

学位論文題名

prefoldinのポリグルタミン凝集抑制効果に関する研究

学位論文内容の要旨

研究背景

ハンチントン病は遺伝性の神経変性疾患であり、線条体や大脳皮質の神経細胞が減少することで不随意運動、情動障害、認識力の低下などの症状があらわれる。これはハンチンチン (*Huntingtin*, *Htt*) 遺伝子の第一エクソン内部にある CAG (Q) 反復配列が変異により異常伸長することが原因であり、変異 *Htt* の遺伝子産物は非常に凝集しやすく神経細胞に蓄積し毒性を示す。ハンチントン病患者の神経細胞内には様々な変異 *Htt* の凝集中間体が混在していると考えられているが¹、変異 *Htt* がどのような機序で神経毒性を示すかについては未だ不明な点が多い。

分子シャペロンは様々なタンパク質の品質管理を担っており、Hsp70/Hsp40 や CCT などいくつかの分子シャペロン因子が変異 *Htt* の凝集を阻害し神経細胞死を抑制することがわかっている^{4,5}。Prefoldin は真核生物と古細菌にユビキタスに発現する分子で、13~21 kDa の6つの subunit PFD1~6 からなるヘテロ六量体の複合体である⁶。Prefoldin は Hsp70/Hsp40, CCT と協調して actin, tubulin のフォールディングを補助する分子として発見され、新規合成タンパク質に一時的に結合し未変性状態を維持する機能を担っている^{7,8}。Prefoldin の基質認識部位は6つの subunit ごとに異なる基質親和性を持っているため様々なタンパク質を認識すると考えられている⁹。また、Prefoldin はアルツハイマー病の原因である amyloid β の繊維状凝集の形成を抑制することが知られている⁹。我々の研究グループは変異 *Htt* 凝集経路のうち、最も初期の段階である変異 *Htt* のミスフォールドやオリゴマー形成を阻害する機構を解析するため Prefoldin による変異 *Htt* の凝集状態の変化と細胞死について解析を行った。

実験結果

(a) 変異 *Htt* 不溶性凝集は Prefoldin 減少により増加した

神経分化誘導した Neuro-2a において PFD2, PFD5 ノックダウン条件下での変異 *Htt* 凝集陽性細胞を計測したところ *Htt*Q78-GFP 発現細胞の一部で核近傍に封入体を形成した細胞が観察され、さらに Prefoldin ノックダウン細胞では変異 *Htt* の封入体が有意に増加した。また *Htt*Q78-GFP 発現 Neuro-2a における Prefoldin の局在を観察した。細胞内在性 PFD2, PFD5 を免疫染色したところ PFD2, PFD5 ともに細胞質にドット状に局在し *Htt*Q78-GFP 封入体と共局在しないことがわかった。

(b) 再構成 Prefoldin は *in vitro* 環境において変異 *Htt* 凝集を抑制する

上記までの実験結果を受けて、より微小な凝集を詳細に観察するため *in vitro* 実験を行った。変異 *Htt* は非常に凝集しやすいため電子顕微鏡下において繊維状の凝集が観察された。野生型の *Htt* では繊維状の凝集が見られなかった。一方、*Htt*Q53 に Prefoldin を添加したものを観察すると繊維状の凝集がほとんど見られなかったため、Prefoldin は変異 *Htt* の繊維状凝集形成を直接阻害することがわかった。続いて、Alexa488 を

ラベルした myc-HttQ53 を用いて全反射顕微鏡による一分子観察を行った。Alexa488-HttQ53 は Prefoldin 非添加条件において巨大な凝集を形成した。一方 Prefoldin を添加すると非常に小さい凝集だけが観察された。この小さい凝集を未凝集のAlexa488-HttQ53 単分子の蛍光強度と比較すると観察された凝集の1粒子あたりの蛍光強度はAlexa488-HttQ53 単分子の2倍から4倍までの範囲に収まることがわかった。Prefoldin は *in vitro* 環境において変異 Htt の凝集を dimer-tetramer にとどめ、凝集の成長を阻害することが示唆された。

(c) Prefoldin は細胞内においても変異 Htt の可溶性凝集を減少させる効果をもつ

in vitro 実験での結果が細胞内でも同様に再現されるか検討するために、蛍光相関分光法 FCS を用いて変異 Htt の可溶性凝集のサイズ変化について観察した。FCS は共焦点顕微鏡を用いて蛍光分子の発する蛍光を一分子的に検出し、蛍光分子の移動速度や一分子当たりの蛍光強度を算出することができる。実験の結果 Prefoldin ノックダウン細胞では HttQ78-GFP の可溶性凝集が増加していることがわかった。これにより、細胞内においても Prefoldin が変異 Htt の可溶性凝集の形成を抑制していることが示唆された。

(d) Prefoldin は変異 Htt 毒性によっておこる神経細胞死を減少させる

最後に、Prefoldin が変異 Htt のもつ神経毒性を軽減することができるかを検討するために細胞死について観察した。GFP, HttQ23-GFP を導入した細胞と比較して HttQ78-GFP 導入細胞では明らかに細胞死が増加していた。さらに PFD2, PFD5 ノックダウン細胞において細胞死率は有意に上昇した。よって神経分化処理した Neuro-2a 細胞において Prefoldin は変異 Htt の細胞毒性による神経細胞死から保護する作用があると示唆された。

まとめ

Prefoldin は既に形成された変異 Htt 凝集体を解いて凝集を減少させるというよりも変異 Htt monomer やより小さい oligomer と結合し凝集の成長を抑制する効果があると考えられる。また、Prefoldin により変異 Htt 凝集が抑制されることで神経細胞死が減少していることが示唆された。

参考文献

1. Uversky VN (2010) *FEBS J* **277**: 2940-2953
2. Muchowski PJ, Schaffar G, Sittler A, Wanker EE, Hayer-Hartl MK, Hartl FU (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 7841-7846
3. Kitamura A, Kubota H, Pack CG, Matsumoto G, Hirayama S, Takahashi Y, Kimura H, Kinjo M, Morimoto RI, Nagata K (2006) *Nat Cell Biol* **8**: 1163-1170
4. Siegert R, Leroux MR, Scheuffler C, Hartl FU, Moarefi I (2000) *Cell* **103**: 621-632
5. Geissler S, Siegers K, Schiebel E (1998) *EMBO J* **17**: 952-966.
6. Vainberg IE, Lewis SA, Rommelaere H, Ampe C, Vandekerckhove J, Klein HL, Cowan NJ (1998) *Cell* **93**: 863-873
7. Simons CT, Staes A, Rommelaere H, Ampe C, Lewis SA, Cowan NJ (2004) *J Biol Chem* **279**: 4196-4203
8. Sakono M, Zako T, Ueda H, Yohda M, Maeda M (2008) *FEBS J* **275**: 5982-5993

学位論文審査の要旨

| | | | | |
|----|-----|----|---|---|
| 主査 | 教授 | 有賀 | 寛 | 芳 |
| 副査 | 教授 | 鈴木 | 利 | 治 |
| 副査 | 准教授 | 山本 | | 融 |
| 副査 | 講師 | 米田 | | 宏 |

学位論文題名

prefoldinのポリグルタミン凝集抑制効果に関する研究

ハンチントン病は遺伝性の神経変性疾患であり、線条体や大脳皮質の神経細胞が減少することで不随意運動、情動障害、認識力の低下などの症状があらわれる。これはハンチンチン (*Huntingtin, Htt*) 遺伝子の第一エクソン内部にある CAG (Q) 反復配列が変異により異常伸長することが原因であり、変異 *Htt* の遺伝子産物は非常に凝集しやすく神経細胞に蓄積し毒性を示す。ハンチントン病患者の神経細胞内には様々な変異 *Htt* の凝集中間体が混在していると考えられているが¹、変異 *Htt* がどのような機序で神経毒性を示すかについては未だ不明な点が多い。

分子シャペロンは様々なタンパク質の品質管理を担っており、Hsp70/Hsp40 や CCT などいくつかの分子シャペロン因子が変異 *Htt* の凝集を阻害し神経細胞死を抑制することがわかっている。Prefoldin は真核生物と古細菌にユビキタスに発現する分子で、13~21 kDa の6つの subunit PFD1~6 からなるヘテロ六量体の複合体である。Prefoldin は Hsp70/Hsp40、CCT と協調して actin, tubulin のフォールディングを補助する分子として発見され、新規合成タンパク質に一時的に結合し未変性状態を維持する機能を担っている。Prefoldin の基質認識部位は6つの subunit ごとに異なる基質親和性を持っているため様々なタンパク質を認識すると考えられている。また、Prefoldin はアルツハイマー病の原因である amyloid β の繊維状凝集の形成を抑制することが知られている。我々の研究グループは変異 *Htt* 凝集経路のうち、最も初期の段階である変異 *Htt* のミスフォールドやオリゴマー形成を阻害する機構を解析するため Prefoldin による変異 *Htt* の凝集状態の変化と細胞死について解析を行った。

(a) 変異 *Htt* 不溶性凝集は Prefoldin 減少により増加した

神経分化誘導した Neuro-2a において PFD2, PFD5 ノックダウン条件下での変異 *Htt* 凝集陽性細胞を計測したところ *Htt*Q78-GFP 発現細胞の一部で核近傍に封入体を形成した細胞が観察され、さらに Prefoldin ノックダウン細胞では変異 *Htt* の封入体が有意に増加した。また *Htt*Q78-GFP 発現 Neuro-2a における Prefoldin の局在を観察した。細胞内在性 PFD2, PFD5 を免疫染色したところ PFD2, PFD5 とともに細胞質にドット状に局在し *Htt*Q78-GFP 封入体と共局在しないことがわかった。

(b) 再構成 Prefoldin は *in vitro* 環境において変異 *Htt* 凝集を抑制する

上記までの実験結果を受けて、より微小な凝集を詳細に観察するため *in vitro* 実験を行った。変異 *Htt* は

非常に凝集しやすいため電子顕微鏡下において繊維状の凝集が観察された。野生型の Htt では繊維状の凝集が見られなかった。一方、HttQ53 に Prefoldin を添加したものを観察すると繊維状の凝集がほとんど見られなかったため、Prefoldin は変異 Htt の繊維状凝集形成を直接阻害することがわかった。続いて、Alexa488 をラベルした myc-HttQ53 を用いて全反射顕微鏡による一分子観察を行った。Alexa488-HttQ53 は Prefoldin 非添加条件において巨大な凝集を形成した。一方 Prefoldin を添加すると非常に小さい凝集だけが観察された。この小さい凝集を未凝集の Alexa488-HttQ53 単分子の蛍光強度と比較すると観察された凝集の1粒子あたりの蛍光強度は Alexa488-HttQ53 単分子の2倍から4倍までの範囲に収まることがわかった。Prefoldin は *in vitro* 環境において変異 Htt の凝集を dimer-tetramer にとどめ、凝集の成長を阻害することが示唆された。

(c) Prefoldin は細胞内においても変異 Htt の可溶性凝集を減少させる効果をもつ

in vitro 実験での結果が細胞内でも同様に再現されるか検討するために、蛍光相関分光法 FCS を用いて変異 Htt の可溶性凝集のサイズ変化について観察した。FCS は共焦点顕微鏡を用いて蛍光分子の発する蛍光を一分子的に検出し、蛍光分子の移動速度や一分子当たりの蛍光強度を算出することができる。実験の結果 Prefoldin ノックダウン細胞では HttQ78-GFP の可溶性凝集が増加していることがわかった。これにより、細胞内においても Prefoldin が変異 Htt の可溶性凝集の形成を抑制していることが示唆された。

(d) Prefoldin は変異 Htt 毒性によっておこる神経細胞死を減少させる

最後に、Prefoldin が変異 Htt のもつ神経毒性を軽減することができるかを検討するために細胞死について観察した。GFP, HttQ23-GFP を導入した細胞と比較して HttQ78-GFP 導入細胞では明らかに細胞死が増加していた。さらに PFD2, PFD5 ノックダウン細胞において細胞死率は有意に上昇した。よって神経分化処理した Neuro-2a 細胞において Prefoldin は変異 Htt の細胞毒性による神経細胞死から保護する作用があると示唆された。

これらの知見は、タンパク質の quality control 機能解析に対し大きく貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。