

論文の内容の要旨

論文題目: ERBB4-MEK-ERK 経路による SOD1 構造変化制御と ALS 発症機構の解析

氏名：坪田 充司

【序論】

筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis; ALS)は、運動神経特異的な細胞死を特徴とする発症原因不明の神経変性疾患である。現在までに ALS に対する根本的な治療法や治療薬は存在しない。*Copper, zinc superoxide dismutase (SOD1)*は家族性の ALS において変異が認められる原因遺伝子の一つであり、SOD1 は毒性獲得的に ALS 発症に関与すると考えられている。SOD1 は分子内に亜鉛イオン、銅イオンを配位する抗酸化酵素であるが、当研究室の先行研究により、ALS において見られる 124 種類の変異型 SOD1 は N 末端を構造的に露出する共通の異常構造をとることが明らかとなった(1)。これらの変異型 SOD1 は小胞体に局在する Derlin-1 と特異的に結合し、小胞体関連分解を阻害し小胞体ストレスを惹起することも示され(2)、SOD1 の構造変化は *SOD1* 遺伝子変異が原因となる ALS に共通の発症メカニズムであることが考えられる。また、近年 *SOD1* に遺伝子変異を持たない ALS 患者でも SOD1 の構造が異常化していることや毒性を発揮することが報告されている一方で、当研究室においても亜鉛欠乏下では野生型 SOD1 が ALS における遺伝子変異が入った場合同様に N 末端を構造的に露出する構造変化を起こすことを明らかにしている (3)。これらのことは *SOD1* 遺伝子変異非依存的な ALS に野生型 SOD1 も関与する可能性を示唆している。しかしながら、SOD1 の構造変化の詳細な分子機構は未だ不明であり、実際に構造変化した SOD1 が ALS 発症に寄与するか検証できてはいない。これまでに当研究室では、詳細な構造変化機構の解明を目指し、ゲノムワイド siRNA スクリーニングによって亜鉛欠乏依存的な野生型 SOD1 の構造変化に必要な因子の同定を試みていた。本研究ではスクリーニングで陽性となった因子の機能解析を行い、野生型 SOD1 の構造変化機構を解明することで、SOD1 構造変化が ALS 発症と関連するか検証することを目指した。

【結果と方法】

1: MEK1/2 は亜鉛欠乏依存的な SOD1 の構造変化に必要である

これまでに、ゲノムワイド siRNA スクリーニングから 118 遺伝子を陽性遺伝子として得ていた。パスウェイデータベース Reactome によるエンリッチメント解析の結果から、MAP キナーゼである ERK1/2 につながるパスウェイに属する遺伝子が陽性遺伝子群にエンリッチしていることがわかったため、本研究では陽性遺伝子群の中でも最上位に位置していた MEK1 から解析を開始した。まずスクリーニングとは異なる実験系である、変異型構造 SOD1 特異的抗体を用いた免疫沈降-ウエスタンブロット実験を行なったところ、MEK1/2 の発現抑制下では亜鉛欠乏依存的な SOD1 の構造変化程度が減弱することが確認できた。さらにキナーゼである MEK1/2 の阻害剤 U0126 の処置によっても亜鉛欠乏依存的な SOD1 の構造変化程度が減弱した。これらのことから、亜鉛欠乏依存的な SOD1 の構造変化には MEK1/2 のキナーゼ活性が必要であることが明らかとなり、MEK1/2 の下流因子で MAP キナーゼである ERK1/2 も SOD1 の亜鉛欠乏依存的な構造変化に必要であることが示唆された。

2: MEK-ERK シグナル経路が SOD1 の構造変化に必要である

また、亜鉛欠乏刺激によつては MEK1/2 活性の指標である ERK1/2 のリン酸化状態は増強しなかったことから MEK-ERK 経路は亜鉛欠乏刺激とは独立して SOD1 の構造変化に関与する可能性を予想した。さらに SOD1 の構造変化が一部で引き起こされていることから定常状態の SOD1 の構造変化にも MEK-ERK 経路が関与している可能性が考えられた。そこで MEK 阻害剤 U0126、ERK 阻害剤 FR180204 を用いて検討を行ったところ、これら阻害剤の処置によつて SOD1 の構造変化程度が減弱した。以上の結果から、MEK-ERK 経路は定常状態での SOD1 の構造変化にも必要であることが示唆された。

3: MEK-ERK 経路の活性化は SOD1 の構造変化を促進する

続いて、MEK-ERK 経路の阻害が SOD1 の構造変化程度を減弱させたことから、逆に MEK-ERK 経路が活性化すると SOD1 の構造変化程度が促進する可能性が考えられた。そこで、MEK1/2 の恒常活性化変異体を用いて MEK-ERK 経路を活性化したところ、定常状態、亜鉛欠乏刺激下いずれにおいても SOD1 の構造変化程度が促進した。これらの結果から、亜鉛欠乏刺激の有無を問わず、MEK-ERK 経路の活性が SOD1 の構造変化に必要な

十分であることが確認できた。

4: ALS 関連 ERBB4 変異体は MEK-ERK 経路を活性化し SOD1 の構造変化を促進する

スクリーニングの陽性遺伝子群には過去に MEK-ERK 経路の上流因子として知られている上皮成長因子受容体 ERBB4 が含まれていた。また、*ERBB4* は近年 ALS の原因遺伝子であることが見出されていたことから(4)、本研究での結果を踏まえて ALS 関連 ERBB4 変異体が MEK-ERK 経路を活性化し、SOD1 構造変化を引き起こすことで ALS 病態の発症に寄与するという仮説を立て検証を行った。その結果、ALS 関連 ERBB4 変異体の過剰発現が ERK1/2 を活性化することが確認された。さらに、ALS 関連 ERBB4 変異体の過剰発現は SOD1 の構造変化を促進する可能性も示唆され、ALS 関連 ERBB4 変異体は MEK-ERK 経路の活性化を介して、SOD1 の構造変化を促進することで ALS 病態発症に関与することが示唆された。

【まとめと考察】

本研究の結果から、亜鉛欠乏刺激の有無に関わらず、SOD1 の構造変化に MEK-ERK 経路の活性化が必要であり十分であることも明らかとなった。さらに ALS の新規原因遺伝子として同定されていた *ERBB4* の ALS 関連変異体が MEK-ERK 経路を活性化することで SOD1 の構造変化を促進する可能性を示し、*ERBB4* 遺伝子変異が原因となる ALS にも SOD1 の構造変化が関与することを示唆した。本研究の結果は、*SOD1* 遺伝子変異非依存的な ALS 病態にも構造変化した SOD1 が関与することを示唆すると考えられる。当研究室では、*SOD1* 遺伝子変異が原因となる ALS 病態を改善する SOD1-Derlin-1 阻害剤の開発にすでに成功している(5)。本研究の結果から SOD1-Derlin-1 阻害剤が *ERBB4* 遺伝子変異を含む *SOD1* 遺伝子変異非依存的な ALS にも有効となる可能性が考えられ、今後はより多くの ALS を対象とする治療薬へと発展することが期待される。

【参考文献】

(1) Fujisawa, T., *et al. Ann. Neurol.*, 2012, 72(5):739-749 (2) Nishitoh, H., *et al. Genes Dev.*, 2008, (22)11:1451-1464 (3) Homma, K., *et al. Mol. Cell*, 2013, (52)1:75-86 (4) Takahashi, Y., *et al. Am. J. Hum. Genet.* 93(5): 900-5 (5) Tsuburaya, N., *et al. Nat. Commun.*, 2018, (9)1:2668