

二量体SOD酵素の構造変化とALS発症

山形大学 理学部

西田 雄三

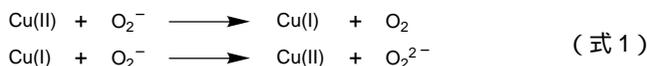
1. 家族性ALS発症とSOD酵素の変異

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かつ系統的に傷害される代表的な運動疾患である。有病率は人口10万人あたり2～6人で、世界各地でほぼ一定しているが、西南太平洋に分布するグアム島、西部ニューギニア、本邦の紀伊半島、グレートアイランド（オーストラリア）は本症の多発地域として有名である^{1,2)}。本症では通常2～5年で全身の筋萎縮と呼吸不全を来たすが、現在でも有効な治療法は発見されておらず、患者とご家族の苦悩は計り知れない。

ALSがおよそ120年まえに一疾患単位として確立されてから多くの研究がなされているにもかかわらず、病因に対する定説は未だにない³⁾。しかし、グアム島、紀伊半島では近年、ALS発症が激減していることなどから、なんらかの環境因子・社会経済的因子が関与していると考えられる。その中でも金属イオンの関与について古くから指摘されてきており⁴⁾、鉛・水銀イオンによる影響については現在でも研究が続けられているが⁵⁾、最近ではアルミニウム・マンガンイオンに対する関心が高まっている⁶⁾。それは、本症の多発地域として有名なグアム島、西部ニューギニア、本邦の紀伊半島の地域に共通して河川・飲料水・土壤にアルミニウム・マンガンイオンなどの金属イオンの含有が高いことに特徴があるからである^{1,2)}。紀伊半島における最近のALS患者の激減はおそらく水道水の普及によるものと思われる。

ALSのほとんどは孤発性であるが、約10%が家族性（FALS）に発症することが知られている^{1,2)}。FALSは臨床・病理学的には孤発性ALSと類似はしているが感覚障害などでは違った症状が見られる。このFALSについて徹底的な調査が行われた結果、FALSには原因遺伝子が複数存在することが指摘され、1993年21q22.1に存在するSOD1遺伝子の変異が明らかにされた⁷⁾。SOD1遺伝子には100bp前後の小さなエクソンが存在するが、すべてのエクソンについて点変異が観測されたが、正常コントロールには変異は全く存在していない。現在までに100を超える変異が見つかっている⁸⁾。

SODは、体内で生成する活性酸素種のひとつであるスーパーオキシドイオンを酸素と過酸化水素に分解する（式1）。第2段階で生成した過酸化水素はグルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼなどで水と酸素に分解される。



さて、このSOD1酵素における変異とALS発症とがどのように関連しているかが一番の関心事である。SOD酵素の方から言えば、変異による効果としてスーパーオキシドイオンの分解能が問題となる。実際に、いくつかの変異型SODではSOD活性は正常型の40～50%までに落ち込んでいるが、しかしほとんど活性が落ちていないものも多い^{2,9)}。例えば、Asp90Ala変異体は正常コントロール型の90%以上、Gly93Aspは86%の活性がある。複数の変異SOD1のトランスジェニックマウスが実際に運動ニューロンの変性を来すことが明らかにされている。例えば、Gly93Ala変異SOD1を過剰発現させたマウスは生後3～4ヵ月後から筋力低下を発症し、5ヶ月までには死亡する。このマウスではコントロールの4倍以上のSOD活性がみられる。このように高いSOD活性がありながら細胞障害が生じるというのは、単にSOD活性の低下のみで運動ニューロンの変性メカニズムを論じることができないことを示している。

もともとスーパーオキシドイオンそのものの酸化力は小さく、それ自身での細胞障害を起こす可能性は低いのである。この点についてBeckmannらは、このスーパーオキシドイオンがNOと反応して、peroxynitrite (ONOO⁻)を生成し、これからチロシンのニトロ化などで細胞毒性が出るのではないかと提案した¹⁰⁾。しかし、これもSOD活性の高い変異型でもALS発症が見られるのであるから、本質的な解決にはなっていない。

現在の中心的な考え方は、「変異SOD1が構造変化によって神経細胞に対する細胞毒性機能を新たに獲得したことが原因で、ニューロンの変性が起きる」というものである¹¹⁾。これを“gain-of-function”と呼んでいるが、この“gain-of-function”の真の発現作用機構も解明されていなかった。

2. 二量体SOD酵素のモノマーへの解離とその検出法

この変異SODに由来する毒性の原因はなんであろうか。多くのSODの構造解析の結果から、変異はβバレル構造の骨格となる分子表面のβ鎖に集中して存在しており、それが原因でβバレル構造が歪み、SOD1サブユニットの二量体形成(図1)¹²⁾が阻害され、SOD1が不安定化することが指摘されている。この構造不安定性のためにSOD酵素の会合体形成が進行することが毒性の最大の原因であるとする研究者が多い^{9,13,14)}。

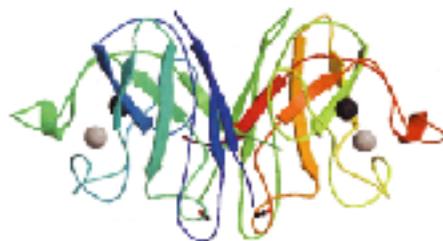
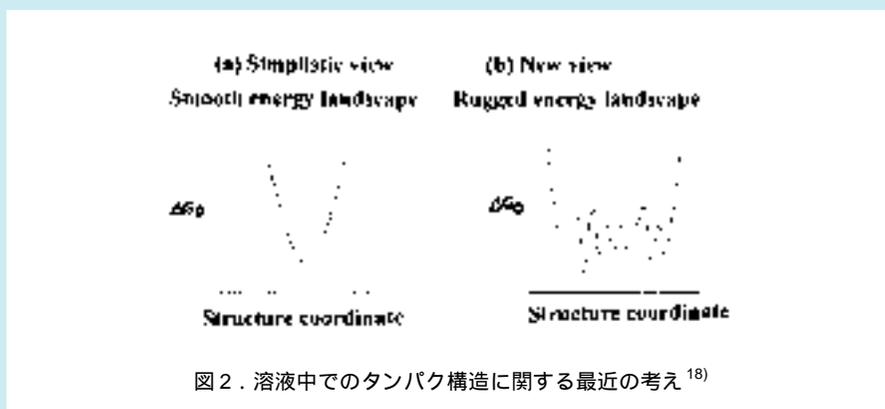


図1. 二量体SOD酵素の構造：2個の銅と亜鉛イオンは丸で表されている。

蛋白の会合体形成は多くの神経性疾患に共通に見られる現象であることは広く認識されている¹⁵⁾; 例えばアルツハイマー病におけるアミロイド斑形成, パーキンソン氏病における α -synuclein タンパクの会合体 (Lewy 小体), ポリグルタミン病などが知られており, 蛋白のミスフォールディングによる会合体形成の毒性が指摘されてきている。ただ, あとで述べるようにこの SOD 酵素の会合体と ALS との関連性については最近大きな疑問が投げられている。

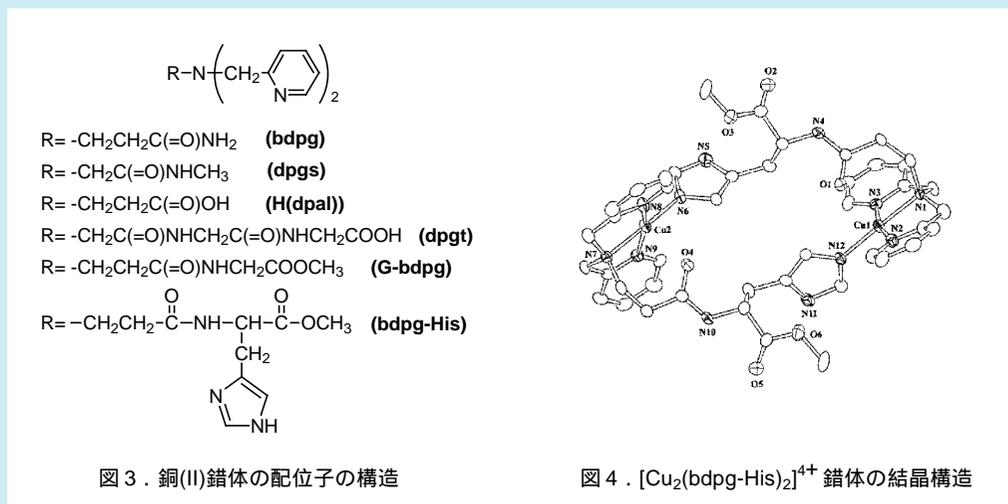
最初に SOD 酵素の二量体構造からモノマーへの解離反応から見てみよう。二量体 SOD の単量体への解離反応を調べる手法として, DLS (dynamic light scattering) 法がある。これは分子の大きさを直接的に測定する方法で, 単量体と二量体ではその大きさが異なることを利用する。Wild-type 二量体 SOD の溶液に銅(II)イオン / アスコルビン酸溶液を加えると, モノマーへ解離することが DLS 法で検出できる¹⁶⁾。この場合, 更に生成したモノマーが会合体を形成することも観測されている。Wild-type 二量体と metal-free モノマーはゲルろ過カラム法などで分離することも明らかにされている^{11,17)}。

われわれは SOD 酵素の構造変化・モノマーへの解離反応を検出する簡単な方法がないかを検討した。最近の概念によれば, 蛋白質は溶液中ではいくつもの構造 (コンフォメーション) をとる (図 2 (b))¹⁸⁾。しかし, どれか一つが主たる構造ということになれば, その存在比は非常に高くなる。一方, 特にどの構造が有利というわけではないとき, いくつかのコンフォメーションが可能になり, 溶液中でいくつもの可能な構造で存在できるので, 個々のコンフォメーションの存在確率は低くなる。これをキャピラリー電気泳動 (CE) で観測すると, 可能なコンフォメーションの数の少ない蛋白のシグナルは幅の狭い, 強度の高いピークで観測され, 一方, コンフォメーションの数が多い場合は, はっきりとしたシグナルが見えず, 幅広い強度の弱いシグナルとなって観測される^{19,20)}。

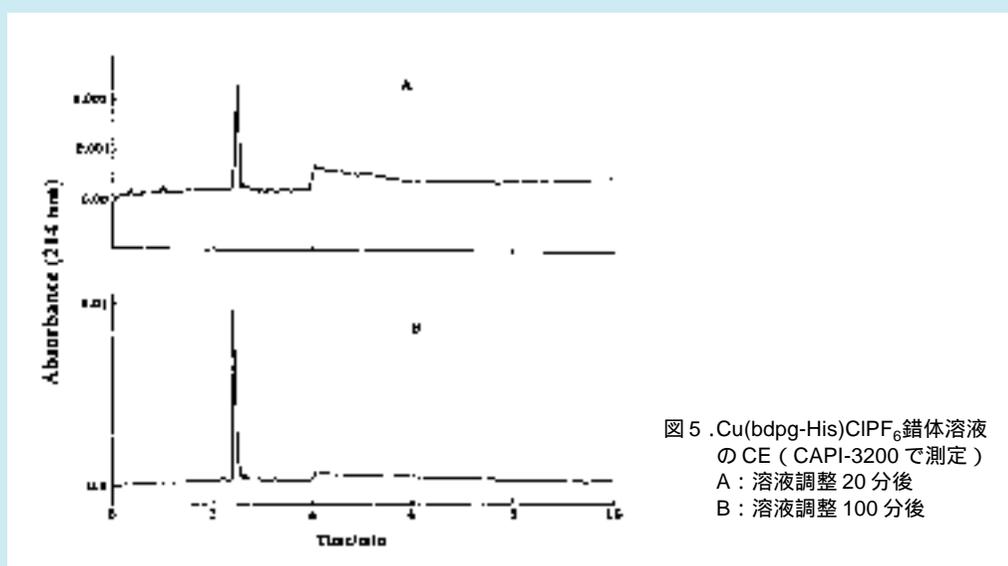


この挙動は金属錯体でも見ることが出来る。Cu(bdpg-His)CIPF₆ という錯体 (bdpg-His; 図 3) は, イミダゾール基をアンカーとして持つ特異な錯体である。結晶状態では, そのアンカーであるイミダゾール基がもう一つの銅(II)イオンに配位した二量体構造をとっている (図 4)²¹⁾。

この錯体を水/アルコールの混合溶媒に溶かすと、溶液中では二量体構造のものと、イミダゾール基がアンカーとなっている単量体に解離していることが溶液のマスペクトルから明らかにされている。この溶液のCEを測定すると、図5のようになる²¹⁾。特徴は幅の狭い鋭いシグナル(～2.4分)と、強度の弱い幅広いシグナル(4～6分)が観測されることにある。



同種の単核銅(II)錯体に対応するシグナルとの比較などから、鋭いシグナルと幅広いシグナルはそれぞれ二核構造、単核構造の錯体に帰属できる。このように構造における揺らぎの少ない二量体に対して鋭いシグナルが対応するという点に、CE法の特徴があるが、同じ理由で溶液中でのCEは一般的に濃度・時間依存を示すことが多い(図5、AとBを比較のこと)。



この特徴を同じような二量体構造を持つ2つのタンパクで比較すると面白い対応が見つかる。図6に、二量体構造のSODとアポトランスフェリンのCEを示した。2つの蛋白の濃度は同じ(2 mg / 1 ml)であるが、その強度は相当に異なる。アポトランスフェリンは、SODと同じ二量体構造を持つタンパクではあるが(図7)²²⁾、その二量体としてのコンフォーメーションはSODほど固定されていないことが、シグナル強度が弱い原因と思われる。

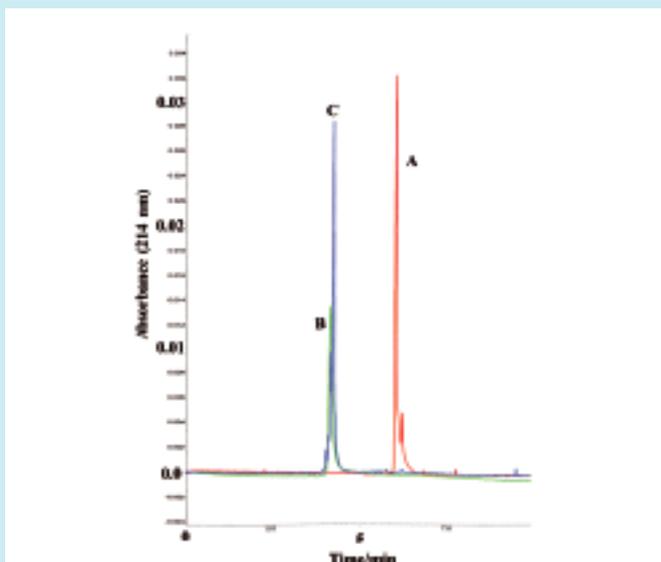


図6 . SOD (赤 : A), アポトランスフェリン (緑 : B) に鉄 - (ida)錯体を加えた溶液のCE (青, C)
(蛋白 2 mg/1 mL 溶液 P / ACE,MDQ で測定)

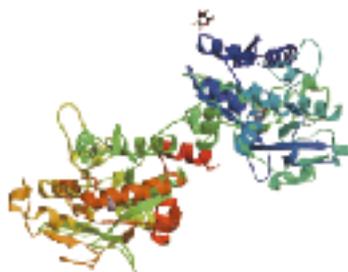


図7 . トランスフェリンの二量体構造

ここでアポトランスフェリンに鉄(III) - (ida)X₂(H₂ida : イミノ 2 酢酸)錯体溶液を加えると、アポトランスフェリンのシグナル強度が大幅に増大する(図6, C)。アポトランスフェリンに鉄(III) - (ida)錯体を加えると鉄(III)イオンがトランスフェリンに移行することは明らかにされているので²³⁾、これは鉄イオンとの結合でトランスフェリンの二量体構造のコンフォーメーションがより固定されたことでシグナル強度が増したといえる。

二量体SOD酵素に、Cu(II) / アスコルビン酸溶液を加えると、二量体SODがモノマーへ解離することがすでにDLS法から明らかにされているが¹⁶⁾、同じ溶液のCEを測定してみると、二量体に相当すると思われるピーク(図6, A)の強度が大きく減少することが判った(図11; B, Cに酷似)。これらの結果よりわれわれは二量体SOD酵素の構造変化・モノマーへの解離をCEでの二量体構造に相当するシグナル強度の減少で判定できるようになった。

3. “gain-of-function” の発現機構

変異SODと正常型SODではどのように違っているのでしょうか。1993年、Yimらは正常型、および変異SODに過酸化水素とDMPO(スピン・トラップ剤)を加えたところ、変異SODは正常型と比較して過酸化水素を異常に活性化できることを報告した^{24,25)}(図8)。この結果は、変異SODでの二量体構造での表面相互作用力が低下しており、モノマーへの解離が容易になり、銅(II)イオンと過酸化水素との相互作用が可能になったためと判断された。但し、正常型SODでもDMPO-OHが観測されている(図8, A)ことにほとんど注意が払われていなかった。

SODはすでに示したようにスーパーオキシドイオンを酸素と過酸化水素に分解する酵素である。ここで発生した過酸化水素はすぐに分解されねばいけないが、そのためには生成した過酸化水素はSOD酵素から直ちに離れなければいけない。この過程が重要で、正常型SODでは過酸化水素は離れやすいのであるが、そのことと構造とがどのように結びついているかである。

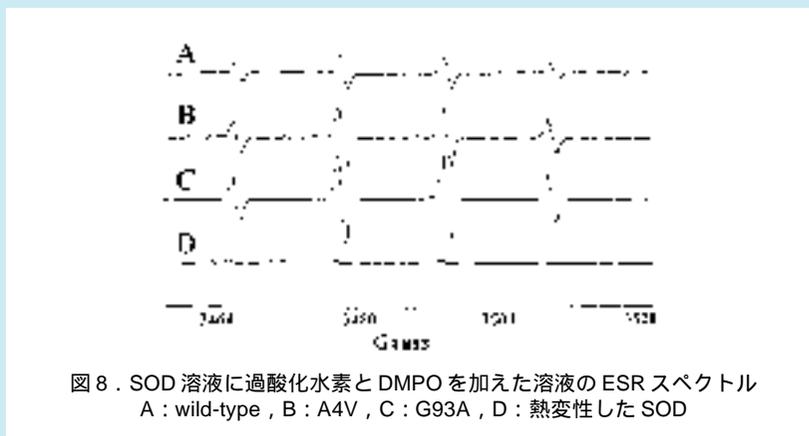


図8. SOD溶液に過酸化水素とDMPOを加えた溶液のESRスペクトル
A: wild-type, B: A4V, C: G93A, D: 熱変性したSOD

それに関しては、我々はモデル錯体の研究から調べた⁶⁾。例えば、いまCu(bdpg)Cl錯体(bdpg; 図3, 結晶構造; 図9)とCu(tpa)Cl錯体((tpa): トリス(2-ピリジルメチル)アミン)と過酸化水素との反応を考えてみよう。反応溶媒中では過酸化水素は塩化物イオンと置き換わって銅(II)イオンに結合できる。Cu(bdpg)錯体では、銅(II)イオンに結合しているカルボニル酸素原子のために、図9右側に示したパーオキシド付加体形成が可能であるが、それはこの錯体が過酸化水素存在下でシクロヘキサンの酸素化に高い活性を示すことから支持されている²⁶⁾。

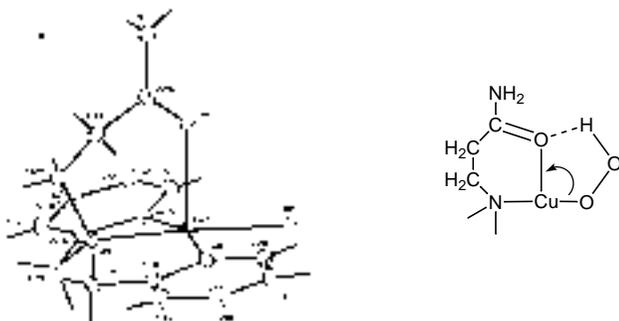


図9. 左: Cu(bdpg)Cl錯体の結晶構造 右: この錯体溶液に過酸化水素を加えたときに推定されるパーオキシド付加体の構造

別の言葉で言えば、過酸化水素がカルボニル酸素原子の存在で銅(II)イオンで捉えられたことになる。一方、Cu(tpa)錯体にはそのような付加体形成能はないので、過酸化水素を捉えることができず、実際シクロヘキサンの酸素化に対する活性はない²⁶⁾。ところが、Cu(tpa)錯体は過酸化水素の存在下、一重項酸素の消去剤であるTMPN(図10)を加えるとナイトロンラジカルを与えることが解った²⁷⁾。この結果は意外であるが、Cu(tpa)錯体としては過酸化水素を捉える能力はないが、TMPNの存在下では過酸化水素と結合した複合体が形成し、それによって過酸化水素の活性化が行われたことを示唆している⁶⁾。これはTMPNの存在によってももとなかった銅(II)イオンによる過酸化水素捕獲能力が新しく出現したことを意味するが、このような現象はTMPNだけでなく、アミロイド蛋白・DNAの存在下でも起き、このようにして捕捉された過酸化水素は蛋白のC-N結合の切断、メチオニンの硫黄原子上での酸素化反応を触媒する、などの特徴的な作用を示すことが解った²⁸⁾。もちろんこれらの作用発現も図3の配位子の置換基Rに大きく依存している。

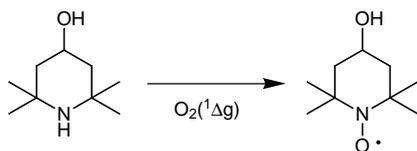


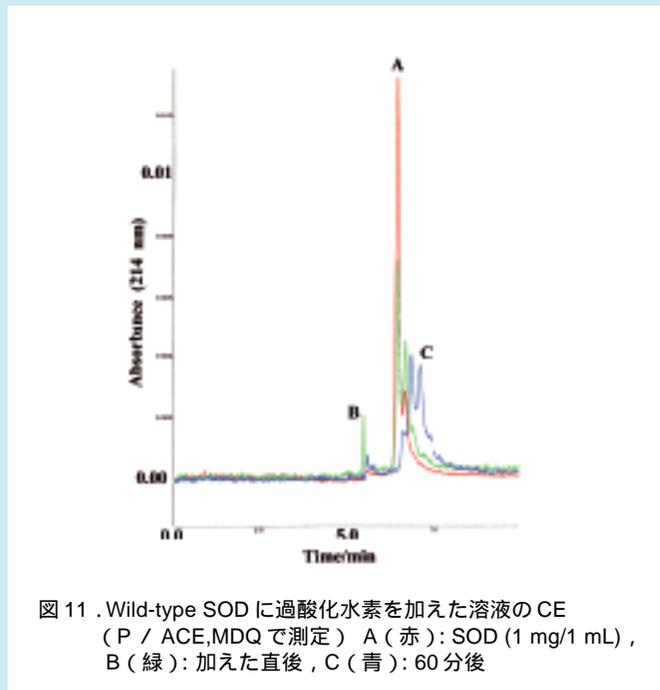
図10. TMPNとその反応生成物

上で述べた事実は、銅(II) - パーオキシド付加体の反応性は、パーオキシド付加体自身が固有に持っているものではなく、周辺基・基質との相互作用によって多様に発現される、ことを示唆している。これはこれまでの「酸素分子の活性化に関する定説」とは相容れないものであり、従来の常識を180度転換させる必要があるだろう。詳細は総説を参照されたい³⁰⁾。

以上の事実から、ALSと関連しているSODの変異は一般的には銅(II)イオンとは離れたところで生じており、その影響は銅(II)イオンの周りのわずかな構造変化しか引き起こさないが、

しかし過酸化水素の捕獲・活性化とは密接に関連していると推定される。これらのことから変異SODではSOD作用の途中で生成する過酸化水素の高い反応性が原因で二量体構造の表面相互作用が変化し、モノマーへ解離が起きやすくなっていると推測され、これより“gain-of-function”の発現機構が、初めて明らかにされたのである。

正常型SODに過酸化水素を加えると、モノマーへ解離することが、CEより示唆され(図11; B, C), その理由も明らかにされている²⁹⁾。これにより正常型SODに過酸化水素を加えたときのDMPO-OH形成(図8, A)も理解できるようになった。



4. 家族性ALS・孤発性ALSとSOD酵素

変異SODの“gain-of-function”とALS発症・進行との関連性については現在でも完全には解明されていない。変異SODは“gain-of-function”により、モノマーへ解離しやすい状態にあることは事実である。すでに多くのALS患者の脳ではSOD会合体形成が確認され、会合体形成がALS発症と関連していることは指摘されてきた^{9,13,14,31)}。ただし、会合体と神経細胞障害との関連性についてはいまだ明らかではない。最近の研究から、ALS発症とその進行の機構は違うという考えが提案されている。すなわち、会合体の形成は必ずしもALS発症とは関係していないという考えである³²⁾。これはアミロイド蛋白の会合とアルツハイマー病に対する最近の考えと似ている^{33,34)}。アルツハイマー病では、当初アミロイド斑がその発症と密接に関連していると

いう説が有力であったが、最近ではむしろ溶液中に溶けているアミロイド蛋白のオリゴマーによる毒性が発症と関連していると考えられるようになってきている。ALSの場合、構造的に不安定な二量体SODからミスフォールディングしたSODモノマーが形成し、それが他の分子と会合することで細胞死を導くと考えたほうが合理的であろう³⁵⁻³⁷⁾。

SOD変異による症例は、ALS全体から見れば10%前後を占めるに過ぎず、これまで述べてきたFALSに関する研究成果が、孤発性ALSの病因解明に直結するかは不明ではあるが、過酸化水素で wild-type SOD も構造変化を受ける事実からして²⁹⁾、SOD 二量体構造がいわゆる “ gain-of-function ” 以外の原因で壊れる可能性を調べることは、孤発性ALS発症を考える上でも非常に重要な問題であると思っている。事実、孤発性ALSについては過酸化水素を中心とした酸化ストレスとSOD酵素との関連性を指摘する論文は多い^{37,38)}。

酸化ストレスというと、「活性酸素」となるが、私は過酸化水素と鉄イオンが、酸化ストレスを引き起こす最大の原因であると指摘してきた^{6,30)}。この過酸化水素の形成・蓄積にいわゆる non-specific iron ion といって、特に明らかな構造を持たない鉄イオン種 (labile iron pool (LIB) とよばれる箇所に存在している) が関与している可能性が高い^{6,39,40)}。多量の non-specific iron ion の形成は、症状的には「鉄過剰症」と呼ばれているが、これは単に鉄イオンを過剰に摂取する以外に、アルミニウム・マンガンイオンの多量の摂取・蓄積によっても引き起こされるので、注意しなければいけない^{6,41)}。最新のレビューに、「アルツハイマー病に対するアルミニウムイオン原因説には科学的根拠は得られておらず、この説への関心は弱まっている」と記載されているが⁴²⁾、これはとんでもない認識不足である⁴¹⁾。

難病ALSについては、SOD酵素の “ gain-of-function ” が注目されてきた。同じ機構がプリオン蛋白にも生じる可能性があり、私は孤発性BSEの発症機構として、プリオン蛋白における “ gain-of-function ” の重要性を指摘してきた^{6,41,43)}。いずれにしてもこれらALS・アルツハイマー病・BSEなどの神経性疾患の根本的な発生源は「酸化ストレス」にあるので今後「鉄イオンと酸化ストレス」の視点からの予防・治療薬の開発が重要になると予想される^{30,41,43)}。

参考文献

- 1) Y. Yase, *Brain Medical*, **1995**, 7, 17-20.
- 2) R. Nakano, *Brain Medical*, **1996**, 8, 35-41.
- 3) 日出山拓人, 河原行朗, 郭伸, *医学のあゆみ*, **2005**, 212, 937-944.
- 4) Y. Kuroda, *Brain Medical*, **1996**, 7, 11-15.
- 5) H. Moriwaka, H. Okumura, K. Tashiro, *Brain Medical*, **1996**, 7, 29-35.
- 6) Y. Nishida, *Medical Hypothesis Research*, **2004**, 1, 227-245,
http://www.journal-mhr.com/PDF_Files/vol_1_4/1_4_PDFs/1_4_2.pdf.
- 7) D. R. Rosen, *et al.*, *Nature*, **1993**, 362, 59-62.
- 8) T. Sato, *et al.*, *Neurology*, **2005**, 65, 1954-1957.
- 9) C. Vijayvergiya, *et al.*, *J. Neuroscience*, **2005**, 25, 2463-2470.
- 10) J. S. Beckmann, *et al.*, *Nature*, **1993**, 364, 584.
- 11) Y. Furukawa, T. V. O'Halloran, *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 17266-17274.
- 12) PDB, 1spd_x.
- 13) P. Andreas, *et al.*, *Brain*, **2004**, 127, 73-88.
- 14) J. A. Johnston, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97, 12571-12576.

- 15) S. E. Radford, *Trends Biochem. Sci.*, **2000**, 25, 611-618; M. Buccintini, *et al.*, *Nature*, **2002**, 416, 507-511.
- 16) R. Rakhit, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 15499-15504.
- 17) A. Desideri, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**, 272, 81-83.
- 18) L. C. James, D. S. Tawfik, *Trends Biochem. Sci.*, **2003**, 28, 361-368.
- 19) A. Kishita, Y. Nishida, *Annu. Rep. CIN.*, **2004**, 1-6.
- 20) A. Kishita, S. Nishino, Y. Nishida, *Synth. Reac. Inorg. Metal-org. Nano-metal Chem.*, **2005**, 35, 379-383.
- 21) S. Nishino, *et al.*, *Z. Naturforsch.*, **2007**, 62b, 205-209.
- 22) PDB, 1n04.
- 23) R. Mizuno, *et al.*, *BioMetals*, **2006**, 19, 675-683.
- 24) M. B. Yim, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 4099; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93, 5709; *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 8861.
- 25) M. W.-Pazos, *et al.*, *Science*, **1996**, 271, 515-518.
- 26) T. Okuno, S. Ohba, Y. Nishida, *Polyhedron*, **1997**, 16, 3765-3774.
- 27) S. Nishino, *et al.*, *Z. Naturforsch.*, **1999**, 54c, 94-99.
- 28) S. Nishino, Y. Nishida, *Inorg. Chem. Commun.*, **2001**, 4, 86-89; S. Nishino, *et al.*, *Inorg. Chem. Commun.*, **2000**, 3, 145-147; S. Nishino, A. Kishita, Y. Nishida, *Z. Naturforsch.*, **2001**, 56c, 1144-1149.
- 29) Y. Chiba, Y. Sutoh, Y. Nishida, *Z. Naturforsch.*, **2006**, 61c, 273-277.
- 30) Y. Nishida, *The Chemical Times*, **2007**, 2-15. http://www.kanto.co.jp/times/t_pdf/CT_204_01.pdf.
- 31) P. B. Stathopoulos, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 7021-7026; M. J. Lindberg, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102, 9754-9759; A. Nordlung, M. Oliverberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103, 10218-20223.
- 32) K. Yamanaka, D. W. Cleaveland, *Neurology*, **2005**, 65, 1859-1860.
- 33) R. Kaye, *et al.*, *Science*, **2003**, 300, 486-489; W. L. Klein, *et al.*, *Neurology Ageing*, **2004**, 25, 569-580.
- 34) Y. Okawamukai, Y. Sutoh, Y. Nishida, *Synth. Reac. Inorg. Metal-org. Nano-metal Chem.*, **2006**, 36, 373-375.
- 35) A. O.-Matsumoto, I. Fridovich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 9010-9014; P. Pasinelli, *et al.*, *Neuron*, **2004**, 43, 19-30.
- 36) H. Kikuchi, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103, 6025-6030.
- 37) F. Cova, *et al.*, *Neuroscience Lett.*, **2006**, 399, 186-190.
- 38) Y. Furukawa, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103, 7148-7153; H.-X. Deng, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103, 7142-7147.
- 39) T. Land, *et al.*, *Neuroscience Lett.*, **2005**, 389, 133-136; C. Ferreira, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 3021-3024.
- 40) Y. Nishida, *Recent Res. Devel. Pure & Appl. Chem.*, **1999**, 3, 103-122.
- 41) 西田雄三, “BSEの化学”, 牧歌舎, 2004.
- 42) 秦千里, 化学と工業, **2007**, 60, 7-11.
- 43) Y. Nishida, “Inorganic-Biochemical Perspectives of Sporadic Prion Diseases”, CIN Press, 2006. ([http://repo.lib.yamagata-u.ac.jp/bitstream/123456789/107/1/ rep.01.pdf](http://repo.lib.yamagata-u.ac.jp/bitstream/123456789/107/1/rep.01.pdf))

(Received Jun. 2007)

執筆者紹介**西田 雄三 (Yuzo Nishida)**

山形大学 理学部 教授

[ご経歴] 1969年3月九州大学大学院理学研究科博士課程中退, 同年4月九州大学理学部助手, 1987年4月山形大学理学部助教授, 1991年4月同教授, 1998年4月分子科学研究所教授(流動部門), 2000年4月山形大学理学部教授, 現在に至る。理学博士。

[ご専門] 錯体化学, 生体無機化学, 脳疾患化学