

研究

亜鉛欠乏時に小胞体ストレスを誘導する分子スイッチとしてのSOD1の新機能

東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学 本間謙吾, 一條秀憲

要約

亜鉛は生体に必須の微量元素であり、亜鉛欠乏は人体に様々な異常をもたらすことが知られている。しかしながら、亜鉛欠乏時の細胞応答については未解明な点が多く残されており、その一つとして小胞体ストレス応答が挙げられる。著者らはこれまでに、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) の原因遺伝子である *Cu/Zn Superoxide dismutase (SOD1)* が遺伝子変異により構造変化し、小胞体ストレスを誘導する分子メカニズムを明らかにしてきた。これに加えて、今回新たに野生型 SOD1 も亜鉛欠乏時に変異型と同様の構造に変化し、亜鉛欠乏依存的な小胞体ストレスを惹起する分子スイッチと機能していることを見出した。さらに、小胞体ストレスを介した翻訳抑制や遺伝子発現は、亜鉛欠乏に対する恒常性維持機構の一端であることが明らかとなった。本稿では、亜鉛欠乏時の小胞体ストレス誘導分子スイッチとしての SOD1 の機能を中心に、著者らのこれまでの研究を紹介したい。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は運動神経が選択的に侵される、進行性・晩発性の神経変性疾患である。ALS 全体のおよそ 90 % が家族歴を伴わない孤発性の ALS (sporadic ALS: SALS) であり、残りの 10 % 程度が遺伝的な要因が関与する家族性の ALS (familial ALS: FALS) である。近年の技術発展により 20 種類を超える原因遺伝子が次々と発見され、様々な病態発症機構が提唱されているが、未だに詳細な発症メカニズムは明確になっておらず、それ故に分子メカニズムに基づいた治療方法も存在しない。

最も初期に発見された ALS 原因遺伝子である *Cu/Zn Superoxide dismutase (SOD1)* についてはこれまでに多くの研究がなされており、180 種類を超える変異が見つかっている^{1,2)}。SOD1 は抗酸化酵素として機能することが知られているが、*SOD1* 遺伝子変異による ALS の多くは常染

色体優性遺伝形式であること、SOD 活性と病態に相関がないこと、*SOD1* ノックアウトマウスが病態を示さない一方で ALS 病態関連変異型 SOD1 のトランスジェニックマウスが ALS 様の症状を呈することから、SOD 活性の変化ではなく遺伝子変異による獲得性の神経細胞毒性が ALS に関わっていると考えられている^{3,7)}。SOD1 の獲得性の毒性として、興奮毒性・酸化ストレス・小胞体ストレス・ミトコンドリア機能異常・軸索輸送異常・タンパク質の異常凝集・ミクログリアによる細胞非自律的な運動神経毒性などが報告されており⁷⁾、これらの要因が複合的に絡み合っ

て ALS 発症に至る。しかし、これまで数多の変異型 SOD1 が共通に毒性を発揮する分子機構の詳細はわかっていなかった。著者らはその中でも小胞体ストレスに着目して、細胞毒性を発揮する分子メカニズムの解析を行ってきた。

一方で、小胞体ストレスは細胞の亜鉛欠乏に対する細胞応答の一つとしても知られている^{8,9)}。しかしながら、亜鉛の欠乏が小胞体ストレスを誘

導する詳細な分子メカニズムや生理的な意義については未解明な点が多く残されている。

本稿では、これまでに著者らが明らかにした変異型 SOD1 に共通の小胞体ストレス誘導メカニズムと、近年新たにわかった亜鉛による SOD1 構造制御機構とその生理的な機能について概説する。

1. 変異型 SOD1 による小胞体ストレス誘導機構

遺伝子変異や虚血などの原因により小胞体内に構造異常なタンパク質が蓄積すると、小胞体ストレスが惹起される。小胞体ストレス応答は様々な疾患に関与することが知られており、ALS 患者においても小胞体ストレスの増強が確認されている⁷⁾。しかしながら、変異型 SOD1 による小胞体ストレス誘導が報告されている一方で、主に細胞質に存在する変異型 SOD1 が小胞体ストレスを誘導するメカニズムは不明であった。以前著者らは、変異型 SOD1 が小胞体膜タンパク質 Derlin-1 との特異的な結合を介して小胞体関連分解 (ER-associated degradation: ERAD) を阻害することで小胞体ストレスを惹起することを報告した¹⁰⁾。ERAD は小胞体内の不良タンパク質を細胞質へと逆輸送し分解する機構であるが、変異型 SOD1 が ERAD 複合体構成因子である Derlin-1 と結合すると不良タンパク質の逆輸送が阻害され、小胞体内に不良タンパク質が蓄積することで小胞体ストレスが惹起されることがわかった。検討した 100 種類以上の変異型 SOD1 のほぼ全てが Derlin-1 と結合する一方で野生型 SOD1 は結合しないことから、Derlin-1 との結合は ALS 病態関連変異型 SOD1 に共通する小胞体ストレス誘導メカニズムであると考えられる¹¹⁾。

2. 亜鉛欠乏による野生型 SOD1 構造変化

では、100 種類を超える変異型 SOD1 はどのようにして共通に Derlin-1 と結合するのだろうか。Derlin-1 との結合を引き起こす ALS 関連変異は、SOD1 構造上の至るところに存在することから、

変異により新たに Derlin-1 との結合面を形成するとは考えにくい。そこで、SOD1-Derlin-1 結合の詳細な解析を行った結果、野生型 SOD1 では三次元構造上内部に隠れた Derlin-1 結合領域が遺伝子変異による構造変化を介して外部に露出することが、変異型 SOD1 と Derlin-1 が結合する分子メカニズムであることがわかった¹¹⁾。ここで、野生型 SOD1 も Derlin-1 との結合領域を有していることから、野生型 SOD1 に潜在する Derlin-1 結合領域が何らかの条件下で露出することで、SOD1 が生理的な小胞体ストレス誘導スイッチとして機能している可能性が考えられた。そこで、小胞体ストレスを惹起する様々な条件下で SOD1 が構造変化、Derlin-1 と結合するか検討したところ、血清飢餓条件で細胞を培養すると、野生型 SOD1 も変異型 SOD1 と同様の構造に変化し、Derlin-1 と結合することが明らかとなった¹¹⁾。さらに、この結合は血清飢餓条件下での培養後、培地中に血清を再添加することで解離することから、血清中に SOD1 構造変化を抑制する因子が含まれていることが想定された。そこで、SOD1 と Derlin-1 の結合を指標にこの因子の同定を試みたところ、血清中に含まれる亜鉛が SOD1 の構造制御因子であることがわかった¹²⁾。実際に亜鉛キレーターを用いて亜鉛欠乏状態にすると、血清存在下であっても SOD1 が構造変化し、Derlin-1 と結合した。さらに、亜鉛配位部位に変異を導入した SOD1 や in vitro での構造変化の解析結果から、亜鉛欠乏時の SOD1 構造変化は SOD1 に配位した亜鉛が解離することで可逆的に起こることが明らかになった¹²⁾。つまり SOD1 は、亜鉛欠乏時には配位した亜鉛を失うことによる構造変化を介して Derlin-1 と結合し、細胞内に亜鉛が十分に補給され亜鉛を再び配位すると、構造が戻ることで Derlin-1 から解離する、亜鉛欠乏センサーとしての機能を有することが示唆された。

3. 亜鉛欠乏時の野生型 SOD1-Derlin-1 結合を介した小胞体ストレス

前述したように、変異型 SOD1 は Derlin-1 と

の結合を介して ERAD を阻害することで小胞体ストレスを惹起するため、亜鉛欠乏時に Derlin-1 に結合した野生型 SOD1 も小胞体ストレス誘導に関与していると想定された。実際に、亜鉛欠乏依存的に上昇する、小胞体ストレスマーカーである *XBP-1* と *BiP* の mRNA 発現が、SOD1 や Derlin-1 の発現抑制によって減弱したことから、野生型 SOD1 と Derlin-1 との結合は亜鉛欠乏時の小胞体ストレス誘導スイッチとして機能していると考えられる¹²⁾。

4. 亜鉛欠乏に対する恒常性維持機構としての小胞体ストレス応答

亜鉛は 300 種類以上のタンパク質が正常な立体構造をとるために必要であると予想されており、亜鉛欠乏時にはこれらのタンパク質が正常な三次元構造をとれず、不良タンパク質として蓄積すると考えられる。実際、亜鉛欠乏依存的な細胞の viability の低下はタンパク質合成阻害剤の添加により回復することから、やはり不良タンパク質の蓄積が亜鉛欠乏時の細胞恒常性の破綻に寄与していることがわかった¹²⁾。一方で、小胞体ストレスセンサーの 1 つである PERK の下流では eIF2- α^P のリン酸化を介して翻訳が抑制されることがよく知られている¹³⁾。亜鉛欠乏による小胞体ストレス

誘導においても PERK が活性化され、翻訳が抑制されることが確認された。さらに、この PERK の活性化と翻訳抑制は Derlin-1 の発現抑制により減弱することから、SOD1-Derlin-1 結合を介した小胞体ストレス誘導が関与していることがわかった¹²⁾。また、亜鉛欠乏時の viability の低下が Derlin-1 の発現抑制により促進することから、SOD1-Derlin-1 結合による小胞体ストレスを介した翻訳の抑制が、不良タンパク質の蓄積を防ぐことで細胞の恒常性維持に関わっていると考えられる。

さらに、亜鉛欠乏による小胞体ストレス誘導がより直接的に亜鉛恒常性の回復に関わっている可能性を検討するため、マウス肝臓において小胞体ストレスおよび亜鉛欠乏のどちらの刺激においても共通に誘導される亜鉛トランスポーターを探索した。同定された亜鉛トランスポーターの 1 つである ZIP14 は小胞体ストレスセンサーの 1 つである ATF6 により顕著に誘導され、亜鉛欠乏依存的な発現上昇は ATF6 のドミナントネガティブ体の発現により抑制された¹²⁾。ZIP14 は細胞内に亜鉛を取り込むトランスポーターである¹⁴⁾。つまり亜鉛欠乏時の小胞体ストレスは、ATF6 の活性化により亜鉛トランスポーター ZIP14 の誘導を介して亜鉛取り込みを促進し、亜鉛恒常性の回復に貢献していると考えられる。

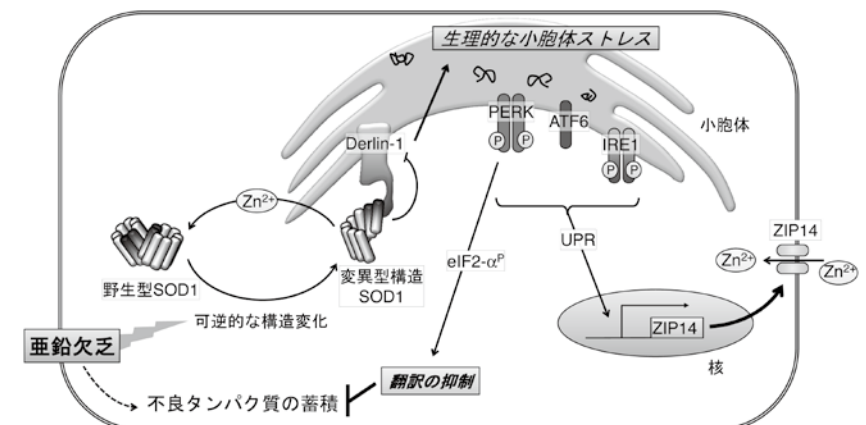


図1 亜鉛欠乏による SOD1 構造変化と小胞体ストレス応答

亜鉛が欠乏すると SOD1 は配位した亜鉛を失うことで変異型構造に変化し、Derlin-1 と結合する。この結合により、ERAD が阻害され、小胞体ストレスが惹起される。小胞体ストレス下流で起こる翻訳の抑制や遺伝子発現誘導は、亜鉛欠乏時の不良タンパク質蓄積の阻害や亜鉛取り込みを促進することで細胞の恒常性維持に関与している。

おわりに

本研究結果は、SOD1が従来の抗酸化酵素としての機能の他に亜鉛欠乏をセンスして、小胞体ストレスを惹起する分子スイッチとして機能していること示している。さらに、SOD1は亜鉛欠乏時にALSの原因となる変異型SOD1と同様の構造に変化することから、SOD1遺伝子変異によるALSでは、変異によりSOD1の小胞体ストレス誘導スイッチとしての機能が破綻し、常に小胞体ストレスを誘導する構造になっていることが、運動神経細胞死を引き起こす原因であると考えられる。一方で、近年の研究からSOD1の構造変化が非SOD1遺伝子変異によるALSの発症に関

わっている可能性が示唆されている^{15, 16)}。今回、亜鉛欠乏という環境要因がSOD1構造変化の原因であることが明らかになったことで、亜鉛恒常性の破綻がSOD1構造変化を介したALS発症に関わっている可能性が推測される。亜鉛欠乏がSOD1構造変化を介して小胞体ストレスを惹起する一方で、SOD1構造変化による小胞体ストレスは亜鉛に取り込みを促進することから、ALS病態に亜鉛の欠乏と過剰のどちらも関与しえと考えられるため、今後のさらなる研究により、SOD1が構造変化する詳細な分子機構が解明され、ALS病態と亜鉛恒常性破綻がどのように関与しているか解明されることが望まれる。

◆文献

- 1) Rosen DR, et al : Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362 : 59-62, 1993
- 2) ALSod : Amyotrophic Lateral Sclerosis Online genetics Database. <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>
- 3) Cleveland DW, Laing N, Hurse PV, et al : Toxic mutants in Charcot's sclerosis. *Nature* 378 : 343-343, 1995
- 4) Reaume AG, et al : Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13 : 43-47, 1996
- 5) Gurney ME, et al : Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264 : 1772-1775, 1994
- 6) Pasinelli P, Brown RH : Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis : insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 7 : 710-723, 2006
- 7) Ilieva H, Polymenidou M : Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders : ALS and beyond. *J Cell Biol* 187 : 761-772, 2009
- 8) Ellis CD, et al : Zinc and the Msc2 zinc transporter protein are required for endoplasmic reticulum function. *J Cell Biol* 166 : 325-335, 2004
- 9) Ishihara K, et al : Zinc transport complexes contribute to the homeostatic maintenance of secretory pathway function in vertebrate cells. *J Biol Chem* 281 : 17743-17750, 2006
- 10) Nishitoh H, et al : ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress-and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev* 22 : 1451-1464, 2008
- 11) Fujisawa T, et al : A novel monoclonal antibody reveals a conformational alteration shared by amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants. *Ann Neurol* 72 : 739-749, 2012
- 12) Homma K, et al : SOD1 as a molecular switch for initiating the homeostatic ER stress response under zinc deficiency. *Mol Cell* 52 : 75-86, 2013
- 13) Malhotra JD, Kaufman RJ : The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* 18 : 716-731, 2007
- 14) Hojo S, et al : The zinc transporter SLC39A14/ZIP14 controls G-protein coupled receptor-mediated signaling required for systemic growth.

PLoS ONE 6 : e18059, 2011

- 15) Bosco DA, et al : Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat Neurosci* 13 :

1396-1403, 2010

- 16) Haidet-Phillips AM, et al : Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol* 29 : 824-828, 2011

Noncanonical role of SOD1 as an ER stress-inducing switch during zinc deficiency

Kengo Homma, Hidenori Ichijo

Laboratory of Cell Signaling, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

Laboratory of Cell Signaling, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan.

Tel: 03-5841-4858

Zinc is an essential micronutrient and the shortage of zinc causes various defects. Cells deal with zinc deficiency through the various cell responses, one of which is the activation of endoplasmic reticulum (ER) stress signaling. However, the precise mechanism to induce ER stress signaling and the physiological role of the ER stress response during zinc deficiency remained poorly understood. We previously revealed the common mechanism by which most of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-pathogenic Cu/Zn Superoxide dismutase (SOD1) mutants cause ER stress. Recently, we also found that during zinc deficiency, wild-type SOD1 adopts the same conformation as mutants, and functions as switch to activate ER stress signaling. Moreover, the translational attenuation and gene induction through the activation of the ER stress response were shown to contribute to save cell homeostasis during zinc deficiency. Here, we introduce our recent studies focusing on the noncanonical function of SOD1 as a molecular switch for initiating the ER stress response under zinc deficiency.

◆本間謙吾略歴

2008年	東京大学薬学部薬化学科卒業
2013年	同大学薬学系研究科博士課程修了 薬学博士 同研究科細胞情報学教室特任研究員
2014年	同研究科細胞情報学教室特任助教