

## 64. Sigma-1 受容体異常による運動神経変性機序の解明

山中 宏二

名古屋大学 環境医学研究所 病態神経科学分野

Key words : 小胞体・ミトコンドリア膜間領域, Sigma-1 受容体, SOD1, ALS

### 緒言

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動神経に選択的な細胞死がおこる神経変性疾患であり、約 10 % は遺伝性に発症する。遺伝性 ALS の原因遺伝子の一つとして、*SOD1* (Cu/Zn superoxide dismutase) 遺伝子上の優性変異が知られている。SOD1 蛋白質は主に細胞質に存在し、細胞内の有害な活性酸素種の除去を担う酵素であるが、患者由来の変異 SOD1 はその酵素活性に関係なく、未知の毒性を発揮することが知られている。患者由来の変異を持つ *SOD1* 遺伝子を強発現するトランスジェニックマウス (変異 SOD1 マウス) は、進行性に後肢の麻痺と運動神経変性を呈し、ALS の動物モデルとして頻用されている<sup>1)</sup>。

ALS の運動神経細胞では、ミトコンドリアや小胞体などの様々なオルガネラが傷害されるが、その詳しい機序は明らかでない。そこで、本研究では小胞体・ミトコンドリア膜間領域 (MAM: mitochondria-associated membranes) に着目した。最近の研究から MAM は小胞体やミトコンドリアの機能維持に重要であることが指摘されており<sup>2)</sup>、更に興味深いことに MAM 特異的な Sigma-1 受容体 (Sig1R) タンパク質をコードする *SIGMAR1* 遺伝子の劣性変異が新規の ALS 原因遺伝子として報告された<sup>3)</sup>。本研究では MAM の機能異常が ALS 病態に及ぼす影響を明らかにするため、培養細胞およびマウスモデルを用いた実験により検討を行った。

### 方法および結果

マウス神経芽腫細胞株 Neuro2a (N2a) に ALS 関連変異である E102Q または L95fs を導入した Sig1R 変異体を発現させたところ、これらの Sig1R 変異体は細胞内で極めて不安定であることが判明した (図 1A)。また、共免疫沈降法により、Sig1R と結合する分子として知られるイノシトール三リン酸受容体 3 型 (IP<sub>3</sub>R3) との相互作用を検討したところ、Sig1R 変異体は IP<sub>3</sub>R3 と相互作用できないことも明らかとなった (図 1B)。さらに Sig1R 変異体は、野生型 Sig1R のもつ細胞質へのカルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>) 流量の抑制 (図 1C) やミトコンドリアへの Ca<sup>2+</sup> 流量の促進 (図 1D) の作用をもたなかった。以上の結果から、*SIGMAR1* 遺伝子の変異に伴う ALS は、Sig1R が IP<sub>3</sub>R3 を介した細胞内 Ca<sup>2+</sup> 制御能の欠失、すなわち MAM における Sig1R の機能喪失 (loss-of-function) の機序により引き起こされていることが示唆された。

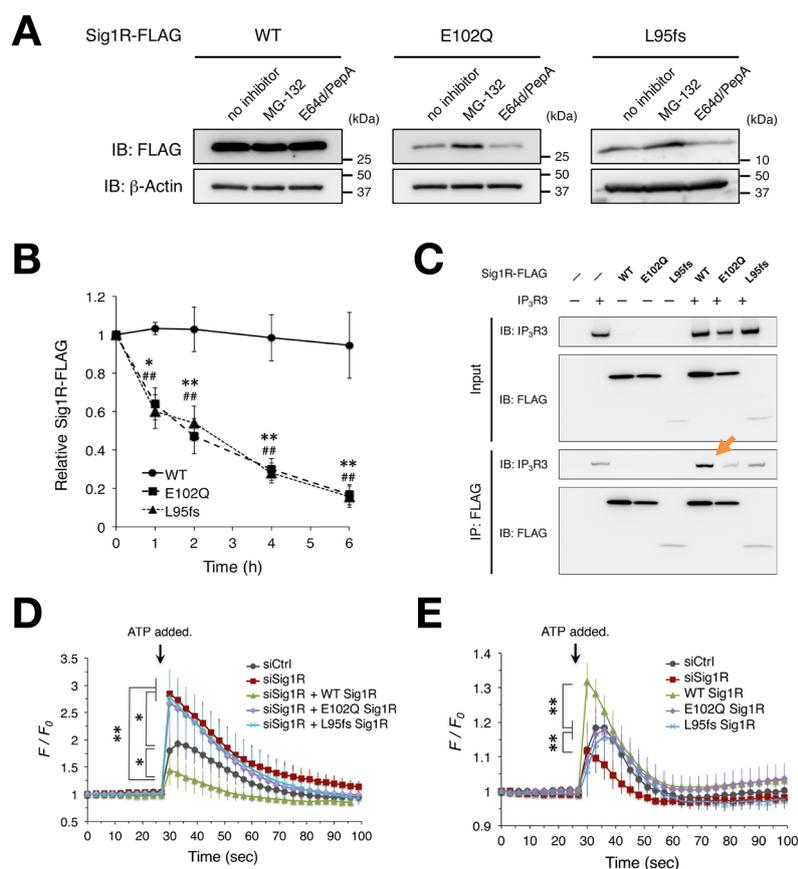


図1. ALS 関連変異をもつ Sig1R 変異体は細胞内で不安定である

(A) ALS 関連 Sig1R 変異体 (E102Q, L95fs) のタンパク量はいずれもプロテアソーム阻害剤 MG-132 の存在下で顕著に増加したことから、これらの変異体はプロテアソームで恒常的に分解され、不安定と考えられた。(B) シクロヘキシミドチェイスアッセイ。細胞内で Sig1R 変異体は野生型よりも極めて迅速に分解された。Error Bar: SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , E102Q vs. WT. ## $p < 0.05$ , L95fs vs. WT. One-way ANOVA with subsequent post hoc Tukey's tests. (C) 共免疫沈降法による Sig1R-IP<sub>3</sub>R3 の相互作用の検討。Sig1R-FLAG を抗 FLAG 抗体で沈降したところ、野生型 Sig1R は IP<sub>3</sub>R3 と結合した (矢印) が、Sig1R 変異体は IP<sub>3</sub>R3 と結合しなかった。(D, E) アデノシン三リン酸 (ATP) 刺激時 (10 $\mu$ M) の細胞質 (D) とミトコンドリア (E) への Ca<sup>2+</sup>流量の測定。縦軸は Ca<sup>2+</sup>応答性レポーターの蛍光強度であり、Ca<sup>2+</sup>流量を示す。野生型 Sig1R は細胞質への Ca<sup>2+</sup>流量を減少させるとともにミトコンドリアへの Ca<sup>2+</sup>流量を増加させたが、変異体はいずれも Ca<sup>2+</sup>流量に全く影響を及ぼさなかった。Error Bar: SD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs siCtrl. Two-way ANOVA with subsequent post hoc Tukey's test.

MAM の機能破綻と ALS 病態の関係を明らかにするため、変異 SOD1 マウス (SOD1<sup>G85R</sup> マウス) と Sig1R ノックアウトマウス (Sig1R-KO マウス) を交配した。その結果、SOD1<sup>G85R</sup>/Sig1R-KO マウスでは、SOD1<sup>G85R</sup> マウスと比較して顕著に発症時期が早くなり (平均発症時期; SOD1<sup>G85R</sup> マウス: 289 日, SOD1<sup>G85R</sup>/Sig1R-KO マウス: 224 日)、それに伴って生存期間も短縮した (図 2A, B)。生化学的な解析から変異 SOD1 マウスでは、発症前の早期から変異 SOD1 タンパク質が MAM に異常蓄積することが判明した (図 2C)。このような変化は、非病巣組織である肝臓や初代培養アストロサイトでは見られず、病巣の神経細胞に特異的であることが示唆された。また、変異 SOD1 マウスの運動神経細胞では Sig1R の異常な凝集、および IP<sub>3</sub>R3 の局在異常が生じることが明らかとなった (図 2D)。また、IP<sub>3</sub>R3 の局在は Sig1R-KO マウスでも観察された (図 2E)。これらの結果から、MAM の異常化が SOD1 と Sig1R で共通した病態であることが考えられた。

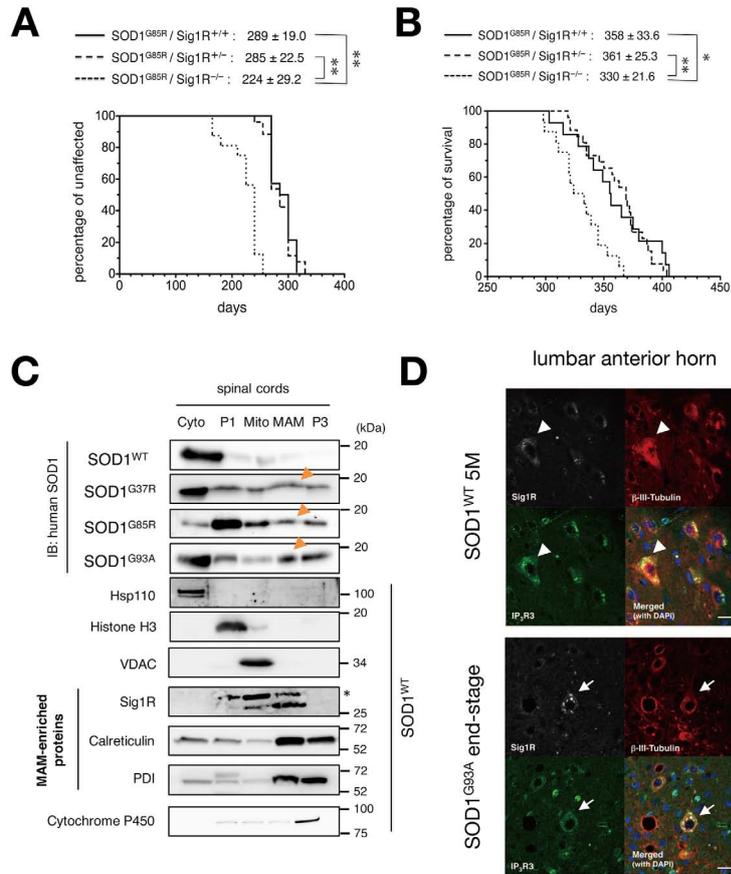


図2. MAMにおけるSig1Rの機能喪失は変異SOD1マウスの病態を増悪させる

(A, B) SOD1<sup>G85R</sup>/Sig1R-KO マウスでは、SOD1<sup>G85R</sup> マウスよりも発症時期が約65日早くなり (A)、生存期間も短縮した (B)。\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs SOD1<sup>G85R</sup>/Sig1R<sup>+/+</sup>, Log-rank test. (C) 変異SOD1タンパク質はMAM画分に異常蓄積した (矢頭)。(D) 脊髓前角の神経細胞において、正常ではSig1RはIP<sub>3</sub>R3と共局在している (矢頭、上図) が、変異SOD1マウス (SOD1<sup>G93A</sup>) ではSig1Rが凝集し、IP<sub>3</sub>R3が細胞体全体へ局在異常を起こした (矢印、下図)。Scale bar: 50μm.

さらに、IP<sub>3</sub>R3を過剰発現させたN2a細胞では変異SOD1の細胞毒性が亢進した (図3A)。変異SOD1の発現に伴って、N2a細胞ではカルパインの異常な活性化と細胞内のアデノシン三リン酸 (ATP) 量の減少が観察され、これらは野生型Sig1Rの共発現によって回復した (図3B, C)。また、Sig1RのアゴニストであるPRE-084は*in vitro*でカルパインの活性化と細胞内ATP量の減少を抑制し、更に*in vivo*でIP<sub>3</sub>R3の局在異常も抑制することが明らかとなった (図3D)。

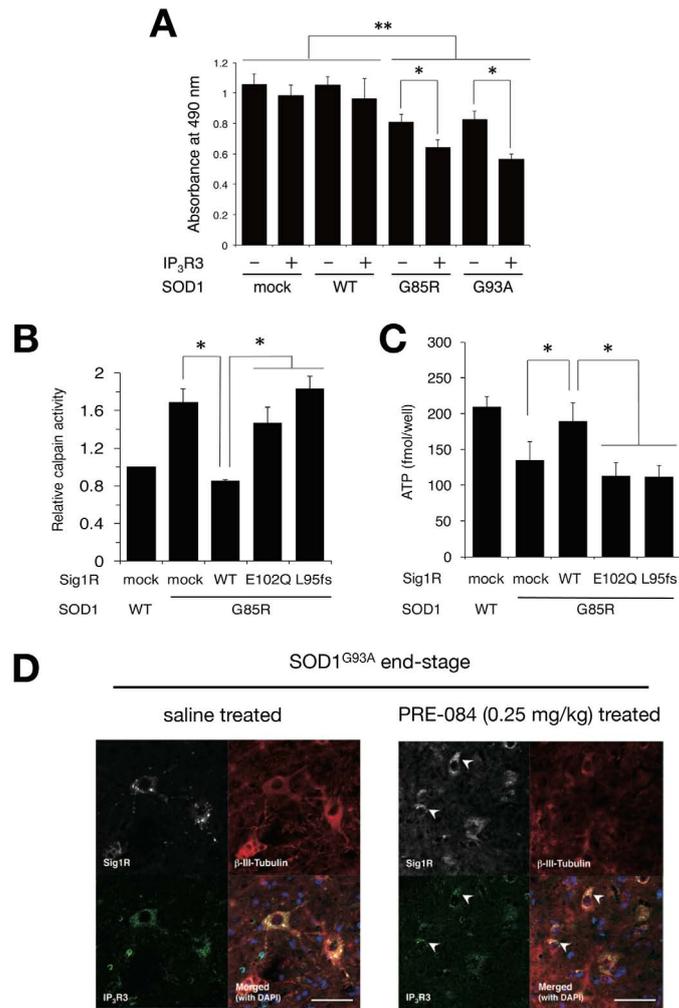


図3. Sig1R-IP<sub>3</sub>R3 の相互作用の破綻はカルパインの活性化と細胞内 ATP 量の減少を伴って細胞毒性を亢進する (A) IP<sub>3</sub>R3 の過剰発現は N2a 細胞の変異 SOD1 に対する脆弱性を亢進した。細胞生存率は MTS アッセイにより測定した。Error Bar: SEM, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (B、C) 変異 SOD1 の発現に伴って細胞内カルパインの相対活性が増加し (B)、同時に細胞内 ATP 量が減少した (C)。野生型 Sig1R の強制発現により、これらの変化は抑制された。Error Bar: SEM, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, One-way ANOVA with subsequent post hoc Tukey's tests. (D) Sig1R アゴニスト PRE-084 を腹腔内投与した SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは、Sig1R の凝集および IP<sub>3</sub>R3 の局在異常が抑制された (矢頭)。Scale bar: 100μm。

## 考 察

本研究から、MAM の機能異常が Sig1R と SOD1 を原因とする ALS に共通した病態であり、特に IP<sub>3</sub>R3 を介した Ca<sup>2+</sup>シグナルの異常を介して運動神経細胞死を惹起することが示唆された。また、IP<sub>3</sub>R3 の発現は運動神経核で強く、MAM の機能異常は ALS の運動神経選択的な細胞死に影響していると考えられた。また、Sig1R は強制発現やアゴニスト処理によって MAM の機能異常を抑制したことから、Sig1R は MAM の恒常性を維持する上で重要な分子であると考えられる。これまでミトコンドリアや小胞体の傷害はそれぞれ個別に生じると考えられてきたが、本研究結果から、これらのオルガネラの傷害は MAM の機能異常を通じて相互に関連していることが明らかとなった。今後、MAM の機能異常が孤発性 ALS も含めた、ALS 一般に共通した病態である可能性や、MAM の機能を維持することによって ALS の進行を抑制する治療法開発に向けて、より詳細な検討が必要であると考えられる。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋大学環境医学研究所の渡邊征爾、Johns Hopkins University の Hristerina Ilieva、The University of Texas Medical School at Houston の Pedro Mancias である。

最後に、本研究に御支援を賜りました上原記念生命科学財団に深謝致します。

## 文 献

- 1) Komine O, Yamanaka K. Neuroinflammation in motor neuron disease. Nagoya J Med Sci, 2015; 77: 537-549. PubMed PMID: 26663933
- 2) Hayashi T, Su T-P. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. Cell, 2007; 131: 596-610. PubMed PMID: 17981125
- 3) Al-Saif A, Al-Mohanna F, Bohlega S. A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol, 2011; 70: 913-9. PubMed PMID: 21842496