

氏名(本(国)籍)	木村 慎太郎(奈良県)		
主指導教員氏名	岐阜大学 准教授 神志那 弘 明		
学位の種類	博士(獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第603号		
学位授与年月日	令和4年3月14日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学位論文題目	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		
審査委員	主査	岩手大学 教授	片山 泰章
	副査	帯広畜産大学 准教授	松本 高太郎
	副査	岩手大学 教授	山本 欣郎
	副査	東京農工大学 教授	田中 綾
	副査	岐阜大学 准教授	神志那 弘明

学位論文の内容の要旨

イヌのスーパーオキシドジスムターゼ1(SOD1)関連変性性脊髄症(DM)は高齢で発症する慢性進行性の致死性神経変性疾患である。特徴的な全身骨格筋の進行性麻痺を呈し、発症から約3年で呼吸筋麻痺により死亡する。日本国内ではペンブロック・ウェルシュ・コーギー(PWC)での発症が多く、SOD1遺伝子を変異型ホモ接合体で有することから、変異型SOD1タンパク質がDMの病態に深く関与すると考えられている。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、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、未だ病態の解明には至っていない。本研究では、変異型SOD1タンパク質の凝集メカニズムを解明し、変異型SOD1タンパク質の凝集を抑制する化合物を開発することを目的に研究を行なった。

第1章では、組換えSOD1タンパク質を作製し、その性状解析を行うことで凝集メカニズムを解明した。タンパク解析ソフトウェアを用いたタンパク質の立体構造モデリングおよび表面電荷の計算を行なった。次に、現在までに報告されている野生型(WT型)および2種類の変異型SOD1タンパク質(T18S型およびE40K型)の活性型(holo型)および金属解離型(apo型)の組換えタンパク質を作製した。円偏光二色性スペクトルを用いて二次構造を測定し、昇温条件下で二次構造の安定性を評価した。各タンパク質にチオフラビンT色素(ThT)を添加し、凝集体形成を継時的に観察した。その後、凝集体の形態を電子顕微鏡を用いて観察した。タンパク質の立体構造モデルより、T18S変異によってダイマー間の疎水性結合が破綻し、内部のシステイン残基が露出することが示唆された。これによって、分子間で新たなジスルフィド結合を有するオリゴマー(SSオリゴマー)が形成される可能性が考えられた。また、E40K-SOD1では表面電荷が顕著に低下していた(Δ charge = 2.0)。SOD1タンパク質の二次構造レベルでの安定性はWT型および変異型で変化は認められな

った。しかし、WT 型、変異型ともに holo 型は安定した構造であるのに対して、apo 型では著しく不安定な構造になった。ThT を用いた実験では、apo 型 SOD1 タンパク質に変異が加わることで、凝集が始まることが明らかになった。また、電子顕微鏡による観察ではアミロイド繊維様の凝集体 (worm-like fibrils) が認められた。これらの結果より、凝集促進因子として、T18S 変異では SS オリゴマーの形成が、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明らかにした。また、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 病態に深く関与していることを明らかにし、治療薬開発におけるターゲットになり得ることを示した。

第 2 章では、イヌの脊髄組織中の SOD1 タンパク質の性状を明らかにした。holo 型、分子内ジスルフィド結合 (SS 結合) を保持した apo 型 (apoSS 型) および分子内 SS 結合を切断した apo 型 (apoSH 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 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、E40K-SOD1 タンパク質の立体構造を特異的に認識する 16G9 抗体を検出抗体、各種組換え SOD1 タンパク質を抗原としたサンドイッチ ELISA を行い、16G9 抗体の抗原認識アイソフォームを同定した。その後、16G9 抗体を用いた免疫沈降およびウエスタンブロットにより DM 脊髄組織中の 16G9 抗体認識抗原を評価した。最後に、DM 脊髄中の SOD 活性を評価した。DSF による評価では、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 型ともに、apoSS 型になることで顕著に不安定な構造となった (熱変性中点 (T_m) : apoSS-WT-SOD1 51.5 ± 0.14 °C, apoSS-E40K-SOD1 48.4 ± 0.26 °C)。また、apoSH 型になることで T_m は 40 °C 以下まで低下し (apoSS-WT-SOD1 38.2 ± 0.55 °C, apoSH-E40K-SOD1 31.4 ± 0.38 °C)、E40K 型では犬の生理的体温付近では天然構造を保持できないことが明らかになった。DM 脊髄を用いた 16G9 抗体による解析では、DM 脊髄組織中に apoSH-E40K-SOD1 および E40K-SOD1 凝集体が優位に存在することを明らかにした。さらに、DM 脊髄中では SOD 活性が低下していることを明らかにした。これらの結果より、DM 脊髄中では、構造的に安定で活性を有する holo 型の割合が少なく、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された。

第 3 章では、治療薬候補のスクリーニングを行い、銅含有低分子化合物である Cu II (at-sm) およびオキシインドール誘導体である 2 種類の化合物 (GIF-0854-r および GIF-0890-r) が変異型 SOD1 タンパク質凝集抑制効果を有することを明らかにした。これらの化合物は ThT スクリーニングにおいて apo-E40K-SOD1 タンパク質の ThT 蛍光の上昇を顕著に抑制した。また、SOD1 タンパク質発現培養細胞でも顕著に凝集体の形成を抑制した。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。

本研究は DM の病態に深く関与する変異型 SOD1 タンパク質の凝集メカニズムを明らかにし、凝集抑制化合物を見出した。今後 DM の病態の解明および治療薬を開発する上で本研究成果は重要であり、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。

審査結果の要旨

本研究では、イヌの変性性脊髄症 (DM) の病因タンパク質である変異型スーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) タンパク質の凝集メカニズムを解明し、変異型 SOD1 タンパク質の凝集を抑制する化合物を開発することを目的に研究を行なった。

第 1 章では、組換え SOD1 タンパク質を用いて SOD1 タンパク質の性状解析および凝集メ

カニズムを解明した。各種生化学的解析により、凝集促進因子として T18S 変異 SOD1 タンパク質では SS オリゴマーの形成が、E40K 変異 SOD1 タンパク質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が示された。また、変異を有する金属解離型 (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 病態に深く関与していることを明らかにし、治療薬開発におけるターゲットになり得ることを示した。

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した。DM 脊髄中では SOD 活性が顕著に低下しており、apo 型および凝集体型の SOD1 タンパク質が優位に存在していることを明らかにした。また、DM 脊髄組織中に存在する apo 型 SOD1 タンパク質はイヌの生理体温付近では正常構造を保持できないほど不安定な構造を有することを明らかにした。

第 3 章では、変異型 SOD1 タンパク質の凝集を抑制する化合物を明らかにした。候補化合物のうち、銅含有低分子化合物である Cu^{II} (at-sm) およびオキシインドール誘導体である GIF 化合物 (GIF-0854-r および GIF-0890-r) は apo 型 E40K-SOD1 組換えタンパク質の凝集を顕著に抑制した。また、これらの化合物は SOD1 タンパク質発現培養細胞でも凝集抑制効果を示した。同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。

本研究は DM の病態に深く関与する変異型 SOD1 タンパク質の凝集メカニズムを明らかにし、凝集抑制化合物を見出した。今後 DM の病態の解明および治療薬を開発する上で本研究成果は重要であると判断される。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Canine SOD1 harboring E40K or T18S mutations promotes protein aggregation without reducing the global structural stability
著 者 名 : Kimura, S., Kamatari, Y.O., Kuwahara, Y., Hara, H., Yamato, O., Maeda, S., Kamishina, H. and Honda, R.
学術雑誌名 : PeerJ
巻・号・頁・発行年 : 5 : e9512, 2020

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Infiltrative lipoma causing vertebral deformation and spinal cord compression in a dog
著 者 名 : Kimura, S., Yamazaki, M., Tomohisa, M., Mori, T., Yanai, T., Maeda, S. and Kamishina, H.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 80 (12) : 1901-1904, 2018
- 2) 題 目 : Encapsulated gas accumulation in the spinal canal: Pneumorrhachis in two dogs
著 者 名 : Kimura, S., Nakata, K., Sube, A., Kuniya, T., Watanabe, N., Yonemaru, K., Maeda, S. and Kamishina, H.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

卷・号・頁・発行年：82 (9) : 1354-1357, 2020

- 3) 題 目 : Changes of dorsal root ganglion volume in dogs with clinical signs of degenerative myelopathy detected by water-excitation magnetic resonance imaging
著 者 名 : Naito, E., Nakata, K., Nakano, Y., Nozue, Y., Kimura, S., Sakai, H., Yamato, O., Md, S.I., Maeda, S. and Kamishina, H
学術雑誌名 : Animals
卷・号・頁・発行年 : 11 (6) : 1702-1714, 2021
- 4) 題 目 : In vitro evidence of propagation of superoxide dismutase-1 protein aggregation in canine degenerative myelopathy
著 者 名 : Tanaka, N., Kimura, S., Kamatari, Y.O., Nakata, K., Kobatake, Y., Inden, M., Yamato, O., Urushitani, M., Maeda, S. and Kamishina, H
学術雑誌名 : The Veterinary Journal
卷・号・頁・発行年 : 274 : 1-9, 2021
- 5) 題 目 : Artepillin C, a major component of Brazilian green propolis, Inhibits endoplasmic reticulum stress and protein aggregation
著 者 名 : Hirata, Y., Motoyama, M., Kimura, S., Takashima, M., Ikawa, T., Oh-hashi, K. and Kamatari, Y.O.
学術雑誌名 : European Journal of Pharmacology
卷・号・頁・発行年 : 912 : 1-7, 2021
- 6) 題 目 : Microendoscopic mini-hemilaminectomy and discectomy in acute thoracolumbar disc extrusion dogs: A pilot study
著 者 名 : Kamishina, H., Nakano, Y., Nozue, Y., Nakata, K., Kimura, S., Drury, AG. and Maeda, S.
学術雑誌名 : Veterinary Sciences
卷・号・頁・発行年 : 18 (8) : 241-251, 2021
- 7) 題 目 : Case report: Spinal stabilization surgery using a novel custom-made titanium fixation system for the spinal instability caused by vertebral malformation in a dog
著 者 名 : Kimura, S., Nakata, K., Nakano, Y., Nozue, Y., Konno, N., Sugawara, T., Maeda, S. and Kamishina, H.
学術雑誌名 : Frontiers in Veterinary Science
卷・号・頁・発行年 : 8 : 1354-1358, 2021