

細胞傷害性獲得における伸長ポリグルタミン鎖の 重合体形成の重要性

堅 田 慎 一

新潟大学医歯学総合研究科分子細胞医学専攻（神経内科学）

（主任：西澤正豊教授）

The Pivotal Role of Oligomerization in Expanded Polyglutamine for its Cytotoxicity

Shinichi KATADA

Department of Neurology,

Graduate School of Medicine Niigata University

(Director: Prof. Msatoyo NISHIZAWA)

要 旨

ポリグルタミン病は、原因遺伝子産物内に異常伸張したポリグルタミン鎖を持つ遺伝性神経変性疾患である。伸長ポリグルタミン鎖そのものが細胞傷害性を持つと推定される。伸長ポリグルタミン鎖は、 β シート構造への構造変化を経て、重合して多量体となり、不溶性の封入体を形成する。近年、伸長ポリグルタミン鎖は、封入体形成前の構造で、細胞傷害性を持つことが明らかになった。多量体構造に関してはシート様、もしくはチューブ様構造モデルが提唱されていた。筆者は、この多量体構造を明らかにし、多量体形成が細胞傷害性獲得に重要か否かを検討した。両端にドナーもしくはアクセプターの蛍光蛋白を付加した伸長ポリグルタミン鎖を用い、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）法にて多量体構造を検討した。伸長ポリグルタミン鎖による多量体は、シート様構造を取った場合に予想される FRET を起こさなかった。また、両端にドナー及びアクセプターの蛍光蛋白を付加した伸長ポリグルタミン鎖は、一分子で FRET を起こし、両端が近接した構造と推察された。このことから、伸長ポリグルタミン鎖の多量体は、シリンダー構造が重合したチューブ構造と推察した。シリンダー構造であるが、多量体に重合しない伸長ポリグルタミン鎖を用い、ポリグルタミン単量体の細胞傷害性について、分化誘導した SH-SY5Y 細胞にて検討した。単量体のポリグルタミン鎖を発現する細胞では、ポリグルタミン鎖非発現細胞に比し、有意な細胞傷害性は認めなかった。ポリグルタミン鎖の細胞傷害性獲得には重合体形成が重要である。

キーワード：ポリグルタミン病、伸長ポリグルタミン鎖、単量体、多量体、FRET、シリンダー構造、チューブ構造

Reprint requests to: Shinichi KATADA
Department of Neurology
Brain Reserch Institute Niigata University
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8585 Japan

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学脳研究所神経内科学教室 堅田 慎一

はじめに

ポリグルタミン病は、原因となる蛋白内のポリグルタミン鎖の異常伸長を原因とする遺伝性神経疾患である。現在までに脊髄小脳失調症1型、2型、3型(マシヤド・ジョセフ病)、6型、7型、17型、球脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)の9つの疾患が知られている。これらの疾患は、各々の原因蛋白内のポリグルタミン鎖が約40リピート以上に伸長している。さらに、伸長ポリグルタミン鎖の長さは、疾患の発症年齢や重篤度と密接に関係する^{1)~9)}。これらの事実から、伸長ポリグルタミン鎖そのものが細胞傷害性を持つと推察される。伸長ポリグルタミン鎖は、 β シート構造への構造変化を経て、二量体、多量体へと重合し、不溶性の封入体を形成すると考えられている。伸長ポリグルタミン鎖は、この過程のいずれかの構造で、細胞傷害性を獲得すると考えられる。この伸長ポリグルタミン鎖の細胞傷害性を獲得する構造を解明することは、本症の治療法開発において重要である。

ポリグルタミン病の患者やモデルマウスの神経細胞では、伸長ポリグルタミン鎖を含む封入体が認められる^{7)~9)}。また培養細胞を用いた系でも、伸長ポリグルタミン鎖は、長さ依存性に封入体を形成し、封入体形成率は、細胞死と正の相関を示す⁴⁾⁵⁾。これらの事実から、封入体が細胞傷害性をもつと推定されてきた^{7)~9)}。しかし、モデルマウスを用いた研究により、神経症状の発症が、封入体形成に先行することが示された¹⁰⁾。またArrasateらは、初代培養神経細胞を用い、封入体を形成した細胞の生存率が、封入体を形成しない細胞より高いことを明確に示した¹¹⁾。これらの事実から、近年、封入体は細胞死に対し防御的であり、伸長ポリグルタミン鎖は、封入体形成前の状態で細胞傷害性を持つと考えられるようになった。

Nagaiらは、 β シート構造に構造変化を起こした伸長ポリグルタミン鎖が細胞傷害性を持つことを示し、 β シート構造への構造変化が細胞傷害性獲得に重要であることを示した¹²⁾。さらに、当研

究室のTakahashiらは蛍光共鳴エネルギー移動(FRET) microscopyを用い、伸長ポリグルタミン鎖の、可溶性の多量体と非可溶性の封入体を、生細胞で区別することを可能とし、多量体が、封入体に比し細胞傷害性が高いことを示した¹³⁾。これらの結果から、封入体形成前の状態の伸長ポリグルタミン鎖の細胞傷害性が明らかになった。しかし、その細胞傷害機序については依然不明である。 β シート構造を持った単量体が細胞傷害性を持つと提唱するグループは、他の蛋白質との蛋白質結合により細胞傷害性を獲得する機序を唱えている¹²⁾。一方、多量体が重要と考えるグループでは、これらがチューブ構造を形成し、細胞膜障害をもたらすという機序を提唱している¹⁴⁾¹⁵⁾。細胞傷害性を持つ構造を明らかにすることは、本症の病態機序と、治療介入の方策を考える上で重要である。

一般に、 β シート構造をとった伸長ポリグルタミン鎖の単量体と多量体の間には、平衡関係が存在し、お互いの構造を行き来すると考えられている¹³⁾¹⁶⁾。そのため、 β シート構造をとった単量体と多量体を区別し、その細胞傷害性を検討することは困難であった。この目的のためには、構造変化を起こしながら、かつ、多量体を形成しない伸長ポリグルタミン鎖を作成する必要がある。当研究室のTakahashiらは、FRET microscopyを用いた研究により、伸長ポリグルタミン鎖の重合体形成は、各々の単量体が平衡に重合する“シート構造”、もしくはシリンダー構造をとった各々の単量体がhead to tailで重合する“チューブ構造”のいずれかであることを示してきた¹³⁾。本研究では、伸長ポリグルタミン鎖の体形成が、このいずれであるかを明らかとし、さらに、構造変化しながら重合しない伸長ポリグルタミン鎖を用い、細胞傷害性における重合体形成の重要性につき検討した。

方 法

ベクター作成

DRPLA患者、および健常者の末梢血白血球よ

り抽出したゲノム DNA を用い、DRPLA 遺伝子の CAG 繰り返し配列 (ポリグルタミン鎖) 領域を polymerase chain reaction (PCR) 法にて増幅後、得られた DNA 断片を XhoI/EcoRI で切断し、pEGFP-N1 (Clontech) の XhoI/EcoRI 部位に挿入した。増幅に用いたプライマー配列は以下の通りである：5'-TGATCTCGAGCGCCACCATGCCCTCACCATGTGCTGAAGC, 5'-TGATGAATTCTGCGGACATTGGCAGCCGCGGGCGG)。Roger Y. Tsien より供与された monomeric yellow fluorescent protein (mYFP), monomeric cyan fluorescent protein (mCFP) の発現ベクターを鋳型とし、同領域を PCR 法にて増幅後、得られた DNA 断片を BamHI/NotI で切断、前述のベクターの BamHI/NotI 切断部位に挿入し、GFP と入れ替え trDQn-mCFP および trDQn-mYFP (Qn は異なる長さのポリグルタミン鎖長を表す、36, 60, 90 のポリグルタミン鎖を用いた) を作成した。増幅に用いたプライマーは 5'-AAAGGATC CAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT, 5'-AAAGCGGCCGCTTACTTACTTGTACAGCTCGTCCAT である。両端に蛍光蛋白を融合する mCFP/mYFP-trDQ-mCFP/mYFP は次のように作成した。mCFP および mYFP の発現ベクターを鋳型に 5'-TGATCTCGAGCGCCACCATGGTGATCAAGG, 5'-ATCGCTCGAGCCGAGCTCGGTACCAGCCTT のプライマーを用い mCFP もしくは mYFP 領域を PCR 法にて増幅。得られた DNA 断片を XhoI で切断し、trDQn-mCFP または trDQn-mYFP の XhoI 切断部位に挿入した。

FRET Microscopy

両端もしくは片端を蛍光蛋白で標識したポリグルタミン鎖発現ベクターを、lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて COS7 細胞に導入し、ガラスボトムディッシュ (Matsunami Glass Industries) にて培養した。48 時間後に液体培地を serum-free Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) without phenol red (GIBCO) に交換し、FRET microscopy 解析を行った。一過性発現細胞の観察には、倒立顕微鏡 (TE-300NT; Nikon) と共焦点

顕微鏡 (CSU-10; Yokogawa Electric Corp.) に 4 倍および 40 倍の対物レンズ (NA 0.80; Olympus) を用いた。ドナー (mCFP) の蛍光値取得には 405 nm excitation (iFLEX-2000; Point Source) と 450-510 nm emission filter を用い、アクセプター (mYFP) の蛍光値取得には 405 nm excitation と 510-570 nm emission filter を用いた。それぞれの emission spectrum は、デジタルカメラ (ORCA-ER, Hamamatsu Photonics) を用いて取得し、AQUACOSMOS ソフトウェア (Hamamatsu Photonics) を用いて解析した。FRET ratio 値は 510-570 nm emission filter で取得した蛍光画像と 450-510 nm emission filter で取得した蛍光画像をスーパーインポーズし、FRET ratio 値を [FRET ratio 値 = fluorescence (Emission 510-570 nm)/fluorescence (Emission 450-570 nm)] の計算式で算出した。この FRET ratio 値は細胞画像上でカラーイメージとして表した (FRET ratio image)。FRET 陽性細胞の定義は、各々が単量体を保つ蛍光蛋白である mCFP および mYFP を共発現させた COS7 細胞における FRET ratio 値の上限である 0.9 を上回る値を示す細胞とした。

安定発現細胞株の作成および細胞培養

作成した trDQ56-mYFP または mCFP-trDQ56-mYFP をヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に nucleofector (amaxa) を用いて導入。G-418 (CALBIOCHEM) 500 μ g/ml 存在下にて培養し、安定発現細胞株を得た。細胞培養は DMEM (GIBCO) に 10 % Fetal Bovine Serum (FBS), G-418 500 μ g/ml を添加した培養液を用いて 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ の環境下で継代、維持した。

ウェスタンブロット解析

作成した trDQ56-mYFP または mCFP-trDQ56-mYFP を安定発現する SH-SY5Y 細胞を lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5 % NP40, 0.5 % sodium deoxycholate, 5 mM EDTA) にて 5 分間氷上で処理した後、14000rpm, 10 分間, 4 $^{\circ}$ C の遠心を行い蛋白抽出した。抽出蛋白は BCAssay (Thermo) でタン

パク定量を行い、総タンパク量を合わせた後、同容量の sample buffer (95% Laemmli's sample buffer (BIO-RAD), 5% 2-Mercaptoethanol (SIGMA)) を加え、95℃で5分間処理した後、電気泳動を行った。泳動後、PVDF膜に転写し、5% スキムミルクでブロッキングした。ブロッキング後、1次抗体 monoclonal anti-GFP antibody (1:10000; Clontech), polyclonal anti-actin antibody (1:2000; Santa Cruz), 2次抗体 Goat polyclonal anti-mouse HRP conjugated antibody (1:50000; Dako), Mouse polyclonal anti-goat HRP conjugated antibody (1:5000; Chemicon Temecula) で抗原抗体反応を行い、enhanced chemiluminescence (Millipore Corporation) で検出した。

細胞生存期間解析

作成した trDQ56-mYFP 安定発現細胞株、mCFP-trDQ56-mYFP 安定発現細胞株と無処置の SH-SY5Y 細胞を 10 μ M Retinoic acid (Sigma) と 10% FBS を添加した DMEM にて 5日間 37℃、5% CO₂ 環境下で培養し、その後 EDTA 処理にて細胞を浮遊後、4×4 nm グリッド付きガラスボトムディッシュ (Matsunami Glass Industries) に継代した。50 ng/ml の brain derived neurotrophic factor (BDNF) (Sigma) を添加した DMEM にて 37℃、5% CO₂ 環境下で培養。同一グリッド内の細胞数を連日計測した。計測した生存細胞数は Kaplan-Meier 法を用いて解析し、有意差検定は log-rank 検定にて行った。統計解析には SPSS ver12.0.1J (SPSS Inc) を用いた。

結 果

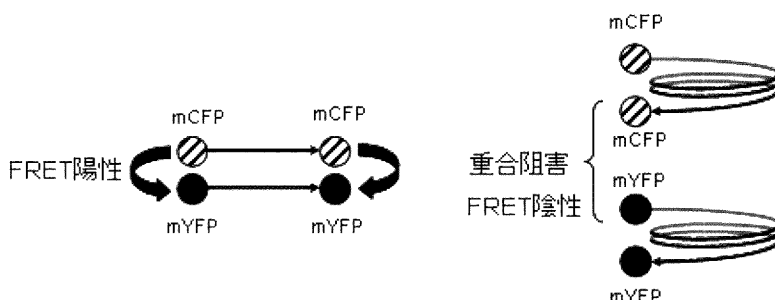
伸長ポリグルタミン鎖の重合体形成の解析

前述のように、伸長ポリグルタミン鎖は、各々が平行に重合する“シート構造”、もしくはシリンダー構造をとった各々が head to tail で重合する“チューブ構造”を形成する¹⁴⁾¹⁵⁾。さらに、チューブ構造をとると仮定した場合、蛍光蛋白を持つ末端同士は重合しない¹³⁾(図 1A)。筆者は、まず、伸長ポリグルタミン鎖の重合体形成が“シー

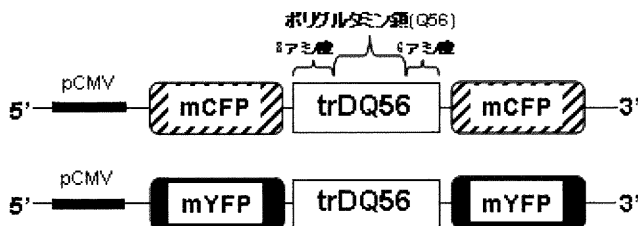
ト構造”もしくは“チューブ構造”のいずれであるかを明らかにすることを目的とした。当研究室の Takahashi らは、同側にドナーもしくはアクセプターを付加した伸長ポリグルタミンの場合にのみ FRET を認めた¹³⁾。先行研究では、一端のみに付加されていたため、筆者は、両端に、ドナーもしくはアクセプターを付加した融合蛋白を共発現させ、FRET 解析を行った。もし、シート構造であれば、この融合蛋白では、両端で FRET 現象が励起されるため、より強い FRET 値を示す。一方、チューブ構造であれば、これらの融合蛋白は、末端の蛍光蛋白により重合体形成が阻害され、FRET 現象は生じないと考えた(図 1A)。

まず、56 リピートのポリグルタミン鎖を持つ部分 DRPLA 蛋白 (trDQ56) の両端に mCFP を付加した融合蛋白と (mCFP-trDQ56-mCFP) と mYFP を付加した融合蛋白の (mYFP-trDQ56-mYFP) の発現ベクターを作成し(図 1B)、COS7 細胞に共発現させ、FRET microscopy による観察を行った(図 2)。mCFP-trDQ56-mCFP と mYFP-trDQ56-mYFP を共発現させた細胞の FRET 値は、単量体蛋白である mCFP と mYFP を共発現させた細胞の FRET 値と有意差を認めなかった(図 2A, B, trD56-mCFP + trD56-mYFP; 最小値 0.60 最大値 2.75 平均値 0.77, mCFP + mYFP; 最小値 0.60 最大値 0.89 平均値 0.73, mCFP-trDQ56-mCFP + mYFP-trDQ56-mYFP; 最小値 0.61 最大値 1.00 平均値 0.78 ; 有意差なし, Turkey HSD 検定)。さらに重合体形成が起こっていないことを確認する目的で、mYFP-trDQ56-mYFP 発現細胞での封入体形成率を COS7 細胞、HEK293T 細胞を用いた一過性発現系で検討した。mYFP-trDQ56-mYFP では、いずれの細胞でも、封入体はほとんど観察されず(図 2C 上段)、片側を蛍光蛋白標識した trDQ56-mYFP (図 1C) に比し、封入体形成率は有意に低値を示した(図 2C 下段, trDQ56-mYFP; COS7 9.3% ± 0.005, HEK293T 20.1% ± 0.013, mYFP-trDQ56-mYFP; COS7 2.3% ± 0.003, HEK293T 2.1% ± 0.011 (n = 3, 各 600 細胞測定の平均 ± 標準誤差; p < 0.005, Turkey HSD 検定))。

(A) シート構造を呈する場合 チューブ構造(head to tail)を呈する場合



(B) mCFP/mYFP-trDQ56-mCFP/mYFP



(C) trDQ56-mCFP/mYFP

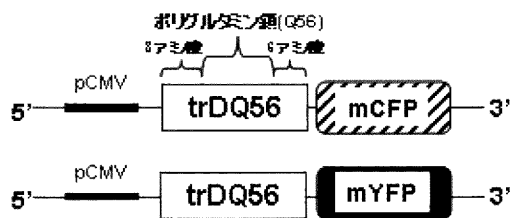


図1 蛍光蛋白標識したポリグルタミン鎖の作成

- A：両端に monomeric cyan fluorescent protein (mCFP：斜め線丸) を融合したポリグルタミン鎖と両端に monomeric yellow fluorescent protein (mYFP：黒丸) を融合したポリグルタミン鎖が重合する場合の概念図を示した。シート構造により重合する場合およびチューブ構造により重合する場合は、二量体形成をきたした際に両端で FRET が生じるため、強い FRET 値を示す。一方、チューブ構造により重合する場合には、融合した蛍光蛋白が、二量体形成を阻害するため、FRET は生じない。矢印頭は C 末を示す。
- B：56 リピートのポリグルタミン鎖の部分 DRPLA 蛋白 (trDQ56：白ボックス) の C 末に (mCFP：斜線ボックス) (trDQ56-mCFP) もしくは (mYFP：黒ボックス) (trDQ56-mYFP) を付加した発現ベクター。pCMV：サイトメガロウイルスプロモーター (黒太線)
- C：56 リピートのポリグルタミン鎖の部分 DRPLA 蛋白 (trDQ56：白ボックス) の N 末および C 末に mCFP (斜線ボックス) (mCFP-trDQ56-mCFP) もしくは mYFP (黒ボックス) (mYFP-trDQ56-mYFP) を付加した発現ベクター。pCMV：サイトメガロウイルスプロモーター (黒太線)

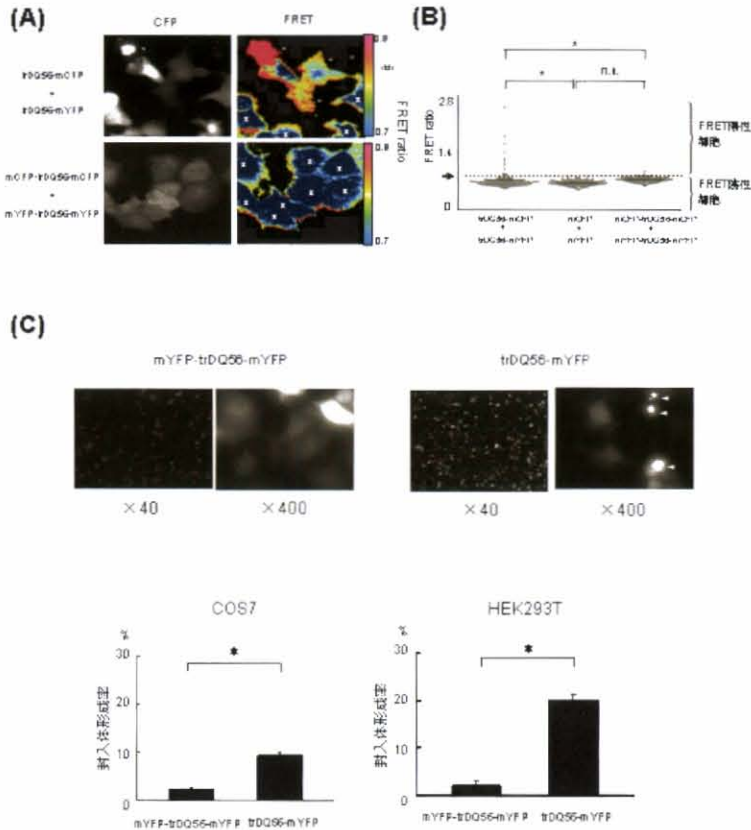


図2 伸長ポリグルタミン鎖による多量体構造の検出

A: COS7細胞に trDQ56-mCFP および trDQ56-mYFP (上段) もしくは mCFP-trDQ56-mCFP および mYFP-trDQ56-mYFP (下段) を一過性に共発現し 48 時間後に観察した CFP 蛍光画像 (左) と FRET ratio image (右) を示す。FRET ratio image のカラーバーは、FRET ratio 値とカラーの対応を示す。高い FRET ratio 値を赤色で、低い FRET ratio 値を青色に変換して表示した。図中の“←”は FRET 陽性細胞、“*”は FRET 陰性細胞、矢印頭は封入体を示す。

B: COS7 細胞に trDQ56-mCFP および trDQ56-mYFP (左)、mCFP および mYFP (中央)、mCFP-trDQ56-mCFP および mYFP-trDQ56-mYFP (右) を共発現し、48 時間後に FRET microscopy 観察を行った。各細胞 (n = 400) の平均 FRET ratio 値を計測し、ランダムに選択した 80 個のデータを散布図にして示した。陰性対照 (mCFP + mYFP) の上限値より定義した陰性上限の FRET ratio 値 0.9 を“←”と点線で示す。

両端に蛍光蛋白標識したポリグルタミン鎖 (mCFP-trDQ56-mCFP) は FRET 陰性の範囲にプロットされ、FRET ratio 値の統計学的解析でも陰性対照 (mCFP + mYFP) と有意差を認めなかった (n.s.: 有意差なし, Turkey HSD 検定)。

C: 上段は、HEK293T 細胞に mYFP-trDQ56-mYFP (右) もしくは trDQ56-mYFP (左) を導入後、72 時間後の蛍光顕微鏡 CFP 蛍光顕微鏡画像 (左: 弱拡大像, 右: 強拡大像) を示す。mYFP-trDQ56-mYFP ではほとんど封入体 (矢印頭) を認めない。

下段は COS7 細胞 (左) もしくは HEK293T 細胞 (右) に trDQ56-mYFP もしくは mYFP-trDQ56-mYFP を導入し、72 時間後に 600 個の細胞の観察を行った。その封入体形成率を示す。mYFP-trDQ56-mYFP は、有意に封入体形成率が低値を示した (*: p < 0.005, Student-T 検定)。グラフは 3 回の実験の平均値 ± 標準誤差を示す。

構造変化を起こす単量体伸長ポリグルタミン鎖の作成

先の結果より、伸長ポリグルタミン鎖は、シリンダー構造を取った各々が、重合し、チューブ構造を取ると推察した。しかし、両端に蛍光蛋白を付加した伸長ポリグルタミン鎖が、安定性を増し、構造変化を起こさないため重合体形成がしなかった可能性がある。その可能性を除外するため、両端にドナーとアクセプターを付加した伸長ポリグルタミン鎖にて FRET 解析を行った。一般に FRET 減少は、ドナーとアクセプター間の距離が 10 nm 以下で起こる現象であり、両端の蛍光蛋白間に約 50 アミノ酸が直線状に存在すると、FRET は起こらない¹⁷⁾。一方、ポリグルタミン鎖によるシリンダー構造モデルでは、両端が 4 nm 以下と近接し、FRET 現象を起こしうる¹⁴⁾。この原理を用い、融合蛋白が重合体形成に至るシリンダー構造を取り得るか検討した。

N 末端に mCFP、C 末端に mYFP を付加した 36, 60, 90 のポリグルタミン鎖を含む部分 DRPLA 蛋白の融合蛋白の発現ベクターを作成し (図 3A)、COS7 細胞に一過性発現し、FRET microscopy による観察を行った (図 3B)。いずれの融合蛋白でも陰性対照である mCFP + mYFP に比して有意に高い FRET 値を認めた (図 3B, 3C 右図, mCFP + mYFP 0.81 ± 0.058 , mCFP-Q36-mYFP 1.00 ± 0.082 , mCFP-Q60-mYFP 0.96 ± 0.073 , mCFP-Q90-mYFP 0.95 ± 0.070 , 各 30 個の細胞の平均値 ± 標準誤差; $p < 0.001$, Turkey HSD 検定)。また、いずれの融合蛋白でも、ほとんど封入体形成を認めなかった (図 3C)。

FRET 陽性、単量体伸長ポリグルタミン鎖の細胞傷害性の検討

伸長ポリグルタミン鎖の細胞傷害性獲得における重合体形成の重要性を確認するために、シリンダー構造であり重合体形成しない伸長ポリグルタミン蛋白 mCFP-trDQ56-mYFP を用い、その細胞傷害性を検討した。まず mCFP-trDQ56-mYFP もしくは trDQ56-mYFP (図 4A 上段) の安定発現 SH-SY5Y 細胞を作成した。作成した安

定発現細胞でのポリグルタミン鎖の発現量には差を認めなかった (図 4A 上段, 右)。これらの安定発現細胞および無処理の SH-SY5Y を Retinoic acid 処理後 BDNF により分化誘導し、各々の細胞の生存期間解析を行った (図 4A 下段)。trDQ56-mYFP 発現細胞では、既報通り、無処理の SH-SY5Y と比し、細胞死に関するハザード比の有意な上昇を認めた (図 4B; $p < 0.001$, log-rank 検定)。一方 mCFP-trDQ56-mYFP 発現細胞では、無処理の SH-SY5Y 細胞と比し、有意なハザード比の上昇は認めず、trDQ56-mYFP 発現細胞に比し、有意に低いハザード比を示した (図 4B; 有意差なし, log-rank 検定)。

考 察

伸長ポリグルタミン鎖は、容易に重合体形成し、また、単量体と重合体は相互に平衡関係にあるため、両者を区別し、その細胞傷害性を検討することは困難であった。しかし、ポリグルタミン病の病態機序と、その治療ターゲットを考える際、細胞傷害性の主座が、単量体か、もしくは多量体かを明らかにすることは重要である。今回筆者は、構造変化を起こしながら、単量体を保ち続ける伸長ポリグルタミン鎖を用い、単量体のみでは細胞傷害性を示さないことを明らかにし、伸長ポリグルタミン鎖の細胞傷害性における、多量体形成の重要性を示した (図 5)。

伸長ポリグルタミン鎖は、単量体が β シート構造に構造変化した後に、重合体形成すると考えられている。この単量体が、直鎖状に存在するのか、また Perutz らが提唱したように 40 グルタミン残基で 2 回転し安定化するシリンダー状の構造を取るかは、明らかではなかった¹⁴⁾。さらに、その重合体形成が、平行に並び、シート状の構造を取るのか、シリンダー構造が直鎖状につながり、チューブ状の構造を取るのかも不明であった¹⁸⁾¹⁹⁾。今回筆者は、両端にドナーもしくはアクセプターを付加した伸長ポリグルタミン鎖では FRET を示さないこと (図 2A, B)、また封入体形成も認めないことから (図 2C)、伸長ポリグルタミン鎖は、

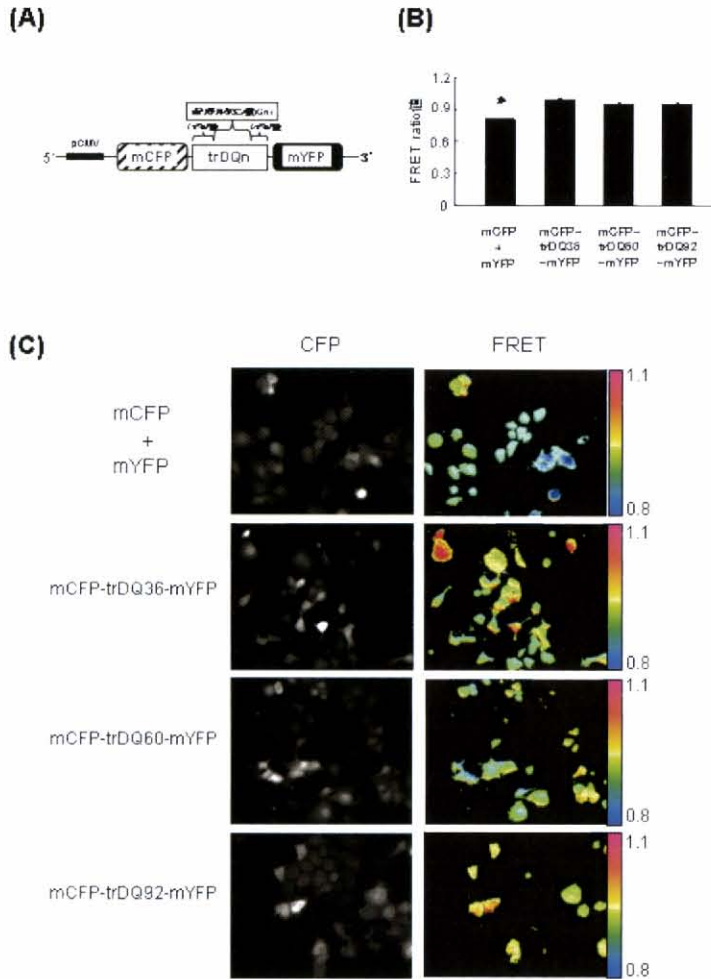


図3 一分子FRETによる構造変化の検討

- A : 部分DRPLA蛋白(trDQn;nはグルタミンリピート数を示し, ポリグルタミン領域のN末側は8アミノ酸残基, C末側は6アミノ酸残基を有する。:白ボックス)のN末にmCFP(斜線ボックス), C末にmYFP(黒ボックス)を付加した発現ベクター(mCFP-trDQn-mYFP). pCMV:サイトメガロウイルスプロモーター(黒太線)ポリグルタミン鎖長は36リピート, 60リピート, 90リピートの3種類を作成した。
- B : COS7細胞にmCFP-trDQ36-mYFP, mCFP-trDQ60-mYFP, mCFP-trDQ90-mYFP, mCFP+mYFP(陰性対照)を一過性発現し, 48時間後に細胞内の平均FRET ratio値を測定した平均値を示す(評価細胞数は各30個)。エラーバーは標準誤差を示す。mCFP-trDQ36-mYFP, mCFP-trDQ60-mYFP, mCFP-trDQ90-mYFPのいずれも, 陰性対照であるmCFP+mYFPと比して有意に高いFRET ratio値を示した(*: $p < 0.001$, Turkey HSD検定)。
- C : COS7細胞にmCFP-trDQ36-mYFP, mCFP-trDQ60-mYFP, mCFP-trDQ90-mYFP, mCFP+mYFP(陰性対照)を一過性発現し48時間後に観察したCFP蛍光画像(左)とFRET ratio image(右)を示す。FRET ratio imageのカラーバーは, FRET ratio値とカラーの対応を示す。mCFP-trDQ36-mYFP, mCFP-trDQ60-mYFP, mCFP-trDQ90-mYFPはいずれも, 陰性対照であるmCFP+mYFPに比し, 高いFRET ratio値を示したが, 封入体形成はほとんど認めなかった。

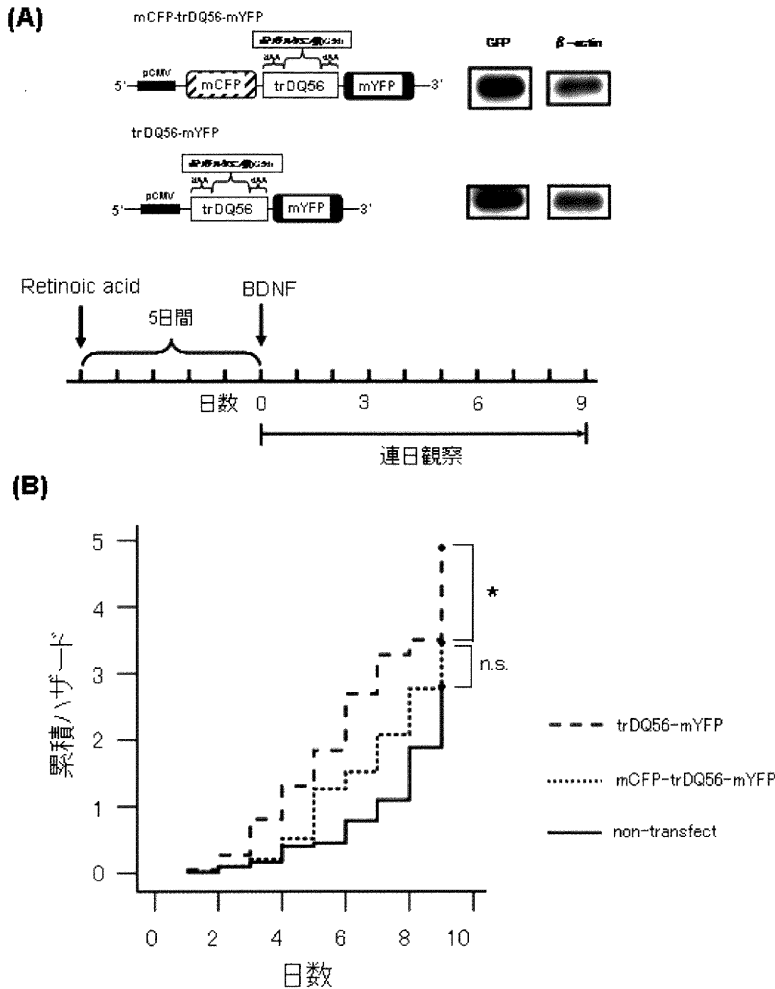


図4 mCFP-trDQ56-mYFPの細胞傷害性の検討

- A : mCFP-trDQ56-mYFP (上段, 上) もしくは trDQ56-mYFP (上段, 下) を安定発現する SH-SY5Y 細胞を作成した. 図右には, それぞれの安定発現細胞の抗 GFP 抗体ウェスタンブロットによる蛋白発現量を示した. mCFP-trDQ56-mYFP では trDQ56-mYFP に比し, 抗原量に応じた二倍程度の濃度のバンドを認める. 作成した安定発現細胞に Retinoic acid 処理を 5 日間行い BDNF 受容体を発現させた後, BDNF 処理を行い分化誘導を行い, 各 30 個の細胞の生存の有無をグリッド付きガラスボトムディッシュ上で BDNF 処理開始より 9 日間観察した. 細胞死は, 細胞の消失もしくは蛍光値の消失にて判断した (下段).
- B : 分化誘導した trDQ56-mYFP (破線), mCFP-trDQ56-mYFP (点線) の SH-SY5Y 細胞安定発現細胞および無処置の SH-SY5Y 細胞 (実線) を, Retinoic acid 処理後, BDNF 処理を行って分化させた. 30 個の細胞の生存の有無をグリッド付きガラスボトムディッシュ上で BDNF 処理開始より 9 日間観察した. 細胞死は, 視野からの消失, もしくは蛍光値の消失にて判断した. Kaplan-Meier 法にて解析し, 細胞死の累積ハザードを縦軸に現わす. mCFP-trDQ56-mYFP 安定発現細胞は無処置の SH-SY5Y 細胞と比して, 有意な差を認めない (n.s.: 有意差なし, log-rank 検定). trDQ56-mYFP 安定発現細胞では mCFP-trDQ56-mYFP 安定発現細胞に比して有意なハザード比の増加を認める (* : $p < 0.001$, log-rank 検定).

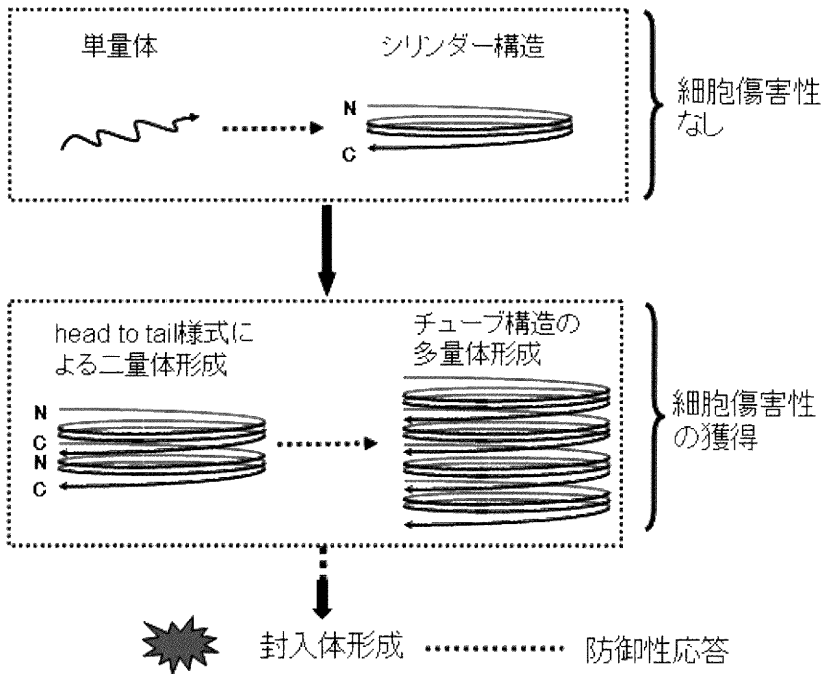


図5 伸長ポリグルタミン鎖の重合体形成モデル

伸長ポリグルタミン鎖は構造変化を起こし、シリンダー構造を形成する。このシリンダー構造を基本としてhead to tail様式にチューブ様の重合体を形成する。単量体では細胞傷害性を認めず、重合開始により細胞傷害性を獲得する。

平行に重合する“シート構造”を取らないことを示した。さらにドナーおよびアクセプターを両端に付加したポリグルタミン鎖では、封入体を形成せずにFRETを示すことを示した(図3B, C)。このことは、伸長ポリグルタミン鎖が、生細胞内で、直線状でなく、両端が近接する構造を取ること示唆する。これは、Perutzらが提唱したシリンダー構造を支持する。これらの結果から、伸長ポリグルタミン鎖は、シリンダー構造をとりhead to tailで重合する“チューブ構造”を形成すると考えた(図5)。

興味深いことに、近年、アルツハイマー病、パーキンソン病等の他の神経変性疾患においても、細胞傷害性を引き起こす本態が多量体であるとの報告が蓄積している²⁰⁾²¹⁾。それらの疾患蛋白質の構造は未解明な点が多い。しかし、アルツハイ

マー病の原因蛋白であるアミロイド β 蛋白や、パーキンソン病の原因蛋白である α -synucleinでも、シリンダー構造を呈すると報告されている¹⁴⁾。また、アミロイド β 42、ポリグルタミン鎖、 α -synuclein、いずれの多量体も共通して認識する抗体が報告されている²²⁾²³⁾。これらの事実から、原因蛋白由来の多量体が共通の構造体を持つ可能性が示唆されている。

これらの疾患における細胞障害性について、アミロイド β 42、プリオン蛋白、islet amyloid polypeptide、ポリグルタミン鎖などの複数の分子で、重合体形成に伴い、細胞内外のCaイオンコンダクタンスの変調をきたすといった共通の病態が報告されている²⁴⁾²⁵⁾。チューブ構造は、内側が親水性、外側が疎水性であるため、細胞膜の脂質二重膜構造に取り込まれる可能性があり、チューブ構

造を介した水や Ca イオンなどの不整な流入がおこる仮説が唱えられている¹⁴⁾¹⁵⁾²⁶⁾。今後、病因蛋白の重合体が、どのような細胞傷害を惹起し、病態を引き起こすかについて、更なる検討が必要である。

今回筆者は、伸長ポリグルタミン鎖の細胞障害機序において、重合体の形成が重要であることを示した。さらにその重合体がチューブ構造を取る可能性を示した。今後、ポリグルタミン病の治療を検討する上で、ポリグルタミン鎖の重合を阻害する薬剤、さらに重合により惹起される細胞傷害機序を改善する薬剤の開発が期待される。神経変性疾患の病態機序に、共通の立体構造を伴う重合体による、共通の分子病態基盤が存在するという仮説は、治療戦略を考える上で極めて重要であり、さらなる検討が必要である²⁷⁾²⁸⁾。

謝 辞

本研究全般にわたり、ご指導ご助言をいただいた新潟大学医学部保健学科基礎生体情報学講座 高橋俊昭先生、新潟大学脳研究所リソースセンター 小野寺理先生、新潟大学脳研究所神経内科 西澤正豊先生に深謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Andrew SE, Goldberg YP and Hayden MR: Rethinking genotype and phenotype correlations in polyglutamine expansion disorders. *Hum Mol Genet* 6: 2005 - 2010, 1997.
- 2) Davie SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangrini L and Bates GP: Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90: 537 - 548, 1997.
- 3) DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP and Aronin N: Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neuritis in brain. *Science* 277: 1990 - 1993, 1997.
- 4) Martindale D, Hackam A, Wiczorek A, Ellerby L, Wellington C, McCutcheon K, Singaraja R, Kazemi - Esfarjani P, Devon R, Kim SU, Bredesen DE, Tufaro F and Hayden MR: Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat Genet* 18: 150 - 154, 1998.
- 5) Li SH and Li XJ: Aggregation of N - terminal huntingtin is dependent on the length of its glutamine repeats. *Hum Mol Genet* 7: 777 - 782, 1998.
- 6) Yamada M, Tsuji S and Takahashi H: Pathology of CAG repeat diseases. *Neuropathology* 20: 319 - 325, 2000.
- 7) Hayashi Y, Kakita A, Yamada M, Koide R, Igarashi S, Takano H, Ikeuchi T, Wakabayashi K, Egawa S, Tsuji S and Takahashi H: Hereditary dentatorubral - pallidoluyian atrophy: detection of widespread ubiquitinated neuronal and glial intranuclear inclusions in the brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 96: 547 - 552, 1998.
- 8) Holmberg M, Duyckaerts C, Durr A, Cancel G, Gourfinkel - An I, Damier P, Faucheux B, Trotter Y, Hirsch EC, Agid Y and Brice A: Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions. *Hum Mol Genet* 7: 913 - 918, 1998.
- 9) Paulson HL, Perez MK, Trotter Y, Trojanowski JQ, Subramony SH, Dass SS, Vig P, Mandel J - L, Fischbeck KH and Pittman RN: Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 19: 333 - 344, 1997.
- 10) Klement IA, Skinner PJ, Kaytor MD, Yi H, Hersch SM, Clark HB, Zoghbi HY and Orr HT: Ataxin - 1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine - induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell* 95: 41 - 53, 1998.
- 11) Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR and Finkbeiner S: Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431: 805 - 810, 2004.
- 12) Nagai Y, Inui T, Popiel HA, Fujikake N, Hasegawa K, Urade Y, Goto Y, Naiki H and Toda T: A toxic monomeric conformer of the

- polyglutamine protein. *Nat Struct Mol Biol* 14: 332 - 340, 2007.
- 13) Takahashi T, Kikuchi S, Katada S, Nagai Y, Nishizawa M and Onodera O: Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Hum Mol Genet* 17: 345 - 356, 2008.
- 14) Perutz MF, Finch JT, Berriman J and Lesk A: Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 5591 - 5595, 2002.
- 15) Merlino A, Esposito L and Vitagliano L: Polyglutamine repeats and beta-helix structure: molecular dynamics study. *Proteins* 63: 918 - 927, 2006.
- 16) Schaffar G, Breuer P, Boteva R, Behrends C, Tzvetkov N, Strippel N, Sakahira H, Siegers K, Hayer-Hartl M and Hartl FU: Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation. *Mol Cell* 15: 95 - 105, 2004.
- 17) Xia Z and Liu Y: Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes. *Biophys J* 81: 2395 - 2402, 2001.
- 18) Merlino A, Esposito L and Vitagliano L: Polyglutamine Repeats and β -Helix Structure: Molecular Dynamics Study. *Proteins* 63: 918 - 927, 2006.
- 19) Jonathan S and Nazneen N: Evidence that Perutz's double-beta-stranded subunit structure for beta-amyloids also applies to their channel-forming structures in membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1546 - 1550, 2006.
- 20) Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL and Selkoe DJ: Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Med* 14: 837 - 842, 2008.
- 21) Outeiro TF, Putcha P, Tetzlaff JE, Spoelgen R, Koker M, Carvalho F, Hyman BT and McLean PJ: Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells. *PLoS ONE* 3: e1867, 2008.
- 22) Romesberg FE, Spiller B, Schultz PG and Stevens RC: Immunological origins of binding and catalysis in a Diels-Alderase antibody. *Science* 279: 1929 - 1933, 1998.
- 23) Kaye R, Head E, Sarsoza F, Saing T, Cotman CW, Necula M, Margol L, Wu J, Breydo L, Thompson JL, Rasool S, Gurlo T, Butler P and Glabe CG: Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Mol Neurodegener* 2: 18, 2007.
- 24) Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I and Glabe CG: Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* 280: 17294 - 17300, 2005.
- 25) Kaye R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE and Glabe CG: Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J Biol Chem* 279: 46363 - 46366, 2004.
- 26) Singer SJ and Dewji NN: Evidence that Perutz's double-beta-stranded subunit structure for beta-amyloids also applies to their channel-forming structures in membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1546 - 1550, 2006.
- 27) Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, Baroni F, Formigli L, Zurdo J, Taddei N, Ramponi G, Dobson CM and Stefani M: Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416: 507 - 511, 2002.
- 28) Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW and Glabe CG: Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300: 486 - 489, 2003.

(平成21年1月20日受付)