

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：37104  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23770108  
 研究課題名（和文） ポリグルタミン蛋白質によるミトコンドリア膜構造・ダイナミクス障害の分子機構解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of molecular mechanism of polyglutamine protein induced dysfunction of mitochondrial membrane and dynamics  
 研究代表者  
 伴 匡人（TADATO BAN）  
 久留米大学・分子生命科学研究所・助教  
 研究者番号：23770108

研究成果の概要（和文）：ポリグルタミン病は、蛋白質のミスフォールディングに起因する神経変性疾患である。モデルポリグルタミン蛋白質を用いて、コンフォメーション変化が、蛋白質機能や人工脂質膜との相互作用に与える影響を解析した。その結果、アミロイド線維前駆体に至るコンフォメーション転移により、モデル蛋白質自体の機能が阻害されることがわかった。この結果から、異常なコンフォメーション変化が、ポリグルタミン蛋白質が持つ生理機能を阻害し、細胞機能障害をもたらすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Polyglutamine disease is neurodegenerative disorder caused by protein misfolding and aggregation. In this study, we analyzed the effect of conformational change of model polyglutamine protein to its enzymatic function and interaction with model lipid membrane. We show the enzymatic activity of polyglutamine protein is suppressed by soluble amyloidogenic conformer. This finding indicates that conformational transitions of polyglutamine protein inhibit physiological function and induce cellular dysfunction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：神経変性疾患、ポリグルタミン蛋白質、ミスフォールディング、アミロイド線維、ミトコンドリア、脂質膜、膜ダイナミクス

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質は、そのアミノ酸配列に規定された立体構造にフォールディングして、蛋白質ごとに特化した機能を発現し、生物・細胞の営みに中心的な役割を果たしている。しかし誤ったフォールディング（ミスフォールディング）が起きた場合、線維状の凝集体である「アミロイド線維」の沈着を引き起こし、生命活動を危うくする存在になることが近年明らかになってきた。実際アミロイド線維は、アルツハイマー病やハンチントン病などに関わることが知られており、その形成機構を解明することが緊急の課題となっている。アル

ツハイマー病やポリグルタミン病では、ミトコンドリアの呼吸鎖活性、メンブレンポテンシャル、ATP 生産活性の低下が報告されており、ミスフォールディング蛋白質が、ミトコンドリア機能に障害を与えることが明らかにされている（Bauer et al., J. Neurochem. 110, 1737-1765, 2009）。ポリグルタミン病の原因となるポリグルタミン蛋白質は、ミトコンドリア膜に沈着し機能障害を及ぼすことや（Panov et al., Nat. Neurosci. 5, 731-736, 2002）、単離ミトコンドリアにポリグルタミン蛋白質凝集体を加えると、膜上にポア構造を形成することが報告されており（Choo et al., Hum.

Mol. Genet. 13, 1407-1420, 2004)、ポリグルタミン蛋白質がミトコンドリア膜と直接的に相互作用する可能性が考えられる。またポリグルタミン蛋白質が、ミトコンドリアの異常分裂を促進し、細胞死をもたらすことが報告されている (Wang et al., Hum. Mol. Genet. 18, 737-752, 2009)。さらに、ハンチントン病患者の脳内には、膜ダイナミクスの変異に伴う融合・分裂の平衡異常が報告されており (Kim et al., Hum. Mol. Genet. 19, 3919-3935, 2010)、ミトコンドリア膜構造のみならず、融合・分裂を含む膜ダイナミクスへ与える影響も注目されている。ポリグルタミン蛋白質の細胞毒性は、そのコンフォメーションに大きく依存する (Nagai et al., Nat. Struct. Mol. Biol. 14, 332-340, 2007) が、現在のところ、ポリグルタミン蛋白質のコンフォメーション変化と、ミトコンドリア膜障害を関連づけた研究例はなく、脂質膜上でどのようなコンフォメーション変化を起こし、どのようにして脂質膜に作用するかについては明らかにされていない。以上のことから、脂質膜上に於けるポリグルタミン蛋白質のコンフォメーション及び会合体形成挙動、膜構造・ダイナミクスに与える影響を検討することは、生体内におけるポリグルタミン蛋白質のミトコンドリア膜障害の分子機構解明に極めて重要である。

## 2. 研究の目的

ポリグルタミン病をモデル疾患に選び、アミロイド線維形成機構及びミトコンドリア内膜融合機構に関する申請者の研究成果を有機的に統合し、ポリグルタミン蛋白質のミトコンドリア膜障害の作用機構について知見を得るために、以下の検討を行う。(1) 脂質膜上でのポリグルタミン蛋白質のコンフォメーション変化及び会合体形成機構の解析、(2) 脂質膜構造及び膜融合ダイナミクスに与える影響、(3) ミトコンドリアの形態及び膜構造・ダイナミクスに与える影響。これらの結果を踏まえ、ポリグルタミン病のみならず、ミスフォールディング蛋白質に共通するミトコンドリア膜障害機構モデルを提案する。

## 3. 研究の方法

モデルポリグルタミン蛋白質として、チオレドキシニンにポリグルタミン鎖が融合した蛋白質を用いた (Nagai et al., Nat. Struct. Mol. Biol. 14, 332-340, 2007)。このモデルポリグルタミン蛋白質は、自発的に  $\alpha$  ヘリックス構造から  $\beta$  シート構造へコンフォメーション変化を起こし、細線維状会合体であるアミロイド線維形成に至るので、コンフォメーション変化が、ポリグルタミン蛋白質分子の挙動に与える影響を解析するのに適していると考え

た。グルタミン数の異なるポリグルタミン蛋白質 (Q0、Q19、Q62) を大腸菌で発現し、His-tag アフィニティークロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、研究に用いた。ミトコンドリア膜を模した人工脂質二重膜 (リポソーム) を調製し、リポソーム存在下に於けるポリグルタミン蛋白質のコンフォメーション変化及び会合体形成挙動、またリポソームへの結合挙動を、円偏光二色性スペクトル、チオフラビン T 蛍光測定などの分光手法、SDS-PAGE により解析した。また各コンフォメーションに於けるモデルポリグルタミン蛋白質の活性は、ポリグルタミン鎖に融合したチオレドキシニン活性により調べた。

## 4. 研究成果

### (1) ポリグルタミン蛋白質の冷凍保存技術の確立

今回用いたポリグルタミン蛋白質は、自発的に  $\alpha$  ヘリックス構造から  $\beta$  シート構造へコンフォメーション変化を起こす (Nagai et al., Nat. Struct. Mol. Biol. 14, 332-340, 2007)。しかしながら冷凍保存後に解凍すると、不定型な凝集体を形成し、コンフォメーション変化を調べることができなかった。そこで、精製法や緩衝液の再検討を行い、さらに 100,000 xg の超遠心処理を行うことで、冷凍保存したポリグルタミン蛋白質を解凍しても、これまで報告されているように、再現性よくコンフォメーション変化を検出できるようになり、研究を効率よく行うことができるようになった (図. 1)。

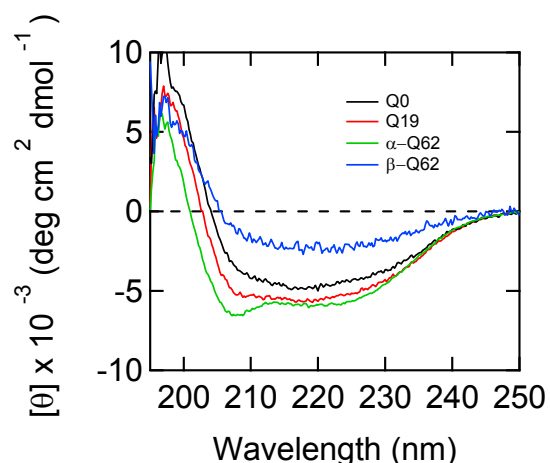


図 1: ポリグルタミン蛋白質のコンフォメーション変化。グルタミン数が増加すると、 $\alpha$  ヘリックス構造から  $\beta$  シート構造へとコンフォメーション変化を起こす。

### (2) ポリグルタミン蛋白質のアミロイド線維

## 形成反応

$\beta$  シート構造を示す Q62 ポリグルタミン蛋白質を、37 度でさらにインキュベートすると、アミロイド線維形成の指示薬として広く使われている蛍光色素チオフラビン T (ThT) の蛍光が、増加することが分かった(図. 2)。さらに電子顕微鏡観察からアミロイド線維を確認することができた(図. 3)。

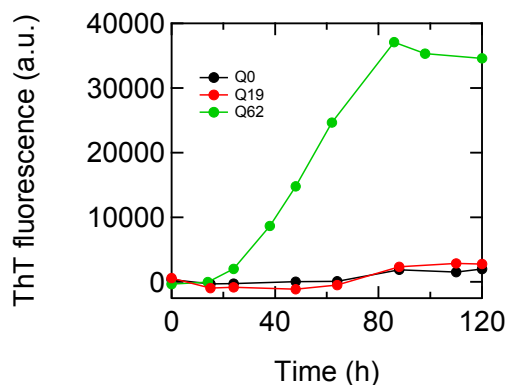


図 2: アミロイド線維形成反応  $\beta$  シート構造を持つ Q62 ポリグルタミン蛋白質に ThT 蛍光の増加が観察された

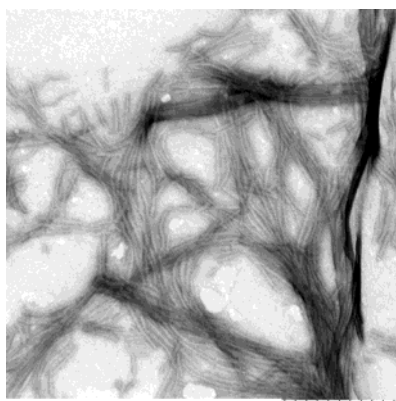


図 3: Q62 ポリグルタミン蛋白質アミロイド線維の電子顕微鏡像

### (3)ポリグルタミン蛋白質のコンフォメーション転移による挙動の違い

続いて、ポリグルタミン蛋白質のコンフォメーション状態や、会合状態が、ポリグルタミン蛋白質自身の機能へどう影響するかを調べた。ポリグルタミン鎖に融合したチオレドキシンの活性を、インシュリンを基質として使い、インシュリンのジスルフィド結合還元によるインシュリン凝集体形成を 650 nm の吸光度変化から解析した。その結果、ポリグルタミン鎖が増えても、顕著なチオレドキシンの活性の差は無いが、 $\alpha$  ヘリックス構造から  $\beta$  シート構造へコンフォメーション変化を起

こすと、活性が低下することが明らかになった(図. 4)。さらに、ポリグルタミン蛋白質の活性部位付近のトリプトファン残基の蛍光スペクトルを測定すると、そのピーク波長が短波長側へシフトすることが分かった(図. 5)。 $\beta$  シート構造へのコンフォメーション変化過程で、トリプトファン残基が、より疎水的環境すなわち、分子内部に移行したことを示している。これらのことから、ポリグルタミン蛋白質のコンフォメーション変化が、蛋白質自身が持つ機能を阻害することが明らかになった。

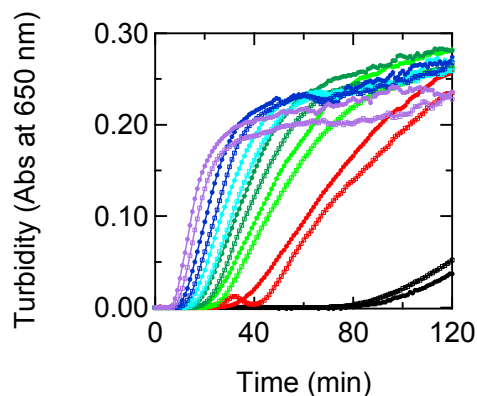


図 4: Q62 ポリグルタミン蛋白質のコンフォメーション転移によるチオレドキシンの活性の変化  $\alpha$  ヘリックスから  $\beta$  シート構造へのコンフォメーション変化が、活性の低下をもたらした。

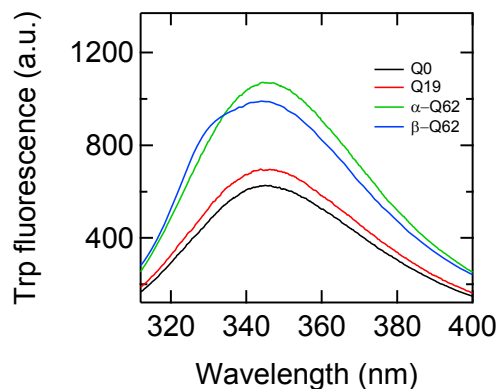


図 5: ポリグルタミン蛋白質の活性部位のトリプトファン残基の蛍光スペクトル  $\beta$  シート構造へのコンフォメーション変化により、ピーク波長が、短波長側に移動する

### (4)ポリグルタミン蛋白質とミトコンドリア膜を模したリポソームとの相互作用

ミトコンドリア外膜・内膜を模したリポソーム存在下でのポリグルタミン蛋白質の会合形成挙動を調べたところ、グルタミン

数や、リポソーム組成によらず、顕著な差は認められなかった。またポリグルタミン蛋白質と、脂質膜との結合状態を調べたところ、 $\alpha$ ヘリックス構造を持つ Q62 と、 $\beta$ シート構造を持つ Q62 にも、有意な差は観察されなかった。また Q62 アミロイド線維に関して、脂質膜との結合を示さなかった。これらの結果は、Q62 ポリグルタミン蛋白質は、ミトコンドリア膜に直接作用しないことを示している。近年、ポリグルタミン蛋白質が、ミトコンドリアの膜構造のみならず、膜ダイナミクスへ寄与が注目されている。今後、ポリグルタミン蛋白質のコンフォメーション変化が、ミトコンドリア融合・分裂の膜ダイナミクスへ与える影響を明らかにするために、ミトコンドリア融合因子のリコンビナント蛋白質をリポソーム内で再構成することで、*in vitro* 膜融合系を構築する予定である。現在、カイコ・バキュロウイルス発現系により、膜融合因子発現の最適化を行っている。

#### 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)

[学会発表] (計 1 件)

伴 匡人、石原 直忠 「再構成 OPA1 を用いたミトコンドリア内膜融合機構の解明」  
日本蛋白質科学会第 13 回年会、2013 年 6 月 14 日 (発表予定)、とりぎん文化会館、鳥取市

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伴 匡人 (TADATO BAN)

久留米大学・分子生命科学研究所・助教

研究者番号：23770108

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし