeated-measures ANOVA で行った。麻痺発症、及 び、生存期間の解析は log-rank テストで行い、Kaplan-Meier 曲線として表記した。罹 病期間の解析は、全マウスデータの正規性、及び、分散を確認した後に、Welch's *t*-test (両側検定)で行った。 その他の解析は、one-way ANOVA で行い、有意差を認めた 場合には、Tukey-Kramer *post-hoc* test での多重比較検定を行った。"n"の値は、ヒト、 あるいは、マウスの個体数として表記した。すべての生化学・病理学的な実験は少な くとも2回以上行い、結果の再現性を確認した。

#### SOD1<sup>L126X</sup>凝集体の作製および確認

ヒト*SOD1<sup>L126X</sup>* 遺伝子を含む pET15b プラスミドを作製し、大腸菌 BL21 (DE3) を用いて、0.5 mM isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) とともに 37 °C で 4-5 時間培養することで、SOD1<sup>L126X</sup> タンパク質を発現させた。2% (v/v) Triton X-100 を含 む PBS (pH 7.2) に大腸菌を懸濁させた後に、超音波ホモジェナイザーを用いて破砕 し、遠心分離 (20,000 x g, 4 °C, 10 min) により可溶性の上清と不溶性の沈殿を得た。 不溶性の沈殿を、2 %(w/v) Sodium dodecyl sulfate (SDS) を含む PBS (pH 7.2) に可溶 化させ、12.5 %(v/v)のポリアクリルアミドゲルを用いて、還元的条件下で電気泳動を 行った (150 V, 1.5 h)。泳動後に Coomassie brilliant blue (CBB) 染色液 (R-250) でゲ ルを染色し、SOD1<sup>L126X</sup> タンパク質の発現を確認した。

#### ヒト SOD1 を発現する線虫の作製

SOD1 を線虫の腸管特異的に発現させるために、ges-1 プロモーターを利用し、 2A ペプチド配列を介して蛍光タンパク質 (EGFP) と融合させた SOD1<sup>WT</sup>、あるいは、 SOD1<sup>L126X</sup>の cDNA を線虫 (N2)の生殖巣にマイクロインジェクションした。cDNA をインジェクションした後、線虫を NGM 寒天培地に移し、EGFP からの蛍光を指標 にして EGFP-SOD1 を発現する線虫を探した。

#### 線虫への SOD1<sup>L126X</sup>凝集体の暴露

上記で作製した線虫への SOD1<sup>L126X</sup> 凝集体の暴露は、**Fig. 14a** に示したタイム スケジュールに従って行った。不溶性の SOD1<sup>L126X</sup> 凝集体を有した大腸菌を、 5-fluorodeoxyuridine (5-FUdR) を含有した NGM 寒天培地に塗布し、L2 ステージのト ランスジェニック線虫をこれら培地中で生育した。2 日後、SOD1<sup>L126X</sup> 凝集体または pET15 を発現した大腸菌を再度、培地に添加した。さらに 3 日間の培養後、培地に PBS, pH 7.2 を加え、線虫を回収した。線虫の体表面に付着している大腸菌を除去す るために、PBS, pH 7.2 で線虫を 5 回洗浄した。

線虫を lysis buffer (1 %(v/v) NP-40, 2x EDTA-free Complete Protease Inhibitor (Roche Applied Science) in PBS, pH 7.2) で超音波破砕し、遠心分離を行うことで (20,000 x g、4 °C、10 min.) 可溶性と不溶性の画分に分離した。不溶性画分は lysis buffer で洗浄した後、2 %(w/v) SDS/PBS, pH 7.2 で可溶化した。可溶性、及び、不溶性 の両画分 (10  $\mu$ g タンパク質) を、12.5%のポリアクリルアミドゲルを用いて還元的 な条件下で電気泳動を行うことで分離した (150 V、1.5 h)。電気泳動後、タンパク質 を PVDF 膜(Wako) に転写し (350 mA、1 h)、膜をスキムミルクによりブロッキン グした後、ヒツジ抗 SOD1 抗体(1:10,000, Calbiochem, 4 ℃, overnight)、及び、HRP 結合抗ヒツジ IgG 抗体(1:10,000, Bio-Rad, r.t., 1 h) を用いてウェスタンブロッティン グによる解析を行った。

### 結果と考察

#### ヒト対照群のオートファジー機能

オートファジーによるタンパク質分解は複数のステップから構成されること が知られている(Fig. 2)。具体的には、隔離膜の誘導、隔離膜の伸長、オートファゴ ソームの成熟化、リソソームとオートファゴソームの融合である(オートリソソーム)。 最終的には、オートリソソームに取り込まれた標的タンパク質は、リソソーム由来の 酸性プロテアーゼにより分解される (Choi et al., 2013)。

本研究ではまず、ヒト中枢神経系(前頭葉、側頭葉、小脳虫部、運動野を含む中心前回、脊髄前角、および、脊髄後角)におけるオートファジー制御タンパク質の挙動をウェスタンブロット法により検討を行った。オートファジーの過程において、隔離膜をオートファゴソームへと伸長させるためには、Beclin 1 と呼ばれるタンパク 質が必須であることが知られているが、神経疾患の罹患歴がない対照群では、脊髄前角におけるBeclin 1 の発現量が、他の中枢神経系と比較して約7倍低いことが分かった(Fig. 3a)。また、オートファゴソーム成熟に関与するタンパク質である LC3-II の 発現量についても、脊髄前角でのみ著しく低いことが分かった(Fig. 3b)。さらに、 オートファジーによって特異的に分解されるタンパク質である p62 の発現量も脊髄 で低値を示した(Fig. 3c)。よって、脊髄前角におけるオートファジー機能は本質的 に低く、タンパク質凝集体に対して脆弱であることが推察された。

#### ALS 患者のオートファジー機能

そこで、ALS 患者の中枢神経系におけるオートファジー制御の挙動を解析したところ、孤発性 ALS、及び、SOD1 変異を伴わない家族性 ALS の患者では、Beclin 1 (Fig. 4a)、及び、p62 の脊髄前角における発現量 (Fig. 4c) が有意に増加していた。また、SOD1 変異を伴う家族性 ALS の患者においても、Beclin 1 の発現量が他の ALS 患者よりも有意に高かった (Fig. 4a, c)。ALS 患者に見られる Beclin 1 の発現量増加 はオートファジー誘導につながると考えられることから、LC3-II の発現量も増加する ことが予想されたものの、ALS 患者に見られる LC3-II の発現量には変化が認められ なかった (Fig. 4b)。また、脊髄前角の他にも、上位運動ニューロンが発現する中心前回の運動野は ALS の責任病巣のひとつであるが、ALS 患者の中心前回においても、Beclin 1、及び、p62 の発現量が有意に増加していたものの、LC3-II の発現量には変 化がなかった (Fig. 4d-f)。一方で、脊髄前角、及び、中心前回以外の中枢神経系組 織におけるオートファジー制御タンパク質 (Beclin 1, p62, LC3-II) の発現量について

は、ALS 患者と対照群で変化がなかった。オートファジー誘導を担う Beclin 1 の増加 とオートファジー機能低下の指標である p62 の増加は、一見すると相反する結果であ るが、mTOR を標的としたオートファジー誘導剤であるラパマイシンを SOD1<sup>G93A</sup>や SOD1<sup>H46R/H48Q</sup> マウスに投与しても、治療効果が得られないことが報告されている (Zhang et al., 2011; Bhattacharya et al., 2012)。つまり、ALS 患者の脊髄前角ではオート ファジー流動の情報伝達に不具合が生じ、その誘導が円滑に行われていない可能性を 示唆することができる。

#### ALS モデルマウス SOD1<sup>G127X</sup>のオートファジー機能

SOD1<sup>G127X</sup> はフレームシフト型の変異タンパク質で、SOD1 遺伝子に TGGG が挿入されることで、C 末端側に野生型 SOD1 に存在しないアミノ酸配列 (127-133) が生じ、134 番目以降は新たなストップコドンにより翻訳が終結する (Andersen et al., 1997)。よって、分子量の違いや C 末端側に存在する非天然のアミノ酸配列を利用することで、SOD1<sup>G127X</sup> と野生型 SOD1 を区別することができる利点があるため、本研究では、SOD1<sup>G127X</sup> を発現するトランスジェニックマウスをモデルとして使用した (Zetterstrom et al., 2007; Zetterstrom et al., 2013)。

まず、SOD1<sup>G127X</sup> マウスにおけるオートファジー機能について、オートファ ジー関連タンパク質の発現量をウェスタンブロット法で解析することにより検討し た。その結果、ALS 患者とは異なり、SOD1<sup>G127X</sup> マウスの脊髄においては、Beclin 1 の発現量は病期の過程で変化がなかったが(Fig. 5a)、オートファジー誘導のマーカ ーである LC3-II、及び、オートファジー抑制のマーカーである p62 の発現量は、すべ ての病期で有意に高いことが分かった(Fig. 5b, c)。つまり、SOD1<sup>G127X</sup> マウスの脊髄 では、オートファジーの制御が破綻しているのではないかと推察される。

#### Becn1 ヘテロ欠損型 SOD1<sup>G127X</sup> マウスにおける ALS 病態

変異 SOD1 による ALS に対してオートファジー機能が果たす役割を検討する ために、オートファジーに必須のタンパク質である Beclin 1 をコードする Becn1 遺伝 子をヘテロ欠損させた SOD1<sup>G127X</sup> マウスを作製した。Becn1 ホモ欠損ノックアウトマ ウスは胎生致死であるが、ヘテロ欠損マウスは正常に誕生することが知られている (Qu et al., 2003)。Becn1 ヘテロ欠損マウスでは、Beclin 1 タンパク質の発現量を約 50 % だけ減少し、ニューロンを含むすべての細胞のオートファジー機能が著しく低下する (Pickford et al., 2008)。

本研究では、雄性の SOD1<sup>G127X</sup>マウスと雌性の Becnl ヘテロ欠損マウスを交

配させることで、*Becn1* 欠損型 SOD1<sup>G127X</sup> マウスを作製し、Beclin 1 タンパク質の脊髄における発現量が、ノントランスジェニックマウス (Non-Tg)、及び、SOD1<sup>G127X</sup> マウスと比較して約 50%に低下していることを確認した (Fig. 6a)。また、オートフ アジー誘導のマーカーである LC3-II の発現量が 40%減少し (Fig. 6b)、オートファジ ー抑制のマーカーである p62 の発現量が 42%増加していたことから (Fig. 6c)、 SOD1<sup>G127X</sup> マウスにおいて *Becn1* をヘテロ欠損させることで、オートファジー誘導が 抑制されることを確認した。

一方で、Becn1のヘテロ欠損が別のタンパク質分解経路であるユビキチン-プ ロテアソーム経路に及ぼす影響を検討するために、不溶性画分に含まれるタンパク質 のユビキチン化についてウェスタンブロット法により解析したところ、SOD1<sup>G127X</sup>マ ウスのBecn1ヘテロ欠損によって、脊髄におけるタンパク質のユビキチン化が亢進し ていることが分かった。しかし、マウス脊髄の可溶性タンパク質中のプロテアソーム 活性を測定したところ、Becn1ヘテロ欠損、及び、SOD1<sup>G127X</sup>の発現に関わらず、す べてのマウスでプロテアソーム活性(キモトリプシン、トリプシン、及び、カスパー ゼ様の活性)は同程度であった。よって、Becn1のヘテロ欠損は、ユビキチン-プロ テアソーム経路とは独立して、オートファジー機能を減弱させることが分かった。

そこで、*Becn1*のヘテロ欠損が SOD1<sup>G127X</sup>マウスの表現型に及ぼす影響を検 討したところ、麻痺の発症が 348±13 日齢から 295±19 日齢へと早発し( $P=5.1 \times 10^{6}$ 、 **Fig. 6d**)、生存期間についても、416±19 日齢から 326±19 日齢へと 22%短縮した (P= 3.0 × 10<sup>6</sup>、**Fig. 6e**)。また、罹病期間については、68±13 日齢から 30±4.4 日齢へ と 56%短縮することが分かった ( $P=7.1 \times 10^{-10}$ 、**Fig. 6f**)。次に、*Becn1* 遺伝子のヘ テロ欠損が運動ニューロンの生存に及ぼす影響を調べるために、腰髄前角の運動ニュ ーロンの数を計測した。その結果、麻痺の発症後(体重 10%減少時)には、SOD1<sup>G127X</sup> マウスでは 70%の運動ニューロンが生存していたのに対して、*Becn1* ヘテロ欠損 SOD1<sup>G127X</sup>マウスでは生存率が 43%にまで低下していることが分かった (P < 0.01) (**Fig. 7**)。また、病末期においても、*Becn1* ヘテロ欠損によって、SOD1<sup>G127X</sup>マウス の運動ニューロン死は加速した (43% vs. 13%、P < 0.01) (**Fig. 7**)。一方で、Non-**Tg** マウスと *Becn1* ヘテロ欠損マウスの運動ニューロン数は同程度であった (**Fig. 7**)。つ まり、オートファジー機能の低下は、ALSの病態を憎悪させることが考えられた。

#### オートファジーが SOD1 凝集体に及ぼす影響

オートファジー機能の低下が SOD1 凝集体の存在量に与える影響を検討する ために、マウス脊髄を非イオン性界面活性剤である NP-40 を含んだバッファーでホ モジナイズし、可溶性、及び、不溶性の画分に遠心分離した。両画分について、 SOD1<sup>G127X</sup>を特異的に認識する抗体を用いたウェスタンブロットにより解析したとこ ろ、*Becn1* 遺伝子をヘテロ欠損させることで不溶性の SOD1<sup>G127X</sup> がすべての病期で有 意に増加することが分かった(Fig. 8a)。また、フィルタートラップ法により検出さ れる不溶性の SOD1<sup>G127X</sup> 凝集体についても、*Becn1* 遺伝子をヘテロ欠損させることで 有意に増加しており(Fig. 8b)、Beclin 1 の発現量減少に伴うオートファジー機能の低 下は変異 SOD1 の凝集体量を増大させることが分かった。

次に、腰髄組織における SOD1<sup>G127X</sup> タンパク質の局在を免疫組織化学により 検討したところ、麻痺が発症する以前(150 日齢)の SOD1<sup>G127X</sup> マウスでは、主に大 型のα-運動ニューロンに局在していることが分かった(Fig. 8c)。しかし、麻痺が発 症した後には、運動ニューロンだけではなく、周囲のグリア細胞や介在ニューロンに も SOD1<sup>G127X</sup> が観察された(Fig. 8c)。よって、病期の過程で、SOD1<sup>G127X</sup> は運動ニュ ーロンから周囲の細胞へと伝播するのではないかと考えられる。さらに、*Becn1* ヘテ ロ欠損 SOD1<sup>G127X</sup> マウスでは、麻痺が発症する以前(150 日齢)から、運動ニューロ ン周囲の細胞群にも SOD1<sup>G127X</sup> タンパク質が観察されることから(Fig. 8c)、オート ファジー機能の低下は、運動ニューロンから他の細胞への SOD1<sup>G127X</sup> の伝播を促進す るのではないかと示唆される。

#### ALS モデル線虫を用いた SOD1 凝集の伝播メカニズム

上記の ALS モデルマウスに見られる SOD1 凝集の伝播について、その分子メ カニズムを明らかにするために、線虫を利用した「シーディング」モデルの確立に挑 戦した。具体的には、GFP 融合型の野生型 SOD1、あるいは、GFP 融合型の SOD1<sup>L126X</sup> を発現する線虫を作製し、SOD1<sup>L126X</sup> 凝集体を有した大腸菌を食させることで、SOD1 凝集が大腸菌から線虫に伝播するのかを検討した(Fig. 9a)。まず、野生型 SOD1 を 発現した線虫において、SOD1<sup>L126X</sup> 凝集体を有した大腸菌(Fig. 9b)を食餌として与 えると、不溶性画分にも野生型 SOD1 が確認された(Fig. 9c)。しかし、SOD1 凝集体 を持たない大腸菌を食した線虫においても、一定量の不溶性 SOD1 を確認できること から(Fig. 9c)、必ずしも、大腸菌から線虫への凝集の伝播が生じている訳ではない ことが考えられた。さらに、SOD1<sup>L126X</sup> を発現させた線虫では、可溶性、及び、不溶 性のいずれの画分においても SOD1<sup>L126X</sup> タンパク質を検出することができなかったが (Fig. 9c)、SOD1<sup>L126X</sup> 凝集体を有した大腸菌を食させると、不溶性画分に SOD1<sup>L126X</sup> を確認することができた(Fig. 9c)。しかし、線虫体内に大腸菌由来の SOD1<sup>L126X</sup> 凝 集体が残存していることも充分に考えられ、現在、その可能性について検討を進めて いる。

## 参考文献

- Andersen PM, Al-Chalabi A (2011) Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? Nat Rev Neurol 7:603-615.
- Andersen PM, Nilsson P, Keranen ML, Forsgren L, Hagglund J, Karlsborg M, Ronnevi LO, Gredal O, Marklund SL (1997) Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with CuZn-superoxide dismutase mutations in Scandinavia. Brain 120 (Pt 10):1723-1737.
- Bhattacharya A, Bokov A, Muller FL, Jernigan AL, Maslin K, Diaz V, Richardson A, Van Remmen H (2012) Dietary restriction but not rapamycin extends disease onset and survival of the H46R/H48Q mouse model of ALS. Neurobiol Aging 33:1829-1832.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW (2006) Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. Science 312:1389-1392.
- Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL (2000) El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 1:293-299.
- Brotherton TE, Li Y, Glass JD (2013) Cellular toxicity of mutant SOD1 protein is linked to an easily soluble, non-aggregated form in vitro. Neurobiol Dis 49:49-56.
- Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. Science 281:1851-1854.
- Choi AM, Ryter SW, Levine B (2013) Autophagy in human health and disease. N Engl J Med 368:651-662.
- Cudkowicz ME, McKenna-Yasek D, Sapp PE, Chin W, Geller B, Hayden DL, Schoenfeld DA, Hosler BA, Horvitz HR, Brown RH (1997) Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 41:210-221.
- Forsberg K, Jonsson PA, Andersen PM, Bergemalm D, Graffmo KS, Hultdin M, Jacobsson J, Rosquist R, Marklund SL, Brannstrom T (2010) Novel antibodies reveal inclusions containing non-native SOD1 in sporadic ALS patients. PLoS One 5:e11552.
- Friese A, Kaltschmidt JA, Ladle DR, Sigrist M, Jessell TM, Arber S (2009) Gamma and alpha motor neurons distinguished by expression of transcription factor Err3. Proc Natl Acad Sci U S A 106:13588-13593.

- Furukawa Y, Kaneko K, Yamanaka K, O'Halloran TV, Nukina N (2008) Complete loss of post-translational modifications triggers fibrillar aggregation of SOD1 in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis. J Biol Chem 283:24167-24176.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. Science 264:1772-1775.
- Jonsson PA, Graffmo KS, Andersen PM, Brannstrom T, Lindberg M, Oliveberg M, Marklund SL (2006) Disulphide-reduced superoxide dismutase-1 in CNS of transgenic amyotrophic lateral sclerosis models. Brain 129:451-464.
- Jonsson PA, Ernhill K, Andersen PM, Bergemalm D, Brannstrom T, Gredal O, Nilsson P, Marklund SL (2004) Minute quantities of misfolded mutant superoxide dismutase-1 cause amyotrophic lateral sclerosis. Brain 127:73-88.
- Korolchuk VI, Mansilla A, Menzies FM, Rubinsztein DC (2009) Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. Mol Cell 33:517-527.
- Lang L, Kurnik M, Danielsson J, Oliveberg M (2012) Fibrillation precursor of superoxide dismutase 1 revealed by gradual tuning of the protein-folding equilibrium. Proc Natl Acad Sci U S A 109:17868-17873.
- Liu HN, Tjostheim S, Dasilva K, Taylor D, Zhao B, Rakhit R, Brown M, Chakrabartty A, McLaurin J, Robertson J (2012) Targeting of monomer/misfolded SOD1 as a therapeutic strategy for amyotrophic lateral sclerosis. J Neurosci 32:8791-8799.
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem 244:6049-6055.
- Mizushima N, Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. Cell 147:728-741.
- Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, Small S, Spencer B, Rockenstein E, Levine B, Wyss-Coray T (2008) The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. J Clin Invest 118:2190-2199.
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. J Clin Invest 112:1809-1820.
- Rakhit R, Robertson J, Vande Velde C, Horne P, Ruth DM, Griffin J, Cleveland DW, Cashman NR,

Chakrabartty A (2007) An immunological epitope selective for pathological monomer-misfolded SOD1 in ALS. Nat Med 13:754-759.

- Ravits JM, La Spada AR (2009) ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. Neurology 73:805-811.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Jr., Scott RW, Snider WD (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. Nat Genet 13:43-47.
- Rohrer JD, Isaacs AM, Mizielinska S, Mead S, Lashley T, Wray S, Sidle K, Fratta P, Orrell RW, Hardy J, Holton J, Revesz T, Rossor MN, Warren JD (2015) C9orf72 expansions in frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. Lancet Neurol 14:291-301.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 362:59-62.
- Saccon RA, Bunton-Stasyshyn RK, Fisher EM, Fratta P (2013) Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? Brain 136:2342-2358.
- Zetterstrom P, Graffmo KS, Andersen PM, Brannstrom T, Marklund SL (2013) Composition of soluble misfolded superoxide dismutase-1 in murine models of amyotrophic lateral sclerosis. Neuromolecular Med 15:147-158.
- Zetterstrom P, Stewart HG, Bergemalm D, Jonsson PA, Graffmo KS, Andersen PM, Brannstrom T, Oliveberg M, Marklund SL (2007) 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 104:14157-14162.
- Zhang X, Li L, Chen S, Yang D, Wang Y, Zhang X, Wang Z, Le W (2011) Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Autophagy 7:412-425.



#### Fig. 1 A crystal structure of human wild-type SOD1.

SOD1 forms homodimer with each subunit containing one Cu ion (cyan) and one Zn ion (red). An intramolecular disulfide bond (Cys57-Cys146; yellow) confers further structural stability to SOD1.



#### Fig. 2 Autophagic and lysosomal proteins that regulate autophagic flux.

Protein degradation by autophagy-lysosome system proceeds several steps, which consist of vesicle elongation, autophagosome maturation, and autophagosome-lysosome fusion. In the final step, contents inside the autolysosome are degraded by lysosomal acidic hydrolases.



Fig. 3 Autophagy factors are present in exceptionally low amounts in spinal ventral horns of human controls.

Scatter plots showing the relative expression patterns of autophagic proteins including (a) Beclin 1, (b) LC3-II, and (c) p62. To allow multiple comparisons between different gels, temporal lobe from a control was used as a standard. All values in each CNS region were normalized to the level of expression of the standard. Bars represent mean values. \*P<0.05 vs. ventral horn of non-neurological controls. \*\*P<0.01 vs. ventral horn of non-neurological controls.  $^{\#\#}P < 0.01$  vs. ventral horn of Parkinson's disease.



# Fig. 4 Autophagy factors become elevated in the spinal ventral horns and precentral gyrus of ALS patients.

Scatter plots showing the relative expression levels of autophagic proteins in  $(\mathbf{a}-\mathbf{c})$  ventral horn and  $(\mathbf{d}-\mathbf{f})$  precentral gyrus from five non-neurological controls, four sporadic ALS (SALS), five familial ALS (FALS) without *SOD1* mutations, and nine FALS with *SOD1* mutations. All values in each CNS region were normalized to the level of expression of the temporal lobe standard. Bars represent mean values. \**P*<0.05 vs. controls. \*\**P*<0.01 vs. controls. N.S. not significant (vs. controls).



Fig. 5 Alterations in autophagy factors in spinal cords of SOD1<sup>G127X</sup> mice over the course of disease.

Densitometric calculations of the relative expression levels of (a) Beclin 1, (b) LC3-II, and (c) p62 in the lumbar spinal cords of SOD1<sup>G127X</sup> mice. Data are given as mean  $\pm$  SD. \*\**P*<0.01 vs. age-matched C57BL/6J.



Fig. 6 Heterozygous deletion of *Becn1* impairs autophagy and exacerbates the disease course in SOD1<sup>G127X</sup> mice.

(**a-c**) The relative expression levels of (**a**) Beclin 1, (**b**) LC3-II, and (**c**) p62 in the lumbar spinal cords of terminally ill hSOD1<sup>G127X</sup>/*Becn1<sup>+/-</sup>* mice and their littermates. Data are given as mean  $\pm$  SD. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 vs Non-Tg. <sup>##</sup>*P*<0.01 vs. hSOD1<sup>G127X</sup>, N.S. not significant (vs. Non-Tg). (**d**) Temporal changes in body weight of the mice. (**e**) Kaplan-Meier curves for disease onset and survival. (**f**) Scatter plot for the disease duration. Bars represent mean values. \*\**P*<0.01.



Fig. 7 Impaired autophagy worsens loss of  $\alpha$ -motor neurons in the lumbar spinal cords of SOD1<sup>G127X</sup> mice.

(a) The lumbar spinal cord sections of the indicated mouse models were immunostained with anti-NeuN antibody. (b) Quantification of NeuN-positive  $\alpha$ -motor neurons in the lumbar spinal cords. \*\*P<0.01 vs. disease stage-matched SOD1<sup>G127X</sup>. N.S. not significant vs. 150-day-old SOD1<sup>G127X</sup>. Scale bars: 100 µm.



b



С



Fig. 8 Impaired autophagy increases SOD1<sup>G127X</sup> aggregation and reduces the amount of soluble species throughout the disease course.

(a) Western blots for SOD1<sup>G127X</sup> protein in the NP-40 insoluble and soluble fractions extracted from the lumbar spinal cords of the mice. (b) Filter-trapped SOD1<sup>G127X</sup> aggregates in the lumbar spinal cords of the mice. (c) Immunohistochemistry for  $hSOD1^{G127X}$  protein in lumbar spinal cords of mice. Scale bars: 100 µm.



#### Fig. 9 Direct effects of SOD1 aggregates on solubility of SOD1 in ALS worms.

(a) A protocol for feeding of *E. coli* forming SOD1<sup>L126X</sup> aggregates to the worms expressing human SOD1 proteins. (b) An SDS-PAGE gel for the analysis of insoluble SOD1<sup>L126X</sup> aggregates in *E. coli* BL21(DE3). (c) Western blotting analysis for the solubility of SOD1 proteins expressed in *C. elegans* worms that were fed with *E. coli* containing SOD1<sup>L126X</sup> aggregates for five days.