

紫外共鳴ラマン分光法を用いた SOD1 変異体に共通する酸化促進性獲得メカニズムの解明

(東北大院・薬) ○藤巻 暢宏、西屋 健、三浦 隆史、中林 孝和

UV resonance Raman studies on the common mechanism of the acquisition of pro-oxidant activity in fALS-linked SOD1 mutants

(Tohoku Univ.) N. Fujimaki, K. Nishiya, T. Miura, T. Nakabayashi

【序】 筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS) は運動神経細胞を特異的に障害する神経変性疾患であるが、その原因は未だ解明されておらず難病に指定されている。家族性 ALS の一部が Cu,Zn-Superoxide dismutase (SOD1) の変異と関連があると報告されたことから、ALS 発症メカニズムの解明を目的とした SOD1 の研究が数多くなされている。現在、変異 SOD1 に起因する酸化ストレスが ALS を発症させる、という酸化ストレス仮説が提唱されているものの、変異 SOD1 が酸化ストレスを生成する機構は明らかになっていない。

本研究室における過去の研究から、家族性 ALS 関連変異体の一つである 43 番目の Histidine が Arginine に置換された (His43→Arg, H43R) SOD1 変異体は、(i) 活性中心の Cu と Zn を欠損する (apo 体になる) ことにより構造不安定性が増加し、pH 7.4、37 °C の生理的条件下で急速に不規則構造に富んだ一定の構造へ変化する (変性する) こと、(ii) こうして得られた変性 apo-H43R は、Cu を再結合することで新たに酸化促進性を獲得することが明らかになった (図 1)¹。変性 apo-H43R による酸化促進性の獲得は、生体内において酸化ストレスの上昇を引き起こし、ALS 発症の一因になると推察される。

一方、家族性 ALS に関連する SOD1 の変異は 160 種類以上報告されており、H43R 以外の変異体でも同様に酸化促進性を獲得するかどうかは、ALS 治療の観点から重要である。我々は ALS 研究で汎用される Ala4→Val (A4V) および Gly93→Ala (G93A) 変異体について調べたところ、H43R と同様に生理的条件下で変性し、酸化促進性を獲得することがわかった²。

異なる変異体でも同様に酸化促進性を獲得することから、変性に伴い構築される酸化促進性の活性中心である Cu 結合部位の構造が共通している可能性が考えられる。そこで本研究では、活性中心である Cu 結合部位の構造解析を行なうことで、変異 SOD1 が共通して酸化促進性を獲得するメカニズムについて検討した。

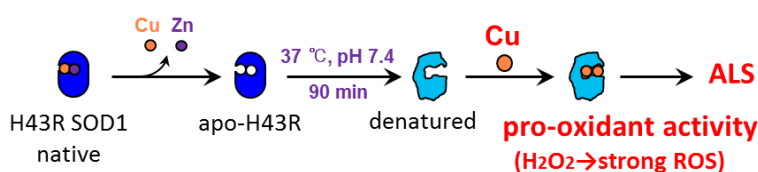


図 1. SOD1 の酸化促進性獲得条件

【実験】 229 nm の紫外の励起光を用いたラマン測定では、共鳴効果によって His 残基や Trp 残基のラマンバンドが選択的に増大する。これを利用し、我々はこれまでに H43R について紫外共鳴ラマンスペクトルの測定を行ない、活性中心となる Cu 結合部位を構成する His 残基を検出してその結合様式を解析してきた³。そこで今回は、野生型 (apo-WT) および変性させた apo-A4V、apo-G93A に Cu²⁺を添加し、紫外共鳴ラマンスペクトルを測定した。変性 apo-A4V および変性 apo-G93A から得られるスペクトルについて、H43R や酸化促進性を示さない WT のスペクトルと比較することで、酸化促進性獲得に必要な共通性を考察した。

【結果】 変性 apo-A4V の紫外共鳴ラマンスペクトルを測定したところ (図 2)、Cu の添加によって Cu が結合した His 残基に由来するバンド (His-Cu) が新たに観測された。この結果は、Cu 結合部位が His 残基により構成されていることを示している。また、同様に測定した変性 apo-G93A および apo-WT についても、His-Cu のバンドが観測された。His 残基はその非対称性から imidazole 環に N π 位と N τ 位の 2 つの N 原子を持つ。紫外共鳴ラマンスペクトルでは、この 2 つの N 原子のどちらに Cu が結合しているかで異なる位置にバンドを示す (HisN π -Cu、HisN τ -Cu)。これらのバンドを利用して、WT と変性した変異体との間における Cu 結合部位を構成する His 残基の配位様式の違いを調べた。1580 cm⁻¹ の His-Cu のバンド (HisN π -Cu 由来のバンドと HisN τ -Cu 由来のバンドが重なったもの) と 1390 cm⁻¹ の HisN π -Cu のバンド、そして 1350 cm⁻¹ の HisN τ -Cu のバンドについて面積強度を見積もり、モデル化合物のラマンスペクトルの面積強度を用いて定量を行なった (表 1)。定量結果から、(i) HisN π -Cu / HisN τ -Cu 比は H43R、A4V、G93A でどれも同程度であり WT とは異なること、(ii) His-Cu の総数が H43R、A4V、G93A では同程度であり、WT とは異なることの 2 点がわかった。どちらも変性した変異体間で共通していることから、どの変異体も変性に伴い金属結合部位を native から変化させることによって酸化促進性を獲得していると考えられる。

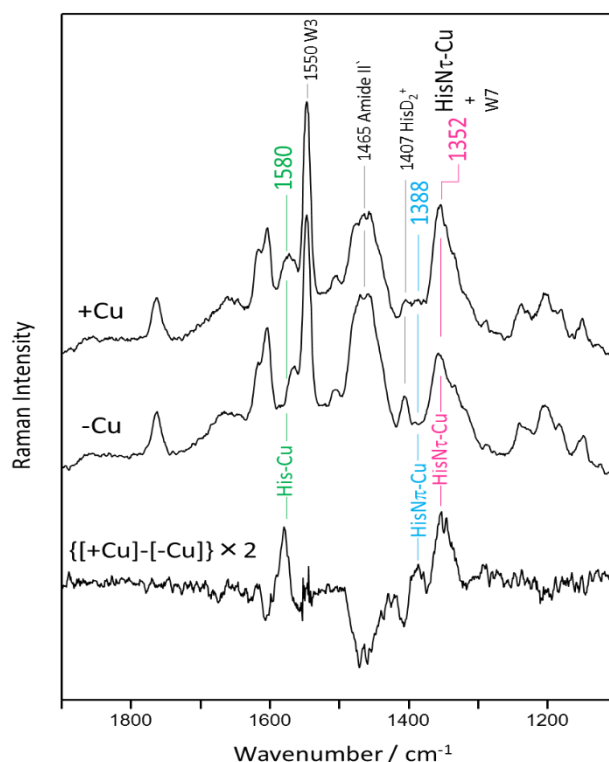


図 2. 変性 apo-A4V の紫外共鳴ラマンスペクトルおよび Cu²⁺添加の有無から得た差スペクトル

表 1. モデル化合物から算出した定量結果

	His-Cu	HisN π -Cu	HisN τ -Cu
変性apo-H43R	4.6	1.1	3.1
変性apo-A4V	4.5	1.0	3.2
変性apo-G93A	4.3	1.4	3.2
apo-WT	5.6	2.2	2.9

【考察】 各変異体は変性に伴い活性中心の Cu 結合部位の構造を変化させ、結果の (i)、(ii) として言及した差異を生じさせた。変性 apo-H43R の Cu 結合部位の構造解析に関する我々の最近の研究から、酸化促進性獲得は変性に伴う Cu 結合部位からの His120 の消失が原因であるという考察がなされている⁴。今回 A4V と G93A の金属結合部位の構造変化は H43R と酷似していたため、変異体に共通して His120 が変性に伴い Cu 結合部位から消失し、酸化促進性獲得に至るといった共通のメカニズムが考えられる。

1. Kitamura, F., et al., *Biochemistry*, **50**, 42420 (2011). 2. 西屋健他 第 52 回生物物理学会年会, 1P047 (2014). 3. Fujimaki, N., et al., *Biochemistry*, **52**, 5184 (2013). 4. 藤巻暢宏他 第 42 回生体分子科学討論会, 34 (2015).