

平成 22 年 4 月 6 日現在

研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19680017
 研究課題名（和文）酵母を用いたポリグルタミン病発症分子機構の解明
 研究課題名（英文）Molecular basis of polyglutamine disease using yeast

研究代表者
 田中 元雅 (Tanaka Motomasa)
 独立行政法人理化学研究所・田中研究ユニット・ユニットリーダー
 研究者番号：40321781

研究成果の概要（和文）：

ハンチントン病の原因蛋白質ハンチンチンの凝集体には異なる構造（多形）が存在することを同疾患モデルマウスの様々な脳部位由来のハンチンチン凝集体（アミロイド）から明らかにし、線条体由来のアミロイドが最も高い細胞毒性を示した。したがってポリグルタミンのアミロイド構造がハンチントン病の疾患部位特異性を決める一つの要因であることを示した。また、ポリグルタミン凝集体を用いた酵母の遺伝学的スクリーニング系を用いて、新規な酵母プリオンを同定した。

研究成果の概要（英文）：

We observed structural polymorphism in the aggregates of huntingtin, a protein responsible for Huntington disease, both *in vitro* and *in vivo*. Among distinct conformations of huntingtin amyloids derived from a variety of brain regions, those in striatum showed the highest cytotoxicity. Therefore, amyloid conformation may be a critical determinant of regional specificity in Huntington disease. In addition, a genetic screening system that can detect cross-seeding between a certain protein and polyglutamine aggregates allows us to identify a novel yeast prion protein that lacks a Gln/Asn-rich domain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2008 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
総計	16,100,000	4,830,000	20,930,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：ポリグルタミン、アミロイド、プリオン、酵母、凝集体

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患において、原因蛋白質の凝集

化とそれが細胞にもたらす影響には不明な点が多い。特に、凝集体（アミロイド）に毒性があるのかないのかは議論が分かれており、統一的な見解

が得られていない。また、神経変性疾患では、神経細胞の脱落が見られるが、その脱落には、脳において部位特異性がみられる。例えば原因蛋白質内に存在するポリグルタミン鎖が異常に伸長することによって発症するポリグルタミン病の一つであるハンチントン病では、主に線条体に神経変性が見られるが、その特異性の発現する理由は不明である。

また、グルタミンやアスパラギンのリピートを含む蛋白質はプリオンになる可能性や機能性アミロイドとして細胞内で遺伝子転写の制御の役割を果たしていることが酵母で示唆されている。一方、グルタミンやアスパラギンのリピートを含まない蛋白質もプリオンになるのか、また、機能的なアミロイドとして、細胞内で何らかの役割をもつのかについては、ほとんど理解されていない。

2. 研究の目的

本研究では、ハンチントン病の原因蛋白質ハンチンチンの生成するアミロイドに構造多形が存在するか、する場合は、その多形によって、細胞毒性が異なるのではないかと、との仮説を立てた。そこで、毒性の高いハンチンチンアミロイドの構造や物性を明らかにし、どのような理由によって、ある特異的なアミロイド構造が高い毒性をもちうるのかを明らかにする。また、様々な脳の部位の中で、線条体ではどのような構造のハンチンチンのアミロイドが存在し、それが神経細胞の脱落に関係しているのかを明らかにする。以上から、ハンチントン病における疾患部位特異性の出現する原因をハンチンチンアミロイドの構造多形から解明する。

さらに、本研究では、神経変性疾患の中でも原因蛋白質の凝集化（アミロイド化）が病態に深くかかわるポリグルタミン病に着目し、ポリグルタミン凝集体と交差種相互作用する酵母由来の蛋白質を遺伝学的スクリーニングにより網羅的に探索する。そのために独自に構築してきたポリグルタミンと酵母プリオンSup35を融合させたレポーター系を用いる。その遺伝学的解析から、新たなポリグルタミン結合蛋白質の探索と同定を通じて、新規な機能性アミロイドや酵母プリオン蛋白質の同定を目指す。

3. 研究の方法

異常に伸長したポリグルタミン鎖を含むハンチンチン蛋白質断片として、42グルタミンリピートを含むハンチンチンエキソン1蛋白質(httEX1Q42)を大腸菌中で発現、精製した。httEX1Q42が凝集条件（4度や37度などの異なる温度下）によって異なる二

次構造をもつアミロイドを形成しうるかについて、円偏光分散計、赤外分光計などの分光学的手法から検討を行った。また、電子顕微鏡による観察や、アミロイドに特異的に結合する色素であるチオフラビンTとの反応性についても検討した。

また、アミロイドの構造多形は、ハンチントン病モデルマウス脳由来のアミロイドにおいても観察されるかをハンチントン病モデルマウス R6/2を用いて検討した。まず、大脳から大脳皮質、線条体、海馬を取り出し、さらに小脳を加えた4つの脳の領域からハンチンチンアミロイドを単離することで、その多形の存在を検討した。まず、R6/2および野生型マウスのこれら領域の脳サンプルから界面活性剤 SDS に耐性の蛋白質凝集体を精製した。その精製度を、各アミロイドの自己伝播能から確認した。さらに、アミロイドの二次構造について、円偏光分散計、赤外分光計で検討した。さらに、これらアミロイドの細胞毒性について、マウス神経芽細胞の neuro2a を用いて、MTT 法により検討した。

一方、新たなポリグルタミン結合蛋白質の探索に関しては、酵母プリオン[PSI⁺]の系を用いた遺伝学的スクリーニングによって行った。この方法では、ポリグルタミンを含む蛋白質と共凝集しうる酵母由来の蛋白質を網羅的に探索することができる。同定された複数の蛋白質の中で、凝集しやすくいとされるグルタミン・アスパラギンに富むドメインが少ない、または全く含まない蛋白質に特に着目し、その蛋白質がプリオンの挙動を示すかについて検討した。特に、その蛋白質の凝集体を野生型酵母へ導入することによって、野生型がプリオン化するか、また、単離された、プリオン化された酵母が非メンデル型の遺伝形式を示すか、二倍体にする事で優性遺伝を示すか、プリオン化された酵母が分子シャペロン Hsp104 の欠損や過剰発現によって野生型に変換されるか、などについて検討した。

4. 研究成果

異常に伸長したポリグルタミン鎖を含む httEX1Q42 は4度、37度と異なる温度下で、異なる物性および構造をもつアミロイドを形成することを見出した。特に、4度のアミロイドは脆弱でβシート含量が比較的少なく、37度のアミロイドは強固でβシート含量が比較的多かった。また、4度のアミロイドは露出したポリグルタミン鎖を含むが、37度のアミロイドはポリグルタミン鎖がアミロイド内部に埋もれていた。さらに、4度のアミロイドは高い細胞毒性を示したのに対して、37度のアミロイドの毒性はかなり低いことが明らかになった。

そのアミロイドの構造多形は、ハンチントン病モデルマウス脳由来のアミロイドにおいても観察された。線条体由来のアミロイドは4度アミロイドのように脆弱でβシート含量が比較的少なく、海馬や小脳由来のアミロイドは強固でβシート含量が比較的多いことが明らかになった。また、脳

の各部位由来のアミロイドの中で、線条体由来のアミロイドが最も高い細胞毒性を示し、これはハンチントン病において線条体で最も神経細胞の脱落が見られることとよく一致した。

以上から、ポリグルタミンのアミロイド構造がハンチントン病における疾患の部位特異性を決める一つの要因になっていることを示した。

一方、新たなポリグルタミン結合蛋白質の探索に関して、遺伝学的スクリーニングにより、凝集しやすいグルタミン・アスパラギンに富むドメインを全く含まない蛋白質 Sug5 を同定した。その蛋白質の凝集体は、ポリグルタミンや酵母プリオン Sup35 の両方と交差種相互作用することが明らかになった。

さらに興味深いことに、このグルタミン・アスパラギンリピートのない蛋白質は新規な酵母プリオンであることが以下の実験から明らかになった。Sug5 蛋白質の凝集体は野生型をプリオン感染させることがその精製蛋白質の凝集体 (アミロイド) を直接酵母へ導入させる手法から明らかになった。また、そのプリオン化した一倍体の酵母は、野生型の一倍体と交配し二倍体にすることで優性遺伝を示した。さらに、プリオン化した酵母では、Sug5 蛋白質が凝集していることが蛍光顕微鏡観察や細胞分画による実験から明らかになった。また重要なことに、分子シャペロン Hsp104 の欠損および過剰発現の両方で、プリオン状態が野生型に変換されるといふ、ゲノムの変化を伴わないプリオン状態の喪失が見られた。これは酵母プリオンに特徴的な現象である。

以上から、本研究で用いたスクリーニング系は新規なプリオン蛋白質や機能性アミロイドの探索に優れており、一方、このような共凝集化は比較的一般的に起こり得ることであり、それは生体内でもプリオン化の誘導などの重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

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 5 件)

- (1) 田中元雅、アミロイド構造による神経変性部位特異性の制御、生物物理、印刷中 (2010).
- (2) 田中元雅、神経変性疾患におけるアミロイドの構造多型とその生理的影響、実験医学、27、1340-1344 (2009).
- (3) Nekooki-Machida, Y., Kurosawa, M., Nukina, N., Ito, K., Oda, T., Tanaka, M. Distinct conformations of in vitro an

d in vivo amyloids of huntingtin-exon1 show different cytotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 9679-9684 (2009).

(4) McDobald M., Kendall A., Tanaka M., Weissman JS, Stubbs G. Enclosed chambers for humidity control and sample containment in fiber diffraction. J. Appl. Cryst., 41, 206-209 (2008).

(5) 田中元雅、酵母を使ってプリオン病を理解する、化学と生物、45、676-678 (2007).

[学会発表] (計 6 件)

(1) 鈴木元治郎・嶋津直之・小見悠介・田中元雅、出芽酵母における新規アミロイド形成タンパク質の探索とその機能解析、第 32 回 日本分子生物学会年会、2009.12.9、横浜市。

(2) 田中元雅、生物科学のドグマの確立：プリオン現象 (アミロイド研究) がもたらす新規な知見、大阪大学蛋白質研究所セミナー、2009.7.14、吹田市。

(3) 嶋津直之・鈴木元治郎・田中元雅、出芽酵母における新規アミロイド形成タンパク質の探索とその機能解析、BMB2008、2008.12.10、横浜市。

(4) 田中元雅、蛋白質凝集体に着目したポリグルタミン病の病態解明、病態脳 平成 20 年度 夏のワークショップ、2008.8.9、札幌市。

(5) Motomasa Tanaka, Yumiko Ohhashi, The physical basis of strain diversity in the yeast prion [*PSI*⁺] system. 第 40 回日本発生物学会・第 59 回日本細胞生物学会 合同大会、2007. 5. 28、福岡市。

(6) Motomasa Tanaka, Yumiko Ohhashi, The physical basis of diversity of prion strain phenotypes. CNRS Jacques Monod conference on protein misfolding and aggregation in ageing and disease. 2007. 4. 13. Roscoff, France.

[図書] (計 3 件)

(1) Tanaka, M. "A protein transformation protocol for introducing yeast prion particles into yeast" Methods in Enzymology (Guide to Yeast Genetics: Functional genomics, proteomics and other systems analysis, 2nd edition), 470, 681-693 (2010).

(2) 田中元雅、プリオン病の感染・伝搬におけるプリオン仮説の現状、実験医学増刊号、脳神経疾患の分子病態と治療への展開、貫名信行、西川徹編 (羊土社) 25, 115-121 (2007).

(3) 田中元雅、酵母プリオン [*PSI*⁺] の系を用いた

プリオン感染・伝播機構の解明、神経変性疾患のサイエンス、高橋良輔編(南山堂)、129-138(2007).

〔その他〕

ホームページ等

(1) http://www.brain.riken.jp/jp/m_tanaka.html

(2) http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2009/090526_2/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 元雅 (Tanaka Motomasa)

独立行政法人理化学研究所・田中研究ユニッ

ト・ユニットリーダー

研究者番号：40321781