

- 32 Murata, S., et al. (2001). CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep* 2, 1133–1138.
- 33 Ballinger, C.A., et al. (1999). Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol* 19, 4535–4545.
- 34 Kalia, S.K., et al. (2004). BAG5 inhibits parkin and enhances dopaminergic neuron degeneration. *Neuron* 44, 931–945.
- 35 Sato, S., et al. (2006). 14-3-3eta is a novel regulator of parkin ubiquitin ligase. *EMBO J* 25, 211^t–221.
- 36 Zhong, L., et al. (2005). RING finger ubiquitin-protein isopeptide ligase Nrdp1/FLRF regulates parkin stability and activity. *J Biol Chem* 280, 9425–9430.
- 37 Imai, Y. and Takahashi, R. (2004). How do Parkin mutations result in neurodegeneration? *Curr Opin Neurobiol* 14, 384–389.
- 38 Huynh, D.P., et al. (2003). The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI. *Hum Mol Genet* 12, 2587–2597.
- 39 Chung, K.K., et al. (2001). Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med* 7, 1144–1150.
- 40 Shimura, H., et al. (2001). Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 293, 263–269.
- 41 Ren, Y., Zhao, J. and Feng, J. (2003). Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J Neurosci* 23, 3316–3324.
- 42 Corti, O., et al. (2003). The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 12, 1427–1437.
- 43 Imai, Y., et al. (2001). An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 105, 891–902.
- 44 Tsai, Y.C., et al. (2003). Parkin facilitates the elimination of expanded polyglutamine proteins and leads to preservation of proteasome function. *J Biol Chem* 278, 22044–22055.
- 45 Staropoli, J.F., et al. (2003). Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron* 37, 735–749.
- 46 Choi, P., et al. (2003). SEPT5_v2 is a parkin-binding protein. *Brain Res Mol Brain Res* 117, 179–189.
- 47 Jiang, H., et al. (2004). Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis. *Hum Mol Genet* 13, 1745–1754.
- 48 Ko, H.S., et al. (2006). Identification of far upstream element-binding protein-1 as an authentic Parkin substrate. *J Biol Chem* 281, 16193–16196.
- 49 Um, J.W., et al. (2006). Parkin ubiquitinates and promotes the degradation of RanBP2. *J Biol Chem* 281, 3595–3603.
- 50 Zeng, Z., et al. (1997). A novel endothelin receptor type-B-like gene enriched in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 233, 559–567.
- 51 Donohue, P.J., et al. (1998). A human gene encodes a putative G protein-coupled receptor highly expressed in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 54, 152–160.
- 52 Marazziti, D., et al. (2004). Altered dopamine signaling and MPTP resistance in mice lacking the Parkinson's disease-associated GPR37/parkin-associated endothelin-like receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 10189–10194.
- 53 Mori, K. (2000). Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 101, 451–454.
- 54 Meusser, B., et al. (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* 7, 766–772.
- 55 Johnston, J.A., Ward, C.L. and Kopito, R.R. (1998). Aggresomes: a cellular response to

- misfolded proteins. *J Cell Biol* 143, 1883–1898.
- 56 Nakagawa, T., et al. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98–103.
- 57 Urano, F., et al. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664–666.
- 58 Yang, Y., et al. (2003). Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron* 37, 911–924.
- 59 Kitao, Y., et al. (2007). Pael receptor induces death of dopaminergic neurons in the substantia nigra via endoplasmic reticulum stress and dopamine toxicity, which is enhanced under condition of Parkin inactivation. *Hum Mol Genet.* 16, 50–60.
- 60 LaVoie, M.J., et al. (2005). Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nat Med* 11, 1214–1221.
- 61 Dong, Z., et al. (2003). Dopamine-dependent neurodegeneration in rats induced by viral vector-mediated overexpression of the parkin target protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 12438–12443.
- 62 Engelender, S., et al. (1999). Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat Genet* 22, 110–114.
- 63 Quevillon, S., et al. (1999). Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein. *J Mol Biol* 285, 183–195.
- 64 Greene, J.C., et al. (2003). Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 4078–4083.
- 65 Pesah, Y., et al. (2004). *Drosophila* parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. *Development* 131, 2183–2194.
- 66 Goldberg, M.S., et al. (2003). Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 278, 43628–43635.
- 67 Itier, J.M., et al. (2003). Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Genet* 12, 2277–2291.
- 68 Von Coelln, R., et al. (2004). Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 10744–10749.
- 69 Perez, F.A. and Palmiter, R.D. (2005). Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 2174–2179.
- 70 Valente, E.M., et al. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304, 1158–1160.
- 71 Clark, I.E., et al. (2006). *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441, 1162–1166.
- 72 Park, J., et al. (2006). Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441, 1157–1161.
- 73 Yang, Y., et al. (2006). Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 10793–10798.
- 74 Palacino, J.J., et al. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 279, 18614–18622.
- 75 Perez, F.A., Curtis, W.R. and Palmiter, R.D. (2005). Parkin-deficient mice are not more sensitive to 6-hydroxydopamine or methamphetamine neurotoxicity. *BMC Neurosci* 6, 71.
- 76 Haywood, A.F. and Staveley, B.E. (2004). Parkin counteracts symptoms in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci* 5, 14.
- 77 Petrucelli, L., et al. (2002). Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron* 36, 1007–1019.
- 78 Omura, T., et al. (2006). A ubiquitin ligase HRD1 promotes the degradation of Pael

- receptor, a substrate of Parkin. *J Neurochem.* 99, 1456–1469.
- 79 Darios, F., et al. (2003). Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum Mol Genet* 12, 517–526.
- 80 Rosen, K.M., et al. (2006). Parkin protects against mitochondrial toxins and beta-amyloid accumulation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 281, 12809–12816.
- 81 Klein, R.L., et al. (2006). Parkin is protective for substantia nigra dopamine neurons in a tau gene transfer neurodegeneration model. *Neurosci Lett* 401, 130–135.
- 82 Menendez, J., et al. (2006). Suppression of Parkin enhances nigrostriatal and motor neuron lesion in mice over-expressing human-mutated tau protein. *Hum Mol Genet* 15, 2045–2058.
- 83 Vercammen, L., et al. (2006). Parkin protects against neurotoxicity in the 6-hydroxydopamine rat model for Parkinson's disease. *Mol Ther* 14, 716–723.
- 84 Lo Bianco, C., et al. (2004). Lentiviral vector delivery of parkin prevents dopaminergic degeneration in an alpha-synuclein rat model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 17510–17515.

第7章

プログラム細胞死と神経変性疾患

高橋良輔, 王 華芹, 小林芳人

アルツハイマー病やパーキンソン病に代表される神経変性疾患はおしなべて、構造の異常なタンパク質の蓄積によるコンフォメーション病であるとの考えが有力になってきた。遺伝的、または後天的要因によって構造異常を生じたタンパク質は凝集し、不溶化して蓄積する。タンパク質蓄積の下流ではミトコンドリア障害、小胞体ストレス、酸化ストレスなどが誘発されて、機能障害を経て細胞死が起こるらしい。アポトーシス阻害タンパク質などによるカスパーゼ阻害は神経変性疾患の動物モデルにおいて一定の治療的効果は認められるが、治癒に至らしめた例はない。異常タンパク質蓄積から細胞死に至る経路は複数あり、その正確な理解が治療法開発に結びつくものと考えられる。

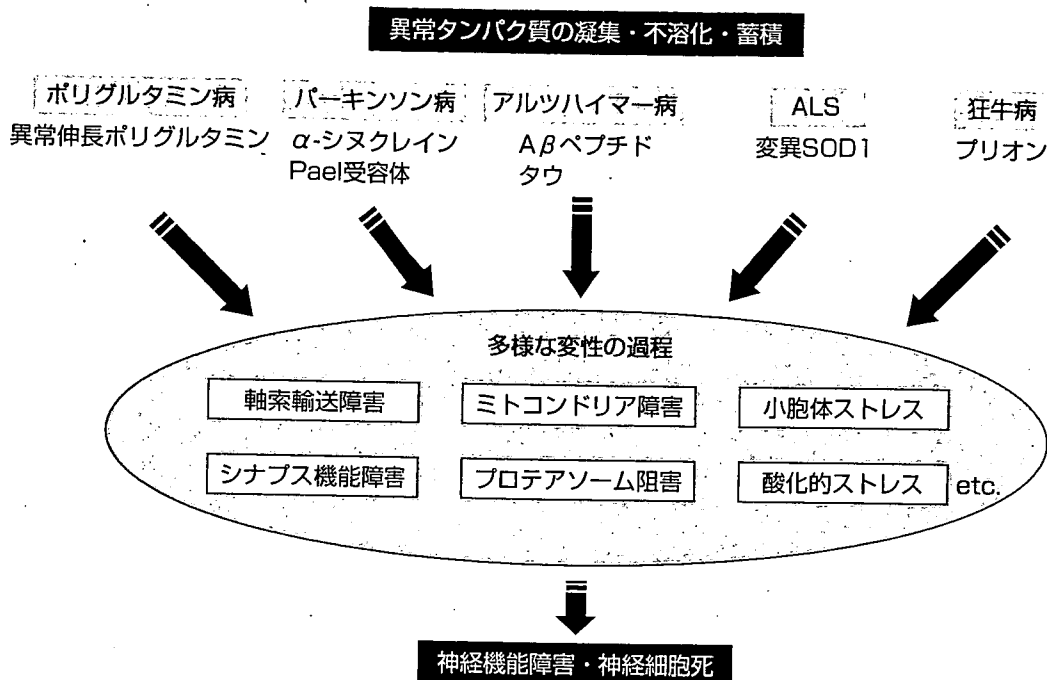
関連UP TO DATE トピックス 18, 19, 20

■ はじめに

神経変性疾患は、炎症、代謝異常、中毒、栄養欠乏、薬剤などの既知の原因によらず中枢神経系のある神経系だけが選択的に細胞死を起こし、重篤な進行性の障害を引き起こす遺伝性または非遺伝性の疾患群を指す。認知症の原因となるアルツハイマー病、運動障害を主徴とするパーキンソン病などが代表的な疾患で、両疾患の患者数は日本だけで優に百万人を超える。また神経変性疾患は介護者に非常に負担がかかるという点、しかも一般に高齢者に多いという特徴がある点から、高齢化の進む現在、上昇の一途をたどる社会経済的コストの面からもその病因を解明して治療法を確立することは急務である。

神経変性疾患の病因は長らく不明であったが、過去20年間の遺伝性神経変性疾患の研究からそのおおまかな分子メカニズムが明らかになってきた。遺伝子解析の結果、有力な仮説となってきたのは、神経変性疾患に共通する病因は構造異常を起こしたタンパク質、いわゆるミスフォールドタンパク質の異常な蓄積であるとの考えである(概略図)。遺伝性神経変性疾患は多くの場合、常染色体優性遺伝形式をとり、その病因となるような変異は多くの場合、点変異によるミスセンス変異など、変異によってもタンパク質は発現するような変異である。発現した変異タンパク質は構造が変化したミスフォールドタンパク質となって不安定化すると考えられる。ミスフォールドタンパク質は、もっぱらユビキチン-プロテアソームタンパク質分解系(後述)によって分解処理されるが、その量が分解系の能力を超えると細胞内に蓄積し、凝集体を形成するようになる。このようにタンパク質がミスフォールド化し、

概略図 神経変性疾患の分子メカニズム



神経変性疾患においては遺伝性、孤発性を問わず、一般的に構造異常のタンパク質が凝集、不溶化して蓄積することが一義的な原因である可能性が高い。この意味で神経変性疾患はコンフォメーション病といえることができる。異常タンパク質の蓄積が、互いに関連し、影響しあうことでさまざまな細胞機能障害、ストレスを引き起こし、複数の経路によって神経細胞機能低下、神経細胞死をもたらすことが神経変性過程ではないかと考えられる

凝集し、蓄積する一群の疾患をコンフォメーション病 (conformational disease) と呼称することが提唱されている¹⁾。一般にミスフォールドタンパク質は凝集の過程でオリゴマー、プロトフィブリルという中間体を経てアミロイド線維^{*1}を形成する性質がある。事実、多くの遺伝性神経変性疾患では変異タンパク質を主成分とする異常な線維性凝集体 (病理学的には封入体と呼ばれる) が神経病理学的特徴になっており、神経変性疾患はコンフォメーション病であるとする仮説を強力に支持する証拠となっている。このようにミスフォールドタンパク質の蓄積がまず神経細胞の機能障害を引き起こし、最終的に細胞死を引き起こすのが神経変性の本体ではないかと現在考えられるようになってきた。

一方、プログラム細胞死の生化学的解析が進み、形態学的にアポトーシスと定義された細胞死はカスパーゼ依存的細胞死、ネクローシスを含めたそれ以外の細胞死はカスパーゼ非依存的細胞死に分類されるようになった。本章では代表的な神経変性疾患における細胞死について最近の知見を紹介し、また細胞死防御が神経変性疾患の治療になりうるかどうか、アポトーシス阻害タンパク質を用いた実験的治療の例をもとに議論する。

^{*1}アミロイド線維

アミロイドとは「デンプンに似た」という意味で染色性の特徴から名付けられた。病理学的に

は、①コンゴレッドで染色され、蛍光顕微鏡下で緑色偏光を呈し、②径10 nm程度の枝分かれのない線維であり、③ β シート構造であるこ

とが条件となる。アミロイド線維が蓄積する疾患はアミロイドーシスと呼ばれ、アルツハイマー病、プリオン病が代表的な疾患である。

1 アルツハイマー病

アルツハイマー病 (AD) は最も有病率の高い神経変性疾患であり、海馬と大脳皮質を中心とした変性の結果、重篤な知能障害、人格変化が生じ、認知症の原因となる。アルツハイマー病の光学顕微鏡下での特徴的な病理所見は細胞外のアミロイド斑 (老人斑) と細胞内の神経原線維変化 (NFT) であり、前者はアミロイド前駆体タンパク質 (APP) から切り出されてできる $A\beta$ ペプチド ($A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$)、後者は微小管関連タンパク質の一種であるリン酸化タウタンパク質から構成される。ADの強力な遺伝的な危険因子はアポリポタンパク質 E4 (ApoE4) ^{※2} の遺伝子型であり、 $A\beta$ および NFT の蓄積に影響を与えている可能性がある。

代表的な遺伝性 AD として APP と、 $A\beta$ を APP から切り出す γ セクレターゼの構成要素であるプレセニリン 1 (PS1)、プレセニリン 2 (PS2) の 3 種類の遺伝子変異が知られており、どの変異でも常染色体優性遺伝性の AD となり、 $A\beta$ ペプチドの過剰産生が生じる。このことより、孤発性、遺伝性に共通して、 $A\beta$ の蓄積が AD の特徴であり、タウの蓄積はその下流で生じると想像されている (アミロイドカスケード仮説、図 1 参照 ²⁾)。 $A\beta$ が細胞障害を引き起こす機序にはいくつもの説がある ³⁾。まず、 $A\beta$ のプロトフィブリルがミクログリアを活性化し、炎症反応と神経毒性をもつサイトカインの放出を引き起こすという説がある。次に、 $A\beta$ プロトフィブリルがグルタミン酸などの興奮性アミノ酸のグリア細胞からの放出を促進し、興奮性毒性 ^{※3} を引き起こすという考えがある。特に NMDA 受容体を刺激すると、NO (一酸化窒素) およびきわめて毒性の強い ONOO⁻ (パーオキシナイトライト) が産生され、強い神経毒性が現れる。また $A\beta$ の可溶性のオリゴマーがシナプス伝達を阻害し、動物レベルでは記憶・学習などの高次脳機能障害を引き起こすことも示されている。さらに $A\beta$ は銅や亜鉛などの金属に結合する性質があり、その作用によって毒性の強いフリーラジカルを産生するとの見方もある。細胞死との関連では $A\beta$ がミトコンドリアの呼吸鎖酵素を阻害して酸化ストレスを引き起こすとのデータも報告されている。これらの毒性が複合的に神経機能障害、神経変性につながっているのかもしれない。ただし $A\beta$ を過剰に産生するトランスジェニックマウスでは細胞死が見られないことから、*in vivo* における細胞死メカニズムの解析は進んでいない。治療面での最近の動向としては $A\beta$ を取り除くことが疾患の根本的な解決になるとの考えから、 $A\beta$ ワクチン療法 ^{※4} が注目を集めている。

※2 アポリポタンパク質 E4 (ApoE4)

リポタンパク質は脂質とタンパク質の複合体のことであり、アポリポタンパク質はそのタンパク質部分のみを指す。アポ E は分子量 34,000 のタンパク質であり、さまざまな種類のリポタンパク質に存在し、脂質の組織間の再分布への関与が想定されている。アポ E2、E3、E4 という遺伝子に規定される多型が存在し、アルツハイマー病では E4 が危険因子になるが、メカニズムは不明である。

※3 興奮性毒性

グルタミン酸は中枢神経系における興奮性神経伝達物質であり、その受容体の活性化によって脳のシナプス伝達を支える重要な物質である一方、特殊な状態においては受容体を過剰に活性化し結果的に神経細胞を死に至らしめる。これを興奮性毒性 (excitotoxicity) と呼び、NMDA 型、カイニン酸型、AMPA 型のイオンチャネル型グルタミン酸受容体を介する細胞内へのカルシウム流入の関与が大きいと考えられている。

※4 $A\beta$ ワクチン療法

脳のアミロイド β ペプチド ($A\beta$) を免疫学的手法 (主として抗体) により除去しようとする方法。最初 $A\beta_{42}$ の投与によって疾患モデルマウスの脳内アミロイド沈着を減少させたことに端を発する。ヒトへの応用は治験で脳炎を誘発し死亡患者が出たことよりいったん頓挫したが、投与方法の工夫により脳炎を回避する方向で研究が進められている。

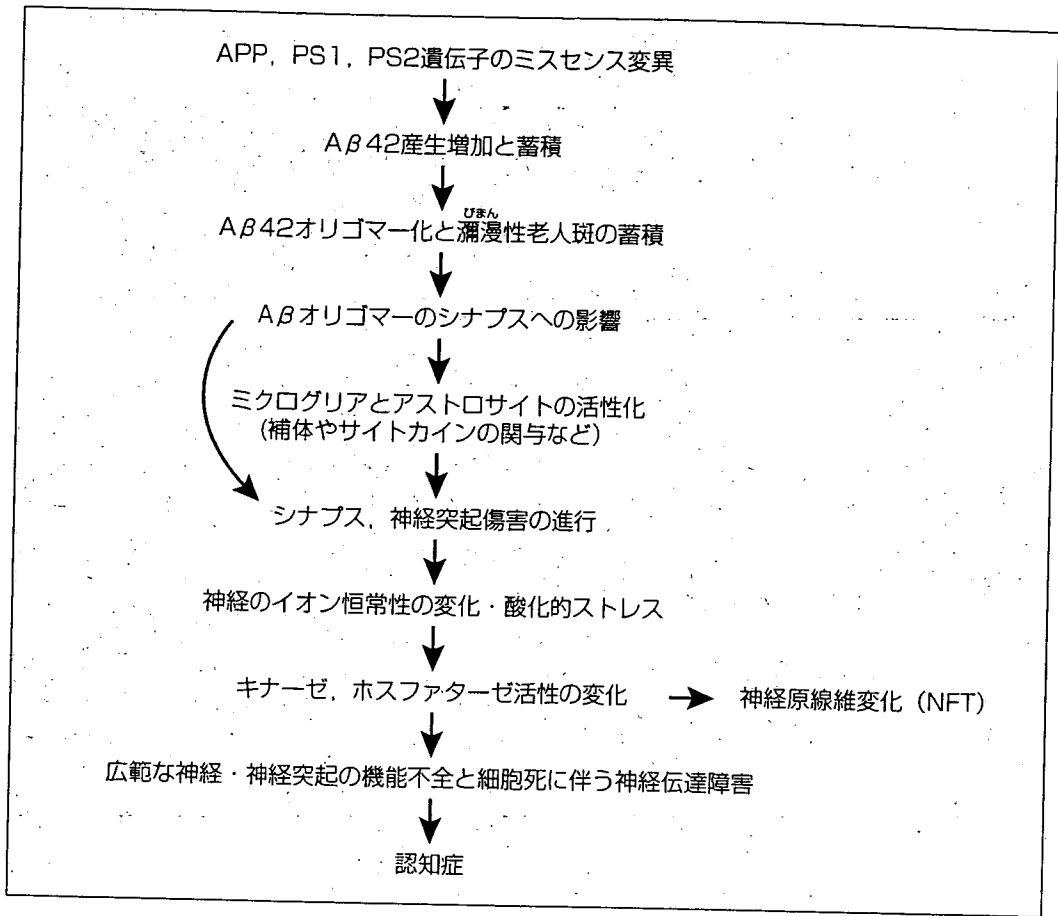


図1 アミロイドカスケード仮説

アミロイドカスケード仮説に基づくアルツハイマー病発症へ至るイベント。曲線矢印は Aβオリゴマーがミクログリアとアストロサイトを活性化するのに加えて、直接脳のニューロンやシナプスを傷害することを意味している

2 パーキンソン病

パーキンソン病 (PD) も 65 歳以上の人口の 1% が罹患する頻度の高い神経変性疾患である。黒質ドーパミンニューロンを中心に、末梢神経、中枢神経のノルアドレナリン作動性ニューロンなどいくつかの系統の神経系が選択的に変性する。病理学的な特徴は変性ニューロンに特異的に見られるレビー小体 (Lewy body) と呼ばれる線維性の封入体である。臨床的な主な症状はドーパミン欠乏による運動機能障害であり、振戦 (ふるえ)、無動 (動きが少なくなり、遅くなる)、固縮 (筋肉が固くなる)、姿勢反射障害 (転倒しやすくなる) などが年余にわたって進行し、歩行困難など著しい機能障害に陥る。PD の約 5~10% は家族性 (遺伝性) であり、家族性 PD^{*5} の病因遺伝子の研究から、PD の神経変性メカニズムの理解が大きく進みつつある⁴⁾。このうち、特に細胞死との関連で研究が進んでいる α-シヌクレインと Parkin について紹介する。

*5 家族性 PD

PD 全体の 5~10% を占め、これまでに 11 部位の異なる遺伝子座に責任遺伝子を有する家族性 PD が見出され、うち 6 疾患は遺伝子が

同定されている。最近、劣性遺伝の PARK6 と PARK7 の病因遺伝子がそれぞれミトコンドリアに局在するプロテインキナーゼ PINK1 と強力なアンチオキシダント活性をもつ多機

能タンパク質 DJ-1 であることがわかり、神経毒の研究からかつて有力であったミトコンドリアと酸化ストレスの PD への関与が再評価されている。

1) α -シヌクレイン

α -シヌクレインはシナプス前末端に豊富に存在する140アミノ酸の生理機能不明のタンパク質である。1997年、PARK1と呼ばれる常染色体優性遺伝性PDが α -シヌクレインのミスセンス変異によって生じることが示され、ついで α -シヌクレインを含む染色体領域の一部が重複、あるいは三重複する変異（遺伝子量としてはそれぞれ正常の1.5倍と2倍）が起こってもPDになることがわかった。その一方で、レビー小体の主要成分が α -シヌクレインであることがわかり、ミスフォールド化した α -シヌクレインの蓄積がPD発症の原因になるという考えが有力になった。しかし、レビー小体が細胞を殺す方向に働いているかどうかについては議論がある。レビー小体の構成成分は最近の研究によるとアグレスーム^{*6}と免疫組織化学的な性質が類似していることが指摘されており、少なくとも形成される時点では細胞保護的な役割を担っているものと思われる。しかしレビー小体に類似して神経突起内に形成されるレビーニューライト（Lewy neurite）は神経突起内の物質輸送を阻害する可能性があり、変性を促進する方向に働いているかもしれない。 α -シヌクレインの毒性に関して最も有力なのは、線維性のレビー小体が形成される過程でできるオリゴマー、プロトフィブリルなどの中間体が毒性をもつという考えである（図2）⁵⁾。ユニークな考えとして、*in vitro*の生物物理学的実験に基づいて、カルシウムを通す程度の半径をもつ環状のプロトフィブリルができると膜に結合して穴をあけるというアミロイドポア説が唱えられ、注目されている。ただし、このような環状のプロトフィブリルの存在は*in vivo*では証明されていない。これ以外に中間体による膜毒性、プロテアソーム阻害活性などが観察されている。 α -シヌクレインによる神経変性機構を*in vivo*で調べるために α -シヌクレイン過剰発現による動物モデルの作製が試みられている。 α -シヌクレイントランスジェニック（Tg）マウスでは非線維性封入体形成、運動機能障害は起こすが、ドーパミン細胞死は見られない。レンチウイルスによる過剰発現では細胞死が起こるが、レビー小体は形成されず、PDを再現できたと言える状況ではない。これに対し、 α -シヌクレインTgショウジョウバエでは、 α -シヌクレイン陽性の線維性封入体形成と成虫発症のドーパミン細胞死が起こる。この細胞死はHsp70の過剰発現、またはHsp70の発現を誘導する薬剤によって防衛されることが示されており、 α -シヌクレインのミスフォールド化が神経変性につながるということが強く示唆されている。

2) Parkin

ParkinはPARK2、または常染色体劣性若年性パーキンソンニズム（autosomal recessive juvenile parkinsonism：AR-JP）の病因遺伝子となるユビキチンリガーゼである。ユビキチンリガーゼの役割はユビチキン-プロテアソームタンパク質分解系^{*7}において、プロテアソーム分解されるためのユビキチン化のターゲットとな

^{*6} アグレスーム
ミスフォールドタンパク質の分解が障害された際、モータータンパク質ダイニンによって微小管のマイナス端に向かって逆行輸送され

て微小管形成中心（MTOC）に運ばれ、凝集体を形成する。これをアグレスーム（aggresome）と呼ぶ。 γ チューブリンや中間径フィラメントと共局在する特徴を有し、ミ

スフォールドタンパク質の毒性を封じ込める細胞保護的な機能があると想定されている。

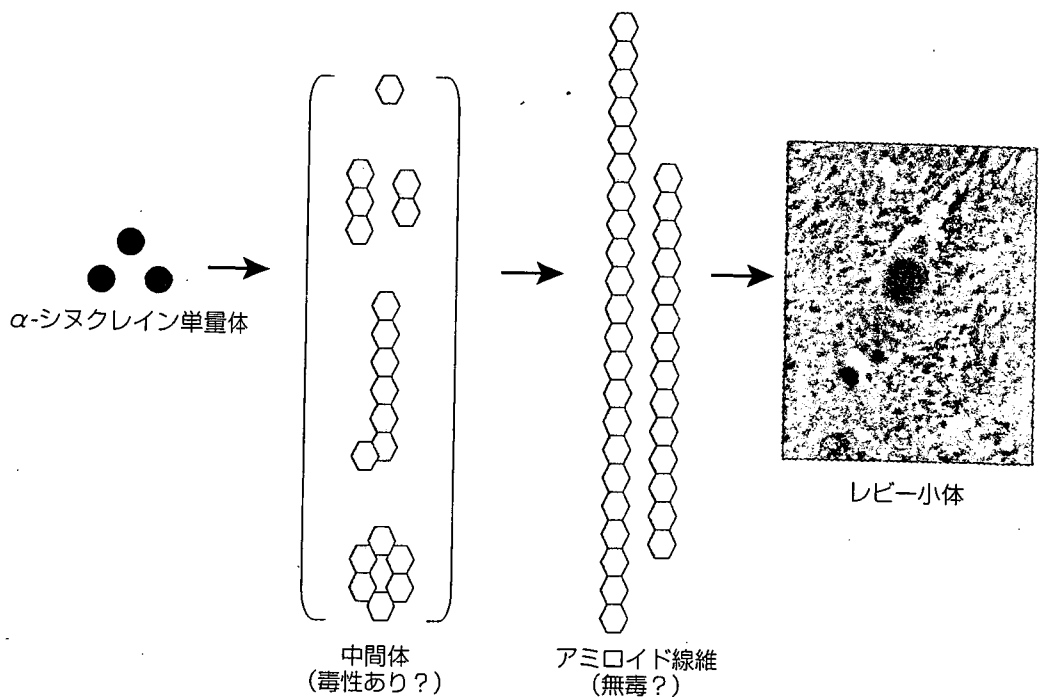


図2 α -シヌクレインの線維形成過程モデル

単量体の正常構造の α -シヌクレイン (●:正常では natively unfolded の状態できちんとした構造をとらないと言われている) が構造変化を起こす (○). 構造変化を起こした α -シヌクレインは凝集し、線維形成中間体となる β シート構造に富むオリゴマーやプロトフィブリルを形成する。プロトフィブリルの中には環状構造のものも含まれる。これらは構造的に安定なアミロイド線維へと変換され、それらがさらに集まってレビー小体が形成される。文献5参照。レビー小体の写真提供: 東海林幹夫先生 (弘前大学医学部)

る基質タンパク質と特異的に結合し、そのユビキチン化と分解を促進することである (図3)。したがって遺伝子変異によってParkinの機能が失われると、本来分解されるべき基質タンパク質が蓄積し、神経変性が生じるものと考えられる。変性誘発のカギとなる基質タンパク質としてこれまで10種類以上の分子がクローニングされているが、そのうち、蓄積により細胞死を起こすという点で有望なのはPael受容体である⁶⁾。Pael受容体はリガンド未同定のGタンパク質共役型受容体であるが、小胞体における折りたたみ (フォールディング) が困難という性質があり、新生タンパク質の50%が折りたたみに失敗する。折りたたみに失敗し、ミスフォールド化したPael受容体は健康人では小胞体関連分解^{※8}という機構で、Parkinによってユビキチン化され、分解されているが、AR-JPでは分解されなくなるため、小胞体に蓄積する。小胞体にミスフォールドタンパク質が過剰に蓄積した状態を小胞体ストレス

※7ユビキチン-プロテアソームタンパク質分解系 (UPS)

ミスフォールドタンパク質など細胞内の短寿命のタンパク質を分解する主要な経路。ユビキチンというタンパク質がATPを消費する酵素反応によって標的タンパク質に結合し、ポリユビキチン鎖が形成されると、プロテアソームという巨大タンパク質分解酵素複合体が認識して分解するシステムで、エネルギー依

存性と基質選択性の2つの特徴を有する (図3も参照)。

※8小胞体関連分解、小胞体ストレス応答
小胞体ストレス応答には以下の4種類がある。
①小胞体シャペロンの遺伝子発現の活性化、
②小胞体関連分解によるミスフォールドタンパク質の分解 (小胞体関連分解ではミスフォールドタンパク質は小胞体内腔から細胞

質に逆輸送され、ユビキチン-プロテアソーム系で分解される)

- ③翻訳の全般的抑制で、小胞体への新生タンパク質流入を抑制
- ④アポトーシス
- ①、②、③でストレスを乗り越えなくなると④に至ると考えられる。

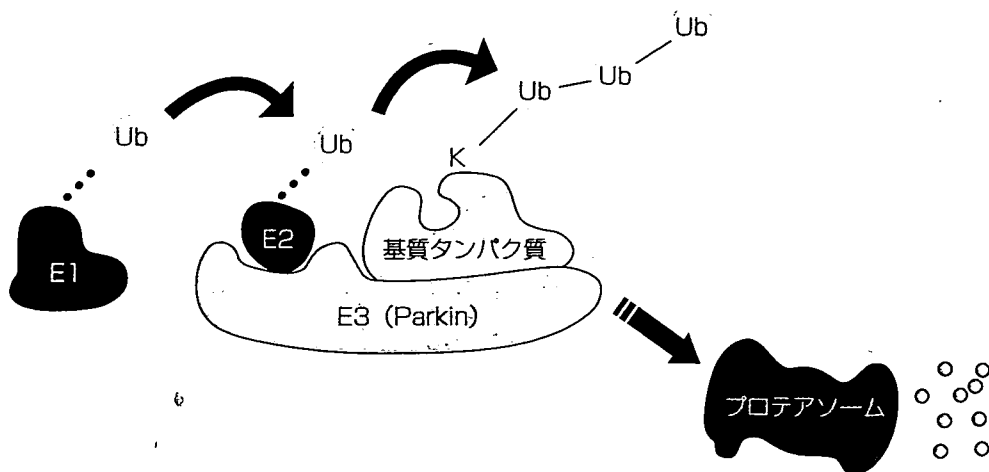


図3 Parkinとユビキチン-プロテアソームタンパク質分解系

76アミノ酸の小さなタンパク質であるユビキチン (Ub) は最初にユビキチン活性化酵素 (E1) によって活性化され、ユビキチン結合酵素 (E2) に受け渡される。さらにE2から基質タンパク質のリジン残基 (K) に受け渡されて共有結合する。この反応が繰り返されて、基質タンパク質上にポリユビキチン鎖が形成され、これが細胞内の巨大なタンパク質分解酵素複合体、26Sプロテアソームによって認識されて分解される。Parkinを含むユビキチンリガーゼの役割は基質を特異的に認識して結合し、E2などと協調してユビキチン化、分解を促進することである

と呼ぶ。細胞はこれに対して小胞体ストレス応答^{※8}で対応するが、対応しきれなくなるとアポトーシスを起こす。Pael受容体を培養細胞で過剰発現させると小胞体ストレスによる細胞死が起こる。さらにショウジョウバエでもPael受容体を神経細胞に過剰発現させるとドーパミン神経の変性脱落が生じることが示され、Pael受容体の蓄積による小胞体ストレス誘発性細胞死がAR-JPの神経変性を説明するとの仮説が提唱されている。ポリグルタミン病のように核内に凝集体が形成される疾患でも、変異タンパク質がプロテアソームを阻害することによって小胞体関連分解 (ERAD) を阻害し、小胞体ストレスを引き起こすとの仮説が提出されており、この考えに基づくと、小胞体ストレスが神経変性疾患の多くを説明できるかもしれない。

③ 筋萎縮性側索硬化症

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は進行性に上位および下位運動ニューロンの変性脱落とグリオーシスを生じる疾患で、通常発症後数年以内に呼吸筋麻痺のため、人工呼吸器の補助が必要になる。進行すると全身の筋肉の麻痺のため、意識・知能は保たれながら、周囲とのコミュニケーションすら困難になる難病である。家族性ALSはALS全体の5~10%を占めるが、その中でスーパーオキシドディスムターゼ (SOD1) の遺伝子変異による常染色体優性遺伝性ALSの分子メカニズムの解析が進んでいる⁷⁾。SOD1はスーパーオキシドを解毒処理する酵素であり、その酵素活性の低下が当初神経変性の原因と予想されていたが、153アミノ酸のSOD1タンパク質に100種類以上の変異が見つかっており、多くはミスセンス変異であること、変異SOD1の中には野生型と酵素活性が変わらないものが存在すること、さらには

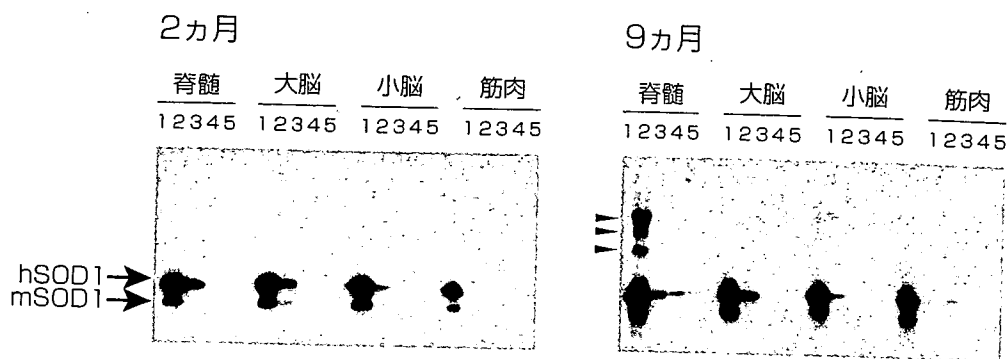


図4 変異SOD1トランスジェニックマウスにおける変異SOD1の脊髄特異的な凝集形成
ヒトG93A変異SOD1トランスジェニックマウスは生後9カ月で運動麻痺を発症して約2週間で死亡し、ヒトのALSのよいモデルになる。このマウスの脊髄、大脳、小脳、筋肉組織でSOD1のウエスタンブロットを行うと、発症前(2カ月)はすべての組織でヒト変異SOD1の単量体のみが検出されるが、発症後(9カ月)は脊髄組織でのみヒト変異SOD1の高分子量化した凝集体(矢頭)が認められる。数字は1から5の順に可溶性から不溶性の分画を示す。hSOD1とmSOD1はそれぞれヒトとマウスのSOD1を意味する。写真提供: 館野美成子先生(国立精神・神経センター)

活性を有する変異SOD1を過剰発現するトランスジェニックマウスの脊髄ではSOD1活性は数倍になるが、ヒトALSとよく似た運動ニューロン変性を起こすことがわかり、SOD1変異による新たな毒性の付与(gain of toxic function)が変性の原因であることが確実になった。現在毒性の説明として最も有力なのは、変異SOD1がミスフォールドタンパク質になって不溶化し、凝集することが原因とする考えであり、実際に変異SOD1トランスジェニックマウスではあらゆる組織にトランスジェンが発現するが、脊髄でのみ、不溶化し、凝集したSOD1タンパク質が見出される(図4)。試験管内でも変異SOD1がアミロイドフィブリルを形成しうることが明らかになっており、 $A\beta$ や α -シヌクレインと共通の毒性を有することが示唆されている。脊髄でのみ変異SOD1のミスフォールド化が進行する原因はよくわかっていないが、カルシウム透過型AMPA型受容体など運動ニューロンに特異的な細胞環境がかかっている可能性がある。また、モデルマウスを使った実験から変異SOD1を運動ニューロンで発現させただけでは神経変性は起こらず、他の細胞での変異遺伝子の発現が、変性が起こるために必要であるとする非細胞自律(non-cell autonomous)^{※9}説が提唱され、神経変性の概念に訂正を迫る考え方として注目されている⁶⁾。

4 IAP と神経変性

アポトーシスと神経変性のかかわりを最も直接的に示したのは、遺伝性の運動ニ

※9 non-cell autonomous (非細胞自律)
遺伝学的な用語で、ある表現系が現れるためにその表現系を示す細胞の遺伝子だけでは不十分で、他の細胞の遺伝子の関与が必要な場

合をいう。変異SOD1トランスジェニックマウスでは運動ニューロンが特異的に変性するが、変異SOD1遺伝子を有するアストログリアやミクログリアの関与も変性が起こるため

に必要な考えがキメラマウスの実験をもとに提唱されている。

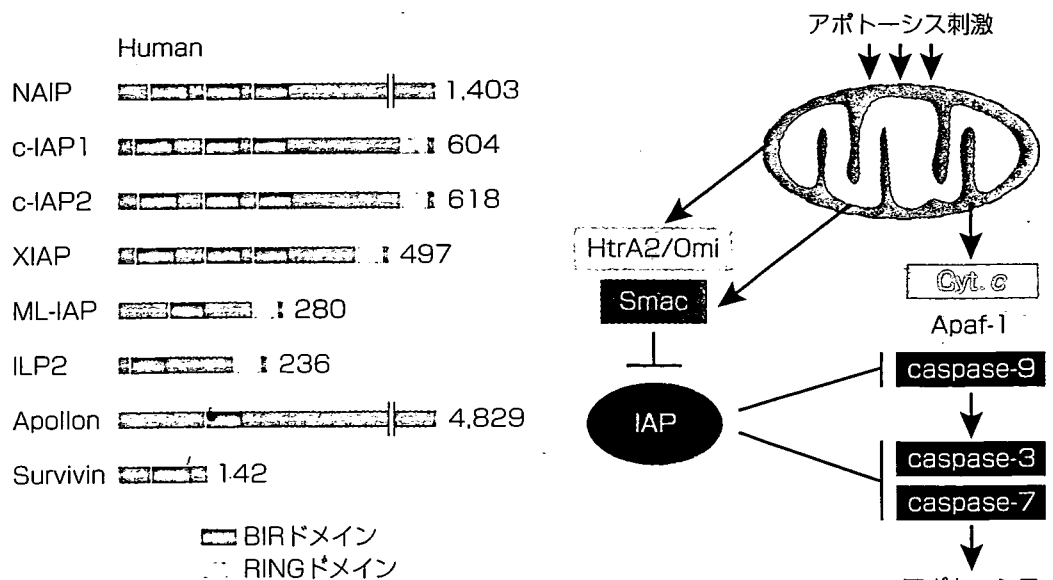


図5 IAP およびその阻害因子

左にヒトの8種類のIAPタンパク質を示す。約70アミノ酸のBaculovirus IAP repeat (BIR)ドメインが構造上の特徴である。右にアポトーシスの内因性経路を示す。IAPはミトコンドリアからシトクロムc (Cyt.c)が放出されて以後活性化されるcaspase-9、caspase-3、caspase-7を阻害する。一方、シトクロムcとともにミトコンドリア膜間スペースから放出されるSmacとHtrA2/OmiはIAPの働きを阻害して、アポトーシスの進行をスムーズに進めているらしい

ニューロン変性疾患である脊髄性筋萎縮症^{※10}の重症度を決定する因子として同定された neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) である。NAIPはアポトーシス阻害タンパク質 (IAP) ファミリーの一つである。IAPはBaculovirus IAP repeat (BIR) と呼ばれる Zinc Finger モチーフに似たドメインを有することが構造上の特徴であり、その多くは内因性のカスパーゼ (caspase) 阻害因子としての働きをもつ⁸⁾。NAIPも3つのBIRドメインを有し、caspase-3、caspase-7の阻害作用をもつ。NAIPの変異で運動ニューロン変性が増悪することから、アポトーシスが変性に関与することが示唆される。ショウジョウバエではIAPが欠損すると発生時期に全身のアポトーシスで致死となり、アポトーシスの決定的制御因子としてきわめて重要なことが示されているが、哺乳類ではいくつかのIAPのノックアウトマウスでも顕著な表現型は見られず、その生理的意義はよくわかっていない。ただIAPの機能を阻害するショウジョウバエの分子 (Reaper, Hid, Grim) のホモログにあたる2種類の分子 (SmacとHtrA2/Omi) が哺乳類でも存在することから、哺乳類でも重要な役割を担っているが、IAPがヒトでは8種類あるというリダンダンシー (冗長性) のため、機能欠損の表現型をとらえることができないだけなのかもしれない (図5とUP TO DATE トピックス20参照)。

神経変性へのアポトーシスの関与を探る目的で、ヒトの疾患を忠実に再現する現

※10 脊髄性筋萎縮症

体幹および四肢近位筋優位の筋力低下と筋萎縮を示す小児期発症の下位運動ニューロン疾患であり、常染色体劣性遺伝形式を示す。原

因遺伝子は第5染色体長腕にあり、RNAスプライシングで重要な役割を果たすSMN (survival motor neuron) である。発症年齢と重症度から3型に分類されるが、重症なもの

ほど、NAIP遺伝子を欠損している割合が多いと報告されている。

在得られる唯一の動物モデルである前述の変異SOD1トランスジェニック ALS マウスモデルを用いた実験が多く行われ、多くの caspase の関与が示唆されている。IAP の効果に関しては、caspase-3, caspase-7, caspase-9 を特異的に阻害するヒト XIAP および広いカスパーゼ阻害のスペクトラムを有するが、caspase-9 は阻害しない因子である p35 を既述の ALS モデルマウスに過剰発現させて、臨床症状への効果を見る実験が行われた。この結果、XIAP は ALS マウスが発症してから死亡するまでの罹病期間を延長させるのに対し、p35 は発症までの期間は延ばすものの、罹病期間には影響を与えないことがわかった。このことはミトコンドリアを介する内因性経路が ALS モデルマウスの神経変性に関与しており、caspase-9 が治療のターゲットになることを示唆している⁹⁾。変異 SOD1 がミトコンドリアに蓄積し、Bcl-2 (> 3 章参照) に結合するという観察もこの結果に一致しており、IAP の遺伝子治療、または内因性の IAP を増加させる抗アポトーシス治療が有効な可能性がある。

5 今後の研究の展開

神経変性疾患がタンパク質の構造異常に起因するコンフォメーション病と認識されるようになってから、異常タンパク質を除去したり、分解を促進することで疾患を治療する方向に期待が集まり、最近では RNAi^{※11} を使ったモデル動物の実験で実際に有望な結果が得られている¹⁰⁾。一方、異常タンパク質を抱えて死すべき運命をもった細胞でアポトーシスの経路だけを止めても根本的な解決にならない可能性が高い。しかしながら、神経変性疾患の発症時期では細胞死が進行過程にあることを考えると、抗細胞死治療は進行を遅らせる意味はある。また、カスパーゼ非依存的な細胞死経路も防御できれば、より高い治療効果が得られる期待ももてる。神経変性疾患の治療法開発への挑戦は始まったばかりであるが、神経変性は複合的な過程であり、異常タンパク質の除去だけでなく、抗細胞死療法も視野に入れた総合的な治療戦略の立案が必要と思われる。

キーポイント

神経変性疾患は、一般に異常タンパク質の蓄積を特徴とするコンフォメーション病である

アルツハイマー病では A β ペプチドとタウの蓄積の下流で、炎症、興奮性毒性、酸化ストレス、シナプス機能障害、ミトコンドリア障害などの過程が起こり神経変性に至ると考えられる

パーキンソン病では α -シヌクレインの蓄積によりレビー小体が形成されるが、レビー小体そのものは細胞保護的性質をもっているらしい

※11 RNAi

RNAi とは、二本鎖 RNA (double-stranded RNA : dsRNA) によってその配列特異的に mRNA が分解され、その結果遺伝子の発現が

抑制される現象。最近ウイルスベクターやトランスジーンを使った RNAi で ALS の表現型を示す変異 SOD1 トランスジェニックマウスの SOD1 の発現を低下させたところ ALS の臨

床経過が劇的に改善したことから、神経変性疾患治療への応用の期待がもたれている。

家族性パーキンソン病 PARK2 の病因遺伝子 Parkin はユビキチンリガーゼであることから、パーキンソン病の病因としてユビキチン-プロテアソーム系の障害が強く示唆される

家族性 ALS の病因遺伝子 SOD1 は変異によってミスフォールド化し、脊髄特異的に凝集して神経変性を起こすらしい

IAP による細胞死抑制治療は神経変性疾患動物モデルの治療に有効であるが、神経変性過程は複合的であり、変性に結びつくさまざまな過程を抑制する治療戦略が必要である

文 献



- 1) Carrell, R. W. & Lomas, D. A. : Conformational disease. *Lancet*, 350 : 134-138, 1997
- 2) Hardy, J. & Selkoe, D. J. : The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease : progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297 : 353-356, 2002
- 3) Bossy-Wetzell, E. et al. : Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature Med.*, 10, Suppl : S2-9, 2004
- 4) Moore, D. J. et al. : Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.*, 28 : 57-87, 2005
- 5) Volles, M. J. & Lansbury, P. T., Jr. : Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry*, 42 : 7871-7878, 2003
- 6) Imai, Y. & Takahashi, R. : How do Parkin mutations result in neurodegeneration? *Curr. Opin. Neurobiol.*, 14 : 384-389, 2004
- 7) Bruijn, L. I. et al. : Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu. Rev. Neurosci.*, 27 : 723-749, 2004
- 8) Vaux, D. L. & Silke, J. : Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304 : 499-504, 2003
- 9) Inoue, H. et al. : The crucial role of caspase-9 in the disease progression of a transgenic ALS mouse model. *EMBO J.*, 22 : 6665-6674, 2003
- 10) Saito, Y. et al. : Transgenic siRNA halts ALS in a mouse model. *J. Biol. Chem.*, 280 : 42826-42830, 2005

参考図書



- 『細胞における蛋白質の一生』 (小椋 光, 遠藤斗志也, 森 正敬, 吉田賢右/編), 共立出版, 2005
⇒ 「病態・フォールディング病」の章が神経変性疾患研究の現状を知るのに最適
- 『脳神経疾患 病態の分子生物学』 (澤 明/編), 南山堂, 2005
⇒ 神経変性疾患と精神疾患を統一的に理解できる優れた脳神経疾患の入門書

Unsaturated Fatty Acids Induce Cytotoxic Aggregate Formation of Amyotrophic Lateral Sclerosis-linked Superoxide Dismutase 1 Mutants*

Received for publication, February 28, 2005

Published, JBC Papers in Press, March 29, 2005, DOI 10.1074/jbc.M502230200

Yeon-Jeong Kim‡, Reiko Nakatomi§, Takumi Akagi§, Tsutomu Hashikawa§, and Ryosuke Takahashi¶||

From the Laboratories for ‡Motor System Neurodegeneration and §Neural Architecture, RIKEN Brain Science Institute, Saitama 351-0198, Japan and ¶Department of Neurology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto 606-8507, Japan

Formation of misfolded protein aggregates is a remarkable hallmark of various neurodegenerative diseases including Alzheimer disease, Parkinson disease, Huntington disease, prion encephalopathies, and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Superoxide dismutase 1 (SOD1) immunoreactive inclusions have been found in the spinal cord of ALS animal models and patients, implicating the close involvement of SOD1 aggregates in ALS pathogenesis. Here we examined the molecular mechanism of aggregate formation of ALS-related SOD1 mutants *in vitro*. We found that long-chain unsaturated fatty acids (FAs) promoted aggregate formation of SOD1 mutants in both dose- and time-dependent manners. Metal-deficient SOD1s, wild-type, and mutants were highly oligomerized compared with holo-SOD1s by incubation in the presence of unsaturated FAs. Oligomerization of SOD1 is closely associated with its structural instability. Heat-treated holo-SOD1 mutants were readily oligomerized by the addition of unsaturated FAs, whereas wild-type SOD1 was not. The monounsaturated FA, oleic acid, directly bound to SOD1 and was characterized by a solid-phase FA binding assay using oleate-Sepharose. The FA binding characteristics were closely correlated with the oligomerization propensity of SOD1 proteins, which indicates that FA binding may change SOD1 conformation in a way that favors the formation of aggregates. High molecular mass aggregates of SOD1 induced by FAs have a granular morphology and show significant cytotoxicity. These findings suggest that SOD1 mutants gain FA binding abilities based on their structural instability and form cytotoxic granular aggregates.

neurons in the brain stem and spinal cord. Approximately 10% of ALS patients are familial cases, with autosomal dominant inheritance. More than 90 different mutations in the gene coding for superoxide dismutase 1 (SOD1) have been identified in about 20% of familial ALS (FALS) families (1, 2). Although the molecular mechanisms of selective motor neuron degeneration by SOD1 mutants in FALS remain largely unknown, common pathological features of conformational diseases, as evidenced by SOD1 immunoreactive inclusions, are found in the spinal cord of ALS patients and in the SOD1 mutant FALS mouse model (3–8). The characteristics of FALS resemble those of many other neurodegenerative diseases in which a causative protein undergoes a conformational rearrangement, which endows it with a tendency to aggregate and form deposits within affected tissues.

SOD1 is a 32-kDa homodimeric enzyme that decreases the intracellular concentration of superoxide radicals by catalyzing their dismutation to O₂ and H₂O₂. ALS-linked mutations of SOD1 are distributed throughout the primary and tertiary structures, and most mutations appear unrelated to the dismutase activity. Many biochemical and biophysical studies have reported that SOD1 mutants are structurally unstable compared with wild-type forms (10–13). These observations suggest that the mutations primarily affect the structural stability of SOD1 rather than the enzyme activity.

The half-life of SOD1 mutants is shorter than that of wild-type forms in cultured cells (14). SOD1 mutants form a complex with Hsp70 and CHIP, which promotes degradation of SOD1 through the ubiquitin-proteasome system (15). Hsp70 directly binds metal-deficient wild-type SOD1 as well as SOD1 mutants, suggesting that destabilized SOD1 is targeted by the molecular chaperone system (15, 16). These observations imply that structural stability of SOD1 may also be strongly involved in refolding by the chaperone or in degradation of SOD1 by the ubiquitin-proteasome system. On the other hand, aggregates of mutant SOD1 are observed to have aggresome-like morphology when cells are treated with a proteasome inhibitor (14). This aggresome-like morphology resembles pathological inclusions of neurodegenerative diseases in affected tissues. These findings suggest that in disease states, misfolded proteins overwhelm the protein handling systems, including chaperones and proteasomes. Therefore, the formation of cellular inclusions may be required for other factors to act as modulators to promote protein aggregates. In fact, lipid molecules, including unsaturated fatty acids (FAs), phosphatidylserine, and phosphatidylinositol, promote amyloidogenesis of amyloid β-peptides, tau (17), and α-synuclein (18, 19) *in vitro*. These molecules are biologically significant as mediators for signal-

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)¹ is a progressive and fatal neurodegenerative disorder that mainly affects motor

* This work was supported by research grants from RIKEN Brain Science Institute and a grant-in-aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, and Technology of Japan. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

|| To whom correspondence should be addressed: Dept. of Neurology, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan. Tel.: 81-75-751-3770; Fax: 81-75-761-9780; E-mail: ryosuket@kuhp.kyoto-u.ac.jp.

¹ The abbreviations used are: ALS, amyotrophic lateral sclerosis; FALS, familial amyotrophic lateral sclerosis; SOD1, superoxide dismutase 1; FA, fatty acid; AA, arachidonic acid; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium.

ing and inflammation during disease progression of neurodegeneration.

Here we investigated *in vitro* SOD1 aggregation affected by FAs to create an aggregation model system for FALS. We demonstrated that unsaturated FAs promote self-assembly and cytotoxic aggregate formation of SOD1. Aggregation by FAs is strongly correlated with structural instability and FA binding activity of SOD1, which may have significant implications in FALS.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Expression, Purification, and Characterization of Recombinant SOD1 Proteins—pcDNA3-SOD1 (20) was digested with EcoRV and XhoI and subcloned into blunted NcoI and XhoI sites of pET-15(b) (Novagen) to construct the expression plasmid. Expression of recombinant SOD1 proteins was induced in BL21(DE3)pLysS by adding 1 mM isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside, 0.1 mM CuCl₂, and 0.1 mM ZnCl₂ until cells were grown to 0.6 absorbance unit at 600 nm, and then bacterial cells were further cultured at 23 °C for 6 h. Cells were pelleted and resuspended in TNE buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 0.1 mM EDTA) supplemented with protease inhibitor mixture (Roche Applied Science). Cells were then disrupted by sonication. Insoluble materials were removed by centrifugation at 10,000 \times g for 30 min. Supernatant was collected for further purification. Purification was performed according to Hayward *et al.* (11), with minor modifications. Briefly, ammonium sulfate powder was added to the supernatant to 65% saturation with gentle stirring on ice. The supernatant, after centrifugation at 10,000 \times g for 30 min, was directly loaded for phenyl-Sepharose (Amersham Biosciences) column chromatography. The column was thoroughly washed with TNE buffer containing 2 M ammonium sulfate. Proteins were eluted using a linearly decreasing salt gradient. SOD1 activity measurement using a xanthine/xanthine oxidase-based method (21) identified fractions containing SOD1. Activity fractions were desalted by ultrafiltration using a centricon filter (Millipore). SOD1 was re-metallated as described previously (22). The proteins were then loaded onto a Q-Sepharose (Amersham Biosciences) anion exchange column and eluted using a linearly increasing salt gradient toward a buffer containing 200 mM NaCl and 10 mM Tris-HCl, pH 8.0. Fractions containing SOD1 were pooled and concentrated. Homogeneity of SOD1 was >95%, as verified by SDS-PAGE with Coomassie Brilliant Blue staining. Specific activity of the purified enzymes was assayed and calculated by bovine SOD1 (Cayman) or human SOD1 purified from erythrocytes (Sigma-Aldrich) as standards. Fully metallated SOD1 was delipidated using hydroxyalkoxypropyl dextran type III (Sigma-Aldrich) as described previously (19) before de-metallation. Metal-deficient apo-enzymes were prepared as described previously (23), and loss of enzyme activity was confirmed after de-metallation. The metal content of purified enzymes was estimated as described previously (22).

Oligomerization of SOD1—A stock solution of 25 mM FAs was prepared in 0.01 M NaOH containing 25 μ M butylated hydroxytoluene. SOD1 proteins were filtered through Microcon YM-100 (100-kDa cutoff) filters (Millipore) to remove high molecular mass SOD1 before oligomerization. FAs were added directly to preincubated SOD1 at 37 °C in 50 mM phosphate buffer, pH 7.2, containing 150 mM NaCl and 0.1 mM EDTA and further incubated at the same temperature.

SDS-PAGE and Western Blotting—For detection of SOD1 oligomers, SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions using 12.5% polyacrylamide gels. After oligomerization of SOD1, protein samples were prepared in SDS-PAGE loading buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% glycerol, and 0.007% bromophenol blue) in the absence of β -mercaptoethanol and then boiled at 95 °C for 3 min before loading. Western blotting was performed as described previously (24). Briefly, proteins were transferred to Hybond ECL nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences), followed by UV cross-linking, boiling membranes in 2% SDS and 50 mM Tris, pH 7.6, for 10 min, and extensive washing in Tris-buffered saline. For detection of SOD1, rabbit anti-SOD1 antibody (Stressgen) was used.

Glycerol Density Gradient Centrifugation and Densitometric Analysis—A glycerol linear gradient of 10–40% was prepared in a centrifuge tube. Formation of the SOD1 oligomer was performed as described above. Approximately 200 μ l of incubated SOD1 was layered onto a glycerol cushion and separated by centrifugation with a SW41Ti rotor (Beckman) at 35,000 rpm for 15 h. In a parallel experiment, protein standards (Amersham Biosciences) were separated simultaneously in order to calibrate fractions. Fractions were subjected to SDS-PAGE

under non-reducing conditions, and then Western blotting was performed. Western blot images were analyzed using image analysis software (Scion Image Beta 4.02; Scion Corp.).

Solid-phase Oleic Acid Binding—Sodium salt of oleic acid (Sigma-Aldrich) was coupled to EAH-Sepharose (Amersham Biosciences) by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (Pierce) to prepare oleate-Sepharose according to Peters *et al.* (25). Oleic acid coupling was verified by binding bovine serum albumin and recombinant α -synuclein protein. Mock-Sepharose was prepared from EAH-Sepharose by blocking coupling ligand with 1 M acetic acid. For the binding assay, 200 ng of Microcon-filtered protein was incubated with oleate-Sepharose or mock-Sepharose in 400 μ l of phosphate-buffered saline containing 0.1 mM EDTA at 37 °C for 30 min with agitation. Protein bound to Sepharose was settled on a spun column and washed extensively with phosphate-buffered saline. The bound protein was then eluted with 50% ethanol. Eluates were subjected to SDS-PAGE and Western blotting.

Transmission Electron Microscopy—SOD1 proteins (40 μ M) were incubated at 37 °C for 24 h in 50 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 150 mM NaCl and 0.1 mM EDTA supplemented with 100 μ M arachidonic acid. The samples were absorbed to a glow-charged supporting membrane on 400-mesh grids and fixed by floating on 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 5 min. After three washes with distilled water, samples were negatively stained by 2% sodium phosphotungstic acid and dried. Specimens were observed in a LEO 912AB electron microscope (LEO Electron Microscopy), operated at 100 kV.

Toxicity Assay—Cytotoxicity of protein aggregates was measured as described previously (26, 27). In brief, neuro2a mouse neuroblastoma cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum and 2 mM glutamine in 5% CO₂ at 37 °C. Cells were differentiated in serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium with 0.3 mM dibutyl cAMP before use. Cells were plated at 30,000 cells/well in 96-well plates and differentiated overnight. The medium was removed, and prepared SOD1 aggregates were added in new medium without phenol red. After incubation for 18 h at 37 °C, the cells were assayed using an MTS reduction assay kit (Promega). Another plate also treated as described above was stained for 1 min with trypan blue, and stained cells were counted as dead cells.

RESULTS

Unsaturated Fatty Acids Promote Self-assembly of SOD1s—We expressed and homogeneously purified recombinant human SOD1s from the bacterial expression system (Fig. 1A). The purified wild-type and G93A enzymes showed comparable specific activity; however, A4V mutant showed ~56% activity compared with that of wild-type enzyme (Fig. 1B). The zinc ion content of the purified enzymes showed almost full occupancy; however, copper ion content of A4V was 54.5% of the wild-type level (Fig. 1C). Specific activity was correlated with copper ion occupancy of purified enzyme, indicating proper metal loading in the active site.

We next examined the effect of long-chain FAs on oligomerization of SOD1 proteins. Wild-type and mutant (A4V and G93A) SOD1 were incubated with various concentrations of arachidonic acid (AA) as described under "Experimental Procedures." After incubation, oligomerized SOD1 was subjected to SDS-PAGE and then detected by Western blotting. Under reducing conditions, mainly bands of ~16 and 38 kDa, corresponding to monomer and dimer sizes of SOD1, respectively, were detected (Fig. 2A). In contrast, under non-reducing conditions, smeared patterns of >50 kDa in size were supposed to be SOD1 oligomers (Fig. 2A). These observations suggest that disulfide bonds maintained SOD1 oligomers. Thus, non-reducing SDS-PAGE was thought to be an efficient method to detect SOD1 oligomers and aggregates. Among the holo-enzymes, wild-type and G93A were not oligomerized; instead, they segregated as monomer and dimer size bands (Fig. 2B, top panel). After incubation with >100 μ M AA, holo-A4V showed a faint smear pattern that was seen from 50 kDa to near the stacking gel range beside monomer- and dimer-size bands (Fig. 2B, top panel). In contrast, all metal-deficient enzymes, regardless of mutations, were oligomerized in the presence of >30 μ M AA

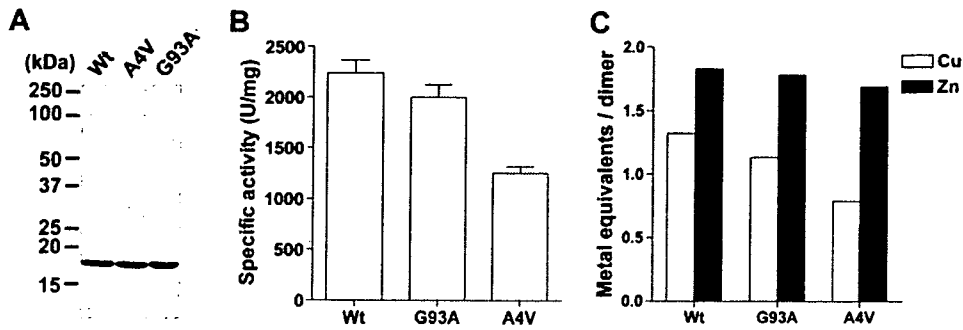


FIG. 1. Characterization of purified recombinant SOD1s. A, purified SOD1s were separated using SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue. B, dismutase activity of the purified SOD1s was assayed by the xanthine/xanthine oxidase-based method. One unit of the activity is defined as the amount of enzyme needed to exhibit 50% of dismutation of the superoxide radicals. C, metal content of the purified SOD1s was measured using 4-pyridylazoresorcinol assay in 6 M guanidine-HCl.

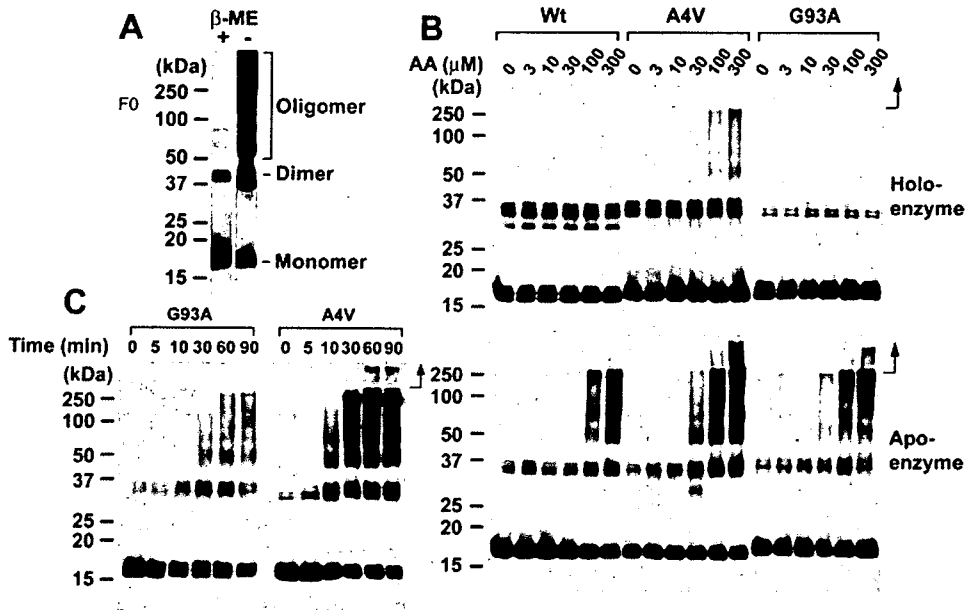


FIG. 2. Arachidonic acid promotes SOD1 oligomerization. A, FA-inducing oligomers of SOD1 were separated using SDS-PAGE with or without β -mercaptoethanol. B, apo-enzymes of SOD1 mutants ($2.5 \mu\text{M}$) were incubated at 37°C in the presence of $100 \mu\text{M}$ AA. At each time point, aliquots were placed on ice to stop the reaction. C, purified holo- or apo-SOD1 proteins ($2.5 \mu\text{M}$) were incubated at 37°C for 90 min in the presence of the indicated AA concentration. Incubated proteins were mixed directly with SDS-PAGE treatment buffer without reducing agents and boiled. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions. Proteins were detected by Western blotting as described under "Experimental Procedures." Arrows indicate the position of stacking gels.

(Fig. 2B, bottom panel). Apo-enzymes demonstrated higher oligomerization propensity than holo-enzymes depending on AA concentration (Fig. 2B). Thus, AA efficiently promoted oligomerization of SOD1s.

Next, we performed a time-course analysis of SOD1 oligomerization in the presence of AA. Metal-deficient G93A and A4V were oligomerized in a time-dependent manner (Fig. 2C). Maximum oligomerization was reached within 60 min of incubation in the presence of AA (Fig. 2C).

We then examined the effect that various FAs, including stearic acid, oleic acid, linoleic acid, and AA, have on SOD1 oligomerization. Unsaturated FAs, including oleic acid, linoleic acid, and AA, promoted SOD1 oligomerization (Fig. 3). However, saturated FAs and stearic acid had little effect on SOD1 oligomerization (Fig. 3). SOD1 oligomerization induced by FAs required at least monounsaturated FAs. This result may reflect the difference of solubility between unsaturated and saturated FAs in the buffer.

We verified the formation of SOD1 oligomers using a 10–40% glycerol density gradient centrifugation because presumable artifacts after detection of SOD1 oligomers using non-reducing SDS-PAGE may have remained. After fractionation, we could not observe high molecular mass SOD1 oligomers

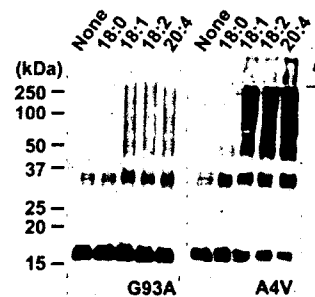


FIG. 3. Unsaturated fatty acids affect oligomerization of SOD1. Apo-enzymes of SOD1 mutants were incubated at 37°C for 90 min in the presence of FAs at concentrations of $100 \mu\text{M}$: 18:0, stearic acid; 18:1, oleic acid; 18:2, linoleic acid; and 20:4, arachidonic acid. Arrows indicate the position of stacking gels.

from the incubated sample in the absence of AA; fractions were <67 kDa and potentially represented monomer and dimer states (Fig. 4A, top panel). In contrast, we detected high molecular mass oligomers in fractions of >440 kDa from the incubated sample in the presence of AA (Fig. 4A, bottom panel). Under these conditions, SOD1 with molecular mass of <67 kDa was dramatically decreased compared with the sample incu-

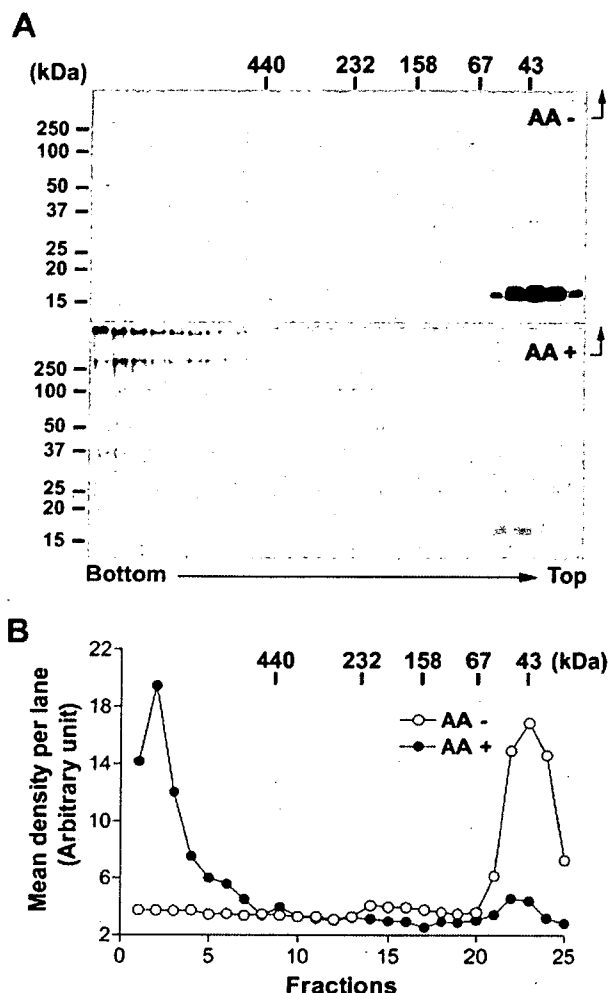


FIG. 4. Glycerol density gradient centrifugation and densitometric analysis of SOD1 oligomers. *A*, apo-A4V (2.5 μ M) was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 90 min in the absence or presence of 100 μ M AA before loading on the glycerol cushion. After centrifugation, fractions were collected from the bottom of the tubes and then subjected to SDS-PAGE under non-reducing conditions. SOD1 proteins were detected by Western blotting. *B*, for densitometric analysis, we measured mean density per lane after background subtraction. Total mean density was similar under each condition, by calculating the mean density of visible lanes (lanes 1–8 for oligomers and lanes 21–25 for dimer or monomer). Arrows indicate the position of stacking gels.

bated in the absence of AA (Fig. 4A, bottom panel). Although oligomers of >440 kDa were fractionated by the glycerol density gradient centrifugation, these were detected as monomer, dimer, and smeared high molecular mass bands that reached stacking gels under non-reducing SDS-PAGE (Fig. 4A, bottom panel). This indicates oligomers are partly disrupted during the boiling of the SDS-PAGE loading buffer. We next performed densitometric analysis from Western blotting images to estimate the amount of oligomerized SOD1 (Fig. 4B). The resulting image analysis found that immunoreactivity for oligomers was ~80% of the total immunoreactivity.

Structural Instability of SOD1 Is Correlated to Oligomerization Propensity and FA Binding—We showed the FA-induced oligomerization propensity of apo-SOD1s was higher than that of holo-SOD1. This implies that protein stability might be strongly associated with FA-induced oligomerization propensity. Among the holo-enzymes, wild-type and G93A were not oligomerized under our experimental conditions (Fig. 2B, top panel). To examine the correlation between oligomerization propensity and protein stability of holo-enzymes, holo-SOD1 was heated and then oligomerized by AA. In the absence of AA,

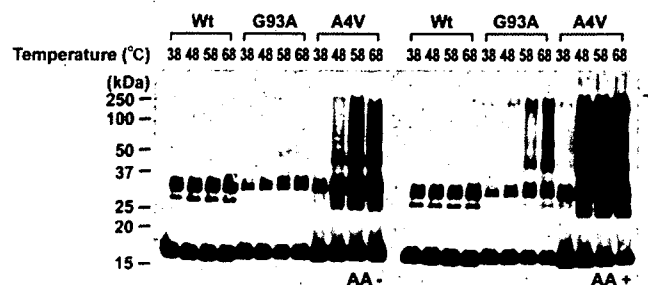


FIG. 5. Thermally destabilized SOD1 mutants show a high oligomerization propensity. Holo-enzymes were heat-treated at the indicated temperatures for 30 min before addition of 100 μ M AA and then further incubated at 37 $^{\circ}$ C for 1 h. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions. Proteins were detected by Western blotting as described under "Experimental Procedures." Arrows indicate the position of stacking gels.

only heat-treated A4V was oligomerized (Fig. 5, left panel). In the presence of AA, heat-treated G93A and A4V were highly aggregated, but under the same conditions, wild-type SOD1 was not (Fig. 5, right panel). Oligomerization was observed above 58 $^{\circ}$ C for G93A and above 48 $^{\circ}$ C for A4V (Fig. 5, right panel). In the previous study, A4V was more unstable than G93A for heat treatment analyzed by differential scanning calorimetry (12). This result suggests that structural instability is strongly correlated with oligomerization propensity induced by FAs.

Although we showed that FAs promoted SOD1 oligomerization, the mechanism is not perfectly understood. Similarly, unsaturated FAs oligomerize α -synuclein and tau. In the case of α -synuclein and tau, FAs were bound to proteins, which suggested that oligomerization mechanisms underlie the FA binding characteristics of protein. To examine whether SOD1 binds to FAs, we carried out a solid-phase oleic acid binding assay. Among the holo-enzymes, very small amounts of holo-A4V were bound to the oleate-Sepharose column, whereas wild-type and G93A were not (Fig. 6A). All of the apo-enzymes were bound to oleate-Sepharose, regardless of their mutations (Fig. 6A). In contrast, bound proteins were not observed in mock-Sepharose (Fig. 6A). Nearly all of the input amounts of metal-deficient proteins were bound, which was estimated by 50% input. This finding suggests that metal-deficient SOD1 proteins strongly bind to FAs. We next examined whether heat-treated holo-enzymes bind to FAs. Apo-enzymes were used as control binding. Heat-treated SOD1 mutant (G93A) at 58 $^{\circ}$ C and 68 $^{\circ}$ C was bound to FAs, whereas wild-type was not (Fig. 6B). The results of the FA binding assay were strongly correlated with the oligomerization propensity of SOD1. These findings suggest that FA binding alters the conformation of SOD1 to form oligomers.

FA-induced SOD1 Aggregates Result in Granular Morphology and Are Cytotoxic—We analyzed the ultrastructure of SOD1 aggregates by electron microscope. SOD1 proteins (~40 μ M) were incubated in the presence of 100 μ M AA at 37 $^{\circ}$ C for 24 h. Holo-enzymes were heated at 50 $^{\circ}$ C for 30 min before incubation in the presence of AA. After incubation, granular aggregates were observed in all of apo-enzymes and heat-treated SOD1 mutants (Fig. 7A). In contrast, no visible materials were found in wild-type holo-SOD1s, even though they were heat-treated (Fig. 7A). The morphology of the aggregates was round or amorphous large granules composed of clustered small granules (Fig. 7A). We could not observe any visible protein aggregates in the samples incubated without AA, except in apo-A4V, which revealed a fibril structure (data not shown).

We next examined the effect of FA-induced aggregates on cell

viability of differentiated neuro2a cells. Aggregates of SOD1s were formed using the same methods as described for observation under an electron microscope. Aliquots incubated in the presence or absence of AA were diluted in the culture medium,

which was directly added to differentiated neuro2a cells. After incubation for 18 h, toxicity was assessed with MTS reduction (Fig. 7B) and trypan blue staining (Fig. 7C). The presence of the granular aggregates formed by AA from Apo-SOD1s and heat-treated SOD1 mutants significantly reduced cell viability (Fig. 7, B and C). In contrast, no significant decrease of viability was detected when the cells were exposed either to incubated proteins in the absence of AA or to the buffer solutions used to form the aggregates in the absence of added protein (Fig. 7, B and C). These findings suggest that FA-induced SOD1 aggregates were highly toxic to the cells.

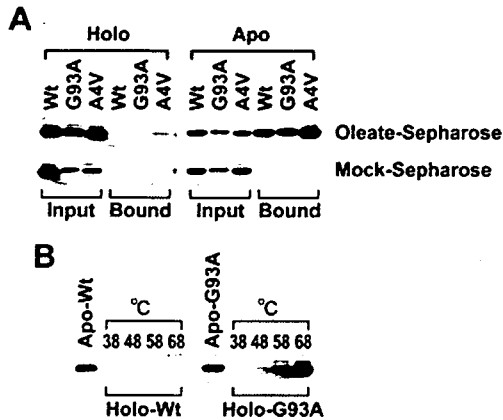


FIG. 6. Solid-phase oleic acid binding assay shows apo-SOD1 or thermally destabilized SOD1 bound to oleate-Sepharose. **A**, solid-phase binding assay was performed as described under "Experimental Procedures." Approximately 50% input (100 ng of proteins) was electrophoresed to estimate the quantity of FA binding SOD1. **B**, holo-SOD1s (wild-type and G93A) were thermally destabilized at the indicated temperatures for 30 min and then directly loaded on oleate-Sepharose. Apo-enzymes were used as positive controls for oleic acid binding.

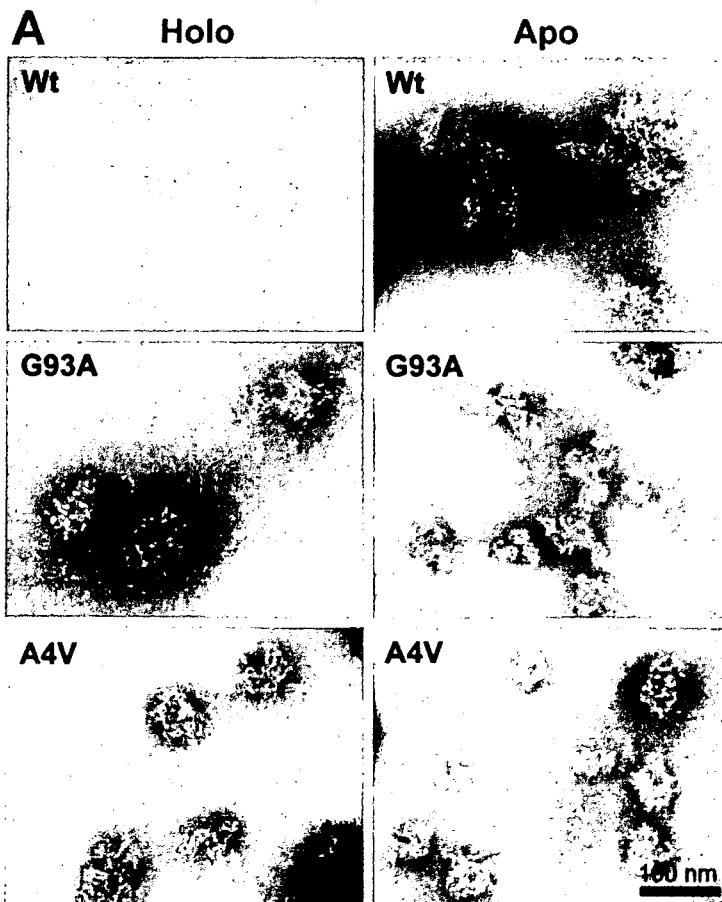
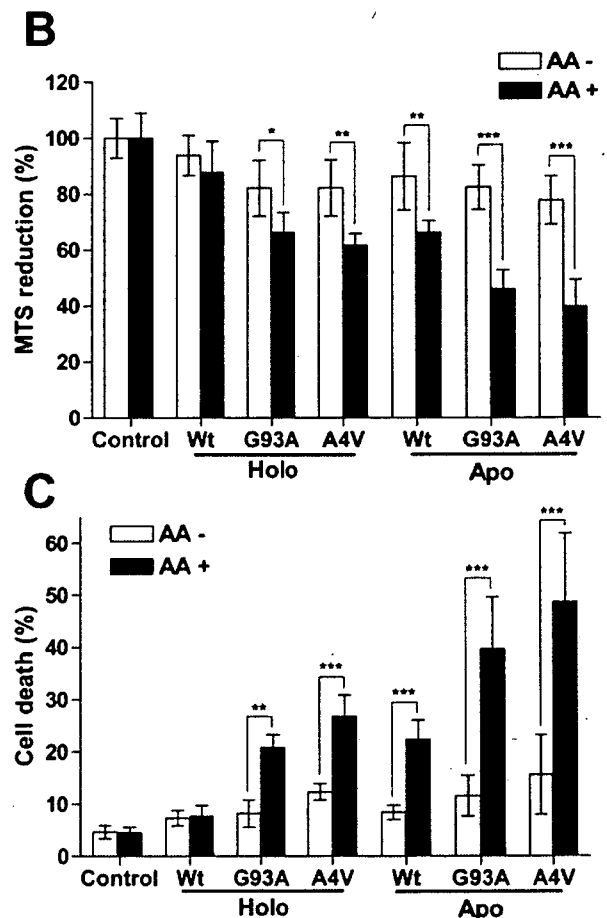


FIG. 7. SOD1 aggregates and their cytotoxicity for the differentiated neuro2a cells. Holo-SOD1s were pre-heated at 50 °C for 30 min before incubation with AA. SOD1 proteins (40 μ M) were incubated in the presence of 100 μ M AA at 37 °C for 24 h before observation under an electron microscope (**A**). Differentiated neuro2a cells were directly exposed for 18 h in medium containing incubated aliquots of SOD1s with or without arachidonic acid. The concentration of SOD1 in the culture medium was 4 μ M. Buffer and AA carryover in the culture medium was controlled. Cytotoxicity was assessed using an MTS reduction assay (**B**) and trypan blue exclusion staining (**C**). The results were analyzed by two-way analysis of variance. The values are the means \pm S.D. ($n = 6$). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

DISCUSSION

Numerous neurodegenerative diseases are accompanied by highly insoluble inclusions of protein aggregates within characteristic neuronal populations. In the case of FALS, the prototypical Lewy body-like hyaline inclusions, composed largely of granule-coated fibrils of SOD1-insoluble filaments, have been detected in the spinal cord of FALS patients with SOD1 gene mutations (5, 28). Although there has been controversy about whether such inclusions are a cause or a consequence of the neuronal degeneration, accumulating evidence suggests that aggregates formed via misfolded proteins, especially soluble oligomeric assemblies, may cause cell injury (29–31). Moreover, cytotoxicity of protein aggregates may have common features because granular aggregates form non-pathological proteins that can also be toxic (26). These findings suggest the avoidance of protein aggregation may be crucial for therapy of



conformational diseases including FALS.

In the present study, we demonstrated that unsaturated FAs promoted SOD1 oligomerization at physiological pH. SOD1 oligomers were detected by SDS-PAGE under non-reducing conditions. Although immunoreactivity for SOD1 oligomers was decreased in SDS-PAGE under reducing conditions, SOD1 oligomers were considerably SDS-resistant under non-reducing conditions. Based on this method, we found that apo-SOD1 proteins were highly oligomerized by AA compared with holo-SOD1 proteins in time-dependent and FA concentration-dependent manners (Fig. 2, B and C). Metal-deficient SOD1s may be representative of misfolding intermediates for their oligomeric assemblies because they are oligomerized independent of their mutations. These findings suggest that metal-deficient SOD1 proteins have a high oligomerization propensity, which is consistent with previous studies (9, 10, 13, 32). Moreover, heating of holo-SOD1 mutants increased the tendency to form oligomer complexes, especially in the presence of AA; however, the wild-type holo-SOD1 did not form oligomers, even after heating to 68 °C and exposure to AA (Fig. 5). This finding suggests that mutations of SOD1 primarily affect their conformation. Our time-course analysis of oligomerization demonstrates that FAs induced the oligomerization process fairly rapidly. We could detect oligomers within 1 h of incubation in the presence of AA (Fig. 1C). Glycerol density gradient centrifugation analysis showed that oligomer species were roughly estimated to be >80% of the total SOD1 after a 90-min incubation in the presence of AA (Fig. 4). The conversion efficiency and the speed of oligomer formation may be considered as supportive evidence that these reactions occur *in vivo*.

Aggregations of misfolded proteins are primarily affected by their mutations, especially in inherited conformational diseases. Mutant proteins in conformational diseases have a common characteristic of easily unfolding in a physiological condition and favoring aggregate formation. Protein aggregation has also been shown to be modulated by several factors, including protein concentration, pH, and interactions with other elements such as lipid molecules. It has been reported that FAs stimulated the polymerization of amyloid β -peptides, tau (17, 33), and α -synuclein (18, 19) *in vitro*. These studies suggest that FAs play a pivotal role as nucleates in the self-assembly of misfolded proteins. Although the precise mechanism of how lipid molecules accelerate protein aggregation has not been elucidated, it has been proposed that lipid-bound proteins change their conformation or anionic surfaces, presenting as micelles or vesicles, which can serve to nucleate aggregate formation (18, 34, 35). We confirmed that apo-SOD1s or heat-treated holo-SOD1 mutants were bound to oleic acid (Fig. 6). The FA binding properties of SOD1s were strongly correlated to their conformational instability. These results are consistent with the notion that misfolding intermediates of SOD1 caused by mutations or metal loss may be facilitated by FAs to form oligomeric structures. Another possible mechanism is protein oxidation by FAs. Oxidation also enhances misfolding and aggregation of SOD1 (32). In particular, FAs can lead to the production of radicals because they are easily peroxidized by auto-oxidation to generate peroxy radicals. However, we could not inhibit SOD1 oligomerization using even a considerable amount of radical scavenger (data not shown). Moreover, oxidized derivatives of FAs also induced SOD1 oligomerization to a similar extent with fresh FAs (data not shown). This finding suggests that oxidation or oxidative damage of SOD1 does not directly drive SOD1 oligomerization. Rather, it is most likely to be associated with a SOD1-destabilizing event.

Recently, several studies for *in vitro* aggregation of SOD1 have been published. Aggregation of SOD1 can be induced by

metal-catalyzed oxidation (32), trifluoroethanol, or heat treatment (10), which induces oxidative modification or protein destabilization. This indicates that structurally unstable SOD1 has an influence on its aggregate formation *in vitro*. Crystallographic studies suggest that metal-deficient SOD1 forms an amyloid-like assembly caused by non-native conformational changes and permits dimer interaction (36, 37). This amyloid-like structure was represented by prolonged incubation of SOD1 at acidic pH (9). In the present study, ultrastructural analysis showed that the FA-inducing aggregates had round or amorphous morphology with clustered tiny spherical aggregates (Fig. 7A). They resemble pre-fibrillar aggregates of the N-terminal domain of *Escherichia coli* HypF protein or aggregates of the Src homology 3 domain of cytosolic phosphatidylinositol 3-kinase as reported by Stefani and co-workers (26). They demonstrated that granular aggregates of proteins, even non-pathological proteins, are cytotoxic when applied externally (26). Our data also demonstrate that granular aggregates of SOD1s reveal significant cytotoxicity (Fig. 7, B and C). Although the cytotoxic mechanism of the aggregates is not completely understood, it has been proposed that such pre-fibrillar intermediates may lead to cytotoxicity by permeabilization of the membrane bilayer (38, 39).

The present findings may provide considerable pathological implication for FALS. Lipid molecules such as FAs may be positive modulators for misfolded protein aggregations. Most misfolded proteins including SOD1 mutants are rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system. Unsaturated FAs may promote misfolded protein aggregations before they are degraded. In addition, cytotoxic aggregate formation of SOD1 may require FAs because granular aggregates structures were markedly observed in SOD1s incubated with AA. Although it is not clear whether the cytotoxic aggregates of SOD1s are generated intracellularly, we have provided a protein aggregation model system to help understand the pathological significance of FAs as a positive modulator for the aggregate formation in FALS. We believe that our system will contribute to efficient drug screening for inhibitors of SOD1 aggregation.

Acknowledgment—We thank Dr. Toshihide Kobayashi for critical advice and helpful discussions.

REFERENCES

- Deng, H. X., Hentati, A., Tainer, J. A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W. Y., Getzoff, E. D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R. P., Warner, C., Deng, G., Soriano, E., Smyth, C., Parge, H. E., Ahmed, A., Roses, A. D., Hallewell, R., Pericak-Vance, M. A., and Siddique, T. (1993) *Science* 261, 1047–1051
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S., Tanzi, R., Halperin, J. J., Herzfeldt, B., Van den Berg, R., Hung, W., Bird, T., Deng, G., Mulder, D. W., Smith, C., Laing, N. G., Soriano, E., Pericak-Vance, M. A., Haines, J., Rouleau, G. A., Gusella, J., Horvitz, H. R., and Brown, R. H., Jr. (1993) *Nature* 362, 59–62
- Shibata, N., Asayama, K., Hirano, A., and Kobayashi, M. (1996) *Dev. Neurosci.* 18, 492–498
- Brujin, L. I., Becher, M. W., Lee, M. K., Anderson, K. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Sisodia, S. S., Rothstein, J. D., Borchelt, D. R., Price, D. L., and Cleveland, D. W. (1997) *Neuron* 18, 327–338
- Kato, S., Hayashi, H., Nakashima, K., Nanba, E., Kato, M., Hirano, A., Nakanishi, I., Asayama, K., and Ohama, E. (1997) *Am. J. Pathol.* 151, 611–620
- Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Dal Canto, M. C., Gurney, M. E., Komori, T., Umahara, T., and Asayama, K. (1998) *Acta Neuropathol.* 95, 136–142
- Watanabe, M., Dykes-Hoberg, M., Culotta, V. C., Price, D. L., Wong, P. C., and Rothstein, J. D. (2001) *Neurobiol. Dis.* 8, 933–941
- Wang, J., Xu, G., Gonzales, V., Coonfield, M., Fromholt, D., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Borchelt, D. R. (2002) *Neurobiol. Dis.* 10, 128–138
- DiDonato, M., Craig, L., Huff, M. E., Thayer, M. M., Cardoso, R. M., Kassmann, C. J., Lo, T. P., Bruns, C. K., Powers, E. T., Kelly, J. W., Getzoff, E. D., and Tainer, J. A. (2003) *J. Mol. Biol.* 332, 601–615
- Stathopoulos, P. B., Rummfeldt, J. A., Scholz, G. A., Irani, R. A., Frey, H. E., Hallewell, R. A., Lepock, J. R., and Meiring, E. M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7021–7026
- Hayward, L. J., Rodriguez, J. A., Kim, J. W., Tiwari, A., Goto, J. J., Cabelli, D. E., Valentine, J. S., and Brown, R. H., Jr. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 15923–15931