

氏名	おおえだともこ 大江田 知子
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2551号
学位授与の日付	平成15年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科脳統御医科学系専攻
学位論文題目	Oxidative stress causes abnormal accumulation of familial amyotrophic lateral sclerosis-related mutant SOD1 in transgenic <i>Caenorhabditis elegans</i> . (酸化ストレスはトランスジェニック <i>Caenorhabditis elegans</i> において家族性筋萎縮性側索硬化症関連変異 SOD1 蛋白の異常凝集を誘導する)
論文調査委員	(主査) 教授 金子武嗣 教授 淀井淳司 教授 柴崎 浩

### 論 文 内 容 の 要 旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者の約10%は家族性で、通常、常染色体優性遺伝を示す。さらに家族性 ALS (FALS) の約20%の家系には、銅/亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) 遺伝子に変異があることが知られ、現在までに70種類以上の変異が報告されている。変異 SOD1 蛋白が運動ニューロンに変性をもたらす機序は明らかでないが、トランスジェニックマウスの研究結果等により、変異による SOD1 酵素活性の低下は問題ではなく、変異蛋白自身が細胞に対してなんらかの毒性を発揮し細胞死を惹起しているものと考えられている。

変異 SOD1 蛋白と細胞傷害の関係を明らかにするために、本研究では、モデル生物として *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) の有用性に注目し、ヒト変異 SOD1 導入トランスジェニック *C. elegans* を創製した。*C. elegans* は、発生・神経回路・遺伝子など、最もよく理解された多細胞生物であり、遺伝学的解析が容易で多数の個体を一度に検討できるなど、実験上多くの利点を有する。

ヒト白血球より分離した野生型 SOD1 遺伝子に、FALS として報告されている3種類の点変異 (A4V, G37R, G93A) をそれぞれ導入した。野生型および変異 SOD1 遺伝子を、*C. elegans* 用熱ショック発現ベクターおよび体壁筋発現ベクターにサブクローニングし、野生型 *C. elegans* に注入した。得られたそれぞれのトランスジェニック株について、ウェスタンブロッティング法およびネイティブゲル解析を行い、野生型および変異ヒト SOD1 が *C. elegans* 体内で発現し、どちらも SOD 活性を有していることを確認した。ネイティブゲル解析では変異蛋白の泳動度はそれぞれ異なっており、変異による蛋白高次構造の変化を反映していると考えられた。

ヒト変異 SOD1 導入トランスジェニック *C. elegans* を顕微鏡下で詳細に観察したが運動異常や器官変異などの明らかな表現型の変化は認めなかった。ALS 患者脊髄では酸化生体分子が増加しているという知見などから、酸化ストレスが ALS の病態機序に関与している可能性が指摘されている。そこで、得られた各トランスジェニック株の酸化ストレスに対する耐性を調べたところ、変異 SOD1 導入株は野生型 SOD1 導入株に比して、パラコート負荷で惹起される酸化ストレスに対して脆弱性を示した。その機序を検索するため、次に、熱ショック後 *C. elegans* 内で発現されたヒト SOD1 蛋白が、どのように消長するか時間経過を追った。すると、通常環境下では、変異蛋白は野生型に比べて速やかに消褪し、変異蛋白の不安定さが示された。一方、同様の実験を酸化ストレス下で行うと、変異蛋白の消褪が遅延することが判明した。これは、酸化ストレスによる蛋白処理機能の障害、もしくは、変異蛋白そのものが処理されにくい状態に変化したものと考えられた。不処理変異蛋白の構造変化を観察しやすいように体壁筋組織に変異 SOD1 蛋白を GFP と共に発現させたトランスジェニック *C. elegans* を、顕微鏡下で詳細に観察した。酸化ストレス下では、一部虫体の筋組織内で GFP が SOD1 蛋白を含む不均一な凝集体を形成し、その異常凝集体をもつ虫体の割合は、虫の加齢と共に増した。

以上の結果より、酸化ストレスは FALS 関連変異 SOD1 蛋白の分解過程を障害し、その結果、変異蛋白を含む異常凝集

体が形成され細胞傷害を引き起こすことが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究では、家族性筋萎縮性側索硬化症（FALS）の病態解明のため、モデル生物として *Caenorhabditis elegans*（*C. elegans*）の有用性に注目し、ヒト変異 SOD1 導入トランスジェニック *C. elegans* を作製した。FALS の原因として報告されている 3 種類の点変異（A4V, G37R, G93A）および野生型 SOD1 を導入した各トランスジェニック株を確立した。まず FALS 病態機序への酸化ストレスの関与を明らかにするため、各株の酸化ストレス耐性を調べたところ、変異 SOD1 導入株は野生型 SOD1 導入株に比して脆弱であることを見出した。さらに、トランスジェニック体内における各 SOD1 蛋白の時間的消長を追うと、変異蛋白は野生型に比べて速やかに消褪し、変異蛋白の不安定さが示された。一方、酸化ストレス下では変異蛋白の消褪が遅延することが判明し、酸化ストレスが変異蛋白処理機能を障害したものと考えられた。変異 SOD1 を GFP 蛋白と共発現した虫体を顕微鏡下で観察すると、酸化ストレス下では、筋組織内で SOD1 蛋白を含む不均一な凝集体を形成し、その異常凝集体をもつ虫体の割合は虫の加齢と共に増した。以上の結果より、酸化ストレスは FALS 関連変異 SOD1 蛋白の分解過程を障害し、その結果、変異蛋白を含む異常凝集体が形成され、細胞傷害を引き起こすことが示唆された。

以上の研究は FALS の発症機序解明に貢献し、同疾患の病態理解ひいては治療法の発見に寄与するところが多い。したがって本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成15年2月3日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。