

## 「神経変性疾患の発症機序及び治療法・治療薬開発に関する研究」

### 【研究概要】

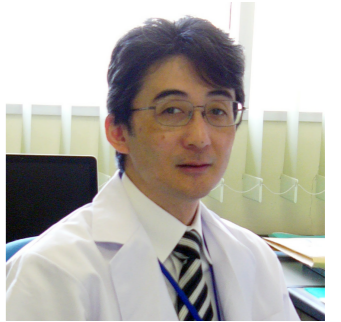
筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis; ALS) は、上位及び下位運動ニューロンの選択的変性を特徴とする進行性の神経変性疾患である。ALS 患者の5～10%は家族性であり、大多数は孤発性である。現在、ALS の発症機序は不明であり、有効な治療法・治療薬はない。疾患に対する効果的な治療法・治療薬を開発するためにも、ALS の発症及び進行の分子機構を解明することは喫緊の課題である。ALS マウスモデル等を用いた分子病態解析により、これまでに酸化ストレス、興奮性毒性、アポトーシス、ミトコンドリア機能異常、ER ストレス、RNA 分子動態の異常、グリア細胞活性化、脳血管系異常、凝集タンパク質の集積、細胞内物質移送異常等、様々な発症並びに疾患進行要因が提唱されてきた。しかし、個別機構のみでALSの発症を説明しようとする試みは全く成功していない。そのため、現在では、ALS は多数の機能的異常が複雑に絡み合って発症するものと想像されているが、実際にはそのような多因子間の相互関連及び各種要因の発症への寄与率等の実態については全く不明である。本研究では、多因子の変調と疾患発症について未だ体系的な解析が全くなされていない現状を打破するため、重要な発症要因の中から、酸化ストレス、タンパク質分解異常、及び細胞内物質移送異常に焦点を絞り、生体レベルでの複数の疾患発症要因の相互関連を明らかにし、最終的にALS 発症の包括的分子機構の解明ならびに治療法の開発を目指す。具体的には、因子間の相互関連及び各種要因の発症への寄与率を明らかにするために、ALS マウスモデルを用いてその疾患発症や進行に影響を与える酸化ストレス、タンパク質分解異常及び細胞内物質移送異常に関与する遺伝子を同定し、ALS 発症及び進行におけるそれぞれの分子の役割を明らかにする。また、同定した遺伝子に着目して、ALS 細胞モデルを用いた分子生物学、生化学及び細胞生物学手法を中心とした解析を遂行し、運動ニューロンの機能異常や変性及び細胞死の背景にある分子メカニズムを明らかにする。

### 【研究成果】

家族性筋萎縮性側索硬化症2型 (2型ALS) は、常染色体劣性遺伝形式を示す家族性ALSの一つである。これまでに、ALS2遺伝子のナンセンス変異、ミスセンス変異、スプライシング受容部位の変異が多数同定されており、遺伝子変異によるALS2タンパク質 (以降ALS2とする) の機能喪失が疾患発症の原因であると考えられている。ALS2は、四量体の多量体を形成し、その構造は低分子量Gタンパク質Rab5の触媒活性 (GEF活性) に必要である。これまでに我々は、数々のALS2変異体の高次構造をゲルろ過クロマトグラフィーにより解析し、ALS2の疾患原因変異によって、四量体の構造がより高次化もしくは、二量体化、単量体化することを報告している。本年度は、イタリア・トリノ大学の研究グループと共同で、AlphaFoldDBを用いてALS2の立体構造を予測し、その構造を基盤にミスセンス変異を持つALS2変異体 (ALS2\_R1611W) の立体構造を予測した。その結果、ALS2\_R1611Wは、自己多量体化する際に必要なALS 2 の立体構造が乱れていることが示唆された (図)。実際に、ゲルろ過クロマトグラフィー—によってALS2\_R1611Wの高次構造を解析した結果、ALS2\_R1611Wは、野生型と比較して正常な四量体としての存在割合が少なく、より高次化しているか、二量体化及び単量体化しており、そのためにRab5に対するGEF活性が著しく低下していると示唆された。次に、ALS2\_R1611Wの高次構造の正常化を目的として、ALS2\_R1611Wに結合し、その立体構造を回復させる化合物をスクリーニングした。その結果、ビタミンKの誘導体であるMK4が候補として同定された。そこで、細胞にALS2\_R1611Wを発現させ、MK4を添加した後にゲルろ過クロマトグラフィーによって高次構造を解析した。その結果、MK4の添加によって、ALS2\_R1611Wの四量体の存在量が増加したことから、MK4はALS2\_R1611Wの四量体形成を補助することが示唆された (図)。また、ALS2の多量体化とその機能について、さらに解析を深めるために、末梢組織と中枢神経系におけるALS2の高次構造を比較した。その結果、脳組織においてALS2は、四量体に加え、さらなる高次化した構造体を形成することが判明した。また、この高次構造は、神経系譜由来の培養細胞においても存在が認められた。よって、ALS2は、神経系において一部は特異的な高次構造を形成すると示唆された。

### 【今後の展望】

in silicoのスクリーニングにより同定されたMK4は、ビタミンKの誘導体であり、骨粗鬆症の改善薬として、また止血剤として汎用されている。MK4によって、ALS2\_R1611Wの立体構造の改善とGEF活性の回復がなされれば、それは、ALS2\_R1611Wを有する患者に対しての治療薬となると期待される。同時に、本研究の結果から、AlphaFoldDBを用いた立体構造予測を基盤としたテララーメイド創薬の足掛かりが示された。今後、ALS2のみならず、ミスセンス変異がタンパク質の立体構造や機能に与える影響を解析することを目的とした研究に応用可能である。また、本研究により中枢神経系において、ALS2が特異的構造体を形成することが示唆された。今後、CryoEMなどを用いてALS2の高次構造解析を進めると共に、中枢神経系におけるALS2の機能を明らかにする。



プロジェクトリーダー：秦野伸二  
*Hadano Shinji*

医学部医学科基礎医学系生体機能学 教授  
医学部 副学部長  
大学院医学研究科 研究科長  
大学院医学研究科脳・神経疾患研究センター センター長  
医学部医学科基礎医学系 学系長

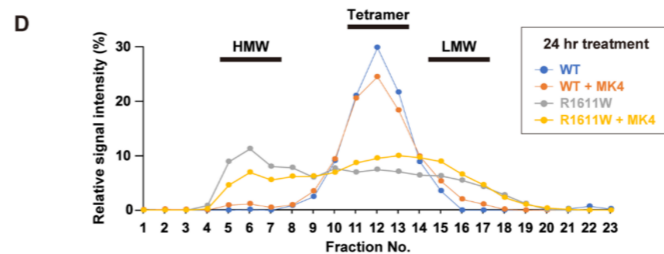
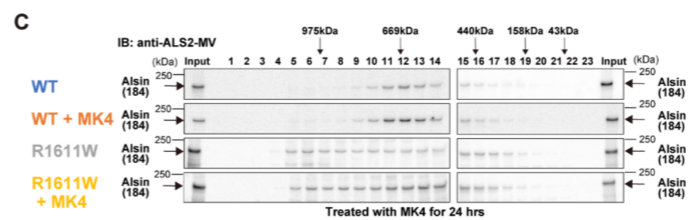
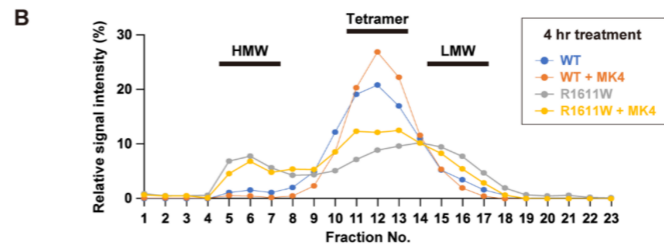
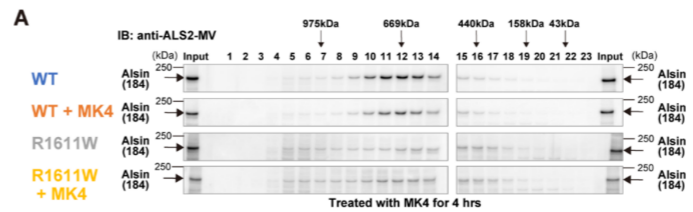
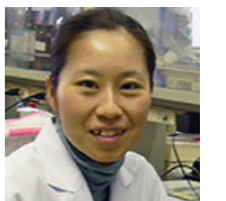


図. ALS2 の高次構造に MK4 の添加が与える影響をゲルろ過クロマトグラフィーによって解析した結果を示す。A, B は MK4 添加 4 時間後、C,D は MK4 添加 24 時間後の結果を示す。WT は ALS2 の野生型、R1611W は、ALS2\_R1611W を示す。660kDa の分子質量マーカーを溶出する画分をピークとして、野生型 ALS 2 が溶出された。よって、ALS2 野生型は、主に 4 量体を形成することが示された。対して、ALS2\_R1611W は、より高次の構造と、2 量体、単量体として存在することが示唆された (A,C)。ウエスタンブロット解析 (A,C) によって得られた結果を定量化し、グラフとして示した (B,D)。MK4 の添加によって、ALS2\_R1611W の 4 量体としての存在量が増加することが示された。



大友麻子  
*Otomo Asako*  
生体機能学 講師

西島恵子 生体機能学 技術職員  
高橋博美 生体機能学 技術補助員  
大野喜美子 生体機能学 技術補助員  
山田優子 生体機能学 事務職員  
山口千沙 MSCO 研究支援ユニット技術職員  
島倉健人 医学研究科 大学院生 博士課程  
村上裕太 工学研究科 大学院生 修士課程  
王 冰冰 工学部 学部生

### Selected Papers,

1. K.Sato, K. Suzuki-Utsunomiya, S. Mitsui, S. Ono, K. Shimakura, A. Otomo, S. Hadano. "Central nervous system specific high molecular weight ALS2/alsin homophilic complex is enriched in mouse brain synaptosomes", Biochemical and Biophysical Research Communications, 638, 168-175 (2023).
2. M. Rossi Sebastiano, G. Ermondi, K. Sato, A. Otomo, S. Hadano, G. Caron. "Personalized Treatment for Infantile Ascending Hereditary Spastic Paralysis Based on In Silico Strategies", Molecules. 27, 7063(2022).
3. S. Mitsui, A. Otomo, K. Sato, M. Ishiyama, K. Shimakura, C. Okada-Yamaguchi, E. Warabi, T. Yanagawa, M. Aoki, HF. Shang,S. Hadano. "SQSTM1, a protective factor of SOD1-linked motor neuron disease, regulates the accumulation and distribution of ubiquitinated protein aggregates in neuron", Neurochemistry International, 158, 105364 (2022).
4. M. Rossi Sebastiano, G. Ermondi, S. Hadano, G. Caron. "AI-based protein structure databases have the potential to accelerate rare diseases research: AlphaFoldDB and the case of IAHS/alsin". Drug Discovery Today, 27, 1652-1660 (2022).