

機関番号：13101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790837

研究課題名 (和文) ポリグルタミン鎖の特異的構造変化と自己重合による神経変性の解明および治療戦略

研究課題名 (英文) Study on a molecular basis for the cytotoxicity induced by polyglutamine proteins.

研究代表者

高橋 俊昭 (TAKAHASHI TOSHIAKI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：70377191

研究成果の概要 (和文)：本研究では、ポリグルタミン鎖の多量体形成が細胞傷害性獲得に重要か否かを検討した。多量体形成に進まず単量体に留まるコンストラクトを作製し、単量体の細胞傷害性について検討した。単量体のポリグルタミン鎖を発現する細胞では、ポリグルタミン鎖非発現細胞に比し、有意な細胞傷害性は認めず、重合形成をするポリグルタミン鎖において細胞傷害性が確認された。このことより、細胞傷害性獲得には重合体形成が重要な起点であることを示した。また単量体ポリグルタミン鎖に対する Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 解析で、伸長ポリグルタミン鎖は、シリンダー状のチューブ構造をとる可能性を示した。

研究成果の概要 (英文)：To assess potential a conformational change of an expanded polyglutamine monomer in living cells, I used single molecular fluorescence resonance energy transfer (FRET) methods in living cells. On the basis of the FRET microscopic observation, a polyglutamine monomer forms a cylindrical structure. However, these cylindrical monomers had no cytotoxicity in neuronally differentiated cells. Furthermore, it was shown that polyglutamine oligomers induced greater cytotoxicity than these polyglutamine monomers. These findings support the hypothesis that polyglutamine oligomers have an important initiation of cytotoxicities.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2010 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学，神経内科学

キーワード：神経変性，ポリグルタミン病，モノマー，オリゴマー，FRET

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに 9 種類の小脳失調を中核とする遺伝性神経変性疾患において原因蛋白中のグルタミン連続配列領域 (ポリグルタミン) の伸長増大が疾病を引き起こすことが示され

ている。この共通した特性により、これらの疾患群はポリグルタミン病と包括される。これまでの知見では、増大したポリグルタミン鎖が conformational change を介し自己重合 (二量体～オリゴマー形成) する過程に細胞

傷害性が推察されている。自身は、ポリグルタミン鎖の重合過程を可視化する FRET (fluorescence resonance energy transfer: 蛍光共鳴エネルギー移動) システムを構築し、封入体形成前の可溶性の段階に細胞傷害性があることを論文報告した (Takahashi T et al. *Human Molecular Genetics*.17(3):345-56,2008)。しかし、単量体から細胞傷害性を発揮するのか、重合体形成過程に細胞傷害性を獲得するのか、依然、未解明な点が多い。今後の治療研究において、分子標的となる構造すなわち、細胞傷害の起点となる構造を同定することが重要な課題となっている。

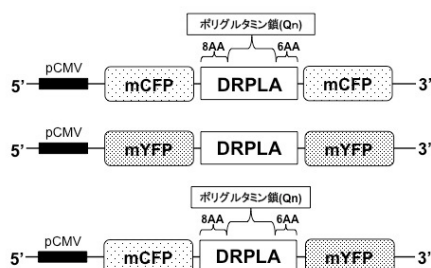
## 2. 研究の目的

ポリグルタミン単量体は、精製蛋白状態、もしくは生細胞内においても重合プロセスが進行するため、純粋な単量体の細胞傷害性を検討する実験系の構築が困難である。本研究では、重合をおこさず、単量体でとどまるポリグルタミン鎖コンストラクトを設計し、単量体から細胞傷害性を発揮するのか、重合形成が細胞傷害性獲得の起点となるかどうかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 重合形成しないポリグルタミン鎖コンストラクトの作製 ポリグルタミン鎖 (部分 DRPLA 蛋白:正常 Q12 および異常伸長 Q56, Q90) の N 末に monomeric CFP (mCFP)、C 末に monomeric YFP (mYFP) の合成蛋白を発現するコンストラクトを製作し、これを安定発現する SH-SY5Y 細胞株を樹立する。

(図 1:作製コンストラクト)



(2) 生存-時間解析 (重合体形成細胞 v.s. 単量体発現細胞)

作成した細胞株を retinoic acid 10  $\mu$ M 添加 5 日間、brain derived neurotrophic factor (BDNF) 50  $\mu$ M 添加 3 日間による神経分化誘導を行なう。その後、FRET 解析で重合形成細胞を判別する。細胞はグリッド付のガラスボトムデッシュで培養し、各細胞の位置を座標によりアドレス付けし、経時的な追視を可能にする。神経分化後、約 7 日間の観察を継続し、ポリグルタミン重合形成細胞とポリグルタミン単量体発現細胞間の生存-時間比較解析

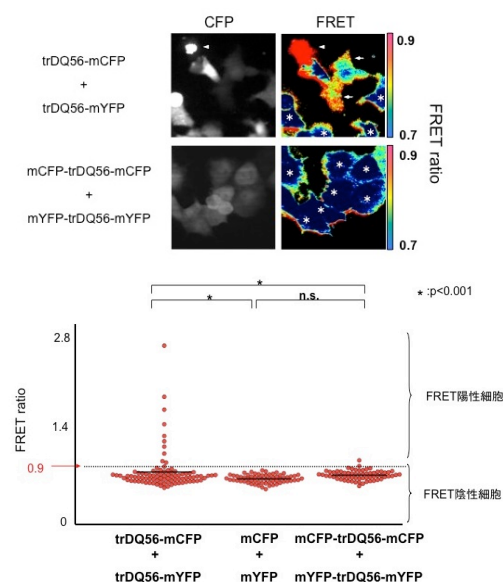
(Kaplan-Meier 法)を行う。

## (3) 立体構造解析

単量体ポリグルタミン鎖 [mCFP (ドナー)-部分 DRPLA 蛋白-mYFP (アクセプター)] 発現細胞 (SH-SY5Y)において、一分子内 FRET 解析により単量体ポリグルタミン鎖の立体構造を検討する。ポリグルタミン鎖長を段階的に変えたコンストラクトを追加作成し、SH-SY5Y 細胞へ transfection により一過性発現させ、同様に各細胞内の一分子内 FRET 値を取得する。FRET 値はドナー(mCFP)とアクセプター(mYFP)の距離に依存して増加するため、ポリグルタミン鎖長の変化に伴う FRET 値の増減を解析することにより、各ポリグルタミン鎖長が形成する立体構造を考察する。

## 4. 研究成果

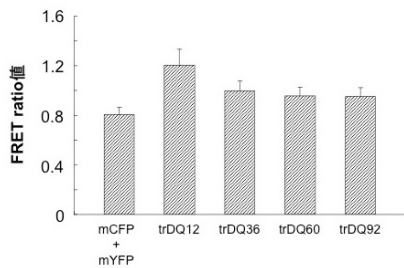
(1) 56 リピートのポリグルタミン鎖の部分 DRPLA 蛋白 (trDQ56)の両端を mCFP で蛍光蛋白標識したコンストラクト (mCFP-trDQ56-mCFP)と mYFP で蛍光蛋白標識したコンストラクト (mYFP-trDQ56-mYFP)の発現ベクターを作成し、COS7 細胞に共発現させ、FRET microscopy による観察を行った。mCFP-trDQ56-mCFP と mYFP-trDQ56-mYFP を共発現させた細胞の FRET 値は、単量体蛋白である mCFP と mYFP を共発現させた細胞の FRET 値と有意差を認めなかった (trD56-mCFP+trD56-mYFP;最小値 0.60 最大値 2.75 平均値 0.77, mCFP+mYFP;最小値 0.60 最大値 0.89 平均値 0.73, mCFP-trDQ56-mCFP + mYFP-trDQ56-mYFP; 最小値 0.61 最大値 1.00 平均値 0.78;有意差なし, Turkey HSD検定)。(図 2:単量体ポリグルタミンの FRET 解析)



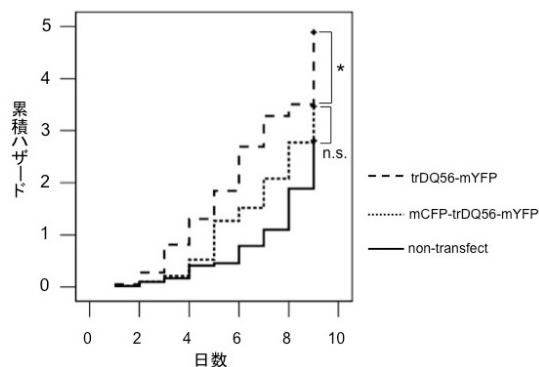
さらに重合形成が起こっていないことを確認する目的で、mYFP-trDQ56-mYFP 発現細胞での封入体形成率を COS7 細胞、HEK293T 細胞を用いた一過性発現系で検討した。mYFP-trDQ56-mYFP では、片側を蛍光蛋白標識

した trDQ56 に比して、いずれの細胞においても封入体はほとんど観察されず、封入体形成率は有意に低値を示した (trDQ56-mYFP;COS7 9.3 %±0.005, HEK293T 20.1 %±0.013, mYFP-trDQ56-mYFP;COS7 2.3 %±0.003, HEK293T 2.1 %±0.011) (n=3, 各600 細胞測定 of 平均±標準誤差; p<0.005, Turkey HSD 検定)。

(2) 両端にドナー (mCFP)、アクセプター (mYFP) の蛍光蛋白を付加した伸長ポリグルタミン鎖 (部分DRPLA蛋白: Q36, Q60, Q90: mCFP-trDQn-mYFP) を用い、一分子FRET法を応用して立体構造を検討した。いずれのコンストラクトでもFRET陰性対照であるmCFP+mYFP に比して有意に高いFRET値を認め (mCFP+mYFP 0.81±0.058, mCFP-Q36-mYFP 1.00±0.082, mCFP-Q60-mYFP 0.96±0.073, mCFP-Q90-mYFP 0.95±0.070, 各30細胞測定 of 平均±標準誤差; p<0.001, Turkey HSD検定)、グルタミン伸長によるFRET値の低下をみとめなかった。このことから、伸長ポリグルタミン鎖は、シリンダー構造をとることが示唆された。(図3: 単量体ポリグルタミンの伸長数ごとのFRET値の変化)



(3) 作製した mCFP-trDQn-mYFP コンストラクトは、構造変化のみで多量体形成をしないため、単量体としての細胞傷害性を分化誘導したSH-SY5Y細胞にて検討した。(図4: 細胞死ハザード評価)

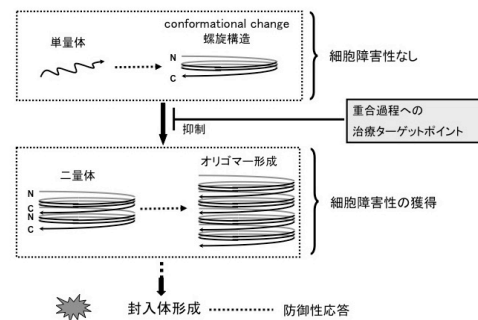


単量体のmCFP-trDQ56-mYFP発現細胞では、無処理のSH-SY5Y細胞と比し、有意なハザード比の上昇は認めず、重合体を形成するtrDQ56-mYFP発現細胞に比し有意に低いハザ

ード比を示した (log-rank検定)。

[考察] ポリグルタミン病の病態機序とその治療ターゲットを考える際に細胞傷害性の起点が単量体か重合体であるかを明らかとすることが重要である。本研究は、構造変化をおこしながら、単量体を保ち続ける伸長ポリグルタミン鎖を用い、単量体のみでは細胞傷害性を示さないことを明らかとし、伸長ポリグルタミン鎖の細胞傷害機序において、重合体の形成が重要な起点であることを示した。今後のポリグルタミン病の治療を検討する上で、ポリグルタミン鎖の重合を阻害する薬剤は有効な分子標的治療であると考えられた。

(図5: まとめ)



## 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1件)

- 1) Takahashi T, Katada S, Onodera O. : Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going? J Mol Cell Biol. 2(4):180-91. 2010. (査読あり)

[学会発表] (計2件)

- 1) 高橋俊昭, 堅田慎一, 小野寺理, 西澤正豊 ポリグルタミン蛋白の立体構造と重合様式の検討. 第50回日本神経学会総会; 2009年5月20日. 宮城県仙台市
- 2) 高橋俊昭, 日高梓, 堅田慎一, 小野寺理, 西澤正豊 PML 発現賦活によるポリグルタミン病の治療検討. 第51回日本神経学会総会 2010年5月21日. 東京都千代田区

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:

出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~neuroweb/laboratory/research\\_basic\\_001.html](http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~neuroweb/laboratory/research_basic_001.html)

にて研究内容の一部を紹介。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 俊昭 (TAKAHASHI TOSHIAKI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：70377191

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：