

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770117

研究課題名（和文） 分子シャペロンによるミスフォールディングタンパク質の凝集ダイナミクス

研究課題名（英文） Effect of molecular chaperone on misfolding protein aggregation

研究代表者

座古 保 (ZAKO TAMOTSU)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・専任研究員

研究者番号：50399440

研究成果の概要（和文）：近年アルツハイマー病に代表される、ミスフォールディングタンパク質が凝集することが原因で引き起こされる疾病が社会的問題となっている。本研究では生体内でタンパク質凝集を抑制する働きをしている分子シャペロンタンパク質の1つであるプレフォールディングがアミロイドβタンパク質やポリグルタミンタンパク質などの疾病タンパク質凝集にどのような働きをしているかを調べたところ、凝集が抑制されることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Protein misfolding disease, such as Alzheimer's disease (AD), is caused by misfolded protein aggregates that induce molecular stress and interfere with cellular function. We examined effect of molecular chaperone prefoldin (PFD) on aggregation of amyloid beta and poly glutamine protein that cause AD and Huntington disease, respectively. We found that PFD could inhibit their aggregation *in vitro*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：(1) アミロイド (2) 分子シャペロンタンパク質 (3) ミスフォールディングタンパク質凝集 (4) プレフォールディング (5) 可溶性オリゴマー (6) 細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

近年、タンパク質ミスフォールディング病とよばれる、天然構造が壊れ、間違っただフォールディング（ミスフォールディング）をしたタンパク質が凝集することが原因で病気

が引き起こされる例が多く見つかっており、社会的問題となっている。代表的な疾病であるアルツハイマー病においては、アミロイドβタンパク質（Aβ）などの凝集体が主な病因と考えられている。特に、Aβの凝集形成中間体である可溶性オリゴマーは毒性が高いこと

から、近年は病気発症の主要因の一つと考えられているが、その形成機構はまだ明らかではない。

一方、生体内では、分子シャペロンタンパク質がタンパク質の凝集抑制に関与していることが知られている。申請者はこれまで、プレフォルディン(PFD)と呼ばれる分子シャペロンにより、A β の幅広い重合度(3~数十量体)の可溶性オリゴマーが生成することを発見した(Sakono and Zako et al. FEBS J. 2008)。生成した可溶性オリゴマーは高毒性を有し、アポトーシスによる細胞死を誘導したことから、プレフォルディンがアルツハイマー病発症に関与している可能性が初めて示唆された。

プレフォルディンはクラゲ状のきわめてユニークな構造を有し、様々なタンパク質やフォールディングに関与すると考えられている分子シャペロンの1つである。申請者はこれまでにプレフォルディンが他の分子シャペロンであるシャペロンとともにタンパク質のフォールディングを促進するメカニズムの一端を明らかにしてきた(J. Biol. Chem. 2004, 2004, FEBS Lett. 2005, J. Biol. Chem. 2005, Zako et al. J. Mol. Biol. 2006, Proteins 2008, J. Biol. Chem. 2008)。分子シャペロンは本来凝集を抑制し、細胞には有利に働くと考えられていたので、プレフォルディンによる毒性オリゴマーの生成は予想外の結果であった。

2. 研究の目的

本研究では、プレフォルディンがミスフォールディング病の原因とされているタンパク質凝集にどのような働きをしているかを明らかにすることを目的としている。特にアミロイド β やポリグルタミンタンパク質などのタンパク質凝集における分子シャペロンの働きを明らかにすることを目指す。特に本研究ではヒト由来のプレフォルディンを用いることとし、これまでの古細菌由来のプレフォルディンを用いた場合と比較する。

3. 研究の方法

本研究では、分子シャペロンタンパク質のひとつであるプレフォルディンがミスフォールディング病の原因とされているタンパク質凝集にどのような働きをしているかを明らかにするために、ヒト由来プレフォルディンのアミロイド β (A β) およびポリグルタミンタンパク質凝集への影響を調べた。ヒト由来プレフォルディンは6つのサブユニットからなり、それぞれを大腸菌にて発現・

精製後、既報の方法(Simons et al. JBC 2004)によりアSEMBLした。その後A β (1-42) ペプチドもしくはポリグルタミンタンパク質と37°Cでインキュベートし、ポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)-ウェスタンブロットなどによる構造解析、細胞毒性検討などを行った。

ポリグルタミンタンパク質はハンチントン病とよばれる脳神経疾患の原因タンパク質と考えられている。本研究では一般的に用いられているポリグルタミンモデルタンパク質 GST-(myc)-Htt PolyQ を使用した。ここでQはグルタミンを表しており、正常型のモデルとしてQが23個連続したもの、異常型のモデルとして53個連続したものを用いた。myc エピトープは、抗体検出のために付加された配列である。GSTはアフィニティ精製を容易にするために付加されたタンパク質であるが、一方でpolyQの凝集を抑制する効果を有する。GSTとmycの間にはプロテアーゼ切断部位が存在し、プロテアーゼによりGSTと(myc)-Htt polyQとが切れることで凝集が始まる。

4. 研究成果

(1) プレフォルディンのA β 凝集への影響

ヒトプレフォルディンとA β をインキュベートすると、A β の凝集が抑制され、可溶性のオリゴマー構造が生成した(図1)。プレフォルディンによるA β の凝集抑制効果はTEMによっても確認された。プレフォルディンはA β 濃度の0.02倍量でも十分に凝集抑制効果があり、結合が非常に強いことが分かった。さらに免疫沈降法などによりオリゴマーがプレフォルディンとA β の複合体であることを明らかにした。このA β オリゴマーのラット副腎髄質由来褐色細胞腫(PC12細胞)に対する細胞毒性は非常に低く、プレフォルディンはA β 凝集を抑制するとともに無毒化している可能性が示唆された。さらにオリゴマーの細胞毒性はマウス神経細胞においても低いことを示した。これらの結果により、ヒトプレフォルディンにより低毒性のA β オリゴマーが生成することが分かった。

我々はこれまでに古細菌由来のプレフォルディンを用いた場合にもA β の凝集が抑制され、可溶性オリゴマーが生成することを見出している。しかしこの可溶性オリゴマーの毒性は非常に強かった。これらの結果を考えると、可溶性オリゴマーでも高毒性のものと無毒性のものがあることが示唆される。近年アルツハイマー病では毒性の高い可溶性オリゴマーが主病因の1つと考えられているが、サイズや構造が異なる様々な可溶性

オリゴマーが報告されており、未だに病因オリゴマーの特定には至っていない。本研究の成果をさらに発展させることにより可溶性オリゴマーの毒性原因について重要な知見が得られることが期待できる。

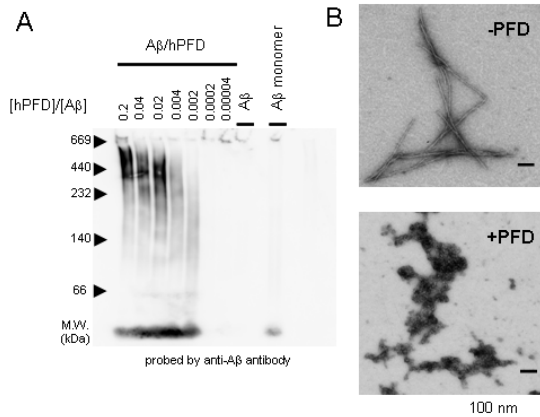


図1 PFDIによるAβ凝集抑制
(A) Native-PAGE/Western Blot, (B) TEM

(2) プレフォルディングのポリグルタミンタンパク質凝集への影響

プレフォルディングのポリグルタミンタンパク質凝集への効果をフィルタートラップ法により調べたところ、プレフォルディング非存在下では、異常型ポリグルタミンタンパク質のモデルである Htt PolyQ53 にのみ凝集が検出された。一方、プレフォルディング存在下では、Htt PolyQ53 の凝集はプレフォルディング濃度依存的に抑制された。また、プレフォルディングによる Htt PolyQ53 の凝集抑制効果は TEM によっても確認された。これらの結果は、プレフォルディングが Aβ 以外にも疾患性ミスフォールディングタンパク質凝集を抑制できることを示唆している。

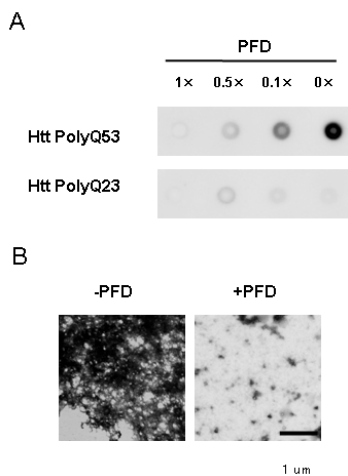


図2 PFDIによるポリグルタミン凝集抑制
(A) Filter trap assay, (B) TEM

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Sakono M, Akiyama S, Zako T., Sakaki S, Waku T, Tanaka N*, Maeda M "Immobilized Insulin Amyloid Enhances Cell Adhesion and Proliferation due to Interaction with Fibronectin" *Chem. Lett.* 40, 315-317 (2011) 査読有
- ② Sakono M, Akiyama S, Zako T., Sakaki S, Waku T, Tanaka N*, Maeda M "Application of two morphologically different fibrillar and filamentous insulin amyloids as a biomaterial for cell culture surfaces" *React. Funct. Polymer* 71, 324-328 (2011) 査読有
- ③ Sakono M, Zako T., Drakulic S, Valpuesta J.M, Yohda M and Maeda M "Size-selective recognition of gold nanoparticles by a molecular chaperone" *Chem. Phys. Lett.* 501, 108-112 (2010) 査読有
- ④ Sahlan M., Kanzaki T., Zako T., Maeda M. and Yohda M. "Analysis of interaction mode between hyperthermophilic archaeal group II chaperonin and prefoldin using a platform of chaperonin oligomers of various subunit arrangements" *Biochimica et Biophysica Acta. - Proteins and Proteomics* 1804, 1810-1816 (2010) 査読有
- ⑤ Sahlan M., Zako T., Tai Phan The, Ohtaki A., Noguchi K., Maeda M., Miyatake H., Dohmane N. and Yohda M. "Thermodynamic Characterization of the Interaction between Prefoldin and Group II Chaperonin" *J. Mol. Biol.* 399, 628-636 (2010) 査読有
- ⑥ Bando K., Zako T., Sakono M., Maeda M., Wada T., Nishijima M., Fukuhara G., Yang C., Mori T., Pace TCS., Bohne C. and Inoue Y. "Bio-Supramolecular Photochirogenesis with Molecular Chaperone: Enantiodifferentiating Photocyclodimerization of 2-Anthracenecarboxylate Mediated by Prefoldin" *Photochem. & Photobiol. Sci.* 9, 655-60 (2010) 査読有
- ⑦ Sakono M. and Zako T. "Amyloid oligomers: Formation and toxicity of

Abeta oligomers” FEBS J. 277, 1348-1358 (2010) 査読有

- ⑧ Zako T., Banba S., Sahlan M., Sakono M., Terada N., Yohda M. and Maeda M.* “Hyperthermophilic archaeal prefoldin shows refolding activity at low temperature” Biochem. Biophys. Res. Commun. 391, 467-470 (2010) 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- ① Tamotsu Zako and Mizuo Maeda, ” Function and application of protein molecules and bio-nanoparticles” Japan-Canada Nanotechnology Workshop, 2011, 11, 22 Toronto, Canada
- ② Naofumi Terada, Tamotsu Zako, Masafumi Sakono and Mizuo Maeda “Development of new photon counting histogram method towards precise analysis of oligomerization” 第 49 回生物物理年会、2011 年 9 月 17 日、姫路
- ③ Tamotsu Zako, Masafumi Sakono, Takahiro Kobayashi, K. Peter R. Nilsson, Per Hammarström, Mikael Lindgren and Mizuo Maeda ” ‘Noodle’ -like filaments of bovine insulin and $\beta 2$ microglobulin were non-cytotoxic due to abbreviated cell binding” EMBO meeting 2011, Vienna, Sep 12th 2011
- ④ Karin Sörgjerd, Tamotsu Zako, Masafumi Sakono, Peter Stirling, Michel Leroux, Mizuo Maeda “The molecular chaperone prefoldin can capture aggregation prone states of A-beta and might play a role in the progress of Alzheimers disease” Pacificchem2010, Honolulu, USA, Dec 19 2010
- ⑤ Masafumi Sakono, Tamotsu Zako, Masafumi Yohda and Mizuo Maeda “Toxic amyloid oligomer detection system using molecular chaperone” Pacificchem2010, Honolulu, USA, Dec 18 2010
- ⑥ Y. Inoue, M. Nishijima, C. Yang, T. Mori, T. Wada, K. Bando, T. Zako, M. Sakon, M. Maeda, T. Pace, C. Bohne “Supramolecular photochirogenesis with biomolecular hosts” Pacificchem2010, Honolulu, USA, Dec 16 2010
- ⑦ 田代絵梨佳, 武藤秀樹, 座古保, 宮澤誠, 北浦 廣剛, 北村朗, 久保田広志, 前田瑞夫, 金城 政孝, 有賀寛芳「分子シャペロン Prefoldin は変異ハンチンチンのオリゴマーおよび凝集体形成を阻害して細胞死を減少させる」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、神戸、2010 年 12 月 6 日
- ⑧ Erika Tashiro, Hideki Muto, Tamotsu Zako, Makoto Miyazawa, Hirotake Kitaura, Akira

Kitamura, Hiroshi Kubota, Mizuo Maeda, Masataka Kinjo, Hiroyoshi Ariga “Molecular chaperone prefoldin blocks the formation of mutant Huntingtin oligomer and inclusion body, resulting in reduction of its cytotoxicity” Neuroscience 2010, Nov., 16 San Diego, USA

- ⑨ Naofumi Terada, Tamotsu Zako, Masafumi Sakono and Mizuo Maeda “Amyloid Beta Oligomer Studied By photon counting histogram” 第 48 回日本生物物理学会、仙台 2010 年 9 月 20 日
- ⑩ Tamotsu Zako, Masafumi Sakono, Arata Utsum, Chika Sugino, Masafumi Yohda, Mizuo Maeda “Formation of non-toxic Abeta amyloids by small heat shock protein (sHsp) under stress condition” EMBO meeting, Barcelona Spain, Sep 6, 2010
- ⑪ 養王田正文、阿部哲也、Sahlan Muhamad, Phan The tai, 神崎太郎、岡俊彦、座古保、前田瑞夫 「分子シャペロンをめぐる分子間相互作用の解析」 第 10 回日本蛋白質科学会年会、仙台、2010 年 6 月 17 日
- ⑫ 伊藤禎宣、座古保、Karin Sorgjerd、寺田尚史、田代絵梨佳、北村朗、久保田広志、武藤秀樹、金城政孝、有賀寛芳、前田瑞夫「ポリグルタミンタンパク質凝集における分子シャペロンプレフォルディンの役割」 第 10 回日本蛋白質科学会年会、仙台、2010 年 6 月 16 日
- ⑬ Karin Sörgjerd, Tamotsu Zako, Masafumi Sakono, Peter Stirling, Michel Leroux, Mizuo Maeda “The Molecular Chaperone Prefoldin can Capture Aggregation Prone States of A-Beta and Might Play a Role in the Progress of Alzheimer’s Disease” 第 59 回高分子学会年次大会、仙台、2010 年 5 月 24 日
- ⑭ Tamotsu Zako, Masafumi Sakono, Arata Utsum, Chika Sugino, Masafumi Yohda, Mizuo Maeda “Formation of non-toxic Abeta fibrils by small heat shock protein (sHsp) under stress condition” Cold Spring Harbor Meeting Molecular Chaperons & Stress responses, New York, USA, May 7th, 2010

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

座古 保 (ZAKO TAMOTSU)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・専任研究員

研究者番号：50399440