

イヌ変性性脊髄症病因タンパク質の  
凝集メカニズムと凝集抑制化合物に関する研究

2021 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科  
(岐阜大学)

木 村 慎太郎

イヌ変性性脊髄症病因タンパク質の  
凝集メカニズムと凝集抑制化合物に関する研究

木村 慎太郎

# 目次

略語一覧	4
緒言	6

## 第1章

### イヌ変異型 SOD1 タンパク質 (E40K-SOD1, T18S-SOD1) の凝集メカニズムの解明

背景	10
材料および方法	12
結果	16
考察	19
図表	22

## 第2章

### 脊髄におけるイヌ変異型 SOD1 タンパク質 (E40K-SOD1) の性状解析

背景	29
材料および方法	31
結果	36
考察	38
図表	42

## 第 3 章

### イヌ変異型 SOD1 タンパク質 (E40K-SOD1) 凝集抑制化合物の探索

背景	49
材料および方法	51
結果	54
考察	56
図表	59
結論	64
謝辞	66
文献	67

## 略語一覧

A/A, A/A allele : 変異型ホモ接合体

ALS, amyotrophic lateral sclerosis : 筋萎縮性側索硬化症

BBB, blood-brain barrier : 血液脳関門

CD, circular dichroism : 円二色性

Cu<sup>II</sup>(atsm), Diacetylbis (4-methylthiosemicarbazonato) copper II

DM, degenerative myelopathy : 変性性脊髄症

DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium : ダルベッコ改変イーグル培地

DMSO, dimethyl sulfoxide : ジメチルスルホキシド

DSF, differential scanning fluorometry : 示差走査型蛍光定量法

DTT, dithiothreitol : ジチオトレイトール

ELISA, enzyme-linked immuno sorbent assay : 酵素結合免疫吸着測定法

FBS, fetal bovine serum : ウシ胎児血清

GdnHCl, guanidinium chloride : 塩酸グアニジニウム

GFP, green fluorescent protein : 緑色蛍光タンパク質

G/G, G/G allele : 野生型ホモ接合体

GST, glutathione S-transferase

HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

IPTG, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside : イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド

NMR, nuclear magnetic resonance : 核磁気共鳴

PBS-T, phosphate buffered saline-Tween 20 : Tween 20 加リン酸緩衝生理食塩水

PCR, polymerase chain reaction : ポリメラーゼ連鎖反応

PWC, Pembroke Welsh Corgi : ペンブローク・ウェルシュ・コーギー

PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride ; フッ化フェニルメチルスルホニル

SDS, sodium dodecyl sulfate : ドデシル硫酸ナトリウム

SOD1, superoxide dismutase 1 : スーパーオキシドジスムターゼ 1

TBS-T, tris-buffered saline-Tween 20 : Tween 20 加トリス緩衝生理食塩水

TEM, transmission electron microscope : 透過型電子顕微鏡

TEMED, tetramethylethylenediamine : テトラメチルエチレンジアミン

ThT, thioflavin-T : チオフラビン T

T<sub>m</sub>, melting temperature : 熱変性温度

WT, wild-type control : 野生型コントロール

## 緒言

イヌの変性性脊髄症 (Degenerative myelopathy : DM) は慢性進行性の致死性神経変性疾患である (4) (5) (16)。1973 年に Averill によってジャーマン・シェパード・ドッグで初めて報告された(4)。その後、ボクサー(5) (44) (78), バーニーズ・マウンテン・ドッグ(52) (74) (78), ペンブローク・ウェルシュ・コーギー (Pembroke Welsh Corgi : PWC) (4) (16) (17) (50) (78)など複数の犬種における発症が報告されている。

DM は高齢期 (平均発症年齢 : 10.9 歳) に発症し, 特徴的な全身骨格筋の進行性麻痺を呈する(16) (17) (43)。初期症状は後肢における運動失調であり, 次いで上位運動ニューロン性不全麻痺が認められる。その後, 後肢の下位運動ニューロン性麻痺へと進行し, 自力歩行が不可能となる。脊髄の神経変性は前肢の支配領域へと至り, 前肢にも下位運動ニューロン性麻痺が認められ, 起立困難となる。終末期には呼吸筋麻痺へと進行し, 発症から約 3 年で呼吸機能障害により死亡する(17) (51)。これら進行性麻痺に対する有効な治療法は存在しない。

DM の発症原因として, スーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) 遺伝子の変異が報告されている(5) (74)。122 頭の PWC を対象とした研究では 48.4 %の個体の変異型 SOD1 遺伝子をホモ接合体で有し, PWC で高い発症リスクが明らかにされている(10)。DM 症例では SOD1 遺伝子における 2 種類の変異 (c.118G>A, c.52A>T) が報告されており, それぞれの変異により SOD1 タンパク質に 1 アミノ酸残基の置換 (E40K, T18S) が発生する。SOD1 タンパク質は, 酸素に依存する生物の細胞内で発生する有害なスーパーオキシドを解毒する抗酸化酵素である。組換えタンパク質を用いた研究では, 変異型 SOD1 タンパク質は野生型と同様の SOD1 酵素活性を保持していることが示されている(19)。したがって, DM の発症に

SOD1 酵素活性は関与せず，変異型 SOD1 タンパク質自体が毒性を獲得すると考えられている(19)。

DM 症例の脊髄の病理組織学的特徴として，脊髄白質における髄鞘の脱落および軸索の変性ととともに，神経細胞への変異型 SOD1 タンパク質の凝集体蓄積が挙げられる(4) (5) (43)。神経細胞への変異型 SOD1 タンパク質の凝集体蓄積が認められる疾患としてヒトの筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) が知られている(37; 69) (59) (69)。ALS において，ヒト変異型 SOD1 タンパク質は立体構造異常 (ミスフォールディング) を起こし，凝集体を形成しやすくなることが示されている(36) (46) (62)。神経細胞内へのヒト変異型 SOD1 タンパク質の凝集体蓄積は，小胞体ストレス(70)，ミトコンドリア障害(18)，プロテアソーム機能の低下(35)などを介して，結果的に細胞死を引き起こすことが明らかにされており，DM においても変異型 SOD1 タンパク質の凝集体蓄積が神経変性に関与していると考えられる。したがって，DM の病態発生メカニズムの解明および治療薬開発には変異型 SOD1 タンパク質の凝集メカニズムの解明が重要であるが，現在までに変異型 SOD1 タンパク質の性状や凝集メカニズムに関する研究は僅かであり，未だ凝集メカニズムの解明には至っていない(19)。

本研究の第 1 章では，組換えタンパク質を用いて SOD1 タンパク質の性状および凝集メカニズムを解明することを目的に研究を行なった。組換えイヌ SOD1 タンパク質を合成・精製し，構造安定性や凝集性などの生化学的特徴を解析した。第 2 章では，DM 罹患イヌの脊髄組織中の SOD1 タンパク質の性状を明らかにすることを目的に研究を行なった。DM 罹患イヌの脊髄組織由来の SOD1 タンパク質の酵素活性やアイソフォームを評価した。第 3 章では，変異型 SOD1 タンパク質の凝集抑制効果を持つ化合物を探索した。アミロイド線維に特異的に結合するチオフラビン色素を用いて，凝集抑制化合物候補のスクリーニングを行なった。さらに，スクリー



ニングにより選出した薬物候補化合物の凝集抑制効果を変異型 SOD1 タンパク発現系細胞を用いて評価した。

## 第1章

# イヌ変異型 SOD1 タンパク質 (E40K-SOD1, T18S-SOD1) の 凝集メカニズムの解明

## 背景

イヌの DM は致死性の神経変性疾患である。高齢期のイヌで発症し、全身骨格筋の麻痺が進行することで発症後約 3 年で呼吸筋麻痺により死亡する。発症には SOD1 遺伝子の変異が関与しており、DM 発症犬では現在 2 種類の SOD1 遺伝子変異 (c.118G>A, c.52A>T) が報告されている(5) (74)。これらの変異型 SOD1 遺伝子がコードする変異型 SOD1 タンパク質が神経細胞内に凝集・蓄積することが DM の発症に関与すると考えられているが、その詳細な病態メカニズムは明らかにされていない。

SOD1 遺伝子は、153 アミノ酸残基からなる、活性酸素を無毒化する SOD1 タンパク質をコードする。SOD1 タンパク質は安定した 2 量体構造を有し、各サブユニットは銅イオンと亜鉛イオンを含む 8 本の  $\beta$  ストランドで構成されている (図 1-1)。ヒトにおいては、現在までに 160 以上の変異 SOD1 遺伝子が報告されている(1) (21) (28)。これらの変異はヒト SOD1 タンパク質のミスフォールドや凝集を促進し(8)、様々な細胞活動を阻害して神経変性を引き起こす(15)。ALS 発症に関連するこれらの変異がヒト SOD1 タンパク質に与える影響はこれまでの研究で明らかにされており、2 量体構造の不安定化(29) (57) (58)、金属の配位阻害(57)、タンパク質の表面電荷の減少(60)などが報告されている。一方で、DM における 2 種類の変異がイヌ SOD1 タンパク質の構造安定性や凝集性に与える影響は明らかにされていない。

本章では、DM における SOD1 遺伝子の変異 (c.118G>A または c.52A>T) によって引き起こされる 2 種類のアミノ酸置換 (E40K または T18S) がイヌ SOD1 タンパク質の構造安定性や凝集性に与える影響を明らかにした。まず、イヌ SOD1 タンパク質のアミノ酸配列とヒト SOD1 タンパク質のアミノ酸配列を比較し、イヌ SOD1 タンパク質の立体構造をモデリングした。次に、イヌ SOD1 タンパク質の組

換えタンパク質を合成・精製し，生化学的な性状を解析した。

## 材料および方法

### SOD1 タンパク質ホモロジーモデルの作製

ヒトおよびイヌの SOD1 タンパク質のアミノ酸配列をアライメントした。

また、凝集性が高いアミノ酸配列をタンパク質凝集傾向予測ソフトウェア

(Zygggregator, Chemistry of Health-software, Cambridge, UK) を用いて予測した(66)。イヌ SOD1 タンパク質の 3D ホモロジーモデルは、ヒト SOD1 タンパク質の立体構造データ (Protein Data Bank code : 3ECU) をもとにホモロジーモデル作製ソフトウェア (SWISS-MODEL, BIOZENTRUM, Lausanne, Switzerland) を用いて構築した。

### 組換えイヌ SOD1 タンパク質の合成と精製

E40K-SOD1 遺伝子変異をホモ接合で有する DM 発症イヌ (n=1) の末梢血からポリアデニル化 RNA を抽出し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応により E40K-SOD1 遺伝子をクローニングした。同様に、WT-SOD1 遺伝子をホモ接合で有する正常イヌ (n=1) より WT-SOD1 遺伝子をクローニングした。用いたプライマーを表 1-1 に示した。得られた PCR 産物をタンパク質発現用プラスミドベクター pGEX 4T-1 (GE Healthcare, Helsinki, Finland) にサブクローニングすることで、イヌ組換え野生型 (WT) -SOD1 および E40K-SOD1 タンパク質発現プラスミドを作製した(47)。T18S-SOD1 タンパク質発現プラスミドは、NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit (New England Biolabs Inc, MA, USA) を用いて WT-SOD1 タンパク質発現プラスミドに部分変異を導入することで得た。導入の際に用いたプライマーは表 1-1 に示した。得られたプラスミドの T18S 変異は DNA 配列解析により確認した。

作製した大腸菌発現用プラスミドを用いて、WT-SOD1 タンパク質、E40K-SOD1 タンパク質および T18S-SOD1 タンパク質を以下の方法で合成した。それぞれのタンパク質は、銅イオン ( $\text{Cu}^{2+}$ ) および亜鉛イオン ( $\text{Zn}^{2+}$ ) を含まないアポフォーム (apo-SOD1 タンパク質) および  $\text{Cu}^{2+}$  および  $\text{Zn}^{2+}$  を含むホロフォーム (holo-SOD1 タンパク質) を精製した。タンパク質発現用大腸菌 (*BL21*, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) に導入し、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンピシリン含有 LB 寒天培地で 37 °C で一晩培養した。単一コロニーを 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンピシリン含有液体 LB 培地に植菌し、37 °C で一晩培養した。その後、新たな 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンピシリン含有 LB 培地で 20 倍希釈し、37 °C で 2 時間培養した。イソプロピル  $\beta$ -D-1-チオガラクトピラシノド (IPTG; 終濃度 1 mM) を添加し、20 °C で 20 時間培養することでタンパク質を発現させた。得られた細胞懸濁液を 3,500  $\times$  g で 20 分間遠心分離し、1  $\times$  PBS で洗浄した後、再度 14,000  $\times$  g で 20 分間遠心分離した。細胞ペレットは使用するまで -30 °C で保存した。

細胞ペレットを自然融解させ、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のリゾチーム と 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) を加えた溶解バッファー (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) に懸濁させた。氷上で超音波破碎し、14,000  $\times$  g で遠心分離後、上清を 0.45  $\mu\text{m}$  の FILSTAR シリンジフィルター (Hawach Scientific, Shaanxi, China) で濾過した。その後、Glutathione Sepharose 4 FF カラム (GE Healthcare) を用いたアフィニティークロマトグラフィーで組換えタンパク質を分離した。400 U のトロンビン酵素 (富士フィルム和光純薬株式会社, Osaka, Japan) を加えて 22 °C で一晩培養し、GST フラグメントを切断した。HiTrap Benzamide FF カラム (GE Healthcare) を用いてトロンビン酵素を除去した後、10 mM EDTA を含む 40 mM リン酸ナトリウム (pH7.4) 中で培養することで apo-SOD1 タンパク質を精製した。精製後、組換えタンパク質は 10K Amicon Ultra

Centrifugal filter (Millipore, MA, USA) で濃縮した。

Holo-SOD1 タンパク質は Crisp らが過去に報告した手順を一部変更して精製した (19)。要約すると, apo-SOD1 タンパク質を 100 mM Tris (pH8.0), 300 mM NaCl および 200  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub> 含有バッファー中で 3.5 時間, 次いで 100 mM Tris (pH8.0), 300 mM NaCl および 200  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> 含有バッファーで 3.5 時間透析した。得られた holo-SOD1 タンパク質は 20 mM Tris および 10 mM NaCl 含有バッファー中で 4°C で一晩透析し, 10K Amicon Ultra Centrifugal filter で濃縮した。タンパク質濃度は UV スペクトロメーター (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて 280 nm の吸光度を測定することで算出した。

#### タンパク質二次構造の測定および表面電荷の計算

各組換え SOD1 タンパク質の二次構造は, 円偏光二色性 (CD) スペクトルを測定することで調べた。CD スペクトルは分光光度計 (Chirascan, Applied Photophysics, Surrey, UK) を用いて測定した。組換え SOD1 タンパク質の表面電荷はタンパク質解析ソフトウェア (PROTEIN CALCULATOR v3.4) を用いて算出した。

#### SOD 活性の測定

SOD 活性は各 SOD1 タンパク質を 40 mM リン酸ナトリウム (pH7.4) で 250  $\mu$ g/mL に希釈後, SOD Activity Kit-WST (DOJINDO LABORATORIES, Kumamoto, Japan) を用いて, メーカーが提供するプロトコールに従って測定した。この実験系は独立して 3 回繰り返した。

#### チオフラビン T 凝集試験

アミロイド線維の継時的な形成過程は、アミロイド線維と特異的に結合し、蛍光を発するチオフラビン T 色素 (ThT) を用いて観察した(76)。40  $\mu$ M の組換え SOD1 タンパク質と 10  $\mu$ M の ThT を 96 ウェルプレート上で混合し、37°C、170 rpm の条件下で振盪した。Apo-SOD1 タンパク質を用いた実験では、上記溶液に 10 mM EDTA を追加した。ThT の蛍光は、プレートリーダー (GloMax Discover Microplate Reader, Promega, WI, USA) を用いて 495-505 nm (励起波長: 405 nm) の蛍光を測定することでモニタリングした。本実験は独立して 6 回行った。WT 型、E40K 変異型および T18S 変異型の ThT 蛍光の最大値 (各 n=6) の平均を一元配置の ANOVA で比較し、各群の比較には Tukey の多重比較検定を用いた。p 値 0.05 以下を統計学的な有意差ありとした。

#### 透過型電子顕微鏡による凝集体の形態観察

SOD1 凝集体を含むサンプル溶液を carbon-coated 200-mesh copper grids (EM Japan Co., Ltd, Tokyo, Japan) に吸着させ、2 % w/v のリンタンングステン酸を用いてネガティブ染色した。透過型電子顕微鏡 (TEM: JEM-2100F, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 200 kV で観察した。

#### 構造安定性の評価

SOD1 タンパク質の構造安定性は、熱変性および化学変性による CD スペクトルの変化をモニタリングすることで評価した。組換え SOD1 タンパク質を 40 mM リン酸ナトリウム (pH7.4) で 10  $\mu$ g/mL に希釈した。キュベット (1 mm pathlength) を用いて、195-260 nm の波長範囲で CD スペクトルを測定した。熱



変性は 20-95 °C の範囲で 1 °C/分 で昇温し、220 nm の波長の変化をモニタリングした。化学変性は塩酸グアニジウム (GdnHCl) による CD スペクトルの変化を調べた。組換え SOD1 タンパク質は、様々な濃度の GdnHCl を含む 5 mM HEPES (pH7.4) で 110 µg/mL に希釈した。混合溶液を 37 °C で 1 時間培養後、220 nm で CD スペクトルを測定した。各実験は独立して 3 回行なった。

## 結果

### イヌ SOD1 タンパク質ホモロジーモデルの作製

ヒトとイヌの SOD1 タンパク質のアミノ酸配列のアライメント結果を図 1-1A に示した。2 種のアミノ酸配列は高い相同性 (69.9 %) を有していた。また 18 番目のアミノ酸残基は凝集の促進に関与する領域に存在することが明らかになった。イヌ SOD1 タンパク質のホモロジーモデルでは、T18 残基は二量体の界面に位置し、もう一方のサブユニットの T54 残基と疎水性結合を形成していた。また、E40 残基は溶媒側に露出しており、同じサブユニットの K91 残基と塩橋を形成していた (図 1-1B)。

### 組換え SOD1 タンパク質の合成

組換え SOD1 タンパク質の合成および精製には大腸菌を用いた発現系とアフィニティークロマトグラフィーを用いた。精製した組換え SOD1 タンパク質の SDS-PAGE では、アミノ酸配列から予測される分子量と一致する 16 kDa 付近に単一かつ均一なバンドが検出された (図 1-2-A)。組換え SOD1 タンパク質は WT 型、変異型でそれぞれ holo 型と apo 型の 2 種類を作製した。図 1-2B に示すように、apo-SOD1 タンパク質の酵素活性は holo-SOD1 タンパク質の活性の約 100 分の 1 であ

り， apo-SOD1 タンパク質が脱金属処理によって適切に  $\text{Cu}^{2+}$  および  $\text{Zn}^{2+}$  を除去できていることが示された。

### タンパク質二次構造の測定および表面電荷の計算

Holo-SOD1 タンパク質の CD スペクトルは， 208 nm で負の最小値を示した（図 1-2C）。この結果から holo-SOD1 タンパク質は逆平行型  $\beta$  シート構造を有していることが明らかになった(31)。また， holo 型と apo 型の SOD1 タンパク質間では CD スペクトルの波形に違いは認められなかった。この結果はヒト SOD1 タンパク質の過去の報告と一致していた(7)。T18S 変異または E40K 変異を有する SOD1 タンパク質の酵素活性や CD スペクトルは WT 型と比較して明らかな違いは認められなかった。したがって， SOD1 タンパク質における T18S 変異または E40K 変異はタンパク質の立体構造に影響を与えないと考えられた。生理的な pH 条件下において， WT 型 SOD1 タンパク質は負の正味電荷 (-4.5) を有していたのに対し， E40K 変異が加わることで， SOD1 タンパク質の負の正味電荷は -2.0 まで増加していた（表 1-2）。一方で， T18S 変異は WT 型の正味電荷を変化させなかった。

### SOD1 凝集体の継時的な評価および形態評価

SOD1 タンパク質の凝集性を調べるために， ThT 凝集試験を行った。Holo-SOD1 タンパク質は， 変異の有無に関わらず， 凝集体を形成しなかった（data not shown）。同様に， WT-apo-SOD1 タンパク質も凝集体を形成しなかった（図 1-3A および 1-3D）。しかし， T18S 変異または E40K 変異を有する apo-SOD1 タンパク質は 0-200 分の振盪によって ThT 陽性の凝集体を形成した（図 1-3B-D）。

形成された ThT 陽性 SOD1 凝集体にネガティブ染色を施し， 電子顕微鏡で形態を観察した。図 1-3E および 1-3F で示すように，“worm-like fibrils” と称される， 湾

曲した線維状のアミロイド様凝集体が観察された(63)。一方で, holo-SOD1 タンパク質や WT 型の apo-SOD1 タンパク質では凝集体は観察されなかった。

#### 二次構造レベルでの構造安定性の評価

SOD1 タンパク質の凝集メカニズムにおける構造安定性の寄与を調べるために, SOD1 タンパク質の二次構造レベルでの構造安定性を, 熱変性および化学変性下での CD スペクトルの変化を測定することで評価した。WT 型, T18S 変異型および E40K 変異型 SOD1 タンパク質の熱変性曲線は apo-および holo-SOD1 タンパク質ともにそれぞれで一致していた (図 1-4)。さらに, これら SOD1 タンパク質の GdnHCl 変性曲線も同様に, ほぼ重なり合っていた (図 1-5)。これらの結果より, T18S 変異と E40K 変異は, 少なくとも二次構造レベルで SOD1 タンパク質の構造安定性を変化させないことが明らかになった。

## 考察

DM の病態を解明するためには、SOD1 タンパク質の凝集メカニズムを理解することが重要である。ヒト SOD1 タンパク質では凝集メカニズムに関する多くの研究が行われているが、イヌ SOD1 タンパク質に関する報告は現在までに 1 報しかない (19)。また、イヌ SOD1 タンパク質とヒト SOD1 タンパク質の凝集メカニズムを比較することは、DM と ALS の類似性を明らかにするという点でも重要である。第 1 章では、T18S 変異および E40K 変異によって促進される SOD1 タンパク質の凝集メカニズムを明らかにした。

変異の有無に関わらず、SOD1 タンパク質は holo 型および apo 型で同様の二次構造を形成していた (図 1-2C, D)。また、構造安定性にも変異の有無で変化は認められなかった。しかし、apo 型の構造安定性は holo 型と比較して著しく低下していた (図 1-4 および図 1-5)。また、ThT 凝集実験において、holo-SOD1 タンパク質および WT-apo-SOD1 タンパク質は凝集体を形成しなかったのに対して、変異型 apo-SOD1 タンパク質は線維状の凝集体を形成した (図 1-3A-D)。一般的に、タンパク質の凝集は不安定な中間体の形成から始まる。したがって、不安定な変異型 apo-SOD1 タンパク質は SOD1 タンパク質の凝集過程における凝集前駆体である可能性が示唆された。

T18S 変異を有する SOD1 タンパク質は apo 型になることで強い凝集性を有していた (図 1-3C)。興味深いことに、T18S 変異は、二次構造レベルでは SOD1 タンパク質の構造安定性を変化させなかった (図 1-4 および図 1-5)。SOD1 タンパク質のホモロジーモデルに着目すると、T18 残基はもう一方のサブユニットの T54 残基と疎水性結合を形成していた (図 1-1B)。スレオニンとセリンは疎水性が異なることから、T18S 変異によって T18 残基と T54 残基間の疎水性結合の破綻が引き起こ

されている可能性が考えられる。また、T18 残基と T54 残基間の疎水性結合の破綻により  $\beta$  ストランド 2 構造が局所的に変化し、Cys6 残基が露出することが予想される。ヒト SOD1 タンパク質では、露出した Cys6 残基が Cys57 残基と Cys146 残基間のジスルフィド結合に干渉し、新たなジスルフィド結合を有する SOD1 オリゴマー (S-S オリゴマー) を形成することが明らかにされている(49) (68)。したがって、イヌ SOD1 タンパク質における T18S 変異でも、S-S オリゴマーの形成促進によりタンパク質の凝集が促進される可能性が示唆された。

E40K 変異を有する SOD1 タンパク質もまた、T18S-SOD1 タンパク質と同様に二次構造レベルでの構造安定性を低下させることなく、タンパク質の凝集を促進させた (図 1-4 および図 1-5)。E40K-SOD1 タンパク質では WT-SOD1 タンパク質と比較して表面電荷が絶対値で 2.5 減少していた (表 1-2)。表面電荷の減少は、アンフォールドしたポリペプチド間の分子間の反発力を低下させることでタンパク質の凝集を促進させると報告されている(9) (14)。ヒト SOD1 タンパク質における D125H, D90A, E100K, D101N および N139K 変異は表面電荷が減少することでタンパク質の凝集が促進されることが明らかにされている(61)。したがって、イヌ SOD1 タンパク質における E40K 変異も同様のメカニズムでタンパク質凝集を促進している可能性が考えられる。また、E40 残基は K91 残基との間に塩橋を形成していることがホモロジーモデルより推察される (図 1-1B)。40 番目の残基のリシンへの変異は 40 番目のグルタミン酸と 91 番目のリシン間の塩橋構造を破綻させる。ヒト SOD1 タンパク質では、E40 残基と K91 残基の塩橋を囲む領域に複数の病原性変異 (G93A や H43R など) が明らかにされており、この塩橋の破綻がタンパク質凝集に寄与することが示唆されている(20)。また、*in silico* 計算を用いた研究では、E40-K91 塩橋が、ヒト SOD1 タンパク質の  $\beta$  バレルコアおよび  $Zn^{2+}$  結合ドメインの安定性に重要であることが示唆されている(20)。これらの知見より、E40K-SOD1

タンパク質においても、E40-K91 塩橋の破綻は凝集体形成に深く関与していると考えられる。

電子顕微鏡による観察より、T18S 変異および E40K 変異は典型的なアミロイド線維の形態と異なるアミロイド様凝集体を形成することが明らかになった。典型的なアミロイド線維は直線的な構造を有する線維が束になる形態を示すが、SOD1 凝集体は曲線的な線維で構成されていた (図 1-3E-F)。また、凝集体の形成曲線は lag phase を示さず、典型的なアミロイド線維の形成曲線とは異なっていた (72)。SOD1 凝集体がアミロイド線維と同様の性質を示すかどうかは、今後さらなる研究が必要とされる。

本章では、SOD1 タンパク質の凝集経路において、apo-SOD1 タンパク質が凝集前駆体として存在することを明らかにした。また、T18S 変異は S-S オリゴマーの形成を促進することで、E40K 変異は表面電荷を低下させることでそれぞれ SOD1 タンパク質の凝集を促進している可能性を示した。これらの変異が S-S オリゴマーの形成を促進するのか、分子間力を低下させるかを調べるために、今後は NMR などの高分解技術を用いてさらなる研究が必要とされる。

## 図表

表1-1. 使用したプライマー

プライマー		配列
SOD1遺伝子増幅用 プライマー	Forward	5'-TGGGCCTGTTGTGGTATCAG-3'
	Reverse	5'-CAAACCTGATGGACGTGGAATCC-3'
T18S変異導入用 プライマー	Forward	5'-GTGGAAGGCTCCATTCATTTTGTGCAGAAA-3'
	Reverse	5'-TTTCTGCACAAAATGAATGGAGCCTTCCAC-3'

SOD1, スーパーオキシドジスムターゼ 1

**表1-2. Net negative charge of SOD1 (pH7.4)**

<b>Protein</b>	<b>charge</b>
WT	-4.5
E40K	-2.5
T18S	-4.5

SOD1, スーパーオキシドジスムターゼ 1 ; WT, 野生型



A

human	1	<b>MATKAVCVLKGDGPVQGIINFEQKE</b> SNGPVKVGSIKGLTEGLHGFHVH <b>EF</b> GDNT
canine	1	<b>MEMKAVCVLKGOGPVEGTIHFVQKGS</b> -GPVVVSGTITGLTEGEHGFHVH <b>Q</b> FGDNT
		<b>S</b> <span style="margin-left: 150px;"><b>K</b></span>
human	56	<b>AGCTSAGPHFNPLSRKHGGPKDE</b> ERHVGD LGNVTA <b>D</b> KDGVAD <b>VSIEDSVI</b> SLSGD
canine	55	<b>QGCTSAGPHFNPLSRKHGGPKDQ</b> ERHVGD LGNVTA <b>G</b> KDGV <b>AI</b> VSIEDSL <b>I</b> ALSGD
human	111	<b>HCII</b> GRTLVVHEKA <b>DDL</b> GKGGNEEST <b>KT</b> GNAGSRLACGVIGIA <b>Q</b>
canine	110	<b>YSII</b> GR <b>M</b> VVHEKR <b>DDL</b> GKGDNEEST <b>Q</b> TGNAGSRLACGVIGIA <b>Q</b>

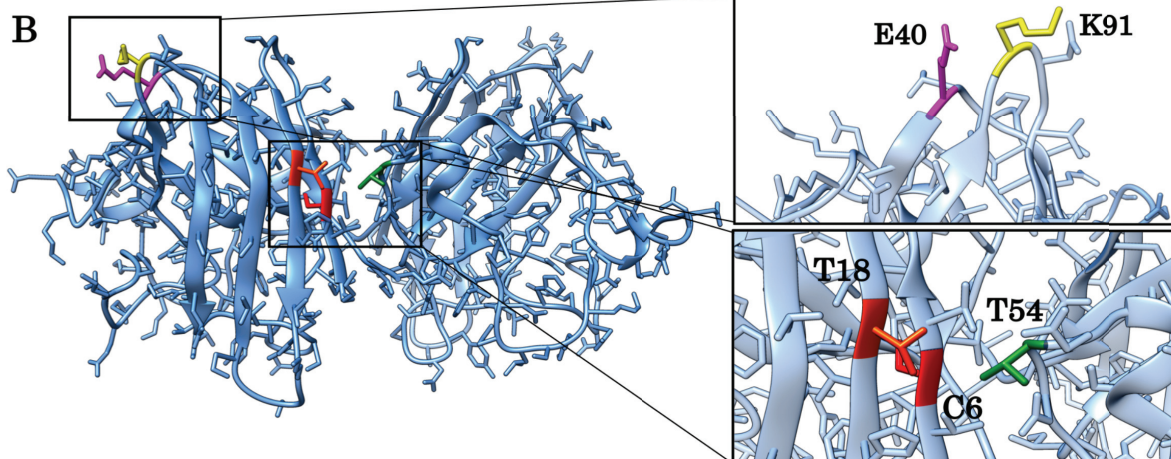


図 1-1. ヒトとイヌの SOD1 タンパク質のアミノ酸配列のアライメント結果とイヌ SOD1 タンパク質の 3D ホモロジーモデル

(A) ヒトとイヌの SOD1 タンパク質のアミノ酸配列のアライメント結果。ヒトとイヌで同一の残基は黒背景で示した。赤下線はタンパク質凝集傾向予測ソフトウェア (Zygggregator) によって予測された凝集促進残基を示す。(B) イヌ SOD1 タンパク質の 3D ホモロジーモデル。このホモロジーモデルは SWISS-MODEL ウェブサーバーを用いて、ヒト SOD1 タンパク質をもとに構築した。T18 残基 (オレンジ色) と T54 残基 (緑色) は二量体の界面で疎水性の相互作用を形成していた。E40 残基 (ピンク色) と K91 残基 (黄色) は塩橋を形成していた。

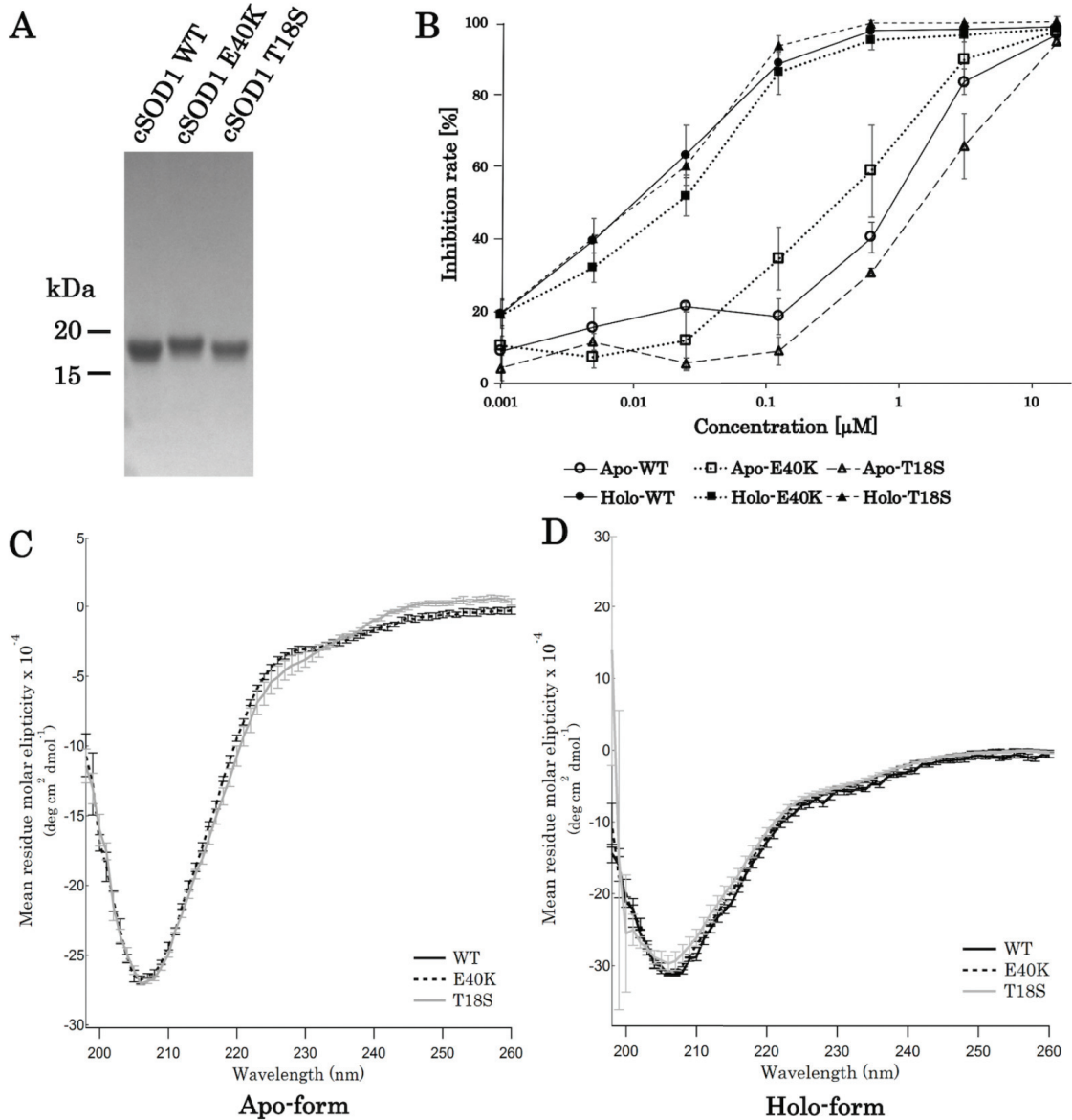


図 1-2. SOD1 タンパク質の発現と精製

(A) 精製した SOD1 タンパク質の SDS-PAGE。16 kDa 付近に均一かつ単一のバンドが認められた。(B) SOD1 タンパク質の酵素活性。Holo-SOD1 タンパク質の活性は apo-SOD1 タンパク質の活性より顕著に上昇していた。WT 型, T18S 変異型および E40K 変異型の間に有意差は認められなかった。各データは平均 $\pm$ SEM を表す。(C) apo-および (D) holo-SOD1 タンパク質の WT 型および変異型の CD スペクトル。全ての表現型のスペクトルは一致していた。各データは平均 $\pm$ SEM を表す。

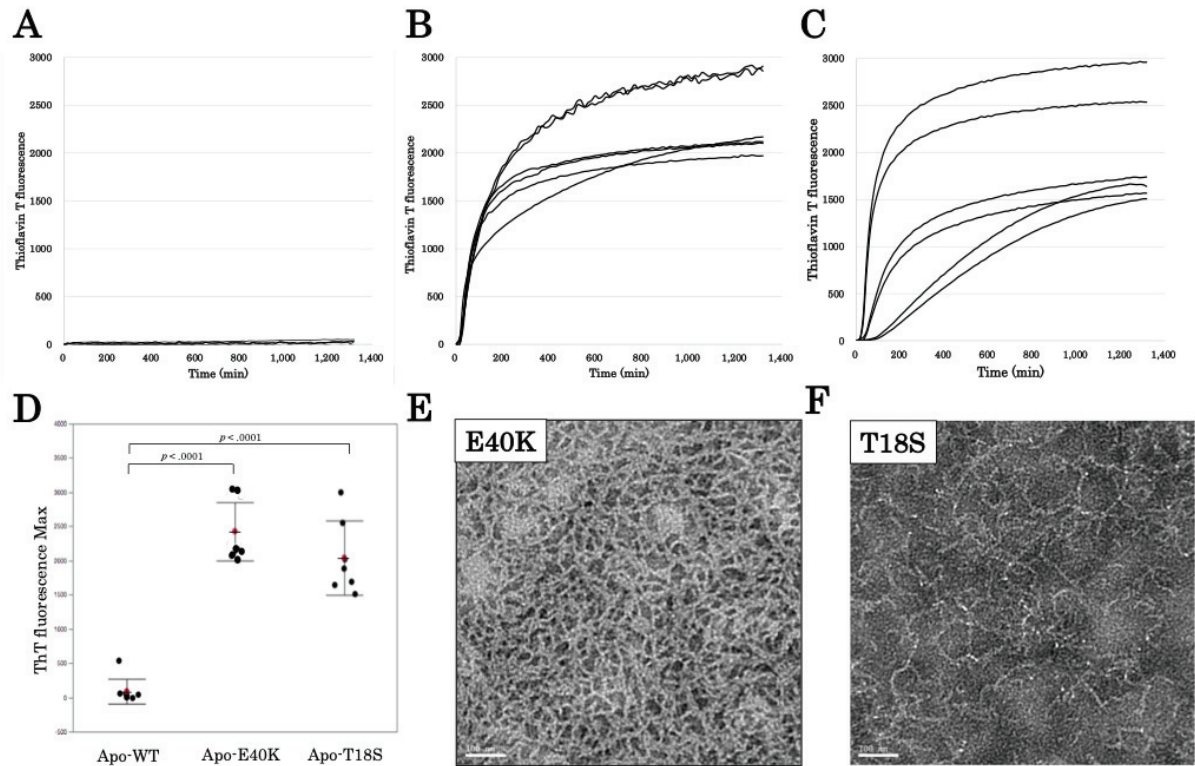


図 1-3. チオフラビン T 試験と SOD1 凝集体の電子顕微鏡写真

WT 型 (A), E40K 変異型 (B) および T18S 変異型 (C) apo-SOD1 タンパク質の継時的な凝集形成曲線。T18S または E40K 変異を有する apo-SOD1 タンパク質は ThT 陽性の凝集体を形成した。(D) 図 1-3A-C から得られた ThT 蛍光値の最大値。T18S 変異型および E40K 変異型で ThT 蛍光値の有意な増加が認められた ( $p < 0.001$ )。(E,F) E40K-SOD1 凝集体 (E) および T18S-SOD1 凝集体 (F) のネガティブ染色後の電子顕微鏡像。細く、湾曲した線維状の凝集体が観察された。スケールバーは 100 nm を表す。

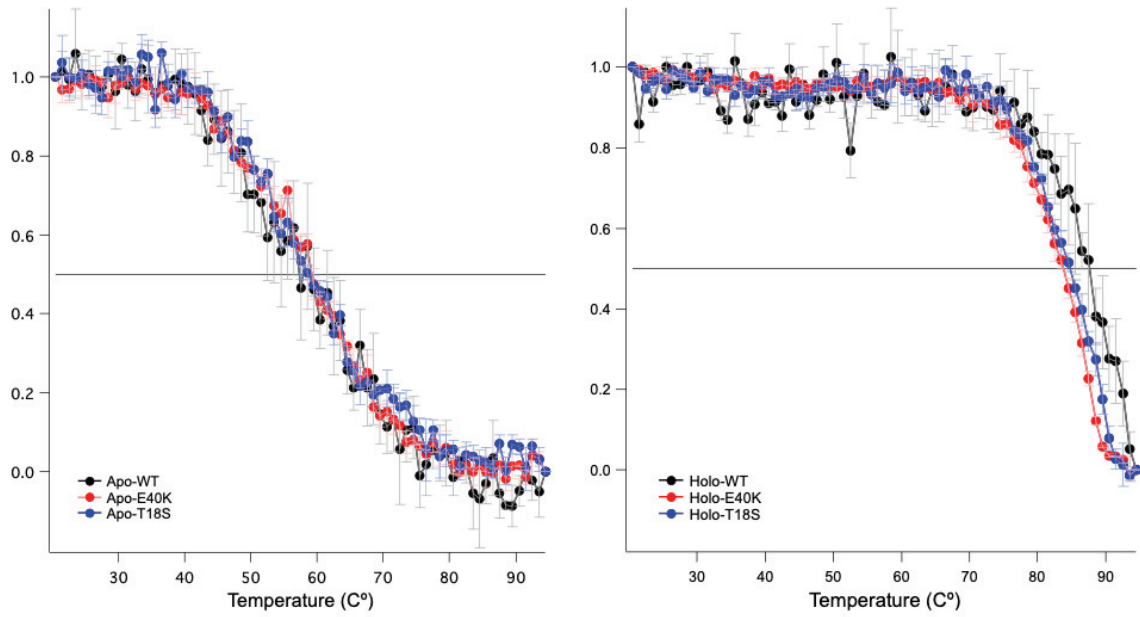


図 1-4. SOD1 タンパク質の熱変性曲線

(A) apo 型, (B) holo 型を表す。縦軸は 220 nm での標準化した CD 値を表す。Apo 型は holo 型よりも顕著に熱安定性が低下していた。各データは平均±SEM を表す。

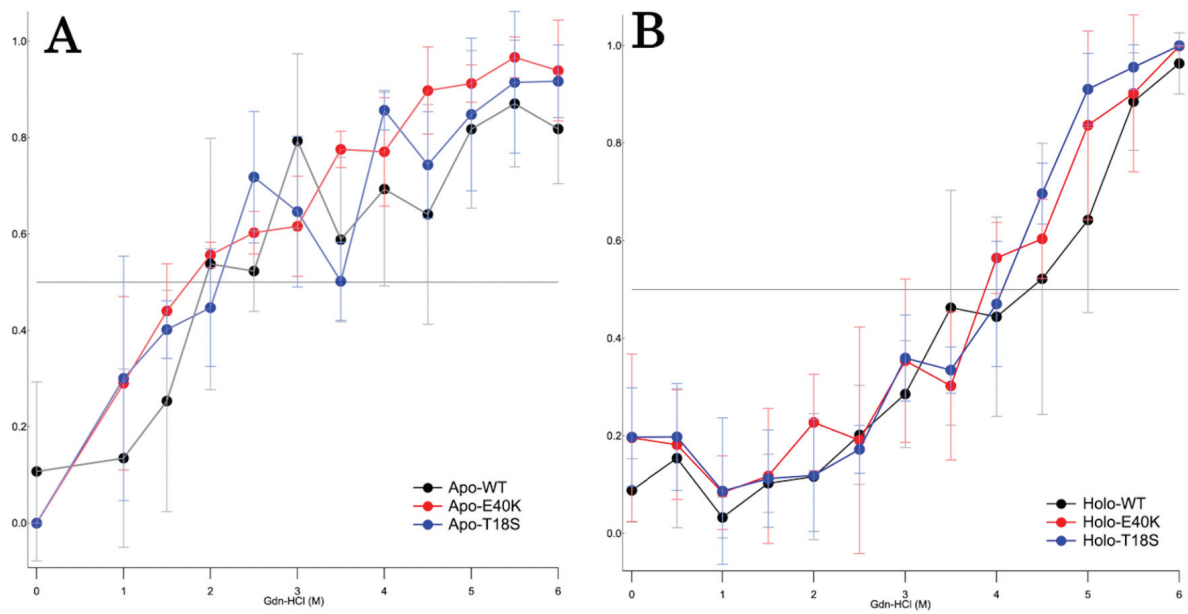


図 1-5. SOD1 タンパク質の GdnHCl 変性曲線

(A) apo 型, (B) holo 型を表す。縦軸は 220 nm での標準化した CD 値から得られたアンフォールドタンパク質の割合 ( $f_D$ ) を表す。Apo 型は holo 型よりも顕著に安定性が低下していた。各データは平均±SEM を表す。

## 第 2 章

### 脊髄におけるイヌ変異型 SOD1 タンパク質 (E40K-SOD1) の性状解析

## 背景

変性性脊髄症 (DM) 罹患犬に対するゲノムワイド関連解析により, DM の発症にはスーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) 遺伝子変異をホモ接合体で有することが重要であると報告された(5)。SOD1 遺伝子の変異は 2 種類 (c.118G>A, c.52A>T) 報告されており, それぞれ 1 アミノ酸残基の置換を有する変異型 SOD1 タンパク質 (E40K-SOD1 または T18S-SOD1) を翻訳する(4) (74)。SOD1 タンパク質は変異が加わることで凝集体形成が促進されることが明らかになっている(47)。また, DM 症例の脊髄の神経細胞やアストロサイト内において, SOD1 タンパク質は抗 SOD1 抗体陽性の凝集体として観察されることから, 変異型 SOD1 凝集体の蓄積が DM の病態に関連していると考えられている(5) (38) (50)。

SOD1 タンパク質の生化学的な性状は, これまで組換え SOD1 タンパク質を用いた研究により報告されている(19)。この研究において, 組換え SOD1 タンパク質は E40K-SOD1 タンパク質および T18S-SOD1 タンパク質ともに野生型 SOD1 (WT-SOD1) タンパク質と同等の SOD 酵素活性を有すると報告されている。我々は第 1 章において E40K-SOD1 タンパク質の活性型 (holo 型) は非常に安定した構造を有し, 凝集性がないのに対し, 活性のない金属解離型 (apo 型) になると著しく不安定な構造になり凝集が促進されることを明らかにした。この結果は, DM の SOD1 凝集メカニズムにおける apo-SOD1 タンパク質の重要性を示唆するが, 現在までにイヌの脊髄組織中の SOD1 タンパク質のアイソフォームを解析した研究は皆無である。

我々は先行研究において, E40K-SOD1 特異的モノクローナル抗体 (16G9 抗体) を作製し, DM 脊髄中の E40K-SOD1 タンパク質を特異的に検出することに成功している(38) (42)。本抗体は E40K-SOD1 タンパク質がミスフォールドした立体構造

依存性エピトープを認識すると考えられているが、認識抗原に関する詳細な検討はなされていない。

第2章では、組換え SOD1 タンパク質および本邦の DM 症例において浸透率が高い E40K 変異を有する症例を用いて、脊髄組織中の SOD1 タンパク質のアイソフォームを明らかにすることを目的とした。まず、holo 型、分子内ジスルフィド結合を保持した apo 型 (apo<sup>SS</sup> 型)、分子内ジスルフィド結合を切断した apo 型 (apo<sup>SH</sup> 型) の 3 種類の組換え SOD1 タンパク質をそれぞれ WT 型および E40K 変異型で作製した。得られた組換え SOD1 タンパク質の立体構造の熱安定性を示差走査型蛍光定量法 (Differential scanning fluorometry ; DSF) を用いて評価した。次に、組換え SOD1 タンパク質を抗原としたサンドイッチ ELISA により、16G9 抗体の抗原認識アイソフォームを同定した後、DM 脊髄組織中の 16G9 抗体認識抗原の存在を免疫沈降反応およびウェスタンブロットにより検出した。最後に、DM 脊髄組織中の SOD 活性を評価した。



## 材料および方法

### 組換え SOD1 タンパク質の調整

第 1 章と同様の手法で SOD1 遺伝子をタンパク質発現用プラスミドベクター pET15b (Novagen, WI, USA) にサブクローニングし, 組換え WT-SOD1 タンパク質および E40K-SOD1 タンパク質発現用プラスミドを作製した(3)。

作製した大腸菌発現用プラスミドをタンパク質発現用大腸菌 (*E. coli SHuffle* : Thermo Fisher Scientific, MA, USA) に導入し, 50 µg/mL アンピシリン含有 LB 寒天培地で 37 °C で一晩培養した。単一コロニーを 50 µg/mL アンピシリン含有液体 LB 培地に植菌し, 37 °C で一晩培養した。その後, 新たな 50 µg/mL アンピシリン含有 LB 培地で 20 倍希釈し, 37 °C で 3 時間培養した。イソプロピル β-D-1-チオガラクトピラシノド (IPTG ; 終濃度 0.5 mM) を添加し, 20 °C で 20 時間培養することでタンパク質を発現させた。得られた細胞懸濁液を 3,500 × g で 15 分間遠心分離し, 得られた細胞ペレットは使用するまで -30 °C で保存した。

細胞ペレットを自然融解させ, 1 M の硫酸マグネシウムおよび 10 mg/mL の DNase を加えた溶解バッファー (PBS/ 2 % TritonX-100) に懸濁させた。氷上で超音波破碎し, 20,000 × g で 15 分間遠心分離後, 上清を回収した。その後, cOmplete™ His-Tag 精製カラム (cOmplete, Basel, Switzerland) を用いたアフィニティークロマトグラフィーで組換えタンパク質を分離した。得られた精製タンパク質を透析膜に注入し, 脱金属バッファー (pH4.0, 250 mM NaOAc/ 0.5 M NaCl, 50 mM EDTA) 中で一晩透析処理を行った。2 U/ 200 µM のトロンビン酵素 (富士フィルム和光純薬株式会社, Osaka, Japan) を加えて 20 °C で一晩培養し, His フラグメントを切断した。HiTrap Benzamidine カラム (GE Healthcare, Tokyo, Japan) を用いてトロンビン酵素を除去した後, ゲル濾過クロマトグラフィ

ーを用いて apo<sup>SS</sup>-SOD1 タンパク質を精製した。精製後、組換えタンパク質は 10K Amicon Ultra Centrifugal filter (Millipore, MA, USA) で濃縮した。得られた apo<sup>SS</sup>-SOD1 タンパク質は原子吸光分析により、サンプル中に銅および亜鉛が含有されていないことを確認した。

Apo<sup>SS</sup>-SOD1 タンパク質にジチオトレイトール (DTT ; 終濃度 50 mM) を添加し、37 °C で 1 時間インキュベートした。得られた還元タンパク質溶液は 10K Amicon Ultra Centrifugal filter を用いて脱 DTT・濃縮処理を行い、apo<sup>SH</sup>-SOD1 タンパク質を作製した。

Apo<sup>SS</sup>-SOD1 タンパク質溶解バッファの脱 EDTA 処理を行った後、タンパク質と同濃度の CuSO<sub>4</sub> を添加し、37 °C で 30 分間インキュベートした。その後、タンパク質と同濃度の ZnSO<sub>4</sub> を添加して 37 °C で 30 分間インキュベートし、反応停止液 (10 mM Bathocuproinedisulfonic acid disodium salt hydrate, 500 mM EDTA) を加えて holo-SOD1 タンパク質を作製した。

精製した組換え SOD1 タンパク質の純度は 95 % 以上であることを SDS-PAGE で確認した。タンパク質の濃度は UV スペクトロメーター (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて 280 nm の吸収波長を測定した。

### DSF による熱安定性の評価

SOD1 タンパク質の各アイソフォームの熱安定性を DSF を用いて評価した。組換えタンパク質は第 1 章で作製した WT-SOD1 タンパク質および E40K-SOD1 タンパク質を用いた。96 ウェルプレート各ウェルに apo-E40K-SOD1 50 μM, EDTA 17.5 mM および 4 × SYPRO Orange (Sigma-Aldrich, MO, USA) を含む溶液を調整した。測定は Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time polymerase chain reaction (PCR) System (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて、

25 °Cから 95 °Cまで 1 °C/分の昇温条件下で行った。測定データは StepOnePlus software で解析し、各アイソフォームの熱変性中点温度 ( $T_m$ ) を決定した。実験は独立して 3 回行った。

#### モノクローナル抗体 16G9 抗体の認識 SOD1 アイソフォームの同定

16G9 抗体と SOD1 タンパク質の各アイソフォームとの反応性を評価した。サンプルとして、野生型および E40K 変異型のそれぞれで holo 型, apo<sup>SS</sup> 型, apo<sup>SH</sup> 型 および凝集体を作製した。凝集体は 40  $\mu$ M の組換え apo<sup>SH</sup>-SOD1 タンパク質, 10 mM の EDTA および 5 mM DTT を 96 ウェルプレート上で混合し, 37°C, 170 rpm の条件下で振盪した。振盪後のサンプルの一部を分取し, ThT を添加して ThT 蛍光の上昇を確認した。まず, キャプチャー抗体として 16G9 抗体 (希釈 1 : 100) を ELISA 用 96 ウェルプレートに 4 °Cで一晩吸着させた。次に, 10  $\mu$ g のサンプルを添加し, 室温・振盪条件下で 1 時間インキュベーションした。その後, 検出抗体として抗 SOD1 ポリクローナル抗体 (SOD-100, Enzo Life Science, NY, USA, 希釈 1 : 1,000), 次いで HRP 結合抗ウサギ IgG 抗体 (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG, Jackson Immuno Reserch Laboratories inc., PA, USA, 希釈 1 : 3,000) をそれぞれ室温, 振盪条件下で 1 時間反応させた。基質溶液として O-phenylenediamine dihydrochloride および 0.012 %の過酸化水素を含有する 100 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を用いた。プレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いて 490 nm の吸光度を測定した。実験は独立して 3 回以上行った。各群の平均値を一元配置の ANOVA で比較し, 各群の比較には Tukey の多重比較検定を用いた。p 値 0.05 以下を統計学的な有意差ありとした。

## 供試動物からの脊髄組織サンプルの採取

SOD1 遺伝子変異 (c.118G>A) をホモ接合体で有しており、病理組織学的検査で DM と確定診断されたペンブローク・ウェルシュ・コーギー (PWC) 2 頭 (DM 犬) の脊髄組織を用いた。対照群として、SOD1 遺伝子の変異を持たず、中枢神経疾患以外の原因で死亡したビーグル 2 頭 (正常犬) の脊髄組織を用いた。全ての症例において飼い主の許可を得て、死亡後 24 時間以内に病理解剖を実施した。得られた脊髄組織サンプルは直ちに凍結させ、使用まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保管した。症例の詳細な情報は表 2-1 に示した。

## 16G9 抗体を用いた脊髄組織中の SOD1 タンパク質の検出

脊髄組織中の 16G9 抗体陽性 SOD1 タンパク質を検出するために、免疫沈降およびウエスタンブロットを行った。DM 犬および正常犬の凍結保存尾側胸髄にプロテアーゼ阻害剤 (complete mini, Roche, Basel, Switzerland) を含む緩衝液 (PBS, 1 % Tween20, 5 mM EDTA, 100 mM ヨードアセトアミド) を加え、氷上で破碎した。破碎液を  $20,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  で 30 分間遠心分離し、上清を脊髄抽出液として回収した。タンパク濃度は Micro BCA Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Tokyo, Japan) を用いて測定した。16G9 抗体を  $0.35 \mu\text{g}$  含む抗体溶液に Protein G 磁気ビーズ (Dynabeads, Veritas, Tokyo, Japan) を添加し、15 分攪拌した。対照群にはマウス IgG 抗体を用いた。次に、総蛋白量が  $50 \mu\text{g}$  となるように脊髄抽出液を添加し、 $4^{\circ}\text{C}$  で 1 時間攪拌した。その後、免疫沈降複合体を PBS-T で 3 回洗浄した。 $4\%$  のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を加えて  $95^{\circ}\text{C}$  で 5 分間加熱し、免疫複合体から標的抗原を遊離した後、上清を回収した。免疫沈降物および  $5\%$  インพุットを  $14\%$  SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて、常法に従い SDS-PAGE を実施した。その後、PolyVinylidene DiFluoride メンブレン (Pore size:

0.45  $\mu$ m, Immobilon-P Membrane, Millipore, Bedford, MA, USA)に転写した。1%スキムミルクを添加した PBS-T に転写後のメンブレンを浸漬し、室温で 1 時間反応させた。一次抗体である抗 SOD1 抗体 (希釈 1:2,000) に浸漬し、4  $^{\circ}$ C で一晩反応させた。その後、メンブレンを PBS-T で洗浄し、二次抗体である HRP 結合抗ウサギ IgG 抗体 (希釈 1:5,000) に浸漬し、室温で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、ECL<sup>TM</sup> Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva, Tokyo, Japan)により 転写タンパクを検出し、化学発光画像解析装置 (LAS-1000UVmini, FUJIFILM, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。

#### 組織中の SOD 活性評価

組織中の SOD 活性は in gel SOD activity assay を用いて評価した。Holo-WT-SOD1, holo-E40K-SOD1 タンパク質および脊髄抽出液に 6  $\times$  Native-PAGE sample buffer (0.5 M Tris pH 6.8, 30 % Glycerol, 0.6 mg/mL Bromophenol blue) を添加した。Holo-WT-SOD1 および holo-E40K-SOD1 は 100 ng, 脊髄抽出液は総蛋白量で 10  $\mu$ g を 10 %ポリアクリルアミドゲルを用いて Native-PAGE を実施した。泳動後、ゲルを 1 mg/mL の Nitro Blue Tetrazolium Chloride 溶液に浸漬し、室温・遮光条件下で 30 分間振盪した。ゲルを洗浄後、TEMED-Riboflavin 溶液 (100 mM K-Pi pH 7.0, 0.2 % TEMED, 140  $\mu$ M リン酸リボフラビンナトリウム) に浸漬し、室温・遮光条件下で 30 分間振盪した。次に、ゲルを発光板上で発色させ、画像解析装置を用いて撮影した。

## 結果

### モノクローナル抗体 16G9 抗体の認識 SOD1 アイソフォームの同定

SOD1 タンパク質の各アイソフォームの構造安定性を調べるために、組換え SOD1 タンパク質を用いた DSF を行った。Holo-WT-SOD1 および holo-E40K-SOD1 タンパク質の  $T_m$  はそれぞれ  $78.5 \pm 0.17$  °C,  $75.8 \pm 0.29$  °C と非常に高く、安定な構造を有していた (表 2-2)。しかし, apo<sup>SS</sup> 型になることで,  $T_m$  は apo<sup>SS</sup>-WT-SOD1 タンパク質で  $51.5 \pm 0.14$  °C, apo<sup>SH</sup>-E40K-SOD1 タンパク質で  $48.4 \pm 0.26$  °C まで低下した。この傾向は第 1 章の二次構造レベルでの熱安定性と一致していた。さらに, SS 結合を切断した apo<sup>SH</sup> 型になると,  $T_m$  は apo<sup>SH</sup>-WT-SOD1 タンパク質で  $38.2 \pm 0.55$  °C, apo<sup>SH</sup>-E40K-SOD1 タンパク質で  $31.4 \pm 0.38$  °C まで低下し, 顕著に熱安定性が低下していた。E40K 変異型の  $T_m$  は WT 型と比較して低く, apo<sup>SH</sup> 型で顕著に低かった ( $\Delta T_m = -6.8$  °C)。

16G9 抗体が認識する SOD1 アイソフォームを同定するために, 16G9 抗体をキャプチャー抗体, 抗 SOD1 抗体を検出抗体として, サンドイッチ ELISA を行った。E40K-SOD1 凝集体で顕著な吸光度の上昇が認められ, apo<sup>SH</sup>-E40K-SOD1 でも吸光度の上昇傾向が認められた (図 2-1)。この結果より, 16G9 抗体は SOD1 タンパク質の中でも, 構造的に非常に不安定な apo<sup>SH</sup>-E40K-SOD1 または E40K-SOD1 凝集体を認識していることが明らかになった。また, 興味深いことに, WT-SOD1 凝集体でも同様に吸光度の上昇が認められ, 実験的に作製した WT 型の凝集体にも結合する可能性が示唆された。一方, 変異の有無にかかわらず holo 型および apo<sup>SS</sup> 型では吸光度の上昇は認められなかった。

### 16G9 抗体を用いた脊髄組織中の SOD1 タンパク質の検出

Apo<sup>SH</sup>-E40K-SOD1 または E40K-SOD1 凝集体を特異的に認識することが明らかになった 16G9 抗体を用いて、脊髄組織中の SOD1 タンパク質のアイソフォームを明らかにした。正常犬および DM 犬の凍結保存尾側胸髄より脊髄抽出液を作製し、16G9 抗体による免疫沈降を実施した後、抗 SOD1 抗体によるウエスタンブロットを行った。正常犬、DM 犬ともに 5%インプットでは組換え SOD1 タンパク質と一致する 16 kDa の位置にバンドが認められ、脊髄組織中の SOD1 タンパク質の存在が確認された (図 2-2)。免疫沈降物のウエスタンブロットでは、DM 犬の脊髄組織のみ、16 kDa の位置にバンドが認められた。この結果より、DM 犬の脊髄組織中には apo<sup>SH</sup>-E40K-SOD1 または E40K-SOD1 凝集体が存在することが示された。

### 組織中の SOD 活性評価

脊髄組織中の SOD 活性を評価するために、Native-PAGE および In gel SOD activity assay を行った。正常犬由来の脊髄組織では、SOD 活性を示すバンドが認められた (図 2-3)。それに対して、DM 犬由来の脊髄組織では正常犬と比較してバンド密度は顕著に減少していた。この結果より、DM 犬の胸腰部の脊髄組織では SOD 活性が顕著に低下していることが示された。同時に、DM 犬の脊髄組織中では正常犬と比較して holo-SOD1 タンパク質が減少していることが示唆された。

## 考察

DMにおいて、SOD1 遺伝子に変異が生じることで細胞毒性を有する変異型 SOD1 タンパク質が産生される (19)。SOD1 タンパク質は S-S 結合の形成および金属 (銅および亜鉛) イオンの結合を経て成熟し、活性を得る酵素タンパク質である。第 1 章では、組換え SOD1 タンパク質を用いて各アイソフォームを作製し、E40K-SOD1 タンパク質では、活性型である holo 型は凝集性を示さず、金属解離型である apo 型になることで構造が不安定になり凝集し始めることを明らかにした。この結果より DM 発症に apo-E40K-SOD1 タンパク質が関与していることが示唆され、脊髄組織における SOD1 タンパク質のアイソフォームを明らかにすることは、DM の病態メカニズムを解明する上で重要であると言える。

SOD1 タンパク質の各アイソフォームの立体構造の安定性を評価するために、DSF を行った。第 1 章の二次構造レベルでの構造安定性と同様に、SOD1 タンパク質は WT 型、E40K 変異型ともに、apo 型になることで顕著に不安定な構造となった。また、S-S 結合を切断することで  $T_m$  は 40 °C 以下まで低下した。さらに、E40K 変異が加わることで、WT 型より  $T_m$  が 6.8 °C 低下し、犬の生理的体温付近では天然構造を保持できなくなることが明らかになった。S-S 結合はタンパク質の構造の安定化に大きく寄与していることから、S-S 結合の切断により SOD1 タンパク質の構造が不安定になったと考えられる(67)。また、プリオン蛋白質(39)やトランスサイレチンタンパク質(79)では、分子内 S-S 結合が細胞毒性の発現に関与することが報告されており、E40K-SOD1 タンパク質においても S-S 結合の切断が細胞毒性発現に関与している可能性が考えられる。

過去の研究において、16G9 抗体は E40K-SOD1 タンパク質に存在する立体構造依存性エピトープを認識することが報告されている(38)。本研究では 16G9 抗体の認



識抗原を明らかにするために、組換え SOD1 タンパク質を用いて 16G9 抗体認識アイソフォームを同定した。サンドイッチ ELISA では、apo<sup>SH</sup>-E40K-SOD1 タンパク質および E40K-SOD1 凝集体で吸光度の上昇が認められた。この結果より、16G9 抗体は E40K-SOD1 タンパク質の中でも apo<sup>SH</sup> 型および凝集体の立体構造依存性エピトープを特異的に認識していることが明らかになった。ヒト SOD1 タンパク質においても、apo<sup>SH</sup> 型は構造的に不安定であり、凝集体を形成しやすい(23) (24)。また、ヒト SOD1 タンパク質の apo<sup>SH</sup> 型は、凝集経路の初期段階でオリゴマーを形成し、成熟した凝集体ではなく、オリゴマーが毒性を発現すると考えられている(24)。DM においても SOD1 凝集体の蓄積は、神経細胞に対する毒性と関連していると考えられている(5) (47) (74)。本実験で 16G9 抗体は、非常に凝集しやすい apo<sup>SH</sup>-E40K-SOD1 タンパク質および E40K-SOD1 凝集体への交差性が認められた。したがって、16G9 抗体は E40K-SOD1 タンパク質の凝集初期産物、すなわち毒性を有する E40K-SOD1 オリゴマーを認識している可能性も考えられる。また、今回の実験では 16G9 抗体は WT-SOD1 凝集体にも交差性を示した。WT-SOD1 タンパク質は実験的に apo<sup>SH</sup> 型を作製することで初めて凝集性を示す。また、実験的に作製された WT-SOD1 凝集体は、SOD1 タンパク質の凝集促進効果を示すことが明らかになっている(65)。本実験結果は、SOD1 タンパク質の apo<sup>SH</sup> 型由来の凝集体構造が DM 脊髄における毒性発現に重要である可能性を示唆する。16G9 抗体のより詳細な抗原認識エピトープや E40K-SOD1 オリゴマーの細胞毒性に関して今後さらなる研究が必要とされる。

16G9 抗体を用いて脊髄組織抽出液の免疫沈降を行ったところ、DM 犬由来の脊髄組織から apo<sup>SH</sup>-E40K-SOD1 タンパク質および E40K-SOD1 凝集体を特異的に検出することができた。また、過去の研究では、正常犬および DM 犬の脊髄組織に対して 16G9 抗体を用いた免疫組織化学を行い、神経細胞およびアストロサイト内に

16G9 抗体陽性反応が認められている(38)(42)。これらの結果を合わせて考慮すると、DM 犬の脊髄組織中には apo<sup>SH</sup>-E40K-SOD1 タンパク質または E40K-SOD1 凝集体が存在していると考えられる。

脊髄組織中の SOD 活性を in gel SOD activity assay により評価したところ、DM 犬由来の脊髄組織では正常犬と比較して顕著な SOD 活性の低下が認められた。SOD1 タンパク質は抗酸化酵素の一種であり、SOD 活性の低下はスーパーオキシドイオンの代謝異常を誘起し、神経細胞障害を引き起こす(55)。DM における脊髄病変は尾側胸腰部から変性が始まり、頭尾側方向へと変性が拡大していく。その理由として、尾側胸髄は他の脊髄領域と比較して血液供給量が少ないため、酸化ストレスに対して最も脆弱であることが挙げられており、DM において酸化ストレスが病態発生に重要な役割を果たしていると考えられている(4)。したがって、本実験で認められた SOD 活性の低下は、DM の発症メカニズムに深く関与している可能性が考えられる。しかし、ALS においては、ヒト SOD1 遺伝子をノックアウトしたマウスは ALS 様の症状を示さないという報告もあり(53)、DM における SOD 活性低下の病態メカニズムへの関与については、今後さらなる検討が必要である。また、SOD1 タンパク質は WT 型、E40K 変異型ともに holo 型に成熟することで、同等の酵素活性を獲得することが明らかになっている(19)。したがって、DM 犬の脊髄組織では SOD 活性が低下していることから、holo 型 SOD1 タンパク質が優位に減少していることが示唆される。

第 1 章および本章で得られた結果を統合すると、DM 犬脊髄組織において E40K-SOD1 タンパク質は翻訳後、holo 型までの成熟経路の初期段階に位置する apo 型として優位に存在し、この apo 型が強い凝集性を示すことで DM 発症メカニズムにおいて重要な働きを担っている可能性が示唆された(図 2-4)。Apo 型 SOD1 タンパク質は金属イオンが付加することで非常に安定な構造である holo 型へと成熟する。し

たがって、apo 型を治療ターゲットとし、holo 型への成熟を促すことは、DM の治療において重要なアプローチとなり得る。今後、apo-E40K-SOD1 タンパク質に着目した DM の病態解明や治療薬の開発を推進させるため、apo-E40K-SOD1 タンパク質の凝集経路のより詳細な解明が必要とされる。

## 図表

### 表2-1 供試個体

Dog No.	犬種	SOD1遺伝子型	死亡年齢	死亡原因
1	ビーグル	WTホモ接合体	10歳1ヶ月	安楽殺
2	ビーグル	WTホモ接合体	8歳0ヶ月	安楽殺
3	PWC	E40Kホモ接合体	14歳3ヶ月	DM
4	PWC	E40Kホモ接合体	12歳6ヶ月	DM

表 2-1. 供試個体

PWC; ペンブローク・ウエルシュ・コーギー, SOD1; superoxide dismutase1, WT  
ホモ接合体; 野生型 SOD1 遺伝子ホモ接合体, E40K ホモ接合体; E40K-SOD1 遺伝  
子ホモ接合体, DM; 変性性脊髄症

**表2-2 Melting temperature of SOD1.**

	Holo		Apo <sup>SS</sup>		Apo <sup>SH</sup>	
	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$
WT	78.5 ± 0.17	NA	51.5 ± 0.14	NA	38.2 ± 0.55	NA
E40K	75.8 ± 0.29	- 2.7	48.4 ± 0.26	- 3.1	31.4 ± 0.38	- 6.8

表 2-2. SOD1 タンパク質の熱変性中点 ( $T_m$ )

野生型 (WT) と E40K 変異型の  $T_m$  の差は  $\Delta T_m$  として表した。

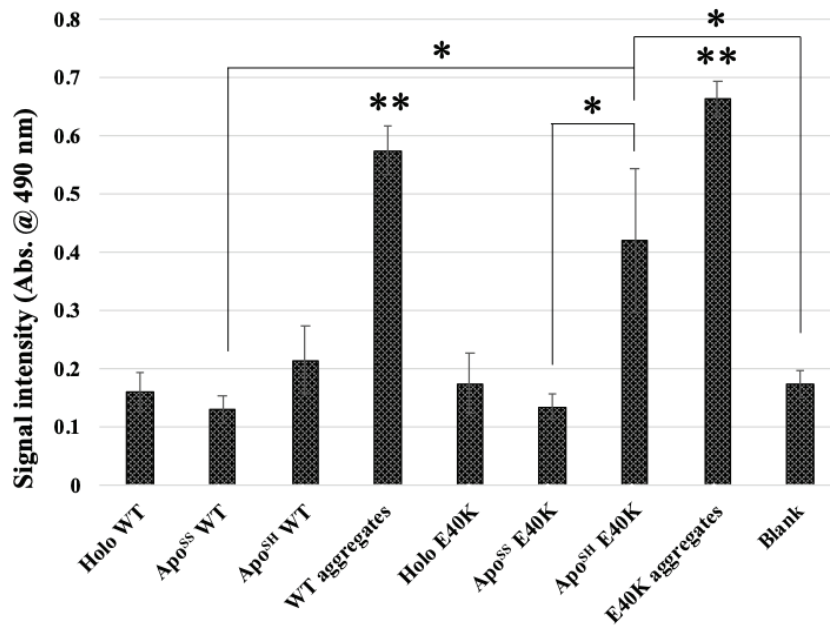


図 2-1. 16G9 抗体をキャプチャー抗体として用いたサンドイッチ ELISA

WT 凝集体, Apo<sup>SH</sup>-E40K-SOD1, E40K-SOD1 凝集体で吸光度の上昇が認められた (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. all isoforms except apo<sup>SH</sup> E40K)。

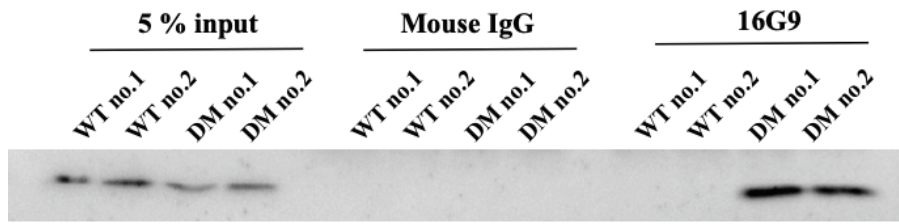


図 2-2. 免疫沈降およびウエスタンブロットによる脊髄組織中の SOD1 アイソフォームの評価

正常犬および DM 犬の脊髄組織よりタンパク抽出液を作製し、16G9 抗体で免疫沈降した後、抗 SOD1 抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。DM 犬の脊髄組織においてのみ 16 kDa の位置にバンドを認めた。

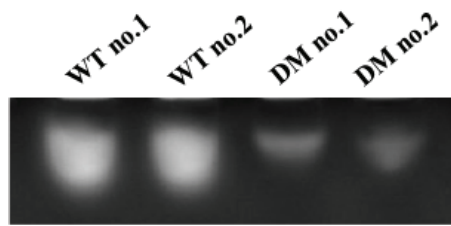


図 2-3. 脊髄組織中の SOD 活性評価

正常犬および DM 犬の脊髄組織よりタンパク抽出液を作製し，in gel SOD activity assay によって SOD 活性を評価した。DM 犬の脊髄組織では SOD 活性を示すバンド密度が顕著に減少していた。



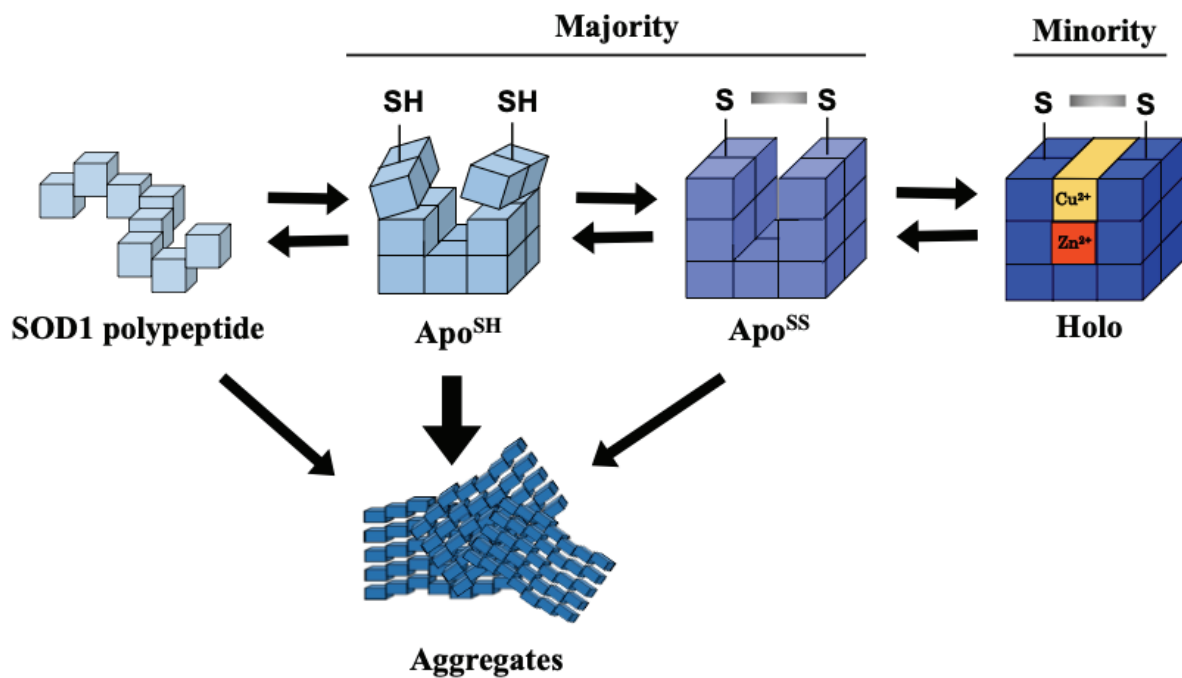


図 2-4. DM 脊髄組織における SOD1 タンパク質のフォールディング・凝集モデル  
 SOD1 タンパク質はジスルフィド結合および金属イオン付加を経て構造的に安定な活性型 (holo 型) へと成熟する。DM 脊髄において、活性を有する holo 型は少なく、不安定な構造で凝集性が高い apo 型が優位に存在している可能性が示唆された。

## 第 3 章

### イヌ変異型 SOD1 タンパク質 (E40K-SOD1) 凝集抑制化合物の探索

## 背景

変性性脊髄症 (DM) は、その発症原因としてスーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) 遺伝子の変異が報告されており(5)(74), DM 症例の脊髄組織には、変異型 SOD1 タンパク質の凝集体が蓄積している (5)(38)。第 1 章では、変異型 SOD1 タンパク質は金属解離型 (apo 型) を凝集前駆体として  $\beta$  リッチ構造を有するアミロイド様凝集体を形成することを明らかにした。第 2 章では、DM 症例の脊髄組織を用いた SOD1 アイソフォームの評価を行い、DM 症例の脊髄組織では holo 型 SOD1 タンパク質が少なく、apo 型および凝集体が優位に存在することを示した。

中枢神経系に凝集体が過剰に蓄積すると、小胞体ストレスや酸化ストレスが誘起され、神経細胞死や脱髄を特徴とする神経変性が引き起こされる (22)(54)。凝集体の過剰蓄積によって引き起こされる神経変性疾患には、ヒトではアルツハイマー病やプリオン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などが知られている。これらの神経変性疾患において、原因タンパク質の凝集を抑制することが治療アプローチのひとつとして知られている。現在までに、アルツハイマー病や ALS の原因タンパク質に対して凝集抑制効果を示す薬物候補化合物がいくつか報告されている(34)(40)(41)(45)。DM においても、変異型 SOD1 タンパク質の凝集体が小胞体ストレスを誘起することが示されており(11; 77), 変異型 SOD1 タンパク質の凝集を抑制することは DM の重要な治療戦略となり得る。しかし、DM における SOD1 タンパク質を対象とした凝集抑制に関する研究は現在までに皆無である。本章では、複数の候補化合物の SOD1 タンパク質凝集抑制効果を評価した。

1 つ目の候補化合物である Diacetylbis (4-methylthiosemicarbazonato) copper II ( $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atSm})$ ) は、経口投与で血液脳関門 (BBB) を通過可能な銅含有低分子化合物 (分子量=322) である(48)。近年、ヒト SOD1 タンパク質を用いた研究では、Cu

$\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$ は細胞内のヒト SOD1 タンパク質に銅を供給することで、凝集を抑制することが示されている(56) (73)。また、ALS モデルマウスを用いた研究では、 $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$ の投与により運動機能低下の改善や、生存期間の延長が報告されている(64)。第1章において、SOD1 タンパク質は銅および亜鉛が解離することで著しく不安定になり、凝集が促進されることを明らかにした。したがって、構造的に不安定な apo-SOD1 タンパク質に銅を付加させることで、凝集を抑制できると考えられた。

2つ目の候補化合物である GIF 化合物（特許申請中）は、神経保護作用を有するオキシインドール誘導体である(25)。オキシインドール誘導体は、アルツハイマーの病因タンパク質である tau タンパク質の凝集体と高い親和性を有することが示されている(71)。リード化合物である GIF-0726-r は、タンパク質ミスフォールディング疾患における神経変性の主な原因である小胞体ストレスおよび酸化ストレスを抑制し(33)、官能基を置換することで神経保護活性が高まることが報告されている(32)。GIF-0726-r をリード化合物として 16 種類の GIF 化合物を合成し、SOD1 タンパク質に対する凝集抑制効果を評価した。

本章では、 $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$ および GIF 化合物の SOD1 タンパク質凝集抑制効果を評価することを目的とした。まず、第1章で確立したチオフラビン T 色素を用いたスクリーニング系を用いて、 $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$ および 16 種類の GIF 化合物の apo-E40K-SOD1 タンパク質に対する凝集抑制効果を評価した。次に、E40K-SOD1 タンパク質発現細胞を用いて SOD1 タンパク質凝集抑制効果を評価した。また、化合物添加条件下で作製した SOD1 凝集体の形態を電子顕微鏡で観察した。

## 材料および方法

### **Cu<sup>II</sup>(at-sm)**

Cu<sup>II</sup>(at-sm)は、Cayman Chemical 社 (MI, USA) より粉末化合物として購入し、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させ、-20 °C で保管した。

### **オキシインドール誘導体**

オキシインドール誘導体である GIF-0726-r は、ベンズアルデヒドとインドリン-2-オンを縮合させ、その後水素化させることで合成した(25) (26)。GIF-0726-r をリード化合物として、GIF-0725-r, GIF-0822-r, -0825-r, -0826-r, -0827-r, -0851-r, -0852-r, -0854-r, -0856-r, -0871-r, -0872-r, -0873-r, -0874-r, -0875-r, -0890-r および -0952-r を合成した (図 3-1)。これらの化合物は DMSO に溶解させ、-20 °C で保管した。GIF 化合物は岐阜大学工学部古田教授から提供された。

### **組換えイヌ SOD1 タンパク質の調整**

組換え apo-E40K-SOD1 タンパク質は第 1 章と同様の方法で合成および精製した。精製した組換え apo-E40K-SOD1 タンパク質の純度は 95 % 以上であることを SDS-PAGE で確認した。タンパク質の濃度は UV スペクトロメーター (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて 280 nm の吸収波長を測定した。

### **組換えイヌ SOD1 タンパク質を用いたチオフラビン T スクリーニング**

SOD1 タンパク質に対する Cu<sup>II</sup>(at-sm)および GIF 化合物の凝集抑制効果を評価するために、チオフラビン T (ThT) スクリーニングを行った。96 ウェルプレートの各ウェルに、脱 EDTA 処理した apo-E40K-SOD1 40 μM および ThT 10 μM を含む

溶液を準備し、Cu<sup>II</sup>(atsm)を最終濃度 50 μM になるように添加した。次に、apo-E40K-SOD1 40 μM, EDTA 10.5 mM および ThT 10 μM を含む溶液を調整し、各 GIF 化合物を最終濃度が 50 μM になるよう溶液に添加した。振盪機 (TAITEC-OnLine, Saitama, Japan) を用いて混合溶液を 37 °C, 600 rpm 条件下で振盪し、マルチスペクトロマイクロプレートリーダー (Varioskan Flash, Thermo Scientific, MA, USA) で 24 時間ごとに 495–505 nm (励起波長 405 nm) の ThT 蛍光値を測定した。実験は独立して 3 回行った。

### SOD1 タンパク質発現細胞における凝集抑制効果の評価

マウス神経芽細胞腫 (Neuro2a) 細胞を 13 mm 径丸カバーガラス (松浪硝子工業, Osaka, Japan) を設置した 24 穴細胞培養用プレート (TrueLine Cell Culture Plates, 日本ジェネティクス株式会社, Tokyo, Japan) の各ウェルに播種し、10 % 牛胎仔血清 (FBS, Biosera, MO, USA) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium : DMEM, FUJIFILM Wako, Osaka, Japan) 中で、37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 環境下で一晩培養した。次に、遺伝子導入薬 (Lipofectamine 2000 Transfection Reagent, Invitrogen, CA, USA) を用いて製品プロトコールに従って、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 付き SOD1 タンパク質の哺乳類発現用プラスミド (野生型 : GFP-WT-SOD1, 変異型 : GFP-E40K-SOD1) を細胞に導入した(47) (77)。遺伝子導入前には培地を無血清培地 (Opti-MEM, life technologies corporation, CA, USA) に交換し、1 ウェルあたり 0.5 μg のプラスミドを添加した。遺伝子導入 4 時間後に培地を 10 % FBS 添加 DMEM に交換した。その後、各ウェルに Cu<sup>II</sup>(atsm) (最終濃度 500 nM) または GIF 化合物 (最終濃度 25 μM) を添加し、36 時間培養した。溶媒コントロールとして DMSO (最終濃度 0.05 %) を用いた。

培養後の細胞は4%パラホルムアルデヒドで10分間固定した。固定後の培養細胞をPBS (pH7.4) で洗浄した後、0.25% Triton X-100 を含むPBSを用いて細胞膜透過処理を10分間行った。PBSによる細胞の洗浄後、4', 6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩 (DAPI, DOJINDO Laboratory, Kumamoto, Japan, 希釈1:1,000) を用いて核染色を行い、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (LSM710, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) で細胞を観察した。核の蛍光を観察するDAPIチャンネルを用いて40倍の倍率でランダムに視野を選択後、GFP陽性を示す100個以上の細胞を観察し、SOD1凝集体を有する細胞の割合を算出した。同実験は独立して3回行った。

#### **E40K-SOD1凝集体の形態観察**

ThT試験と同条件で、GIF化合物添加群および未添加群のapo-E40K-SOD1凝集体を作製した。得られた凝集体はcarbon-coated 200-mesh copper grids (EM Japan Co., Ltd, Tokyo, Japan) に吸着させ、2% w/vのリンタングステン酸でネガティブ染色した。その後、200 kVの透過型電子顕微鏡 (JEM-2100F, 日本電子株式会社, Tokyo, Japan) を用いて観察した。

#### **統計解析**

複数の群の平均値を一元配置のANOVAで比較し、コントロール群との比較にはDunnettの多重比較検定を用いた。また、各群の比較には、Tukeyの多重比較検定を用いた。 $p$ 値0.05以下を統計学的な有意差ありとした。

## 結果

### 組換え SOD1 タンパク質を用いた化合物スクリーニング

Cu<sup>II</sup>(at-sm) および GIF 化合物の SOD1 タンパク質凝集抑制効果を調べるために、組換え SOD1 タンパク質を用いた ThT スクリーニングを行った。コントロール群では、24 時間後に ThT 蛍光強度の顕著な増加が認められた (図 3-2A, C)。一方で、Cu<sup>II</sup>(at-sm) 添加群では、ThT 蛍光の有意な抑制が認められた (図 3-2B)。GIF 化合物添加群では GIF-0725-r, GIF-0874-r および GIF-0875-r を除く 13 種類で ThT 蛍光が抑制された (図 3-2C)。特に、GIF-0854-r および GIF-0890-r 添加群では顕著な凝集体形成抑制効果が認められた (図 3-2D)。

### SOD1 タンパク質発現培養細胞での凝集体形成抑制効果の評価

Cu<sup>II</sup>(at-sm) および ThT スクリーニングで顕著な凝集抑制効果を示した GIF 化合物 (GIF-0854-r および GIF-0890-r) の遺伝子導入培養細胞での SOD1 凝集体形成抑制効果の評価するために、SOD1 プラスミド導入細胞を用いて凝集体形成率を評価した。GFP-WT-SOD1 導入細胞では細胞質内に均一な GFP 蛍光が認められた (図 3-3A)。一方で、GFP-E40K-SOD1 導入細胞では細胞質内に顆粒状の GFP 蛍光として SOD1 凝集体が認められた (図 3-3A)。凝集体含有細胞率は GFP-WT-SOD1 導入細胞で  $7.3 \pm 1.2 \%$ 、GFP-E40K-SOD1 導入細胞で  $20.7 \pm 1.5 \%$  であった。これに対して、Cu<sup>II</sup>(at-sm) 添加群では  $9.7 \pm 0.9 \%$ 、GIF-0854-r 添加群で  $13.3 \pm 2.3 \%$ 、GIF-0890-r で  $10.0 \pm 1.2 \%$  の凝集体含有細胞率が認められ、Cu<sup>II</sup>(at-sm) および GIF 化合物添加によって細胞内での SOD1 タンパク質凝集抑制効果が認められた (図 3-3B)。



## SOD1 凝集体の形態評価

GIF 化合物の添加による SOD1 凝集体の形態変化を評価するために、細胞内で SOD1 タンパク質の凝集をもっとも抑制した GIF-0890-r 添加後の凝集体の形態を電子顕微鏡を用いて評価した。GIF-0890-r 添加の有無に関わらず、過去の報告と同様のアミロイド様凝集体 ‘worm-like fibrils’ が認められた。一方で、GIF-0890-r 添加群では一視野あたりの凝集体量が少ない傾向にあった (図 3-4)。

## 考察

変異型 SOD1 凝集体の蓄積は、DM 罹患犬の脊髄におけるもっとも特徴的な病理組織学的変化であり(5)、神経細胞への凝集体の過剰蓄積は、様々なシグナルを介して細胞死や脱髄などの神経変性を引き起こす(22)。そのため、タンパク凝集性神経変性疾患において、病因タンパク質の凝集を抑制することは重要な治療戦略のひとつである。本章では、ThT スクリーニングを用いて  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{at-sm})$  および GIF 化合物の SOD1 タンパク質凝集抑制効果を評価し、 $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{at-sm})$  および複数の GIF 化合物が SOD1 タンパク質の凝集を抑制することを明らかにした。また、 $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{at-sm})$ 、GIF-0854-r および GIF-0890-r は SOD1 タンパク質発現培養細胞でも顕著な凝集抑制効果を示した。

$\text{Cu}^{\text{II}}(\text{at-sm})$  は低分子化合物であり、経口投与で BBB を通過可能な銅含有化合物である(48)。リボソームで合成された SOD1 タンパク質は、金属イオンを含まない apo 型に亜鉛および銅が付加することで活性を有する holo 型へと成熟する。筆者は、第 1 章で E40K-SOD1 タンパク質の holo 型は非常に安定な構造であるのに対して、apo 型は不安定かつ高い凝集性を有することを明らかにした。本章で用いた  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{at-sm})$  は apo-SOD1 タンパク質に銅イオンを配位し、holo 型への成熟を促進することで SOD1 タンパク質の凝集を抑制したと考えられる。また、第 2 章では DM 犬の脊髄中では E40K-SOD1 タンパク質の apo 型が優位に存在していることを示した。過去の報告ではマウス生体内に取り込まれた  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{at-sm})$  は、脊髄組織へと到達し、SOD1 タンパク質に銅イオンを供給することが示されている(56)。したがって、 $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{at-sm})$  は DM 犬の脊髄組織中에서도効率的に取り込まれ、holo 型への成熟を促進することで、神経保護作用を示すことが期待される。

GIF 化合物は小胞体ストレスや酸化ストレスによる細胞死を抑制することが示されている(25)。筆者らの研究グループで得られたツニカマイシン誘導細胞死の抑制効果(25)と、本研究で得られた SOD1 タンパク質の凝集抑制効果の関係を線形回帰モデルを用いて検討したところ、直線的な正の相関関係が認められた ( $p < 0.01$ ;  $R^2 = 0.66$ ) (図 3-5)。小胞体ストレスの原因の一つとして、異常タンパク質の蓄積が知られている(13)(30)。今回認められた正の相関関係により、GIF 化合物はタンパク質の凝集を阻害することで小胞体ストレスによる細胞死を抑制する可能性が示唆された。

GIF 化合物のスクリーニングでは、GIF-0854-r および GIF-0890-r が顕著な凝集抑制効果を示した。GIF-0854-r は、リード化合物である GIF-0726-r のオキシインドール環の 5 位の水素原子が臭素基に置換された構造を有する。臭素はハロゲングループの一つであり、芳香族分子のハロゲン化はタンパク質の凝集や細胞毒性の調節に極めて重要な役割を果たすことが明らかになっている(6) (27)。さらに、アミロイドβにおける過去の研究において、芳香族分子はハロゲン化することで、凝集抑制剤としての機能が向上し、より顕著な凝集抑制効果を示した(75)。したがって、GIF 化合物においてもオキシインドール環の 5 位の官能基を臭素基へ置換することは、SOD1 タンパク質凝集抑制効果を高めるのに重要であると考えられる。一方、GIF-0890-r は GIF-0726-r の 2 位に炭素原子が 2 個付加された構造を有する。芳香族分子は残基の角度と残基間の距離が相互作用を示し、性状が変化する(2)。今回の結果より、GIF-0890-r の残基の角度と残基間の距離が、SOD1 タンパク質の凝集を抑制するのにより効果的であった可能性が考えられる。それぞれの構造が SOD1 タンパク質の凝集抑制にどのように寄与しているかについては、今後生体分子相互作用解析 (Biacore) などを用いたさらなる研究が必要である。

GIF 化合物の SOD1 タンパク質の凝集抑制効果は、細胞内でも認められた。GIF 化合物の分子量は細胞膜を透過できるほど小さいため (GIF-0854-r; 分子量 346, GIF-0890-r; 分子量 294), 細胞内に侵入し, 化学シャペロンとして細胞内凝集抑制効果を示したと考えられる(12)。またオキシインドール誘導体は, BBB を容易に通過し, 中枢神経系への取り込みとクリアランスが優れていることも報告されており(71), 同様にオキシインドール構造を有する GIF 化合物も優れた BBB 通過性を有し, 生体内でも効果を発揮する可能性がある。

本章では,  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{at-sm})$  およびオキシインドール誘導体である GIF 化合物の SOD1 タンパク質凝集抑制効果を評価した。スクリーニングの結果,  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{at-sm})$ , GIF-0822-r, GIF-0825-r, GIF-0826-r, GIF-0827-r, GIF-0851-r, GIF-0852-r, GIF-0854-r, GIF-0856-r, GIF-0871-r, GIF-0872-r, GIF-0873-r, GIF-0890-r および GIF-0952-r が SOD1 タンパク質の凝集を抑制し, その中でも特に  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{at-sm})$ , GIF-0854-r および GIF-0890-r が顕著な凝集抑制効果を示した。これらの化合物は DM における新規治療薬候補としてその効果が期待できる。 $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{at-sm})$  および GIF 化合物の薬効動態, 毒性や *in vivo* での SOD1 タンパク質凝集抑制効果などについては今後さらなる研究が必要とされる。

# 図表

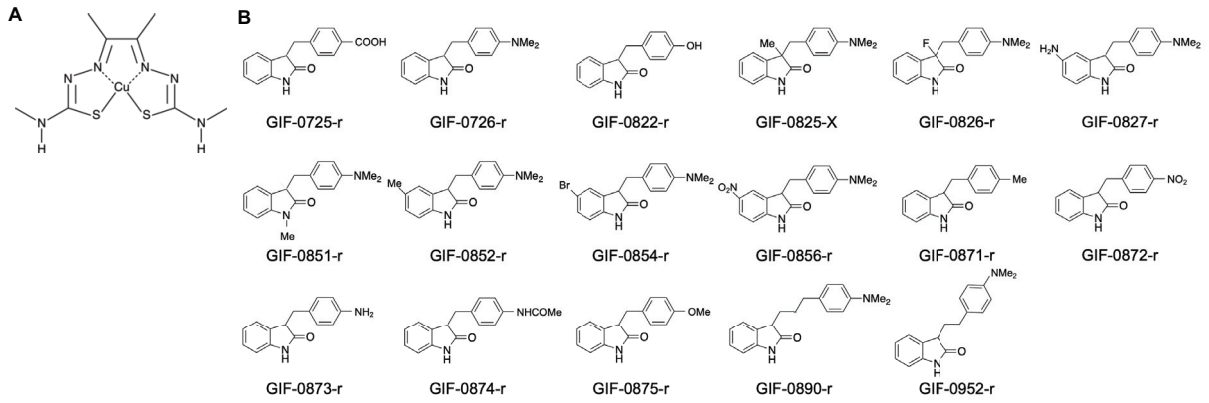


図 3-1. 候補化合物の構造式

(A)  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atsm})$ の構造式。(B) GIF 化合物の構造式。GIF-0726-r はリード化合物を表す。

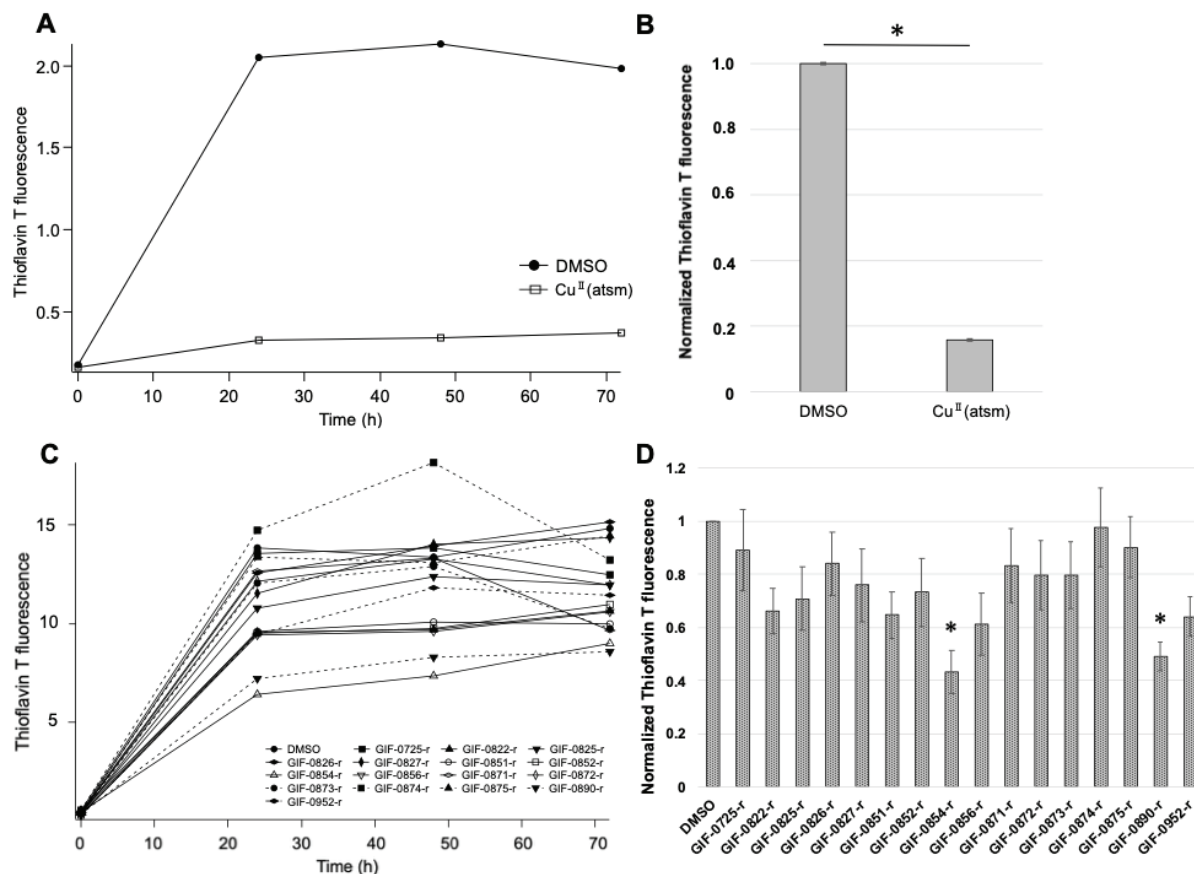


図 3-2. チオフラビン T スクリーニング

(A) Cu<sup>II</sup>(atism)添加条件および (C) GIF 化合物添加条件の apo-E40K-SOD1 タンパク質の継時的な凝集形成曲線。コントロール群 (DMSO 群) と比較して, Cu<sup>II</sup>(atism)添加群および GIF 化合物添加群 (GIF-0725-r, GIF-0874-r, GIF-0875-r を除く) でチオフラビン T 蛍光の抑制が認められた。蛍光強度は 24 時間後にプラトーに達した。(C) Cu<sup>II</sup>(atism)添加群および (D) GIF 化合物添加群の凝集形成曲線における 24 時間時点でのチオフラビン T 蛍光の最大値。各値はコントロール群の蛍光を 1 として標準化した。Cu<sup>II</sup>(atism)添加群, GIF-0854-r 添加群および GIF-0890-r 添加群で有意な凝集抑制効果が認められた ( $p^* < 0.05$ )。

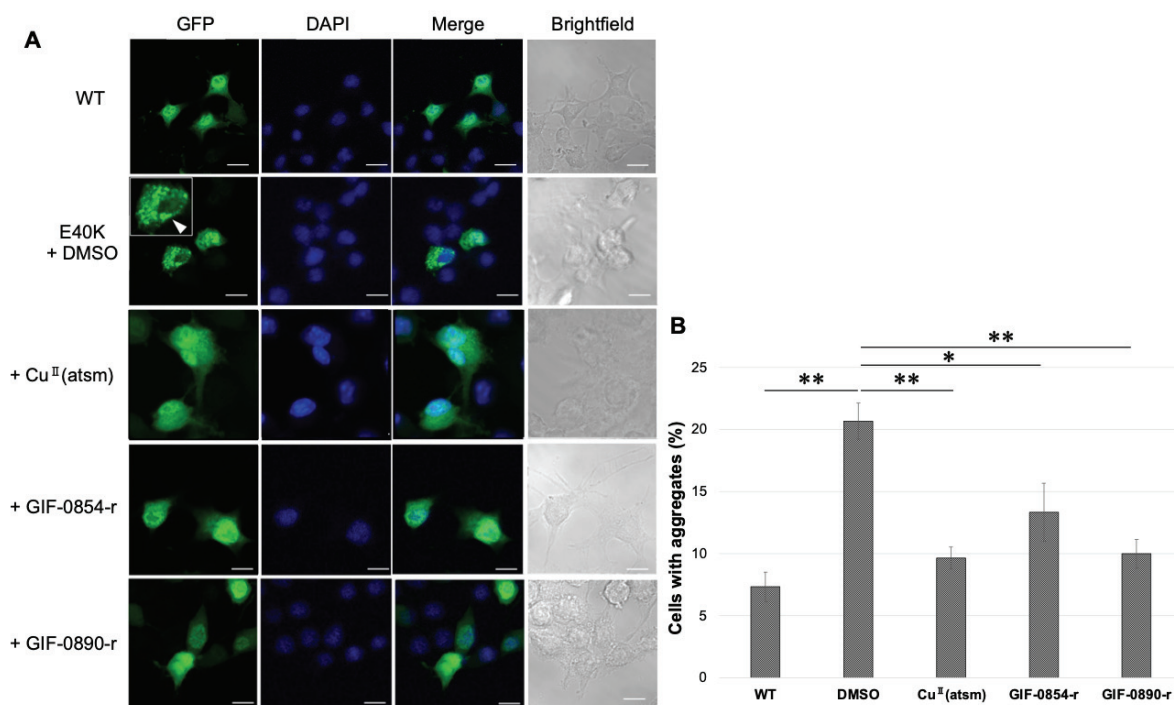


図 3-3. GFP-SOD1 導入細胞における凝集体形成抑制効果の評価

(A) GFP-SOD1 導入細胞の共焦点顕微鏡画像。GFP-WT-SOD1 導入細胞では細胞質内にびまん性に GFP 蛍光が認められた。一方で、GFP-E40K-SOD1 導入細胞では細胞質内に顆粒状の凝集体が認められた (矢頭)。スケールバー = 10  $\mu$ m。(B) SOD1 凝集体含有細胞の割合。Cu<sup>II</sup>(atsm)添加群および GIF-0890-r 添加群 ( $p^{**} < 0.01$ ), GIF-0854-r 添加群 ( $p^* < 0.05$ ) で有意な減少が認められた。

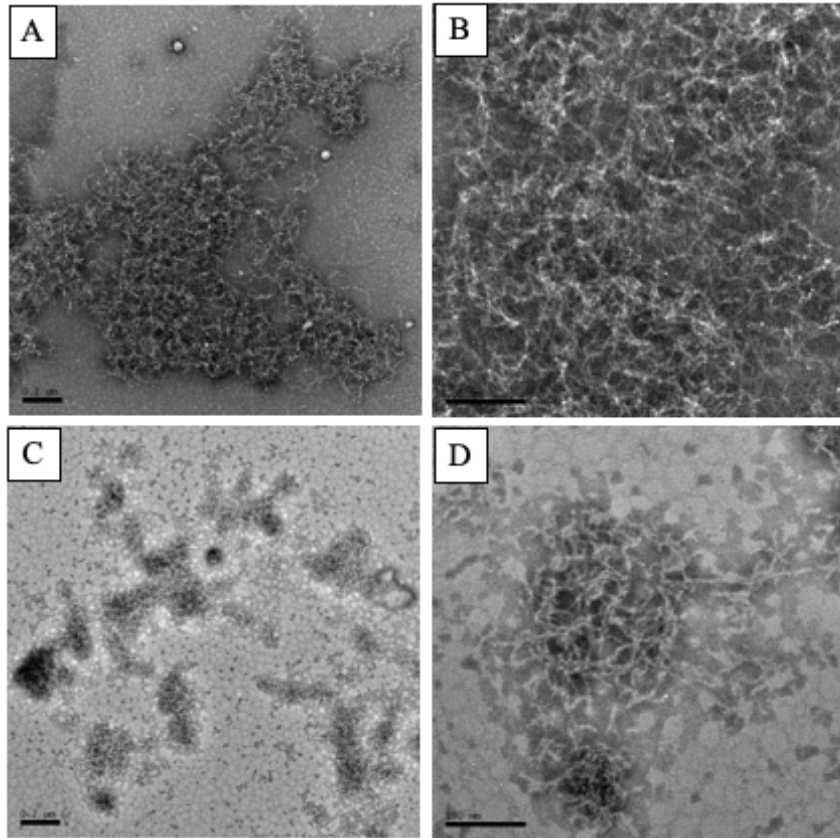


図 3-4. イヌ SOD1 凝集体の電子顕微鏡写真

(A, B) コントロール群 (DMSO 添加群) および (C, D) GIF-0890-r 添加群。

(A) および (C) は 10,000 倍 (スケールバー = 0.2  $\mu\text{m}$ ), (B) および (D) は 25,000 倍 (スケールバー = 100 nm) を示す。細く, 湾曲した凝集体が観察された。



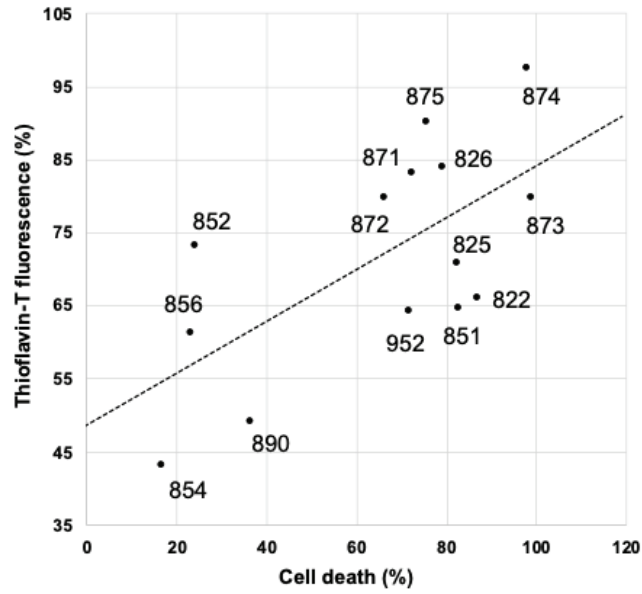


図 3-5. SOD1 タンパク質凝集抑制効果とツニカマイシン誘導細胞死の線形回帰モデル

各チオフラビン T 蛍光および細胞死の割合は、コントロール群 (DMSO 群) を 100 % として標準化した。GIF 化合物は化合物名に含まれる 3 つの数字で示した。2 つの変数は、正の相関を示した ( $p < 0.01$  ;  $R^2 = 0.66$ )。

## 結論

イヌの DM は慢性進行性かつ致死性の神経変性疾患である。高齢期（平均発症年齢; 10.9 歳）で発症し、全身骨格筋の麻痺が進行することで発症後約 3 年で呼吸筋麻痺により死亡する。DM 症例では、脊髄組織中に変異型 SOD1 タンパク質の凝集体が認められることから、この変異型 SOD1 凝集体が病態に深く関与していると考えられている。しかし、現在までに変異型 SOD1 タンパク質の凝集メカニズムなどの DM 病態の詳細は明らかになっておらず、有効な治療法も存在しない。そこで、本博士論文では、DM における変異型 SOD1 タンパク質の凝集メカニズムを解明し、凝集を抑制する治療薬候補を見出すことを目的に研究を行なった。

第 1 章では、組換えタンパク質を用いて SOD1 タンパク質の性状および凝集メカニズムを明らかにすることを目的に研究を行なった。SOD1 タンパク質は活性型 (holo 型) と比較して金属解離型 (apo 型) になると不安定な構造になることを明らかにした。さらに、apo 型 SOD1 タンパク質に変異が加わることで、SOD1 タンパク質が凝集し始めることも示した。それぞれの変異における凝集促進因子として、T18S 変異では分子間 S-S 結合の形成促進が、E40K 変異では分子表面電荷の低下による分子間力の低下が関与している可能性を示した。これらの結果より、変異を有する apo 型 SOD1 タンパク質は凝集経路において凝集前駆体として存在し、DM の病態に深く関与している可能性が示唆された。また、凝集前駆体である apo 型 SOD1 タンパク質は、DM の治療薬開発におけるターゲットになり得ると考えられた。

第 2 章では、DM 罹患イヌの脊髄組織中の SOD1 タンパク質の性状を明らかにすることを目的として研究を行なった。まず、E40K-SOD1 タンパク質を特異的に認識することができる 16G9 抗体が apo<sup>SH</sup>-E40K-SOD1 タンパク質および E40K-

SOD1 凝集体を認識することをサンドイッチ ELISA を用いて明らかにした。次に、DM 症例の脊髄における SOD1 タンパク質のアイソフォームを調べるために、16G9 抗体を用いた免疫沈降を実施し、DM 症例の脊髄において apo<sup>SH</sup>-E40K-SOD1 タンパク質および E40K-SOD1 凝集体が有意に存在することを示した。また、DM 脊髄組織では SOD 活性が著しく低下していることも明らかにし、holo 型が少ないことが示唆された。これらの結果より、DM 脊髄組織中では、構造的に安定な holo 型の割合が少ない一方で、凝集性を有する不安定な apo 型が優位に存在する可能性が示唆された。

第 3 章では、SOD1 タンパク質の凝集を抑制する治療薬候補を見出すことを目的とし、apo-E40K-SOD1 タンパク質をターゲットとした凝集抑制候補化合物をスクリーニングした。組換えタンパク質を用いたチオフラビン T スクリーニングにおいて、Cu<sup>II</sup>(atsm)および 13 種類の GIF 化合物が apo-E40K-SOD1 タンパク質の凝集を抑制することを示した。また、Cu<sup>II</sup>(atsm)、GIF-0854-r および GIF-0890-r は SOD1 タンパク発現培養細胞でも E40K-SOD1 の凝集を顕著に抑制した。これらの化合物は優れた血液脳関門通過性を有することから、生体内でも効果を示すことが予想され、DM の新規治療薬として期待される。

本研究では、DM における変異型 SOD1 タンパク質は、酵素活性を有する holo 型では凝集が起らず、apo 型になることで凝集が始まることを明らかにした。症例脊髄を用いた研究からは、DM 症例の脊髄では holo 型が少なく apo 型が優位に存在する可能性が示唆された。また、apo 型を治療ターゲットとした複数の凝集抑制化合物を見出した。DM における SOD1 タンパク質の凝集メカニズムおよび凝集抑制化合物候補を明らかにした本研究成果は、今後の DM の病態解明および治療研究において重要であり、神経変性疾患に関わる研究のさらなる進展へ広く寄与することが期待される。

## 謝辞

本論文の作成にあたり，終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました岐阜大学応用生物科学部准教授 神志那弘明先生，岐阜大学応用生物科学部教授 前田貞俊先生に深く感謝を申し上げます。

本論文の草稿をご校閲くださいました岩手大学農学部教授 山本欣郎先生，片山泰章先生，東京農工大学農学部教授 田中綾先生，帯広畜産大学畜産学部准教授 松本高太郎先生に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたりご指導を賜りました，岐阜大学高等研究院科学研究基盤センター助教 鎌足雄司先生，連合創薬医療情報研究科教授 加藤善一郎先生，助教 本田諒先生，慶應義塾大学理工学部教授 古川良明先生，岐阜大学工学部化学・生命工学科教授 森田洋子先生，古田享史先生，岐阜大学応用生物科学部助教 小畠結先生，岩手大学農学部助教 中田浩平先生，鹿児島大学共同獣医学部教授 大和修先生に深く感謝いたします。

DM 症例の採血および献体にご協力いただいた飼い主の皆様，臨床獣医師の皆様，そして DM 犬および健常犬に深謝致します。

最後になりましたが，日頃より研究に際して多大なご協力をくださいました岐阜大学獣医臨床放射線学研究室の学生の皆様および技術補佐員の皆様，岐阜大学高等研究院科学研究基盤センター技術補佐員 小林美穂様に心より御礼申し上げます。

## 文献

- 1) Andersen, P. M., & Al-Chalabi, A. (2011). Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol.* 7(11), 603-615.
- 2) Anjana, R., Vaishnavi, M. K., Sherlin, D., Kumar, S. P., Naveen, K., Kanth, P. S., et al. (2012). Aromatic-aromatic interactions in structures of proteins and protein-DNA complexes: a study based on orientation and distance. *Bioinformation.* 8(24), 1220-1224.
- 3) Anzai, I., Tokuda, E., Mukaiyama, A., Akiyama, S., Endo, F., Yamanaka, K., et al. (2017). A misfolded dimer of Cu/Zn-superoxide dismutase leading to pathological oligomerization in amyotrophic lateral sclerosis. *Protein Sci.* 26(3), 484-496.
- 4) Averill, D. R., Jr. (1973). Degenerative myelopathy in the aging German Shepherd dog: clinical and pathologic findings. *J Am Vet Med Assoc.* 162(12), 1045-1051.
- 5) Awano, T., Johnson, G. S., Wade, C. M., Katz, M. L., Johnson, G. C., Taylor, J. F., et al. (2009). Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(8), 2794-2799.
- 6) Azriel, R., & Gazit, E. (2001). Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide. An experimental support for the key role of the phenylalanine residue in amyloid formation. *J Biol Chem.* 276(36), 34156-34161.
- 7) Benatar, M. (2007). Lost in translation: treatment trials in the SOD1 mouse and in human ALS. *Neurobiol Dis.* 26(1), 1-13.
- 8) Bruijn, L. I., Miller, T. M., & Cleveland, D. W. (2004). Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci.* 27, 723-749.
- 9) Calamai, M., Taddei, N., Stefani, M., Ramponi, G., & Chiti, F. (2003). Relative influence

of hydrophobicity and net charge in the aggregation of two homologous proteins.

*Biochemistry*. 42(51), 15078-15083.

10) Chang, H. S., Kamishina, H., Mizukami, K., Momoi, Y., Katayama, M., Rahman, M. M., et al. (2013). Genotyping assays for the canine degenerative myelopathy-associated c.118G>A (p.E40K) mutation of the SOD1 gene using conventional and real-time PCR methods: a high prevalence in the Pembroke Welsh Corgi breed in Japan. *J Vet Med Sci*. 75(6), 795-798.

11) Chang, R. C., Parakh, S., Coates, J. R., Long, S., & Atkin, J. D. (2019). Protein disulphide isomerase is associated with mutant SOD1 in canine degenerative myelopathy. *Neuroreport*. 30(1), 8-13.

12) Chaudhuri, T. K., & Paul, S. (2006). Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *FEBS J*. 273(7), 1331-1349.

13) Chen, Z., & Zhong, C. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*. 30(2), 271-281.

14) Chiti, F., Calamai, M., Taddei, N., Stefani, M., Ramponi, G., & Dobson, C. M. (2002). Studies of the aggregation of mutant proteins in vitro provide insights into the genetics of amyloid diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99 Suppl 4, 16419-16426.

15) Cleveland, D. W., & Rothstein, J. D. (2001). From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci*. 2(11), 806-819.

16) Coates, J. R., March, P. A., Oglesbee, M., Ruaux, C. G., Olby, N. J., Berghaus, R. D., et al. (2007). Clinical characterization of a familial degenerative myelopathy in Pembroke Welsh Corgi dogs. *J Vet Intern Med*. 21(6), 1323-1331.

17) Coates, J. R., & Winiinger, F. A. (2010). Canine degenerative myelopathy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 40(5), 929-950.

18) Cozzolino, M., Ferri, A., Valle, C., & Carri, M. T. (2013). Mitochondria and ALS:

- implications from novel genes and pathways. *Mol Cell Neurosci.* 55, 44-49.
- 19) Crisp, M. J., Beckett, J., Coates, J. R., & Miller, T. M. (2013). Canine degenerative myelopathy: biochemical characterization of superoxide dismutase 1 in the first naturally occurring non-human amyotrophic lateral sclerosis model. *Exp Neurol.* 248, 1-9.
- 20) Crown, A. M., Roberts, B. L., Crosby, K., Brown, H., Ayers, J. I., Hart, P. J., et al. (2019). Experimental Mutations in Superoxide Dismutase 1 Provide Insight into Potential Mechanisms Involved in Aberrant Aggregation in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *G3 (Bethesda)*. 9(3), 719-728.
- 21) Dion, P. A., Daoud, H., & Rouleau, G. A. (2009). Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms. *Nat Rev Genet.* 10(11), 769-782.
- 22) Doyle, K. M., Kennedy, D., Gorman, A. M., Gupta, S., Healy, S. J., & Samali, A. (2011). Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. *J Cell Mol Med.* 15(10), 2025-2039.
- 23) Furukawa, Y., Anzai, I., Akiyama, S., Imai, M., Cruz, F. J., Saio, T., et al. (2016). Conformational Disorder of the Most Immature Cu, Zn-Superoxide Dismutase Leading to Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Biol Chem.* 291(8), 4144-4155.
- 24) Furukawa, Y., & O'Halloran, T. V. (2005). Amyotrophic lateral sclerosis mutations have the greatest destabilizing effect on the apo- and reduced form of SOD1, leading to unfolding and oxidative aggregation. *J Biol Chem.* 280(17), 17266-17274.
- 25) Furuta, K., Kawai, Y., Mizuno, Y., Hattori, Y., Koyama, H., & Hirata, Y. (2017). Synthesis of 3-[4-(dimethylamino)phenyl]alkyl-2-oxindole derivatives and their effects on neuronal cell death. *Bioorg Med Chem Lett.* 27(18), 4457-4461.
- 26) Furuta, K., Mizuno, Y., Maeda, M., Koyama, H., & Hirata, Y. (2017). Synthesis of 3-Arylmethyl-2-oxindole Derivatives and Their Effects on Neuronal Cell Death. *Chem Pharm*

*Bull (Tokyo)*. 65(11), 1093-1097.

27) Gazit, E. (2002). A possible role for pi-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils.

*FASEB J*. 16(1), 77-83.

28) Hayward, C., Brock, D. J., Minns, R. A., & Swingle, R. J. (1998). Homozygosity for Asn86Ser mutation in the CuZn-superoxide dismutase gene produces a severe clinical phenotype in a juvenile onset case of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Med Genet*.

35(2), 174.

29) Hayward, L. J., Rodriguez, J. A., Kim, J. W., Tiwari, A., Goto, J. J., Cabelli, D. E., et al.

(2002). Decreased metallation and activity in subsets of mutant superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*. 277(18), 15923-15931.

30) Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13(2), 89-102.

31) Higurashi, T., Nosaka, K., Mizobata, T., Nagai, J., & Kawata, Y. (1999). Unfolding and refolding of *Escherichia coli* chaperonin GroES is expressed by a three-state model. *J Mol Biol*. 291(3), 703-713.

32) Hirata, Y., Ito, Y., Takashima, M., Yagy, K., Oh-Hashi, K., Suzuki, H., et al. (2020).

Novel Oxindole-Curcumin Hybrid Compound for Antioxidative Stress and Neuroprotection.

*ACS Chem Neurosci*. 11(1), 76-85.

33) Hirata, Y., Yamada, C., Ito, Y., Yamamoto, S., Nagase, H., Oh-Hashi, K., et al. (2018).

Novel oxindole derivatives prevent oxidative stress-induced cell death in mouse hippocampal HT22 cells. *Neuropharmacology*. 135, 242-252.

34) Hock, C., Konietzko, U., Papassotiropoulos, A., Wollmer, A., Streffer, J., von Rotz, R. C.,

et al. (2002). Generation of antibodies specific for beta-amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease. *Nat Med*. 8(11), 1270-1275.



- 35) Kabashi, E., Agar, J. N., Taylor, D. M., Minotti, S., & Durham, H. D. (2004). Focal dysfunction of the proteasome: a pathogenic factor in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 89(6), 1325-1335.
- 36) Kato, S., Nakashima, K., Horiuchi, S., Nagai, R., Cleveland, D. W., Liu, J., et al. (2001). Formation of advanced glycation end-product-modified superoxide dismutase-1 (SOD1) is one of the mechanisms responsible for inclusions common to familial amyotrophic lateral sclerosis patients with SOD1 gene mutation, and transgenic mice expressing human SOD1 gene mutation. *Neuropathology.* 21(1), 67-81.
- 37) Kiernan, M. C., Vucic, S., Cheah, B. C., Turner, M. R., Eisen, A., Hardiman, O., et al. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet.* 377(9769), 942-955.
- 38) Kobatake, Y., Sakai, H., Tsukui, T., Yamato, O., Kohyama, M., Sasaki, J., et al. (2017). Localization of a mutant SOD1 protein in E40K-heterozygous dogs: Implications for non-cell-autonomous pathogenesis of degenerative myelopathy. *J Neurol Sci.* 372, 369-378.
- 39) Lee, S., & Eisenberg, D. (2003). Seeded conversion of recombinant prion protein to a disulfide-bonded oligomer by a reduction-oxidation process. *Nat Struct Biol.* 10(9), 725-730.
- 40) Lindquist, S. L., & Kelly, J. W. (2011). Chemical and biological approaches for adapting proteostasis to ameliorate protein misfolding and aggregation diseases: progress and prognosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(12).
- 41) Lozupone, M., Solfrizzi, V., D'Urso, F., Di Gioia, I., Sardone, R., Dibello, V., et al. (2020). Anti-amyloid-beta protein agents for the treatment of Alzheimer's disease: an update on emerging drugs. *Expert Opin Emerg Drugs.* 25(3), 319-335.
- 42) Mandrioli, L., Gandini, G., Gentilini, F., Chiocchetti, R., Turba, M. E., Avallone, G., et al. (2021). Degenerative Myelopathy in Hovawart Dogs: Molecular Characterization, Pathological Features and Accumulation of Mutant Superoxide Dismutase 1 Protein. *J Comp*

*Pathol.* 182, 37-42.

43) March, P. A., Coates, J. R., Abyad, R. J., Williams, D. A., O'Brien, D. P., Olby, N. J., et al. (2009). Degenerative myelopathy in 18 Pembroke Welsh Corgi dogs. *Vet Pathol.* 46(2), 241-250.

44) Miller, A. D., Barber, R., Porter, B. F., Peters, R. M., Kent, M., Platt, S. R., et al. (2009). Degenerative myelopathy in two Boxer dogs. *Vet Pathol.* 46(4), 684-687.

45) Mohamed, F. E., Al-Gazali, L., Al-Jasmi, F., & Ali, B. R. (2017). Pharmaceutical Chaperones and Proteostasis Regulators in the Therapy of Lysosomal Storage Disorders: Current Perspective and Future Promises. *Front Pharmacol.* 8, 448.

46) Munch, C., & Bertolotti, A. (2010). Exposure of hydrophobic surfaces initiates aggregation of diverse ALS-causing superoxide dismutase-1 mutants. *J Mol Biol.* 399(3), 512-525.

47) Nakamae, S., Kobatake, Y., Suzuki, R., Tsukui, T., Kato, S., Yamato, O., et al. (2015). Accumulation and aggregate formation of mutant superoxide dismutase 1 in canine degenerative myelopathy. *Neuroscience.* 303, 229-240.

48) Nikseresht, S., Hilton, J. B. W., Kysenius, K., Liddell, J. R., & Crouch, P. J. (2020). Copper-ATSM as a Treatment for ALS: Support from Mutant SOD1 Models and Beyond. *Life (Basel).* 10(11).

49) Niwa, J., Yamada, S., Ishigaki, S., Sone, J., Takahashi, M., Katsuno, M., et al. (2007). Disulfide bond mediates aggregation, toxicity, and ubiquitylation of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1. *J Biol Chem.* 282(38), 28087-28095.

50) Ogawa, M., Uchida, K., Park, E. S., Kamishina, H., Sasaki, J., Chang, H. S., et al. (2011). Immunohistochemical observation of canine degenerative myelopathy in two Pembroke Welsh Corgi dogs. *J Vet Med Sci.* 73(10), 1275-1279.

- 51) Oyake, K., Kobatake, Y., Shibata, S., Sakai, H., Saito, M., Yamato, O., et al. (2016). Changes in respiratory function in Pembroke Welsh Corgi dogs with degenerative myelopathy. *J Vet Med Sci.* 78(8), 1323-1327.
- 52) Pfahler, S., Bachmann, N., Fechler, C., Lempp, C., Baumgartner, W., & Distl, O. (2014). Degenerative myelopathy in a SOD1 compound heterozygous Bernese mountain dog. *Anim Genet.* 45(2), 309-310.
- 53) Reaume, A. G., Elliott, J. L., Hoffman, E. K., Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Siwek, D. F., et al. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet.* 13(1), 43-47.
- 54) Richter, M., Vidovic, N., Honrath, B., Mahavadi, P., Dodel, R., Dolga, A. M., et al. (2016). Activation of SK2 channels preserves ER Ca(2)(+) homeostasis and protects against ER stress-induced cell death. *Cell Death Differ.* 23(5), 814-827.
- 55) Robberecht, W., Sapp, P., Viaene, M. K., Rosen, D., McKenna-Yasek, D., Haines, J., et al. (1994). Cu/Zn superoxide dismutase activity in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 62(1), 384-387.
- 56) Roberts, B. R., Lim, N. K., McAllum, E. J., Donnelly, P. S., Hare, D. J., Doble, P. A., et al. (2014). Oral treatment with Cu(II)(atsm) increases mutant SOD1 in vivo but protects motor neurons and improves the phenotype of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci.* 34(23), 8021-8031.
- 57) Rodriguez, J. A., Shaw, B. F., Durazo, A., Sohn, S. H., Doucette, P. A., Nersissian, A. M., et al. (2005). Destabilization of apoprotein is insufficient to explain Cu,Zn-superoxide dismutase-linked ALS pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(30), 10516-10521.
- 58) Rodriguez, J. A., Valentine, J. S., Eggers, D. K., Roe, J. A., Tiwari, A., Brown, R. H., Jr., et al. (2002). Familial amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations decrease the thermal

stability of distinctly metallated species of human copper/zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 277(18), 15932-15937.

59) Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 362(6415), 59-62.

60) Sandelin, E., Nordlund, A., Andersen, P. M., Marklund, S. S., & Oliveberg, M. (2007). Amyotrophic lateral sclerosis-associated copper/zinc superoxide dismutase mutations preferentially reduce the repulsive charge of the proteins. *J Biol Chem.* 282(29), 21230-21236.

61) Shaw, B. F., & Valentine, J. S. (2007). How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein? *Trends Biochem Sci.* 32(2), 78-85.

62) Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Siddique, T., Deng, H. X., Hung, W. Y., et al. (1996). Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55(4), 481-490.

63) Singh, J., Sabareesan, A. T., Mathew, M. K., & Udgaonkar, J. B. (2012). Development of the structural core and of conformational heterogeneity during the conversion of oligomers of the mouse prion protein to worm-like amyloid fibrils. *J Mol Biol.* 423(2), 217-231.

64) Soon, C. P. W., Donnelly, P. S., Turner, B. J., Hung, L. W., Crouch, P. J., Sherratt, N. A., et al. (2011). Diacetylbis(N(4)-methylthiosemicarbazonato) copper(II) (CuII(atm)) protects against peroxynitrite-induced nitrosative damage and prolongs survival in amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J Biol Chem.* 286(51), 44035-44044.

65) Tanaka, N., Kimura, S., Kamatari, Y. O., Nakata, K., Kobatake, Y., Inden, M., et al. (2021). *In vitro* evidence of propagation of superoxide dismutase-1 protein aggregation in

canine degenerative myelopathy. *Vet J.* 274, 1057-10.

66) Tartaglia, G. G., & Vendruscolo, M. (2008). The Zyggregator method for predicting protein aggregation propensities. *Chem Soc Rev.* 37(7), 1395-1401.

67) Thornton, J. M. (1981). Disulphide bridges in globular proteins. *J Mol Biol.* 151(2), 261-287.

68) Toichi, K., Yamanaka, K., & Furukawa, Y. (2013). Disulfide scrambling describes the oligomer formation of superoxide dismutase (SOD1) proteins in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem.* 288(7), 4970-4980.

69) Turner, B. J., & Talbot, K. (2008). Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol.* 85(1), 94-134.

70) Wang, R., Yang, B., & Zhang, D. (2011). Activation of interferon signaling pathways in spinal cord astrocytes from an ALS mouse model. *Glia.* 59(6), 946-958.

71) Watanabe, H., Ono, M., Kimura, H., Matsumura, K., Yoshimura, M., Okamoto, Y., et al. (2012). Synthesis and biological evaluation of novel oxindole derivatives for imaging neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem Lett.* 22(17), 5700-5703.

72) Werner, T. E. R., Bernson, D., Esbjorner, E. K., Rocha, S., & Wittung-Stafshede, P. (2020). Amyloid formation of fish beta-parvalbumin involves primary nucleation triggered by disulfide-bridged protein dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117(45), 27997-28004.

73) Williams, J. R., Trias, E., Beilby, P. R., Lopez, N. I., Labut, E. M., Bradford, C. S., et al. (2016). Copper delivery to the CNS by CuATSM effectively treats motor neuron disease in SOD(G93A) mice co-expressing the Copper-Chaperone-for-SOD. *Neurobiol Dis.* 89, 1-9.

74) Wininger, F. A., Zeng, R., Johnson, G. S., Katz, M. L., Johnson, G. C., Bush, W. W., et al. (2011). Degenerative myelopathy in a Bernese Mountain Dog with a novel SOD1 missense mutation. *J Vet Intern Med.* 25(5), 1166-1170.

- 75) Wong, H. E., Irwin, J. A., & Kwon, I. (2013). Halogenation generates effective modulators of amyloid-Beta aggregation and neurotoxicity. *PLoS One*. 8(2), e57288.
- 76) Xue, C., Lin, T. Y., Chang, D., & Guo, Z. (2017). Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *R Soc Open Sci*. 4(1), 160696.
- 77) Yokota, S., Kobatake, Y., Noda, Y., Nakata, K., Yamato, O., Hara, H., et al. (2018). Activation of the unfolded protein response in canine degenerative myelopathy. *Neurosci Lett*. 687, 216-222.
- 78) Zeng, R., Coates, J. R., Johnson, G. C., Hansen, L., Awano, T., Kolicheski, A., et al. (2014). Breed distribution of SOD1 alleles previously associated with canine degenerative myelopathy. *J Vet Intern Med*. 28(2), 515-521.
- 79) Zhang, Q., & Kelly, J. W. (2003). Cys10 mixed disulfides make transthyretin more amyloidogenic under mildly acidic conditions. *Biochemistry*. 42(29), 8756-8761.