

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 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：82611

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2009～2012

課題番号：21200072

研究課題名（和文）アミロイド蛋白質の異常コンフォメーション伝播性の証明と早期診断法への応用

研究課題名（英文）Demonstration of the abnormal conformational transition of amyloid proteins and its application as an early diagnostic tool

研究代表者

ポピエル ヘレナ・明子（POPIEL HELENA AKIKO）

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター

神経研究所 疾病研究第四部・科研費研究員

研究者番号：40467593

研究成果の概要（和文）：

本研究では、プリオン病でおこるプリオン蛋白質の異常構造の伝播同様に、神経変性疾患 PolyQ 病の原因蛋白質の異常構造の伝播の証明と、さらに構造の伝播の性質を応用し、微量な異常構造 PolyQ 蛋白質を検出できる系の確立を目指した。正常構造の PolyQ 蛋白質に微量の異常構造の PolyQ 蛋白質を添加することにより、異常構造への変化が促進できることを見出した。さらに異常構造蛋白質の検出系には、濁度を用いた方法と蛍光を用いた方法を検討し、どちらも感度は同程度であることを見出した。さらに PolyQ 蛋白質が効率良く異常構造変化を起こす精製条件も確立した。

研究成果の概要（英文）：

In the prion diseases, the abnormal structure of the disease-causing protein is transmitted to proteins with a normal structure. In this study, we aimed to elucidate whether the abnormal structure of the disease-causing proteins of the polyglutamine (polyQ) neurodegenerative diseases can also be transmitted, and whether this phenomenon could be used for detection of minute levels of abnormal polyQ proteins. We found that addition of a minute level of abnormal polyQ protein to normal polyQ proteins causes acceleration of the structural transition of the proteins. Furthermore, for detection of proteins with an abnormal structure, we analyzed systems involving both turbidity as well as fluorescence, and found that they both had equal sensitivity. We also determined a purification method of the polyQ protein that allows structural transition of the protein at high efficiency.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2010 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2011 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2012 年度	3,868,964	1,160,689	5,029,653
年度	0	0	0
総計	23,100,000	6,930,000	30,030,000

研究分野：分子生物学 生化学 神経内化学

科研費の分科・細目：生物化学、内科系臨床医学・構造生物学、神経内科学

キーワード：神経変性疾患、ポルグルタミン病、バイオマーカー、コンフォメーション伝播、アミロイド

1. 研究開始当初の背景

近年、蛋白質のフォールディング異常に起因するヒトの病態が認識されるようになり、コンフォメーション病/フォールディング病という概念が提唱されている。アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン (PolyQ) 病、プリオン病などの多くの神経変性疾患がこれに含まれると考えられており、これらの疾患ではそれぞれ異なる蛋白質がいずれも β シート構造に富んだ難溶性のアミロイド様凝集体を形成して神経細胞内外に蓄積することが知られている。

PolyQ 病は、様々な原因蛋白質内の PolyQ 鎖の異常伸長 (>40) により発症するハンチントン病、種々の脊髄小脳失調症など 9 つの遺伝性神経変性疾患の総称で、これらの疾患では異常伸長 PolyQ 鎖を持つ変異蛋白質がミスフォールディングを起こし、その結果難溶性の凝集体を形成して神経細胞内に蓄積し、最終的に神経変性を引き起こすと考えられている。申請者らは、このカスケードの中で最も上流に位置する異常伸長 PolyQ 蛋白質のミスフォールディングが治療標的として最適であると考えて、詳細な蛋白質構造解析を行ってきた。そして最近、円偏光二色性分散 (CD)・超遠心分析などの結果から、異常伸長 PolyQ 蛋白質は凝集する前にモノマーの段階で β シート構造への異常コンフォメーション変移を獲得し、その結果難溶性のアミロイド線維様凝集体を形成することを明らかにした。そして培養細胞へのマイクロインジェクション実験から、 β シート構造へ変移した可溶性モノマー・オリゴマーが細胞毒性を発揮することを初めて明らかにした (*Nature Struct Mol Biol*, 2007、*J Biol Chem*, 2007)。

このような蛋白質の異常コンフォメーション変移は、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良く研究されており、異常構造のプリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) が正常プリオン蛋白質 (PrP^C) の構造変化を誘発するという、いわゆる「プリオン仮説」が提唱され、プリオン病が PrP^{Sc} を介

して伝播すると考えられている (Prusiner SB *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13363, 1998)。一方他のコンフォメーション病では、一旦形成されたアミロイド線維がシードとなって可溶性蛋白質のアミロイド線維形成を誘発することが知られており、その根底にはやはり蛋白質の異常コンフォメーションの伝播の可能性が示唆されているが、これまで明確な証明はなされていない (Lundmark K et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6979, 2002)。一方、申請者らは異常伸長 PolyQ 蛋白質の異常コンフォメーション変移・凝集体形成を標的とした治療法開発を目指して、PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1 (*J Biol Chem*, 2000) が異常伸長 PolyQ 蛋白質の β シート構造への異常コンフォメーション変移・凝集を阻害し (*Nature Struct Mol Biol*, 2007、*J Biol Chem*, 2007)、PolyQ 病モデル動物の神経変性を抑制することを明らかにした (*Hum Mol Genet*, 2003、*Mol Ther*, 2007、*Neurosci Lett*, 2009)。

2. 研究の目的

本研究では、コンフォメーション病の発症メカニズムの解明および治療法確立を目指し、1) 異常構造へ変移した PolyQ 蛋白質から正常構造の PolyQ 蛋白質への異常コンフォメーションの伝播性を解明し、これが一般的に蛋白質に備わっている普遍的な機構であることを証明する。さらに 2) この異常コンフォメーションの伝播性を応用した新規試験管内シード増幅法を樹立して、患者の脳脊髄液中に漏出する微量な β シート構造体や凝集体などの高感度な検出を可能にし、緩徐進行性の神経変性疾患の短期間での薬効評価に適した疾患バイオマーカーを確立する。

3. 研究の方法

PolyQ 鎖の溶解度を改善するために、チオレドキシシンと融合させたモデル蛋白質 Thio-PolyQ を大腸菌から発現・精製して、用いた。異常伸長 PolyQ 鎖を持つ Thio-PolyQ は、37°Cでのインキュベーションに

より、経時的、濃度依存のかつ PolyQ 鎖長依存的に α ヘリックス構造から β シート構造への異常コンフォメーション変移を生じて、その結果アミロイド線維様凝集体を形成する。

まず β シート変移した異常伸長 PolyQ 蛋白質が正常コンフォメーションの異常伸長 PolyQ 蛋白質の二次構造、凝集体形成に与える影響を検討した。あらかじめインキュベーションして β シート構造への変移を確認した Thio-Q62 の β シートモノマーを、新たに精製した α ヘリックス構造の Thio-Q62 にシードとして少量添加した時の二次構造および凝集体形成に対する影響を CD と濁度測定法にて検討した。さらに Thio-Q62 の凝集体をシードとして少量添加した時の二次構造、凝集体形成に与える影響も同様に検討した。そして添加するシード量がコンフォメーション伝播効率に与える影響などを解析した。さらに系の感度を上げるため、従来凝集体形成の検出に使用していた濁度測定法よりも感度の高い測定法を確立するため、チオフラビン T(ThT)アッセイおよび FRET 法の系を用いて Thio-Q62 の凝集体形成の検出を検討した。Thio-Q62 の精製法に関しても Thio-Q62 蛋白質がよりゆっくりとコンフォメーション変化を起こす条件を検討した。

4. 研究成果

まず、あらかじめ形成させたモデル蛋白質 Thio-Q62 の凝集体シードを、新たに精製した可溶性 Thio-Q62 溶液に添加したところ、新規の Thio-Q62 凝集体形成が誘発・増幅されることを見出した。しかし、可溶性 Thio-Q62 を基質に用いた場合、シード添加なしでも基質自身が凝集体を形成するため、アッセイ系のバックグラウンドが高く、擬陽性の可能性が高いという問題が明らかになった。そこで次に、自発的な凝集体形成を生じない正常鎖長の Thio-Q35 を基質として用いて、クロスシーディングを利用したアッセイ系を検討した。あらかじめ形成させた Thio-Q62 の凝集体シードを、新たに精製した可溶性 Thio-Q35 溶液に添加したところ、Thio-Q62 よりも効率は低いものの新規の Thio-Q35 凝集体形成を誘発・増幅させることに成功した。さらにこの Thio-Q35 凝集体形成の誘発・増幅は、添加した Thio-Q62 凝集体シード量依存的であり、定量性に優れかつバックグラウンドの低い凝集体検出アッセイ系を構築することに成功した。

さらにアッセイ系の感度を上げる為に ThT

アッセイを用いて Thio-Q62 凝集体の検出を検討したところ、Ex405/Em500 でバックグラウンドが少なく濃度依存的なシグナルが確認できた。しかし検出感度は濁度測定法と変わらず、Thio-Q62 1 mM 程度であった。FRET 法の検討では、合成 PolyQ ペプチドを用いた。FITC-TRITC で蛍光ラベルをした正常鎖長の PolyQ25 ペプチドに Thio-Q62 の凝集体シードを添加することにより、Q25 の凝集体形成を高感度で検出することに成功した。さらに異常伸長鎖の Q81-GFP、および正常鎖長の Q35-GFP および Q19-GFP を発現する培養細胞の抽出液を Q25 ペプチドに添加し、この系で Q81-GFP の凝集体を特異的に検出できるかを検討したところ、抽出液を部分的に精製することにより凝集体の特異的な検出が可能であることが明らかとなった。そして Thio-Q62 の精製法に関しては、TALON ビーズを用いた精製後にイオン交換カラムで精製し、最終的に超遠心をかけて微量なシードをサンプルから除いておくことで Thio-Q62 のコンフォメーション変化がより確実に検出できることを見出した。

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) Popiel HA, Takeuchi T, Burke JR, Strittmatter WJ, Toda T, Wada K, Nagai Y. Inhibition of protein misfolding/aggregation using polyglutamine binding peptide QBP1 as a therapy for the polyglutamine diseases, *Neurotherapeutics*, in press, 2013 査読有
<http://link.springer.com/article/10.1007%2F13311-013-0184-7>
- 2) Popiel HA, Takeuchi T, Fujita H, Yamamoto K, Ito C, Yamane H, Muramatsu S, Toda T, Wada K, Nagai Y. Hsp40 gene therapy exerts therapeutic effects on polyglutamine disease mice via a non-cell autonomous mechanism, *PLoS ONE*, 7(11):e52069, 2013 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0051069
- 3) Popiel HA, Burke JR, Strittmatter WJ, Oishi S, Fujii N, Takeuchi T, Toda T, Wada K, Nagai Y. The aggregation inhibitor peptide QBP1 as a therapeutic molecule for the polyglutamine neurodegenerative diseases, *J Amino Acids*, 2011:265084, 2011 査読有
DOI: 10.4061/2011/265084
- 4) Rahman MS, Nagai Y, Popiel HA, Fujikake N,

Okamoto Y, Ahmed MU, Islam MA, Islam MT, Ahmed S, Rahman KM, Uddin MJ, Dey SK, Ahmed Q, Hossain MA, Jahan N, Toda T. Genetic testing for Huntington's disease in Parkinsonism, Mymensingh Med J, 19, 510-514, 2010 査読有

<http://www.banglajol.info/index.php/MMJ/article/view/6708>

- 5) Nagai Y, Fujikake N, Popiel HA, Wada K. Induction of molecular chaperones as a therapeutic strategy for the polyglutamine diseases, Curr Pharm Biotechnol, 11, 188-197, 2010 査読有

<http://www.eurekaselect.com/71304/article>

[学会発表] (計 17 件)

- 1) ポピエル ヘレナ 明子, 凝集阻害分子の遺伝子治療によるポリグルタミン病モデルマウスに対する治療効果, 第 52 回に本神経学会学術大会, 2011.5.18, 名古屋
- 2) Popiel HA, Molecular chaperone gene therapy ameliorates neurological phenotypes and protein aggregation in polyglutamine neurodegenerative disease mice, 3rd International Symposium on Protein Community, 2010.9.13, 奈良
- 3) ポピエル 明子, 凝集阻害分子を用いた遺伝子治療によるポリグルタミン病モデルマウスの神経症状と封入体形成の抑制, 第 33 回日本神経科学会・第 53 回日本神経科学会合同大会, 2010.9.2, 神戸
- 4) Popiel HA, Towards designing chemical analogues of the polyglutamine aggregation inhibitor peptide QBP1: a structure-activity relationship study on QBP1, 5th Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders, 2009.5.31, New Hampshire, USA
- 5) ポピエル 明子, ポリグルタミン病モデルマウスに対する凝集阻害ペプチド QBP1 を用いた遺伝子治療, 第 82 回日本生化学会, 2009.10.21, 神戸

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r4/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

ポピエル ヘレナ・明子 (Popiel Helena Akiko)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部・科研費研究員

研究者番号 : 40467593

(3)連携研究者

永井 義隆 (Yoshitaka Nagai)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部・室長

研究者番号 : 60335354

青木 正志 (Masashi Aoki)

東北大学 医学系研究科 神経内科学分野・教授

研究者番号 : 70302148