

# 分子シャペロンプレフォルディンによる病因性 ポリグルタミン蛋白質凝集の抑制効果に関する研究

物質系専攻 47-096005 伊藤 禎宣

指導教員：前田 瑞夫 (教授)

キーワード：ハンチントン病、分子シャペロン、プレフォルディン、ポリグルタミン

## 1. 緒言

ポリグルタミン病の一種であるハンチントン病は、脳の線条体の神経細胞が変性・脱落することで不随意運動、認識力低下、情動障害等の症状を呈する遺伝性脳神経疾患で、1872年に米国のジョージ・ハンチントン医師により報告された。

その病因としては3100余りのアミノ酸残基からなるハンチンチンタンパク質をコードする遺伝子の一部であるエクソン1部位にあるCAG(グルタミンに対応)リピートの異常伸張と考えられており、グルタミン鎖部が36残基以上に伸張した異常ハンチンチンタンパク質をもつ患者に発症率が高いことが知られている[1]。なお、ハンチンチンタンパク質のグルタミン鎖部位の大部分は不安定なランダムコイル構造となっている[2]ため、グルタミン鎖長が長くなるとより凝集しやすくなる。グルタミン鎖が36残基以上になると、細胞毒性のあるアミロイド凝集体を形成しやすくなるとされている。

プレフォルディン(PFD)は、細胞内でタンパク質の構造形成を助ける分子シャペロンタンパク質の一種であり、1998年に発見の報告がなされた[3]。構造は、2つの $\alpha$ 系サブユニットと4つの $\beta$ 系サブユニットの6つの異なるサブユニットからなるクラゲ型をしており、分子量はおよそ100 kDaである。生体内では、折りたたまれていないタンパク質の疎水部分を認識して捕捉し、安定化させることで異常フォールディングを防ぎ、また別の分子シャペロンであるシャペロニンと協調しながらタンパク質の構造形成を補助していると考えられている[4]。

これまでにポリグルタミンタンパク質を用いた先行研究において、哺乳類由来のシャペロニン(CCT)が、長いグルタミン鎖部を有するポリグルタミンタンパク質の凝集を細胞内で阻害していることが示されている[5]。しかし、シャペロニンと協調して働く分子シャペロンであるPFDがポリグルタミンタンパク質の凝集に対してどのような効果があるかについては未解明であった。

そこで本研究では、病因となるポリグルタミンタンパク質の凝集形成の過程におけるPFDの役割について調べることを目的とした。

## 2. 材料

本研究ではハンチンチンタンパク質(Htt)のモデルとして一般的に用いられているポリグルタミンモデルタンパク質 GST-(myc)-Htt PolyQ を使用した。ここでQはグルタミンを表しており、正常型のモデルとしてQが23個連なったもの、異常型のモデルとして53個連なったものを用いた。myc エピトープは、抗体検出のために付加された配列であり、また部位特異的に色素をラベルするためにシステインを myc エピトープの直前に付加した。GSTはアフィニティ精製を容易にするために付加されたタンパク質であるが、一方で polyQ の凝集を抑制する効果を有する。GST と myc の間にはプロテアーゼ切断部位が存在し、プロテアーゼにより GST と(myc)-Htt polyQ とが切れることで凝集が始まる[6]。

上記のように設計されたタンパク質のプラスミドを、大腸菌(BL21(DE3))に導入し、発現させた。菌は37°Cの2×YT培地(2倍濃度のYT培地)

中で 150 rpm の回転攪拌をしながら波長 600 nm での吸光度が 0.6 になるまで培養した。

その後発現誘導剤 IPTG (0.3 mM)を入れて、20°C・170 rpm でさらに 24 時間回転攪拌培養することで、ポリグルタミンモデルタンパク質 GST-(myc)-Htt PolyQ を発現させ、GST 特異吸着性カラム GSTrap HP (GE Healthcare)を用いて精製した。

ヒト由来 PFD は 6 つのサブユニットをそれぞれ大腸菌で発現・精製し、試験管内で再構成したものをを用いた[7]。

### 3.方法

#### ポリグルタミンモデルタンパク質

##### *Htt PolyQ の凝集形成*

GST-(myc)-Htt PolyQ は PreScission プロテアーゼにより GST を切断することで凝集を開始する。本実験では、3 $\mu$ M GST-(myc)-Htt PolyQ 溶液に PreScission プロテアーゼを添加してから 30°C で 12 時間インキュベートすることで凝集形成反応を行った。一方で PFD による凝集形成への影響を調べるため、等倍量までの PFD 存在下での凝集形成反応を行い、その影響を評価した。評価は以下に示すフィルタートラップ法、電子顕微鏡観察、蛍光顕微鏡法によって行った。

##### フィルタートラップ

反応サンプルを、ドットブロッター(Biorad)を用いて 0.2  $\mu$ m 孔のセルロースアセテートメンブレンで濾過し、PBST バッファーで 3 回洗浄することで、凝集物のみをメンブレンにトラップした。その後、検出用の抗体がメンブレンに非特異的に吸着するのを防ぐため、メンブレンを 5%スキムミルクに 1 時間浸してブロッキングしてから、マウス由来の抗 myc 抗体(1000 倍希釈)に 1 時間浸した。次に、抗マウス IgG 抗体(2000 倍希釈)にメンブレンをさらに 1 時間浸した。本抗体は化学発光検出のためにペルオキシダーゼ(HRP)タンパク質を有する。上記のように処理したメンブレンに化学発光基質を含む ECLPlus 試薬(GE

Healthcare)を滴下し、Las4000mini (Fuji film)で凝集体由来の化学発光を検出した。

##### 透過型電子顕微鏡 (TEM)

サンプルを蒸留水で 10 倍に希釈し、カーボンで覆われた銅グリッドの上に滴下散布した後、余分な水分を紙で吸収して、吹き付け空気でグリッドを乾かしてから、酢酸ウラニルでネガティブ染色を行った。作製した観察基板は JEM-1011 (JEOL, 印加電圧 100 kV)で電子顕微鏡観察を行った。

##### 蛍光顕微鏡観察

PFD の存在下では Htt PolyQ53 の凝集がどの程度の大きさとなるのか知るために、蛍光顕微鏡観察を行った。ここでは、凝集由来の蛍光強度と蛍光色素 1 分子からの蛍光強度を比較することで、凝集の大きさを評価する。本実験で用いる単一蛍光色素分子からの蛍光レベルは、CCD の検出限界に近く、非常に微弱なものであるため、バックグラウンドノイズを低く抑える必要がある。また、入射励起光が極力検出器に入らないようにつつ試料を強く励起する工夫が必要である。

そこで本研究では、エバネッセント光を試料励起に利用した。エバネッセント場は Fig.1 のように石英基板界面において入射励起光を全反射させたときに、界面の試料側の波長程度の極めて近傍のみに局在する電磁場である。これは入射励起光によって生じる基板の分極による電磁場に起因し、量子力学的にはトンネル効果によって基板表面に染み出した光子と解釈することもできる。

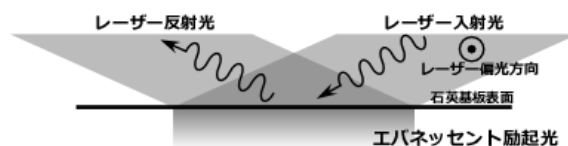


Fig.1 エバネッセント光の様子

蛍光顕微鏡観察のために GST-(myc)-Htt PolyQ のシステイン残基を Alexa 488 色素によってラベルした(GST-(A488)-(myc)-Htt PolyQ)。この GST-(A488)-(myc)-Htt PolyQ を用いて上記同

様にPFDの存在下・非存在下で凝集反応を行った。サンプルは300倍に希釈後、清浄処理した石英基板上に滴下、カバーガラスをかけてマニキュアで封入して作製し、励起に波長488 nmの固体半導体レーザーを用いて、CCDカメラで観察した。

インキュベート前のサンプルは、励起により蛍光が一段で階段消光して0になり、モノマーであることが確認された。この階段消光の幅をモノマーの蛍光強度とした。さらに等倍量のPFD存在下において12時間インキュベートしたサンプルの凝集の蛍光強度を観測し、凝集体の大きさを評価した。

#### 4.結果と考察

まずフィルタートラップ法により、Htt PolyQの凝集に対するPFDの効果を調べた(Fig.2)。

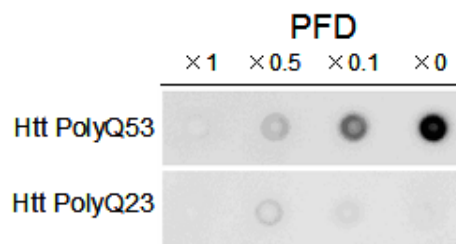


Fig.2 Filter trap assay

PFD非存在下では、異常型ポリグルタミンタンパク質のモデルであるHtt PolyQ53にのみ凝集が検出された。一方、PFD存在下では、Htt PolyQ53の凝集はPFD濃度依存的に抑制された。

また、PFDによるHtt PolyQ53の凝集抑制効果はTEMによっても確認された(Fig. 3)。

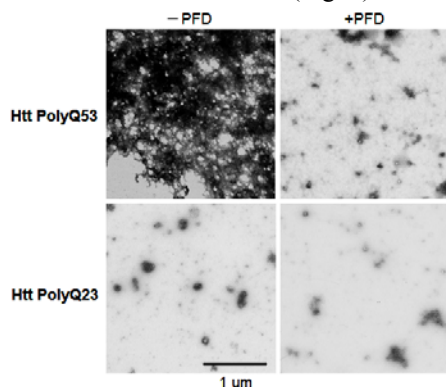


Fig.3 TEM image

エバネッセント蛍光顕微鏡観察によりPFD存在下において形成されたHtt PolyQ53の凝集体のサイズ分布を評価したところ、1~3量体のものが多かった(Fig. 4)。

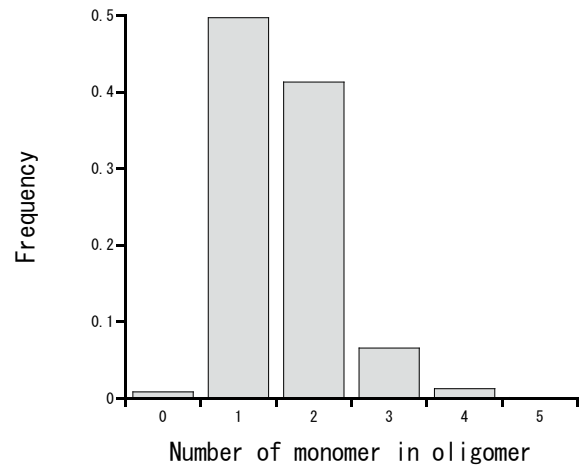


Fig. 4 PFD存在下におけるQ53凝集サイズ分布

以上より、PFDはHtt PolyQ53の凝集をおよそ数量体以内の小さい段階で止めていることが示唆された。

#### 【参考文献】

- [1] S.S.Chong *et al.*, (1997) *Hum. Mol. Genet.* **6**, 301-309
- [2] Kim *et al.*, (2009) *Structure.* **17**, 1205-1212
- [3] I. E. Vainberg *et al.*, (1998) *Cell* **93**, 863-873
- [4] Hartl, M and Hartl, U (2002) *Science* **295**, 1852-1858
- [5] C. Behrends *et al.*, (2006) *Mol. Cell* **23**, 887-897
- Kitamura *et al.*, (2006) *Nature Cell Bio.* **8**, 1163-1170
- [6] G. Schaffar *et al.*, (2004) *Mol. Cell* **15**, 95-105
- [7] Simons, C. T. *et al.*, (2004) *J Biol Chem* **279**, 4196-4203

#### 【学会発表】

日本蛋白質科学会 2010年 年会

『ポリグルタミンタンパク質凝集における分子シャペロンプレフォルデインの役割』