

### *Histological assessment and immunohistochemistry*

Mice were anesthetized with sodium pentobarbital and perfused through the aortic cone with phosphate-buffered saline (PBS), followed with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (PB) at pH 7.4. Brains and spinal cords were removed and post-fixed in the same fixative for 2 h, and then immersed in 20% sucrose in PB overnight at 4°C. The tissue was sectioned at 20  $\mu\text{m}$  on a freezing microtome. For paraffin-embedded section, tissues were transferred to 70% ethanol and embedded in paraffin as described (Ichikawa et al., 1997). Serial brain or spinal cord sections were cut at 5  $\mu\text{m}$ . Sections were stained for Nissl substance with cresyl violet, or Fluoro-Jade B (Chemicon) according to the manufacturer's protocol. For staining of SOD2, SOD1, ChAT, and CHT, paraffin-embedded sections were immunohistochemically processed as described elsewhere (Ichikawa et al., 1997) with diaminobenzidine (DAB) as a chromogen followed by post-staining with hematoxylin. Antibodies used are rabbit polyclonal anti-SOD2 antibody (1:2,000; Stressgen Biotechnologies), rabbit polyclonal anti-SOD1 antibody (1:2,000; Stressgen Biotechnologies), rabbit polyclonal anti-ChAT (1:10,000; Ichikawa et al., 1997), and rabbit polyclonal anti-CHT antibody (50 ng/ml; Misawa et al., 2001). To estimate frequencies of Cre-mediated recombination of the floxed SOD2 alleles, serial paraffin sections were stained with SOD2 and ChAT as above and the number of positive cells were counted. More than 500 cells were analyzed in the spinal cord ventral horn and 200 cells in each of the brainstem motor nucleus (from at least 3 mice at respective age). Double labeling for SOD2 and SMI-32 was performed by immunofluorescence. Sections were

hypoglossal nerve was exposed under the digastric muscle and transected with scissors. After 5 weeks, the animals were re-anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde. The brainstem was removed, 5  $\mu\text{m}$  serial paraffin-embedded sections were prepared and stained with cresyl violet as described above. Hypoglossal motor neurons with distinct clear nuclei in every eighth section (total 8 sections per animal) were counted.

### *Analysis of Wallerian degeneration*

Two days after unilateral transection of hypoglossal nerves as described above, mice were sacrificed by over-dose of sodium pentobarbital, the swollen first 2 mm of the distal nerve was discarded, the next 2 mm was used for morphological analysis, and a segment 4 - 7 mm distal to the lesion site was used for Western blotting. For morphological analysis, the nerve segments were fixed for 1 day in 2% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4 (PB). Samples were treated in 1%  $\text{OsO}_4$  in PB, washed, dehydrated with ethanol and then propylene oxide, and finally embedded in Quetol 812 epoxy resin (Nisshin EM, Tokyo, Japan). Semithin cross-sections (0.5  $\mu\text{m}$ ) for light microscopy were stained with toluidine blue.

### *Electron microscopy*

Animals were perfused with 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 5% sucrose in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4). The brain and spinal cord were removed and postfixed in

heavy chain diluted at 1:3,000 in 5% nonfat skim milk/0.1% Tween 20 in PBS, followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Bio-Rad), and visualized with ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham Pharmacia Biosciences). The same blots were re-probed with monoclonal antibody  $\beta$ -tub 2.1 (1:10,000; Sigma) against  $\beta$ -tubulin. In order to compare SOD2 expression between  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  and  $SOD2^{lox/lox};Cre^{-/-}$  mice, ventral halves of the cervical spinal cord (5-mm length) were micro-dissected, homogenized and processed for immunoblot analysis as described above with rabbit polyclonal anti-SOD2 antibody (1:10,000; Stressgen Biotechnologies), rabbit polyclonal anti-SOD1 antibody (1:10,000; Stressgen Biotechnologies) and mouse monoclonal anti-actin antibody (1  $\mu$ g/ml; Chemicon).

## Results

### *Generation of motor neuron-specific SOD2 knockout mice*

To generate postnatal motor neuron-specific SOD2 knockout mice, we crossed mice homozygous for floxed SOD2 alleles (Ikegami et al., 2002) with VAcHT-Cre.Slow mice in which Cre expression is restricted in postnatal somatomotor neurons (Misawa et al., 2003). The VAcHT-Cre.Fast line was not used in this study because the transgene integrated on the same chromosome as SOD2 (chromosome 17). Double heterozygote animals ( $SOD2^{lox/+};Cre^{slow/-}$ ) were again mated with homozygous floxed SOD2 mice.  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  mice were born at a Mendelian ratio and survived to adulthood with no

these cells under normal physiological conditions. The cytosolic punctate fluorescence of oxidized HEt was more intense in  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  mice compared to  $SOD2^{lox/lox};Cre^{-/-}$  mice in a subset of hypoglossal and spinal cord motor neurons, confirming enhanced production of  $O_2^{\cdot-}$  by mitochondria in  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  mice. On the other hand, this increase in HEt fluorescence was not observed in visceral motor neurons such as the dorsal motor nucleus of the vagus in  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  mice (data not shown).

#### *Normal neurological and neurochemical profile of $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$ mice*

Despite the loss of SOD2 expression and increased superoxide production in motor neurons by 3-months of age (Fig. 2A-F), the number of ChAT-positive motor neurons in the cranial and lumbar spinal cord was not significantly different between  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  and  $SOD2^{lox/lox};Cre^{-/-}$  mice at either 5 or 9 months of age (Fig. 2G). Neither overt cell loss nor vacuolar changes in neurons or neuropil were observed as revealed by Nissl-staining of SOD2-negative motor neurons (Fig. 3A-D). Also analyzed was neuronal degeneration by Fluoro-Jade B (Schmued et al., 1997). No Fluoro-Jade B-positive neurons were detected in brain and spinal cord sections from either  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  or  $SOD2^{lox/lox};Cre^{-/-}$  mice (not shown).

As free radicals are a potential source of damage to cellular constituents such as DNA, lipids and proteins, we evaluated  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  mice for histochemical signs of oxidative injury and stress. Yet SOD2-deficient motor neurons failed to react with any of the following antibodies: anti-SMI-31 monoclonal antibodies (Sternberger Monoclonals) to

spinal motor neurons at the very least.

Finally an ultrastructural analysis of mitochondria in motor neurons was undertaken using electron microscopy. Sections of the facial nucleus and spinal cord from 9-month old  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  and  $SOD2^{lox/lox};Cre^{-/-}$  mice were analyzed. Over 1,000 mitochondria in each brain regions were examined but no degenerative changes such as swelling, disorganization of the cristae or vacuolar formation were observed (n=3 for each genotype; data not shown).

As no obvious phenotype was detected in the cell bodies or organelles of SOD2-deficient motor neurons, we next analyzed the function of axonal processes by looking for muscle denervation and atrophy. Muscle biopsies from  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  mice revealed neither signs of muscle degeneration nor denervation/remodeling of motor axon terminals (Fig. 4). Furthermore, no evidence of reactive gliosis was revealed in  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  mice by GFAP staining (data not shown), despite its presence in the brainstem motor nuclei of SOD2-null mice (Melov et al., 1998; Lynn et al., 2005).

#### *Motor neuron survival after hypoglossal nerve axotomy is unchanged*

Motor neurons in SOD1-deficient mice show an increased vulnerability to facial nerve axotomy despite an otherwise normal phenotype (Reaume et al., 1996). To test whether SOD2-deficient motor neurons are also more vulnerable to nerve injury, we employed unilateral transection of the hypoglossal nerve. Hypoglossal motor neuron survival was then assessed 5 weeks following transection (Fig. 5). Cell number in the axotomized hypoglossal

mitochondrial generated  $O_2^{\cdot-}$  in vivo. In the absence of SOD enzymatic activity,  $O_2^{\cdot-}$  is relatively stable. Other antioxidants such as glutathione, ascorbate and tocopherols are relatively inefficient in removing superoxide radicals, and spontaneous dismutation occurs only very slowly. Because a portion of enzymatically active SOD1 is detected in the mitochondrial intermembranous space (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001; Mattiazzi et al., 2002; Okado-Matsumoto and Fridovich, 2002), we speculate that, although the physiological functions of SOD1 in the mitochondria are not fully understood, some SOD2 function is compensated by SOD1 potentially by removing  $O_2^{\cdot-}$  generated from complex III (Han et al., 2001). And although we did not detect SOD1 up-regulation in SOD2-deficient motor neurons (Fig. 3E and F), endogenous levels of mitochondrial SOD1 may be sufficient to prevent both  $O_2^{\cdot-}$ -induced mitochondrial injury and  $O_2^{\cdot-}$  release from mitochondria to cytosol. The physiological role and possible compensation of SOD2 loss by SOD1 can be addressed in future studies by crossing  $SOD2^{lox/lox}; Cre^{slow/-}$  mice to a SOD1-null background.

Motor neurons in the SOD1-deficient mice are vulnerable to axotomy-induced oxidative burden (Reaume et al., 1996). In the present study, we have analyzed the effect of nerve transection on motor neurons lacking SOD2 expression. We demonstrate here that neuronal survival after axotomy is not affected, but that disorganization of distal nerve axons is accelerated in the SOD2-deficient motor neurons. Thus loss of SOD2 function is insufficient to kill transected motor neurons, but does trigger more rapid motor axon degeneration after nerve injury. Although we don't yet understand the mechanism underlying the observed accelerated disorganization, we speculate that abnormal

(nNOS) is increased in astrocytes surrounding motor neurons in the spinal cord and brainstem (Cha et al., 1998). Also increased nitrotyrosine labeling in motor neurons and in the ventral horn has been reported in ALS and mutant SOD1-expressing mouse models (Abe et al., 1995; Beal et al., 1997; Ferrante et al., 1997; Cha et al., 2000). In the present study we did not find any nitrotyrosine immuno-positive cells in the brain and spinal cord of 9-month old SOD2<sup>lox/lox</sup>;Cre<sup>slow/-</sup> mice. Furthermore, neither signs of reactive gliosis (GFAP-IR) nor peroxynitrite-mediated oxidative damage (nitrotyrosine-IR) in astrocytes surrounding SOD2-deficient motor neurons were evident. We speculate that elevated levels of O<sub>2</sub><sup>·-</sup> in motor neurons is not by itself enough to trigger chronic cell injury, but NO produced from neighboring astrocytes resulting in peroxynitrite production may be a further requirement to trigger ROS-induced toxicity.

Axonal disorganization and reduced slow axonal transport are well-known hallmarks of ALS. Although our present results indicate that loss of SOD2 function is not by itself sufficient to kill motor neurons in vivo, it does modify axonal susceptibility to nerve injury. Recently Vande Velde et al. (2004) reported that Wld<sup>s</sup> protein, the dominant neuroprotective factor that markedly delays Wallerian axonal degeneration after nerve injury, does not prevent SOD1-mediated motor neuron loss when introduced the Wld<sup>s</sup> mutation into the SOD1<sup>G37R</sup> or SOD1<sup>G85R</sup> ALS mouse models. These results show that inhibiting axonal degeneration is not effective to ameliorate ALS pathogenesis induced by the mutant SOD1 protein.

Although the precise pathologic role of O<sub>2</sub><sup>·-</sup> in motor neuron degeneration remains to be fully clarified, the present study is consistent with the possible involvement of nonneuronal cells in mitochondrial-derived, superoxide-induced injury in motor neurons. Thus a rational

Andreassen, O.A., Ferrante, R.J., Klivenyi, P., Klein, A.M., Shinobu, L.A., Epstein, C.J., Beal, M.F., 2000. Partial deficiency of manganese superoxide dismutase exacerbates a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 47, 447-55.

Beal, M.F., 1996. Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 661-666.

Beal, M.F., Ferrante, R.J., Browne, S.E., Matthews, R.T., Kowall, N.W., Brown, R.H.Jr., 1997. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 42, 644-654.

Beckman, J.S., Carson, M., Smith, C.D., Koppenol, W.H., 1993. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 364, 584.

Bendotti, C., Carri, M.T., 2004. Lessons from models of SOD1-linked familial ALS. *Trends Mol. Med.* 10, 393-340.

Bindokas, V.P., Jordan, J., Lee, C.C., Miller, R.J., 1996. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J. Neurosci.* 16, 1324-1336.

Bruijn, L.I., Becher, M.W., Lee, M.K., Anderson, K.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G.,



1271-1279.

Ferrante, R.J., Shinobu, L.A., Schulz, R.T., Matthews, R.T., Thomas, C.E., Kowall, N.W., Gurney, M.E., Beal, M.F., 1997. Increased 3-nitrotyrosine and oxidative damage in mice with a human copper/zinc superoxide dismutase mutation. *Ann. Neurol.* 42, 326-334.

Gong, Y.H., Parsadanian, A.S., Andreeva, A., Snider, W.D., Elliott, J.L., 2000. Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J. Neurosci.* 20, 660-665.

Han, D., Williams, E., Cadenas, E., 2001. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem. J.* 353, 411-416.

Hjalmarsson, K., Marklund, S.L., Engstrom, A., Edlund, T., 1987. Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 6340-6344.

Howland, D.S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N.J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., DeGennaro, L.J., Cleveland, D.W., Rothstein, J.D., 2002. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 1604-1609.

9782-9787.

Li, Y., Huang, T-T., Carlson, E.J., Melov, S., Ursell, P.C., Olson, J.L., Noble, L.J., Yoshimura, M.P., Berger, C., Chan, P.H., Wallace, D.C., Epstein C.J., 1995. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature Genet.* 11, 376-381.

Lino, M.M., Schneider, C., Caroni, P., 2002. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J. Neurosci.* 22, 4825-4832.

Lynn, S., Huang, E.J., Elchuri, S., Naeemuddin, M., Nishinaka, Y., Yodoi, J., Ferriero, D. M., Epstein, C.J., Huang, T-T., 2005. Selective neuronal vulnerability and inadequate stress response in superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 817-828.

Mack, T.G. A., Reiner, M., Beirowski, B., Mi, W., Emanuelli, M., Wagner, D., Thomson, D., Gillingwater, T., Court, F., Conforti, L., Fernando, F.S., Tarlton, A., Andressen, C., Addicks, K., Magni, G., Ribchester, R.R., Perry, V.H., Coleman, M.P., 2001. Wallerian degeneration of injured axons and synapses is delayed by a Ube4b/Nmnat chimeric gene. *Nature Neurosci.* 4, 1199-1206.

Marklund S.L., 1982. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular

Murakami, K., Kondo, T., Kawase, M., Li, Y., Sato, S., Chen, S.F., Chan, P.H., 1998. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J. Neurosci.* 18, 205-213.

Nagai, M., Aoki, M., Miyoshi, I., Kato, M., Pasinelli, P., Kasai, N., Brown, R.H.Jr., Itoyama, Y., 2001. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J. Neurosci.* 21, 9246-9254.

Okado-Matsumoto, A., Fridovich, I., 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. *J. Biol. Chem.* 276, 38388-38393.

Okado-Matsumoto, A., Fridovich, I., 2002. Amyotrophic lateral sclerosis: A proposed mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 9010-9014.

Pramatarova, A., Laganiere, J., Roussel, J., Brisbois, K., Rouleau, G.A., 2001. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J. Neurosci.* 21, 3369-3374.

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., Snider, W.D., 1996.

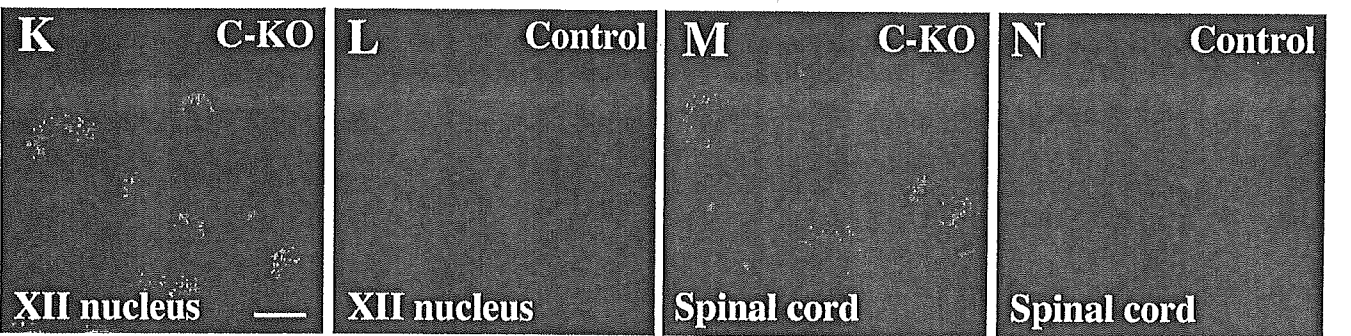
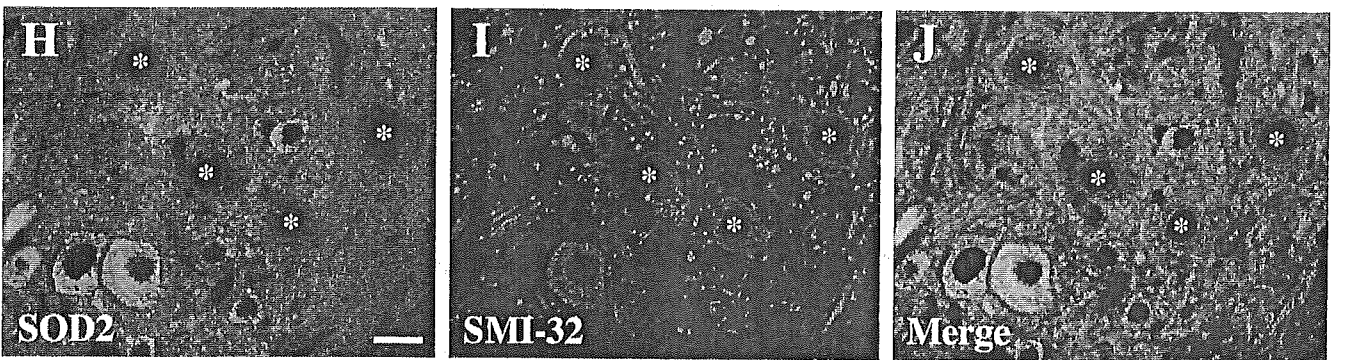
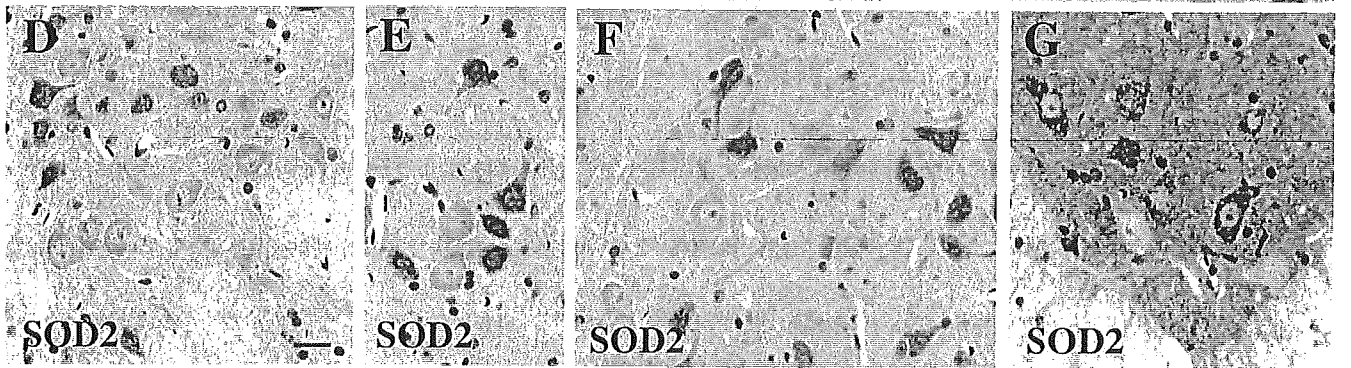
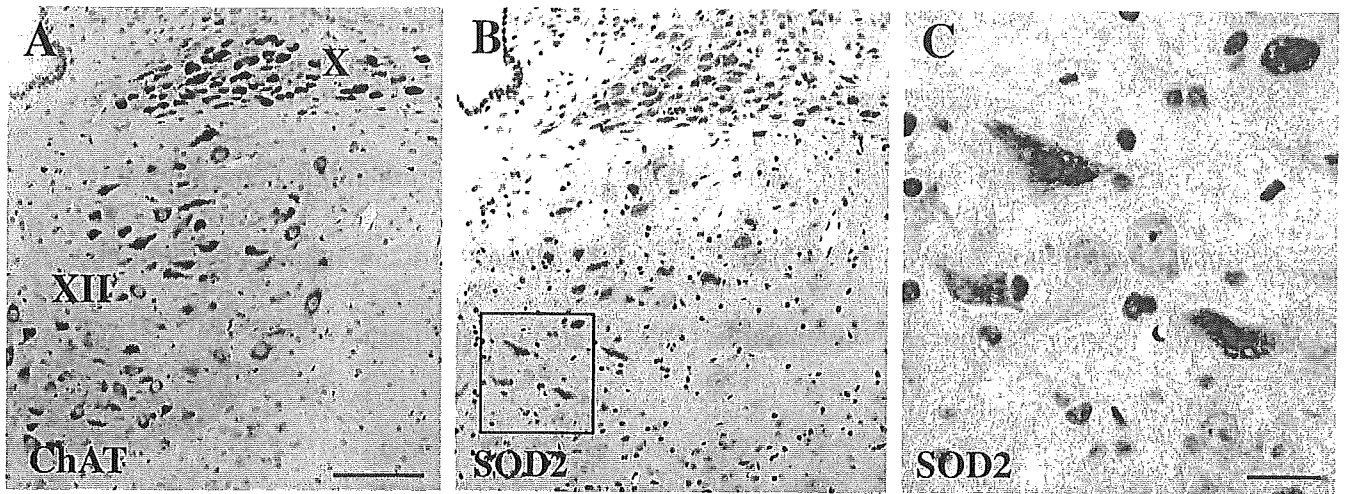
## Figure legends

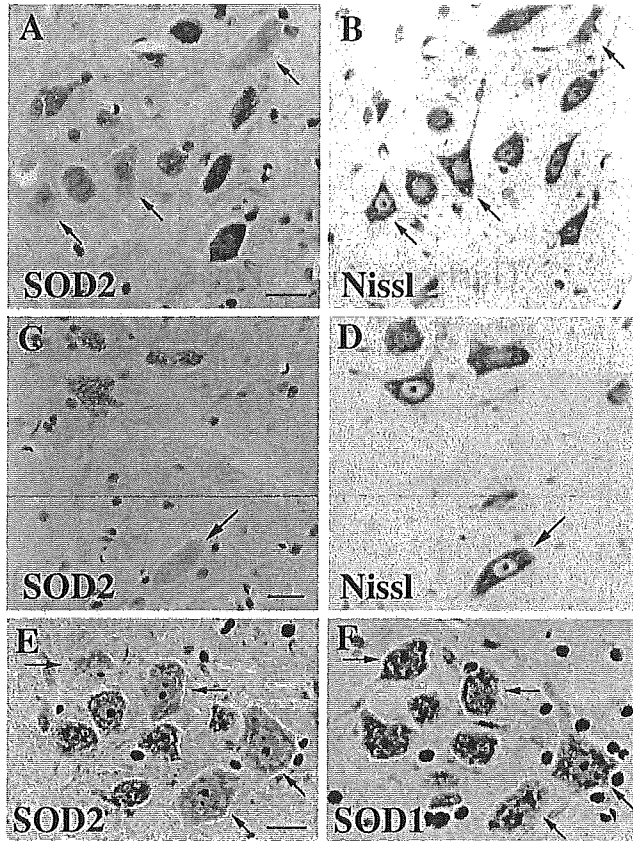
Fig. 1. Loss of SOD2 immunoreactivity in motor neurons from  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  mice. (A-G) Paraffin-embedded sections of brain and spinal cord from  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  mice at 5-months old stained with anti-ChAT antibody (A) or anti-SOD2 antibody (B-G). SOD2-immunoreactivity was lost in a subset of ChAT-positive somatomotor neurons as revealed by serial section through the hypoglossal nuclei (A, B and C) as well as sections through the oculomotor (D), abducens (E), facial (F) nuclei, and the ventral horn of the spinal cord (G). Note that SOD2 immunoreactivity was preserved in visceromotor neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus (B). X, dorsal motor nucleus of the vagus; XII, hypoglossal nucleus. The boxed area in B is enlarged in C. (H-J) Paraffin-embedded sections from the ventral horn of the spinal cord were double-stained by immunofluorescence with anti-SOD2 (H) and anti-SMI-32 (I) antibodies. The merged image is shown in J. SOD2 immunoreactivity was lost in a subset of SMI-32-positive large motor neurons (denoted by asterisks) but not in SMI-32-negative small-diameter interneurons. (K-N) Mitochondrial production of  $O_2^{\cdot -}$  was increased in  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  (C-KO) mice compared with  $SOD2^{lox/lox};Cre^{-/-}$  (Control) mice in motor neurons in the hypoglossal nucleus (K and L) and ventral horn of the spinal cord (M and N) as revealed by HEt oxidation. HEt signals were detected in motor neurons as small granular particles in the cytosol, indicating mitochondrial production of  $O_2^{\cdot -}$  under normal physiological conditions. Scale bars = 100  $\mu m$  (A; also applies to B); 20  $\mu m$  (C); 20  $\mu m$  (D; also applies to E-G); 20  $\mu m$  (H; also applies to I, J); 20  $\mu m$  (K; also applies to L, M, N).

Fig. 4. Absence of muscle atrophy and denervation/remodeling of endplates in  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  mice. Serial cryo-sections of gastrocnemius muscle from a 9-month old  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  mouse stained with hematoxylin and eosin (A) or Gomori-trichrome (B). Paraffin-embedded sections (5  $\mu$ m) of diaphragm muscle containing neuromuscular junction from 9-month old  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  mice stained with an anti-CHT antibody followed by counter-staining with hematoxylin (C). Scale bar = 20  $\mu$ m.

Fig. 5. Nissl-staining of hypoglossal motor neurons 5 weeks after axotomy in  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  (A) and  $SOD2^{lox/lox};Cre^{-/-}$  (B) mice. Arrows indicate the operated side. CC, Central canal; X, dorsal motor nucleus of the vagus; XII, hypoglossal nucleus. Scale bar = 100  $\mu$ m. (C) Number of neurons in hypoglossal nuclei (uncut control or axotomized operated side) from both  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  and  $SOD2^{lox/lox};Cre^{-/-}$  mice (n = 4 for each genotype).

Fig. 6. Accelerated axonal disorganization in  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  mice after motor nerve injury. (A) Western blot of 200-kDa neurofilament protein (NF-200) demonstrating the extent of degeneration 2 days after nerve transection in the distal transected hypoglossal nerve (Axotomy) or corresponding contralateral uncut nerve (Uncut). The blot was re-probed with control monoclonal antibody ( $\beta$ -tub 2.1) against  $\beta$ -tubulin. Samples from three  $SOD2^{lox/lox};Cre^{slow/-}$  and two  $SOD2^{lox/lox};Cre^{-/-}$  control mice are shown. (B) Representative toluidine blue-stained sections of hypoglossal nerves 2-4 mm distal to the lesion site 2 days after transection or corresponding contralateral uninjured nerve. Scale bar = 20  $\mu$ m.





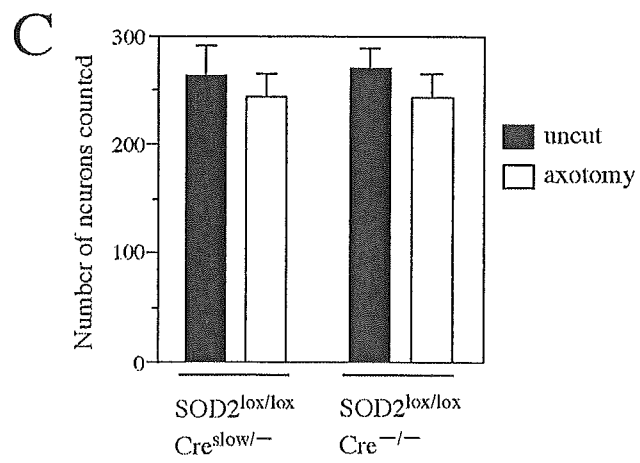
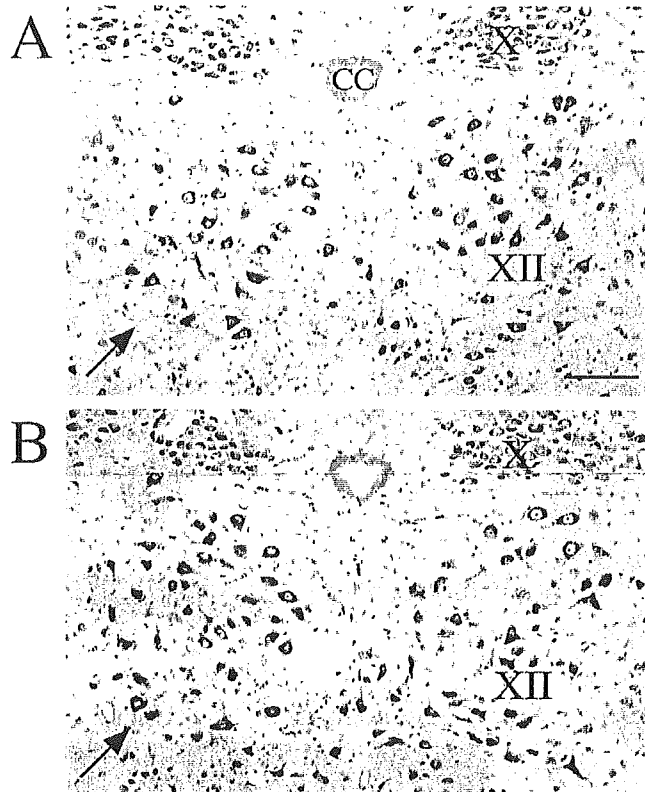
G

Control  
C-KO

SOD2 —

SOD1 —

actin —





# BIOLOGY TOPICS

## コンフォメーション病のしくみ

きむ よんじょん たかはし りょうすけ  
■ 金 然正<sup>1)</sup> ・ 高橋 良輔<sup>2)</sup>

- 1) 独立行政法人理化学研究所 BSI 運動系神経変性研究チーム
- 2) 京都大学大学院医学研究科 脳病態生理学講座



金 然正  
1992年(韓国)中央大学産業科学部卒業。2001年東京大学大学院医学系研究科修了, 03年東京大学理学部助手, 03年~理化学研究所BSI研究員, 現在に至る。研究テーマは神経変性疾患における変異タンパク質の凝集機構。趣味は水泳。

Key words : コンフォメーション病, 神経変性疾患, 凝集, 封入体, タンパク質品質管理システム

### Abstract

病変組織における異常タンパク質の凝集及び蓄積は神経変性疾患の共通の病理所見である。凝集の主な原因は遺伝子の変異によるタンパク質の構造異常であるが、細胞内には分子シャペロンとユビキチン・プロテアソームなどのタンパク質の品質管理システムがあり、タンパク質の機能を安定に保つための働きをしている。老化に伴う細胞ストレスはタンパク質の凝集を促進させる原因の一つであり、神経変性疾患のしくみは原因タンパク質の凝集し易い構造とそれを制御するタンパク質品質管理システムの駆け引きであろう。

### はじめに

1997年, CarrellとLomasにより提唱されたコンフォメーション病(フォールディング病)とは、病変組織に異常タンパク質が凝集し、封入体を形成する疾患の総称である。コンフォメーション病は神経系, 免疫系, 内分泌系, 循環系, 心筋・骨格筋系などに幅広く存在する。特に神経系においては、日本でも発症が

報告され話題となった狂牛病(プリオン病)を始め、パーキンソン病やアルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などのいわゆる神経変性疾患で、神経細胞内外のさまざまな封入体の存在が共通の病理所見として知られている。神経変性疾患の原因は長年不明であったが、近年の研究結果から、原因タンパク質が構造異常により不溶化し凝集物を形成していく過程で、細胞死を引き起こすのではないかと考えられている。本稿ではタンパク質の立体構造, 分解, 凝集のプロセスに注目し、コンフォメーション病としての神経変性疾患の病理形成機序について論じたい。

### 1. タンパク質のフォールディングと凝集

蛋白質はアミノ酸が直線状につながった高分子の“ひも”である。1950年代のアンフィンセン, C. (1972年ノーベル化学賞受賞)に

Mechanism for Conformational Diseases : Yeon-Jeong Kim , Ryosuke Takahashi , 1)RIKEN, Brain Science Institute , Lab for Motor System Neurodegeneration , 2)Kyoto University, Graduate School of Medicine, Department of Neurology

よるリボヌクレアーゼAの可逆的な変性及び再生実験で示されたように、タンパク質が本来の機能を果たすためには、正しく折りたたまれ、特定の立体構造を持たなければならない。タンパク質は、構成アミノ酸の配列が持つ情報に基づき折りたたまれ、特定の立体構造を形成する。タンパク質によっては、翻訳後修飾など、配列情報が複雑であり上手く折りたたまれないものもある。このようなタンパク質の折りたたみ（フォールディング）は分子シャペロンと呼ばれるタンパク質ファミリーがつかさどっており、タンパク質の正しいフォールディングを助けている。

タンパク質の立体構造は流動性（ダイナミクス）を持っており、条件に応じ、その構造は変化する。可溶性タンパク質の多くでは、親水性アミノ酸残基は立体構造の外側に、疎水性アミノ酸残基は内側に分布しており、水溶液中において安定に機能している。しかし、熱、酸化物の蓄積などのストレスにより、タンパク質の立体構造は崩壊し易く、内側の疎水性アミノ酸残基が露出され凝集してしまう。また、タンパク質の働きそのものにより、疎水性アミノ酸残基が露出される恐れがある。球脊髄性筋萎縮症（Spinal and Bulbar Muscular Atrophy）の場合、アンドロゲン受容体（AR）の遺伝子にCAGトリプレットリピートの過剰伸長(>35CAGs)が原因とされ、変異ARは伸長したグルタミン残基を持つ。ARは、非活性の時には、Hsp90というシャペロン分子が結合しており、安定な構造を取っているが、リガンド（テストステロン）と結合すると、Hsp90から離れ、構造が不安定になり凝集する。すなわち、変異ARはリガンド依存的に凝集するのである。

凝集したタンパク質を電子顕微鏡下で観察

してみると、その形態もタンパク質によってさまざまであるが、その中には規則性を持つ線維も存在する。この線維はアミロイド線維と呼ばれ、アルツハイマー病で見られる老人斑の内部構造と類似である。試験管内において、アミロイド様線維構造を形成するタンパク質は数多く、アルツハイマー病のA $\beta$ ペプチド、狂牛病の変異プリオン、パーキンソン病の $\alpha$ -synuclein、家族性アミロイドポリニューロパチーの変異 transthyretin、家族性筋萎縮性側索硬化症の変異 superoxide dismutase 1 (SOD1)などが報告されている。アミロイド線維は主に $\beta$ シート構造であり、Congo redやThioflavin Tのような色素と結合する性質を持つ。狂牛病の場合、正常プリオンは主に $\alpha$ ヘリックス構造だが、異常プリオンに感染されると $\beta$ シート構造に変換（ $\alpha \rightarrow \beta$ 転移）されることが知られている。このような $\alpha \rightarrow \beta$ 転移は生物学的にも興味深い反応である。

## 2. タンパク質のアンフォールディングと生体内の凝集制御

試験管内でタンパク質を凝集させることは比較的容易であり、一定の条件を満たせば、後は待つのみでよい。タンパク質の多くは熱するだけでも容易に凝集物を形成することができる。生理的条件のバッファー系において、アミロイド様凝集物を作るための基本原理はタンパク質を部分的に変性（アンフォールディング）させる、何らかの条件を探ることである。コンフォメーション病の原因タンパク質は多く変異タンパク質であるため、野生型に比べ、アンフォールドしやすい。要するに、変異タンパク質は野生タンパク質より凝集しやすい立体構造を持つ。しかし、生体内にお

いて凝集物の蓄積を観察するための実験モデルを作るのは容易ではない。家族性筋萎縮性側索硬化症の原因タンパク質である、SOD1を培養細胞に発現させてみると、変異SOD1のタンパク質レベルは野生型に比べ低く、半減期も短い。最近の報告によると、SOD1はユビキチン・プロテアソーム系により分解されるという。それでは、どのようにして細胞は野生型と変異SOD1を見分けているのだろうか。その機序は変異SOD1の立体構造に起因する。変異SOD1は立体構造が不安定なため、細胞内でシャペロンHsc70と複合体を形成している。Hsc70のC-末端にはCHIP(carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein)と呼ばれるE3ユビキチン連結酵素が結合し、異常構造のSOD1をユビキチン化することが判明した。すなわち、CHIPはシャペロン依存的ユビキチン化のE3であり、シャペロンを介し変異SOD1の分解を助け、凝集を抑制する

と考えられる。最近の報告では、CHIPは変異tauやパーキンの気質の一つであるパエル受容体の分解にも関与することが明らかになった。

ユビキチン・プロテアソーム系に破綻をきたすことが病因として考えられる神経変性疾患の代表として、家族性パーキンソン病の一病型である常染色体劣性若年性パーキンソニズム(AR-JP)が挙げられる。AR-JPの原因遺伝子産物、パーキンはRING-finger型のユビキチン連結酵素である。この発見により、AR-JPがユビキチン・プロテアソーム系の破綻によって発症することが判明された。さらに、パーキンのN-末端に存在するユビキチンホモロジドメインが、26SプロテアソームのRpn10サブユニットと結合すること、そしてこの相互作用の破綻によってもAR-JPが発症することが報告された。これらのことから、コンフォメーション病におけるタンパク質の

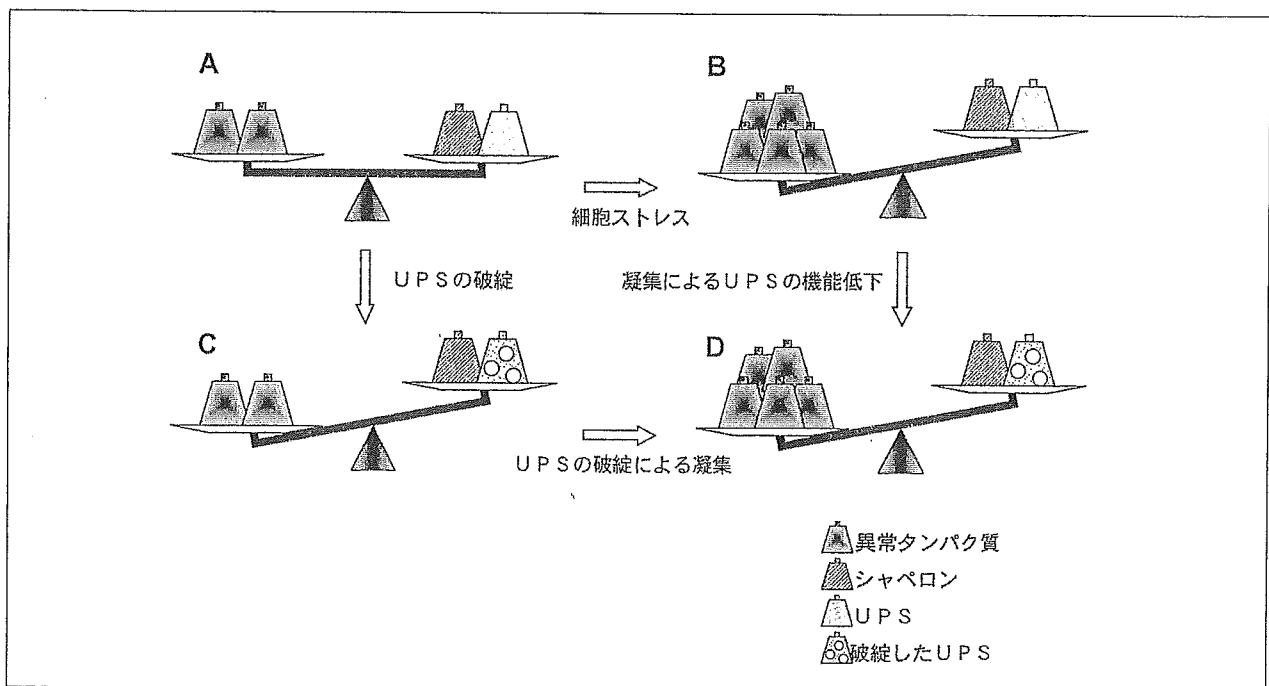


図1 異常タンパク質の凝集。細胞内の異常タンパク質のレベルはシャペロンやユビキチン・プロテアソームシステム(UPS)の働きにより均衡を保つ(A)。酸化ストレスなどの細胞ストレスにより異常タンパク質のレベルがタンパク品質管理システムを上回り(B)、UPSの機能障害を引き起こす。UPSの破綻(C)により、異常タンパク質が凝集する(D)。

凝集は原因となる異常タンパク質のレベルがシャペロンやプロテアソームなどのタンパク質品質管理システムを上回る結果であることが考えられる (図1)。

一方、タンパク質の凝集に影響するもう一つの要因は酸化ストレスや小胞体ストレスなどの細胞ストレスである。孤発性のALSとパーキンソン病においても酸化ストレスの関与が従来から報告されている。培養細胞を用いた実験において、過酸化水素水の処理により、異常タンパク質が凝集し、蓄積することが報告され、酸化ストレスが変異タンパク質のアンフォールディングを促進させることが原因の一つとして考えられている。さらに、凝集タンパク質を含む細胞が酸化ストレスに対する脆弱性を持つという報告が多い。最近では、抗酸化機能を持つDJ-1の変異が若年性パーキンソン病の原因として新たに発見された。

### 3. 封入体とアグリソーム

コンフォメーション病の共通の病理所見である封入体は、アルツハイマー病では老人斑および神経原線維変化、パーキンソン病ではLewy body、ポリグルタミン病では核内封入体、孤発性のALSでは、Bunina 小体など、さまざまである。また、SOD1に変異のある家族性ALSでは、前角運動ニューロンなどの細胞質にLewy body-like hyaline inclusionが認められ、抗SOD1抗体染色で陽性である。これらのことは原因タンパク質の凝集が封入体の核または本体を形成している可能性を示唆している。さらに、封入体はユビキチンやシャペロン、プロテアソームの抗体染色においても陽性で、凝集タンパク質がこれらの因子を巻き込んで、長い期間にわたり、成長したも

のとして考えられている。

近年、封入体形成の機構に関し、逆行性輸送のモータータンパク質であるダイニン複合体が凝集タンパク質を中心体を集積させるという新たな研究結果が報告された。プロテアソームを阻害した際に出現する、中心体を集積したタンパク質の凝集物はアグリソームと名づけられた。アグリソームは、ユビキチン、プロテアソーム、シャペロンなどの抗体染色に陽性反応を示しており、コンフォメーション病で見られる封入体と類似のものとして考えられ、病的封入体の産生経路にダイニンモーターが関与しているのではないかと推測される。また、逆行性輸送を阻害し、アグリソームの形成を抑えると、細胞が死に至ることが見い出され、アグリソームは凝集タンパク質の毒性に対する防御機構の一つではないかと考えられるようになった。さらに、ArrasateとFinkbeinerらは、自動化した蛍光顕微鏡を用い、伸張したポリグルタミン残基を持つ蛍光タンパク質の動態を連続的に観察した。その結果、核内封入体を持っていない細胞が細胞封入体を持っている細胞に比べ細胞死を起こしやすい傾向を明らかにした。細胞間で、封入体形成の差が生じるメカニズムは不明であるが、封入体の形成が細胞防御機構の一つである可能性が示唆された。

### 4. 凝集タンパク質の細胞毒性

凝集タンパク質が持つ細胞毒性やタンパク質の凝集による細胞死のメカニズムに関してはaxonal transportの物理的障害、シャペロンやプロテアソームを凝集体に巻き込むことによる、タンパク品質管理システムの崩壊、カルシウム代謝やリン酸化システムのかく乱、