

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09755

研究課題名(和文)ポリグルタミン蛋白質による異常コンフォメーション転移の伝播機構解明

研究課題名(英文)Transmission mechanism of abnormal conformational transition of polyglutamine protein

研究代表者

小澤 大作(Ozawa, Daisaku)

大阪大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：60554524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン病では、異常構造を獲得したプリオン蛋白質モノマーがモノマー間で異常構造を伝播するというプリオン仮説が提唱されているが、このような異常構造伝播は実験的には証明されておらず未だ仮説のままである。さらに、他の神経変性疾患関連蛋白質でこのプリオン様の異常構造伝播が起きるかは不明である。本研究では、モデルポリグルタミン蛋白質を用いて、プリオン仮説に基づいた蛋白質モノマー間での異常構造伝播を実験的に証明することに成功した。このような異常構造伝播は、神経変性疾患関連蛋白質に共通する普遍的な機構かもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究による蛋白質のミスフォールディングの実態と異常コンフォメーションの伝播機構の解明は、神経変性疾患で起きうる蛋白質のプリオン現象の共通の分子機構の理解に貢献する。さらに、神経変性疾患の治療・予防法の開発への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Abnormal conformational change of proteins is thought to be a common molecular mechanism of many neurodegenerative diseases. In prion hypothesis, it has been proposed that monomeric misfolded proteins transmit its abnormal structure to native proteins and then form newly misfolded protein monomers. However, the prion hypothesis has not been experimentally proven yet. Moreover, whether the similar phenomenon occurs in other disease-related proteins is unknown. Here, we examined the molecular mechanism of conformational transmission of polyglutamine protein. We revealed that monomeric β -sheet thio-polyQ transmits its β -sheet structure to monomeric α -helix thio-polyQ and then replicates newly monomeric β -sheet thio-polyQ. These results revealed the prion-like conformational transmission between polyglutamine protein monomers, providing experimental evidence for the prion hypothesis. It may be a common phenomenon for neurodegenerative diseases-related proteins.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：ポリグルタミン アミロイド 神経変性疾患 プリオン

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病やプリオン病、パーキンソン病、ポリグルタミン病など多くの神経変性疾患において、一部の蛋白質がしばしば天然構造からミスフォールディングし、アミロイド線維と呼ばれる繊維状に連なった異常な凝集体を細胞内外で形成することで、神経変性を引き起こすという共通の発症分子機序が存在し、コンフォメーション病と総称されるようになった (Chiti, F. and Dobson, C. M., *Nat. Chem. Biol.* 2009)。アミロイド線維は、30 種以上の深刻な疾病に関与しており、それぞれの疾病でアミロイド線維を形成する蛋白質は異なる。近年、アミロイド線維形成は、蛋白質に備わっている普遍的性質であると考えられており (Knowles, T. P. *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014)。これら疾病の治療・予防法の開発のためには、蛋白質がどのように連続的にミスフォールディングし、アミロイド線維を形成するのか共通の分子機構を解明することは極めて重要である。

アミロイド線維は、核形成と線維伸長の 2 段階からなる。核形成過程はエネルギー障壁が高く、アミロイド線維形成反応における律速段階であり、線維形成の最も必要不可欠なイベントである。一旦、核が形成されるとモノマーが次々に結合し、線維は迅速に伸長する。線維伸長は、断片化した線維 (シード) をモノマー溶液に添加することで、試験管内で容易に観測できる。一方、核形成は、一過性の蛋白質の異常コンフォメーション転移や蛋白質間相互作用が関与しているため、実態を捉えることが非常に困難であるため、アミロイド性蛋白質の核形成過程の詳細はいまだ不明である。

ポリグルタミン病は、様々な原因蛋白質内のポリグルタミン鎖の異常伸長 (>40) により発症するハンチントン病や種々の脊髄小脳失調症など 9 疾患の総称で、異常伸長ポリグルタミン鎖を持つ変異蛋白質がミスフォールディングを経て、神経細胞内にアミロイド線維を形成する。申請者の研究室では、世界に先駆けて、異常伸長ポリグルタミン蛋白質が、核形成前のモノマーの段階で、正常構造 (α ヘリックス構造) から異常構造 (β シート構造) への異常コンフォメーション転移を引き起こすことを明らかにしており、さらにこの β シート構造を持つモノマー自体が細胞毒性を発揮することを示した (Nagai, Y. *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007)。本研究では、このミスフォールディングした β シート構造状態のポリグルタミン蛋白質モノマーを用いて、正常構造モノマーへの異常コンフォメーション転移の伝播機構に迫る。

蛋白質の異常コンフォメーション転移を誘発する機構は未解明であるが、コンフォメーション病の代表的疾患であるプリオン病では、異常構造を持つプリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) モノマーが、近傍にある正常構造のプリオン蛋白質 (PrP^C) モノマーの構造変化を誘発するプリオン仮説が提唱されており、プリオン病では、異常構造プリオン蛋白質 PrP^{Sc} モノマーによる異常コンフォメーションの伝播が起き、感染が起きると考えられている (Prusiner, S. B., *Science* 1991)。最近、透析アミロイドーシスの原因蛋白質である β_2 -ミクログロブリンの C 末端が 6 残基欠損した Δ N6 β_2 -ミクログロブリンのアミロイド線維形成中間体のモノマーが、野生型 β_2 -ミクログロブリンモノマーの N 末端領域に作用し、野生型 β_2 -ミクログロブリンの構造変化を誘導することで、アミロイド線維形成を促進することが示された (Eichner, T. *et al.*, *Mol. Cell* 2011)。これは、プリオン現象に基づいた異常構造を持つ蛋白質モノマーによる異常コンフォメーションの伝播を示唆する。神経変性疾患における異常蛋白質凝集は、病初期には脳内の限定された部位で始まり、徐々に脳内広範囲へと広まって病態が進行する。実際の病態の広がりには、このような異常構造を持つモノマーが関与している場合、今後の疾患の治療・予防法のターゲットの一つはこのようなミスフォールディングした異常構造モノマーになりうる。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの申請者の医学と理学の両面のアミロイド研究の知見から、ポリグルタミン蛋白質による異常コンフォメーション転移の伝播機構を捉え、神経変性疾患の病態解明とその治療・予防法の開発の端緒を掴むことを目的とする。

(1) β シート構造を持つポリグルタミン蛋白質モノマーによる、正常構造モノマーへの異常コンフォメーション転移の伝播を証明する。さらに、異常コンフォメーション転移の伝播の分子機構を明らかにする。

(2) β シート構造を獲得したモノマーによる細胞毒性や機能障害を解析する。

3. 研究の方法

本研究では、モデル蛋白質として、以前確立したモノマー状態での正常構造 (α ヘリックス)

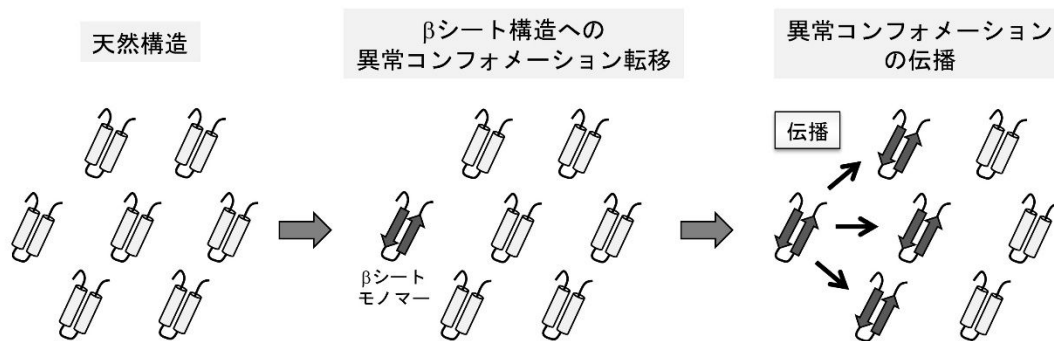
から異常構造（ β シート）への異常構造転移を検出できるチオレドキシシン融合ポリグルタミン蛋白質（Thio-polyQ）を用いた。

（１）濁度測定や円偏光二色性測定、nondenaturing PAGE により、ポリグルタミン蛋白質の β シートモノマーから正常モノマーへの異常コンフォメーション転移の伝播を評価した。異常構造伝播により β シート構造を獲得したポリグルタミン蛋白質の会合状態を、超遠心分析により解析した。

（２） β シートモノマーをマイクロインジェクターにより培養細胞内に導入し、生細胞数から β シートモノマーの細胞毒性を評価した。また、 β シートモノマーをトランスフェクション試薬で線虫内に導入し、線虫の咽頭のポンピング運動を観察することで β シートモノマーによる線虫の咽頭の機能障害を評価した。

４．研究成果

（１）ポリグルタミン蛋白質の異常コンフォメーション伝播機構を解明するため、 β シート構造化した 62 残基のポリグルタミン鎖を持つ Thio-Q62 モノマーを正常構造の α ヘリックス Thio-Q62 モノマーに添加し、その影響を解析した。濁度測定や円偏光二色性測定、nondenaturing PAGE の結果から、 β シート Thio-Q62 モノマーの少量の添加により、 α ヘリックス Thio-Q62 の β シート構造転移が促進された。また、 β シート Thio-Q62 モノマーは、健常者で見られるような短いポリグルタミン鎖長の Thio-Q35 モノマーにも異常構造を伝播し、 β シート Thio-Q35 が次々と形成されることが明らかになった。また、その β シート転移した Thio-Q35 は、モノマー状態であることが超遠心分析から明らかとなった。一方、Thio-Q62 アミロイド線維の添加では、 β シートモノマーが形成されないことが明らかとなった。以上の結果から、異常構造 Thio-polyQ は正常構造 Thio-polyQ へその異常構造を伝播することが示され、ポリグルタミン蛋白質モノマー間で異常構造伝播が起きている可能性が示唆された（図）。このような異常コンフォメーション伝播は、神経変性疾患関連蛋白質に共通する普遍的な機構かもしれない。



図．ポリグルタミン蛋白質による異常コンフォメーションの伝播機構モデル

（２） β シート Thio-Q35 モノマーを単離し、マイクロインジェクターを用いて HeLa 細胞内に導入すると HeLa 細胞の増殖が遅くなり、 α ヘリックス Thio-Q35 モノマーと比較し、 β シート Thio-Q35 モノマーは細胞毒性を発揮することが示された。次に、 β シート Thio-Q35 モノマーが in vivo において線虫の神経系の機能障害を引き起こすか検討した。 β シート Thio-Q35 モノマーをトランスフェクション試薬で線虫内に導入し、線虫の咽頭のポンピング運動を評価した。その結果、 α ヘリックス Thio-Q35 モノマーと比較し、 β シート Thio-Q35 モノマーの導入において、ポンピング回数が有意に減少した。このことから、 β シート Thio-Q35 モノマーは in vivo において線虫の咽頭の神経細胞にも影響を与えることが示唆された。これらの結果から、ポリグルタミン蛋白質は、異常構造を獲得すると毒性を発揮し神経系の機能障害を引き起こす可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Minakawa EN, Popiel HA, Tada M, Takahashi T, Yamane H, Saitoh Y, Takahashi Y, Ozawa D, Takeda A, Takeuchi T, Okamoto Y, Yamamoto K, Suzuki M, Fujita H, Ito C, Yagihara H, Saito Y, Watase K, Adachi H, Katsuno M, Mochizuki H, Shiraki K, Sobue G, Toda T, Wada K, Onodera O, Nagai Y	4. 巻 143
2. 論文標題 Arginine is a disease modifier for polyQ disease models that stabilizes polyQ protein conformation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 1811-1825
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/brain/awaa115.	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小澤大作、武内敏秀、永井義隆
2. 発表標題 ポリグルタミン蛋白質によるプリオン様異常構造伝播
3. 学会等名 第7回アミロイドーシス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤大作、永井義隆
2. 発表標題 ポリグルタミン蛋白質による異常構造伝播
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisaku Ozawa, Toshihide Takeuchi, Yoshitaka Nagai
2. 発表標題 Conformational transmission between polyglutamine protein monomers
3. 学会等名 Asian Pacific Prion Symposium 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤大作、武内敏秀、永井義隆
2. 発表標題 ポリグルタミン蛋白質によるプリオン様異常構造伝播
3. 学会等名 第14回日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤大作、武内敏秀、永井義隆
2. 発表標題 ポリグルタミン蛋白質による異常構造伝播機構の解明
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小澤大作、永井義隆
2. 発表標題 神経変性疾患と液-液相分離
3. 学会等名 第2回LLPS研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisaku Ozawa, Toshihide Takeuchi, Yoshitaka Nagai
2. 発表標題 Prion-like conformational transmission of polyglutamine protein
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤大作、武内敏秀、永井義隆
2. 発表標題 ポリグルタミン蛋白質による異常構造伝播機構の解明
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小澤大作、武内敏秀、永井義隆	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 283
3. 書名 タンパク質のアモルファス凝集と溶解性	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------