

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07242

研究課題名(和文)ポリグルタミン病脳切片ベータシート構造の赤外顕微鏡解析

研究課題名(英文)Infrared microscopy analysis of polyglutamine-related brain sections

研究代表者

中村 和裕 (NAKAMURA, KAZUHIRO)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：10327835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：凝集を解離することは理論上ポリグルタミン病の病態改善に結びつく。私は過去の研究で凝集ポリグルタミンに特定の波長の中赤外レーザーを照射することにより凝集が解離することを見いだした。本研究課題では、ポリグルタミンペプチド、マウス脳切片中のポリグルタミンペプチドを用いた赤外顕微鏡解析で波数3000付近のスペクトルのピークを調べた結果、水素結合の結合状態がポリグルタミン凝集体では変化していた。また、レーザー照射によりその変化が解除されたという結果を得た。以上の結果は、レーザーによる凝集解離の機序はベータシートを構成する水素結合の切断であることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリグルタミン病の病因は、神経細胞内でポリグルタミンを含むタンパクが異常凝集し、それが神経細胞に対して毒性を発揮して神経細胞機能異常、神経細胞死をひき起こすことである。現在まで有効な治療法は開発されていない。

中赤外領域の自由電子レーザーが凝集を解離することはわかっていたが、それはベータシート間の水素結合切断がもたらすものであることが今回の研究で明らかにされた。今回、その機序を明らかにした事は、自由電子レーザーをポリグルタミン病の治療に応用するための技術的進歩を待つことの理由となる。

研究成果の概要(英文)：Effective treatments for polyglutamine diseases have not been determined. Dissociation of polyglutamine aggregates theoretically leads to restoration from the disease. I have previously found that free electron laser at mid-infrared wavelength dissociated the aggregates. In this study, I conducted infrared microscopy analysis to examine status of hydrogen bond between beta-sheet strands of aggregated polyglutamine. Peak of the spectrum at wave number of around 3000 was broad, spreading to lower wave number side using polyglutamine peptides in the mouse brain. Conversely, the irradiated peptide showed the peak shift toward the higher wave number side. These results indicate that status of hydrogen bond between beta sheet strands of polyglutamine is changed, and mid-infrared laser restores the change.

研究分野：神経病理学

キーワード：ポリグルタミン病 赤外顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

原因遺伝子内で CAG リピートが伸長し、結果として神経細胞内でポリグルタミンを含むタンパクが異常凝集し、それが神経細胞に対して毒性を発揮して神経細胞機能異常、神経細胞死をひき起こすことがポリグルタミン病の病因である。現在までのところポリグルタミン病に対する有効な治療法は開発されていない。

私は過去の研究において、凝集ポリグルタミンペプチド、およびそれを導入した培養細胞に特定の波長の中赤外レーザーを照射することにより凝集が解離することを報告した。レーザーによる凝集解離の機序は当時不明であったが、他の凝集体であるアミロイドベータの知見がその機序解明のためのヒントを与えてくれた。フィブリル化したアミロイドベータとフィブリルを解離させたアミロイドベータの波数 3000 - 4000 の範囲の赤外顕微鏡データの波形を観察した結果、解離後の構造体の O-H に比較して解離前の凝集構造体の O-H を反映するピークは波数 3200 - 3500 の範囲で低波数側に異なるピークを持って存在することを報告した。つまり、アミロイドベータ凝集体のベータシートストランド間の水素結合が強固である場合に、低波数側にピークがシフトすることが示された。しかしながらポリグルタミン凝集体のレーザーによる解離も同様に水素結合解離のパターンを示すかどうか調べられていない。

2. 研究の目的

原子間の結合はアミロイドの 2 次構造を決定する。原子間の結合部位の解析はペプチドを試料として用いて検出するのが一般的であるが、私は最近の論文でマウス脳切片を試料とした赤外顕微鏡解析で、原子間の結合状態からたんに 2 次構造を決定した。この知見を応用し、ペプチドおよびマウス脳内のポリグルタミン凝集体内の原子間の結合(C=O, O-H, N-H)を赤外顕微鏡で検出し、ベータシート構造の原子間の結合状態を把握することを本研究の目的とする。特にポリグルタミンにおいてもフィブリル化したアミロイドベータ同様のピークの違いを示すかどうか、そしてレーザー照射によって、水素結合解離のパターンを示すかを調べる。

3. 研究の方法

3-1 試料

以下の 3 つの試料を用いた。

3-1-1 ポリグルタミンペプチド

グルタミンが 69 個連続したもの(69Q)と 15 個連続したもの(15Q)を 37 度でインキュベーションし、凝集したものをを用いた。

3-1-2 L7 プロモーターの支配下で小脳プルキンエ細胞特異的に 69 個連続したグルタミンを持つトランスジェニックマウス(69Q-Tg)の小脳切片

3-1-3 橋に凝集 15Q をインジェクションした後、1 日経過したマウスの脳切片

3-2 自由電子レーザー照射

東京理科大学赤外自由電子レーザー研究センターに設置してある照射装置を用いて 5,6,7 ミクロンの波長のレーザー光を照射した。

3-3 赤外顕微鏡解析

日本分光の解析システムを用いて波数と吸収度の波形からそれぞれの(C=O, O-H, N-H)原子間結合を測定した。

4. 研究成果

4-1

69Q ペプチドに対して、5、6、7 ミクロンの照射を行い赤外顕微鏡解析を行った。

図 1 に示すように、5、6、7 ミクロン全てにおいて未照射の時よりピークが長波数側に広がっていた。

4-2

69Q-Tg の小脳切片では赤外顕微鏡解析により、ベータシート構造の割合が増加していなかった。したがって、波数 3000 付近のデータを取得することが無意味となった。このマウスではプルキンエ細胞が広範に脱落するため、その内部のポリグルタミン凝集体も消失し、凝集の部分を捉える事ができなかったと予想される。

4-3

橋に凝集 15Q をインジェクションした後、1 日経過したマウスの脳切片ではアミド I の領域の赤外顕微鏡解析の結果、凝集体が存在する領域では存在しない領域に比較して、ベータシート構造の割合が増加していた(図 2)。したがって、波数 3000 付近のデータを取得したところ、図 3 に示すように、ピークはブロードであり、低波数側にも及んでいた。

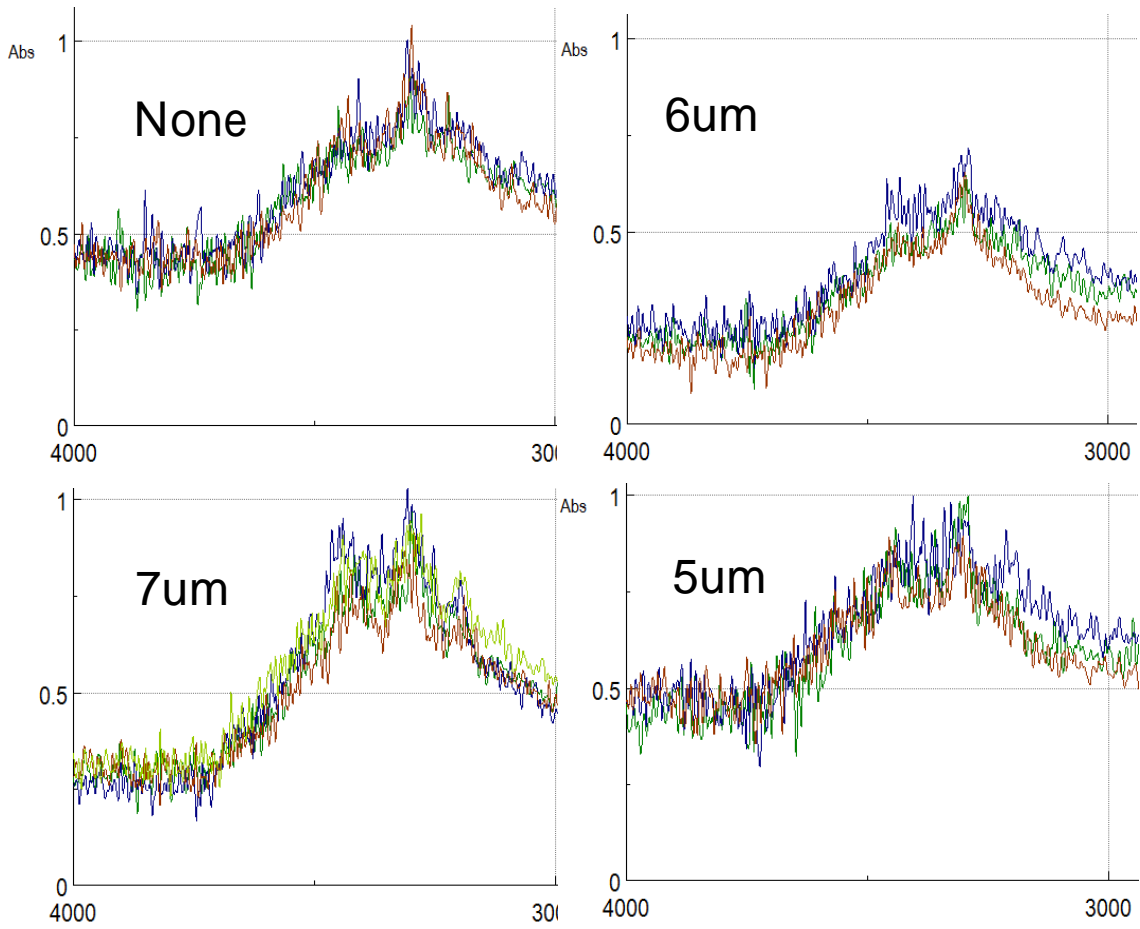


图 1

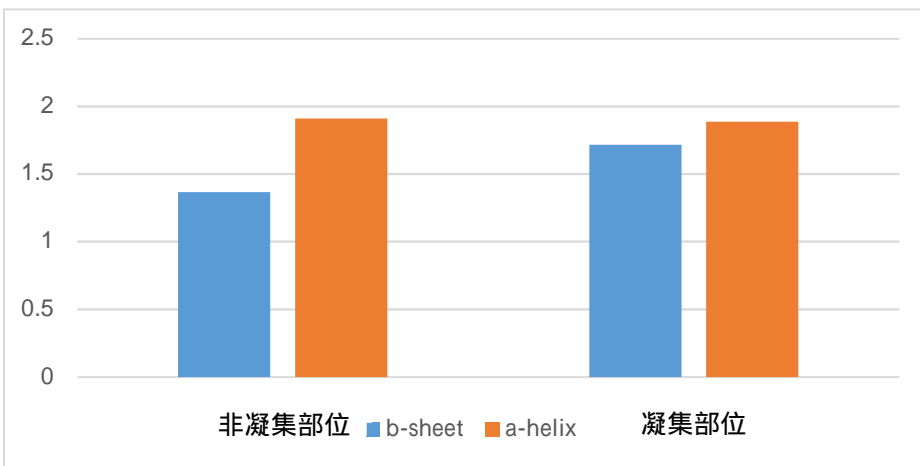


图 2

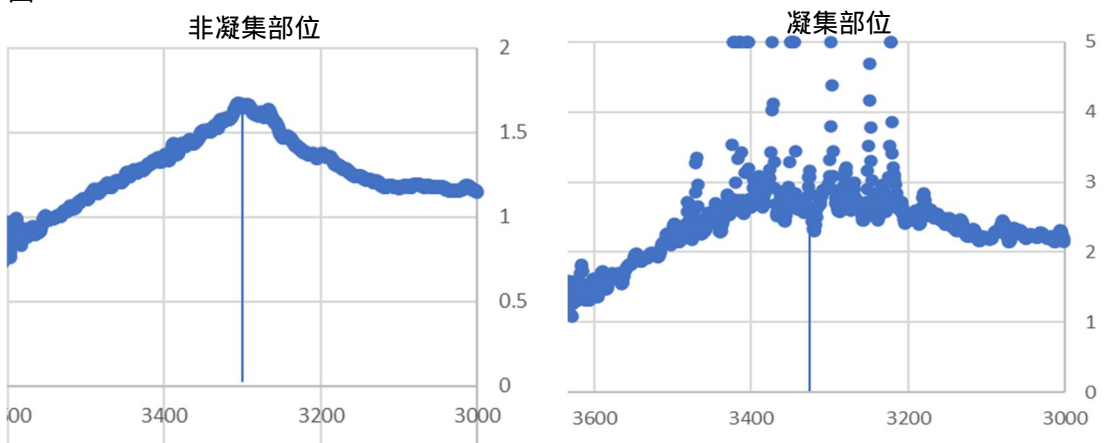


图 3

中赤外領域の自由電子レーザーがポリグルタミン凝集体を解離することを私は以前報告したが、今回、水酸基(OH基)の伸縮振動を示す領域において正常組織に比べて脳の凝集体存在部位でスペクトルがブロードになった。このことからアミロイドの凝集が起こり、水素結合が強固になり、ベータシート構造が形成されたものと推測される。また、レーザーによる凝集解離の機序はベータシート間の水素結合切断がもたらすものであることが示唆された。

私は最近の論文の中で、ポリグルタミン病の原因遺伝子のリピート関連性非ATG依存性翻訳(RAN translation)の結果生じるポリアラニン、ポリセリン、ポリロイシン凝集体がマウス脳に対して毒性をもつことを発表した(論文リスト文献1、2)。これら凝集体に対してのレーザーの効果を近い将来検討する予定である。

本成果を臨床に応用するまでの道のりは長いですが、特に脳へのレーザー浸透が問題となる。今回の結果は自由電子レーザーをポリグルタミン病の治療に応用するための技術的進歩を待つことの理由となる。

(1) Owada R, Mitsui S, Nakamura K. Exogenous polyserine and polyleucine are toxic to recipient cells. *Sci. Rep.* 12, 1685, 2022.

(2) Iizuka Y, Owada R, Kawasaki T, Hayashi F, Sonoyama M, Nakamura K. Toxicity of internalized polyalanine to cells depends on aggregation. *Sci. Rep.* 11, 23441, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okumura H, Itoh SG, Nakamura K, Kawasaki T.	4. 巻 125
2. 論文標題 Role of Water Molecules and Helix Structure Stabilization in the Laser-Induced Disruption of Amyloid Fibrils Observed by Nonequilibrium Molecular Dynamics Simulations.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. B	6. 最初と最後の頁 4964-4976
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcc.0c11491	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Owada R, Mitsui S, Nakamura K	4. 巻 12
2. 論文標題 Exogenous polyserine and polyisoleucine are toxic to recipient cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 1685
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-05720-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Iizuka Y, Owada R, Kawasaki T, Hayashi F, Sonoyama M, Nakamura K	4. 巻 11
2. 論文標題 Toxicity of internalized polyalanine to cells depends on aggregation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 23441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-02889-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村和裕
2. 発表標題 中赤外光による神経変性疾患関連アミロイドの解離と形態異常改善
3. 学会等名 第27回 FELとHigh Power Radiation研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	川崎 平康 (KAWASAKI TAKAYASU) (00363268)	大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・加速器 研究施設・特別技術専門職 (82118)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------