

〈原著〉

## 神経変性疾患の原因となるポリグルタミン鎖の アミロイド様線維形成に関する研究

林 さよ子<sup>1)</sup>、服部 高幸<sup>1)</sup>、高崎 昭彦<sup>1)</sup>、石黒 啓司<sup>1)</sup>

### Study of amyloid-like fibrils formation of the polyglutamine tract caused by neurodegenerative disorder.

Sayoko Hayashi<sup>1)</sup>, Takayuki Hattori<sup>1)</sup>, Akihiko Takasaki<sup>1)</sup> and Hiroshi Ishiguro<sup>1)</sup>

**Summary** Polyglutamine diseases are a group of nine hereditary disorders as well as Huntington's disease caused by the abnormal expansion of polyglutamine tracts. These diseases are the autosomal dominant inheritance form characterized by the progression of protein aggregation in neuronal cells. Several lengths of the polyglutamine protein, which is caused by the polyglutamine disease expressed in *E. coli*, and several proteins were purified for testing the formation of amyloid-like fibrils by use of transmission electron microscope. Using the Glutathione S-transferase (GST) binding polyglutamine tract, formation of the aggregation for an insoluble fibrils structure was tested under several conditions.

In this study, 52 and 82 polyglutamine tracts with GST protein formed the aggregation for the insoluble fibrils structure, but not that of 17 and 32 polyglutamine tract connected GST protein. These amyloid-like fibrils formation was dependent on the polyglutamine length and temperature. These structure-changes could be changed from an unfolded structure to a  $\beta$ -sheet structure. The results of the capability on aggregation for insoluble fibrils will utilize the assay development for innovative drug development.

**Key words:** CAG repeat disease, Huntington's disease, Polyglutamine tract, Amyloid-like fibrils formation, Transmission electron microscope

---

<sup>1)</sup> 岐阜医療科学大学保健科学部臨床検査学科  
〒501-3892 岐阜県関市市平賀字長峰795-1

<sup>1)</sup> Department of Medical Technology, School of Health  
Sciences, Gifu University of Medical Science  
795-1 Nagamine ichihiraga, Seki, Gifu 501-3892, Japan

連絡先：石黒 啓司

岐阜医療科学大学保健科学部臨床検査学科

Tel: +81-575-22-9416 (ex.202)

E-mail: hishiguro@u-gifu-ms.ac.jp

受付日：2019年12月21日

採択日：2020年5月23日

## I. 緒言

神経変性疾患は、脳や脊髄にある神経細胞群に細胞死や機能不全が起り、認知および運動機能が徐々に障害を受ける疾患である。これらの神経変性疾患の中で、ポリグルタミン病としてハンチントン病 (HD)、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA)、脊髄小脳失調症1型 (SCA1)、脊髄小脳失調症2型 (SCA2)、脊髄小脳失調症3型 (SCA3)、脊髄小脳失調症6型 (SCA6)、脊髄小脳失調症7型 (SCA7)、脊髄小脳失調症17型 (SCA17) が遺伝的に類似しており、進行性の神経変性疾患として知られている<sup>1)</sup>。これらの疾患は、その原因遺伝子にCAGリピートを持っており、このトリプレットの異常伸長による変異が原因と考えられている<sup>2)</sup>。このCAGの異常伸長は、タンパク質になると伸長ポリグルタミン鎖となり、特定の神経の機能低下を起こすことが知られている。これらの疾患の原因遺伝子の機能はいまだに不明であるが、疾患特異的に進行性の神経変性が起り、不溶性のタンパク質の凝集が観察されている<sup>3,4)</sup>。このような観察から、疾患の原因は、伸長ポリグルタミンによるタンパク質の異常な立体構造が生じ、そのタンパク質オリゴマーを形成して、小さな沈着として観察できるのではないかと考えられている<sup>5)</sup>。

これらの神経変性疾患の内、HDではヒトの死後脳において沈着物が神経細胞内に観察され、不随意運動や認知症、精神障害などを引き起こすと考えられた。また、これまでの多くのモデルマウスの実験が行われ、異常な伸長ポリグルタミン鎖を発現するトランスジェニックマウスの実験では、運動障害や行動異常を起こすことが報告されている。一方、遺伝子ノックインマウスの研究からは、異常伸長したポリグルタミン鎖が発現しているにも関わらず、特徴的な行動や異常行動等は観察されにくい結果であった<sup>6,7)</sup>。

日本におけるHDは、指定難病とされ希少疾患である。欧米では人口10万人あたり4～8人の患者がいるとされているが、日本の調査では0.7人と欧米の約1/10であり、欧米には多いが、日本では非常に少ない疾患である。発症頻度が

人種によりやや異なる傾向にあるが、性差はない。この疾患は、常染色体優性遺伝形式をとるため、両親のどちらかが異常伸長したCAGリピートを持っていると、50%の確率でその児がHDを発症し、浸透率は100%である。発症原因はいまだ明らかになっておらず、HDの根本的な治療法は見つかっていない。そのため、不随意運動や認知障害などの各症状を和らげるための対症療法を中心に治療が行われている。

HDの病因遺伝子産物であるタンパク質は、ハンチンチン (Huntingtin, HTT) と名付けられ、HTTは異常伸長したポリグルタミン鎖を含み、ポリグルタミン鎖が長くなると神経細胞内に凝集体が確認できる。そのため、HD患者の神経細胞内にはHTTの凝集体が形成され、抗ポリグルタミン抗体を用いた研究から、封入体という形で確認できる。HTTのような遺伝性神経変性疾患をひき起こす変異タンパク質は、 $\beta$ シート構造を持つアミロイド様線維の凝集体を形成して神経細胞の中に封入体として蓄積し、神経変性をひき起こすと考えられている<sup>8)</sup>。また、同じポリグルタミン病に分類されている脊髄小脳変性症 (SCD) も指定難病とされており、小脳や脳幹から脊髄にかけての神経細胞に変性が起きることにより、運動失調が起こる。運動失調はゆっくりと進行し、自律神経障害やしびれなどの末梢神経障害などを伴うこともあるが、認知症を伴うことはない。SCDの約1/3が遺伝性とされており、常染色体優性遺伝性または常染色体劣性遺伝性を示す。

本研究では、遺伝性の神経変性疾患であるポリグルタミン病に注目し、異常伸長したポリグルタミンによるアミロイド様線維形成に至る過程を詳細に検討した。これらの線維化は、神経毒性を発揮すると考えられており、異常伸長ポリグルタミン配列から形成されるアミロイド様線維化構造を、透過型電子顕微鏡を用いて形態変化を明らかにした。これらの研究は、ポリグルタミン病の原因療法につながる基礎的な研究成果であると考えている。

## II. 方法と材料

1. タンパク質発現に用いた遺伝子と形質転換蛋白質の合成に使用した遺伝子配列は、トリ

プレット病の特徴であるCAGの繰り返し配列をもとに、CAGとCAAを適宜組み合わせて合成した（ジェンスクリプトジャパン株式会社、日本）。タンパク質発現ベクターは、GSTとタンパク質を融合したGST結合タンパク質として発現するpGEX-2TKを用いた。合成されたタンパク質発現用遺伝子は、BL21（DE3）の大腸菌に形質転換を行い、実験に使用した（Promega, USA）。

## 2. タンパク質の発現方法及び精製方法

最終濃度が50 mg/LのAmpicillin入りLB培地（20 mL）を用いて前培養した大腸菌を100倍希釈した。この菌液を37℃で2時間振盪培養を行い、大腸菌がMcFarland No.1濁度を越えた時点で、最終濃度が1  $\mu$  mol/LになるようにIPTGを添加し、37℃で4時間振盪培養した。その後、大腸菌培養液全量を2,300  $\times$  gで10分間遠心操作を行い、大腸菌の沈渣を得た。上清を取り除き、4 mLのリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を添加し懸濁液とした。再び2,300  $\times$  gで10分間の遠心操作を行い、菌体を洗浄した。この菌体を4 mLのPBSに懸濁後、4本のチューブに均等に分注し、20,000  $\times$  gで5分間の遠心操作を行った。上清を全て取り除き沈渣を-20℃に凍結保存し、タンパク質溶液の調整に用いた。

タンパク質精製には、MagneGST™ Protein Purification System（Promega, USA）を用いて精製を行った。大腸菌の沈渣に500  $\mu$  LのMagneGST Cell Lysis Reagentを加え細胞を溶解後、RNase-Free DNaseを5  $\mu$  L加え室温で30分間転倒混和した。この溶液に、MagneGST Glutathione Particlesを加え、室温で30分間転倒混和した。その後、試料が入ったマイクロチューブをマグネットスタンドにセットし、MagneGST Glutathione Particlesがマグネットに磁性的に引かれて固定している間に、上清を全て除去した。マグネットスタンドから外した後、MagneGST Binding/Wash Buffer（4.2  $\mu$  mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2  $\mu$  mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.14 mol/L NaCl, 0.01 mol/L KCl）を加えよく攪拌し、室温で5分間転倒混和した。この操作を2回繰り返してビーズを洗浄した。その後、ビーズに0.05 mol/L Tris-buffer（pH 8.1）で調整した0.05 mol/L Glutathione溶液を用いてGST結合ポリグルタミ

ン鎖を精製した。

## 3. タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度測定には、Qubit®2.0 Fluorometer およびQubit®Protein Assay Kit（Thermo Fisher Scientific, USA）を使用して測定を行った。Qubit Protein Standardに1/200量の蛍光染色液（Protein Reagent）を加えよく混和しWorking Solutionとした。その後、Working Solutionに、1/20量のスタンダード溶液もしくはタンパク質試料を加え混和して測定した。スタンダード溶液を用いて作成した検量線をもとに未知濃度の試料の濃度を決定した。

## 4. SDS-PAGEによるタンパク質産生の検討

1  $\mu$  gの精製タンパク質溶液と2  $\times$  SDSゲルローディング緩衝液を等量加え、98℃で2分間加熱処理した。その後、4-20% SDS-PAGE用ゲル（Mini-PROTEAN®TEX™Precast Gels, Bio-Rad, USA）を用いて、40 mAで電気泳動を行った。電気泳動用ランニングバッファーは、0.025 mol/L Tris, 0.192 mol/L glycine, 0.1% SDS溶液を使用した。分子量マーカーは、Precision Plus Protein™Blue Standards（Bio-Rad, USA）を用いた。電気泳動後のゲルは、酢酸メタノール溶液で30分以上固定後、CBB染色キット（Quick-CBB, 富士フイルム和光純薬株式会社、日本）を使用して1時間以上SDS-PAGEゲルを染色した。タンパク質の理論値の計算は、Swiss Institute of BioinformaticsのCompute PI/Mw toolを使用した。

## 5. ウエスタンブロット法によるタンパク質産生の確認

タンパク質を電気泳動したSDS-PAGEゲルを、トランスファーバッファー（0.025 mol/L Tris pH 8.3, 0.192 mol/L グリシン, 20% v/v メタノール）に浸しゲル内の緩衝液を交換した。また、PVDFメンブラン（イミュンブロット PVDFメンブラン, Bio-Rad, USA）を、メタノールに浸潤させて親水化処理を行った。次に、PVDFメンブランをトランスファーバッファーで浸潤化操作を2回行った。ウエスタンブロット用のカセットにSDS-PAGEゲルと浸潤化したPVDFメンブランをセットし、25 Vで転写した。

PVDFメンブレンは、10 mLのブロッキング液（5%スキムミルクTBS, 0.01 mol/L Tris pH 7.4, 0.9% (w/v) NaCl）に入れ、振盪しながら室温で1時間反応させた。洗浄後、ブロッキング液を用いて、抗GSTモノクローナル抗体（200倍希釈, Santa Cruz Biotechnology, USA）もしくは抗ポリグルタミンモノクローナル抗体（2000倍希釈, MERCK, Germany）を2時間、室温で反応させた。TBS緩衝液で2回洗浄後、ブロッキング液にProtein A-HRP（2000倍希釈, Abcam, UK）を加え、4°Cで一晩反応させた。洗浄後、テトラメチルペンチジン（Aproscience, 日本）を用いて目的のバンドを検出した。

#### 6. 透過型電子顕微鏡によるタンパク質の凝集の観察

調整したGSTポリグルタミン鎖は、4°Cで50日間、もしくは4°Cおよび26°Cで3日、7日、14日、21日間静置した試料を用いて観察した。試料を20 μLをとり、パラフィルム上に静置してその上にマイクログリッド（フォルムバール膜貼付メッシュ 200メッシュ Cu, 日新EM株式会社, 日本）を1分間のせて、試料をグリッドに吸着させた。その後ただちに、0.05%のリクタグステン酸溶液（pH 7.0）に10秒間接触させ、ネガティブ染色を行った。この試料を、透過型電子顕微鏡（TEM-1400 Plus, 日本電子株式会社, 日本）を使用し、加速電圧80 kVで凝集体の形態の観察を行った。陽性コントロール実験には、Aβ40（SensoLyte® Thioflavin T Beta-Amyloid (1-40) Aggregation Kit (AnaSpec, USA))を用いた。凝集体は、枝の様な形態を「枝状」もしくは「分岐状」と表し、糸状の細い形態を「線維化」も

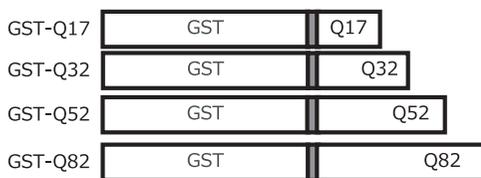


Fig. 1 Structure model of GST connecting polyglutamine tract. GST represents the glutathione S-transferase, and Q17, Q32, Q52 and Q82 display the polyglutamine numbers of each tract. The gray box depicts the thrombin-digested site.

しくは「アミロイド様線維」と示すこととした。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 伸長ポリグルタミン鎖を持つGSTタンパク質の特徴

GSTにポリグルタミン鎖（それぞれQ17、Q32、Q52およびQ82）が結合したタンパク質の発現を、pGEX-2TKを用いて大腸菌BL21 (DE3) 菌体内で行った。これらのタンパク質の構造をFig. 1に示した。このGST結合ポリグルタミン鎖をSDS-PAGEで解析したところ、GST-Q17、GST-Q32、GST-Q52およびGST-Q82で示されるバンドは、それぞれ31 kDa、35 kDa、40 kDaおよび47 kDaであり、ポリグルタミン鎖の長さ按比例して分子量の異なるタンパク質の産生が確認できた（Fig. 2）。これらのバンドは、25 kDaのGSTタンパク質に結合するポリグルタミン鎖の理論的分子量と比較した。それぞれのアミノ酸配列から計算される理論的分子量は、Q17、Q32、Q52およびQ82が2.9 kDa、5.0 kDa、7.5 kDaおよび11.4 kDaであった。GSTの理論分子量は27 kDaで、GST結合ポリグルタミン鎖は、GST-Q17、GST-Q32、GST-Q52およ

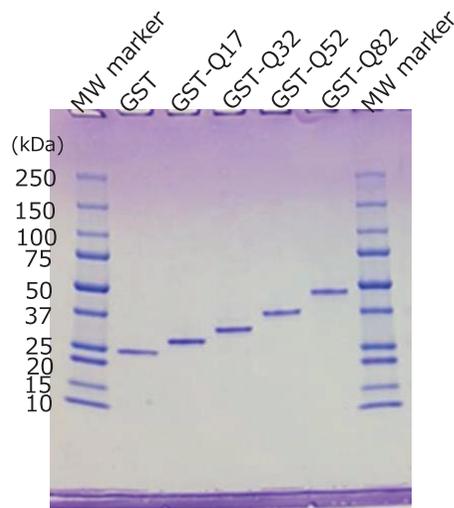


Fig. 2 Analysis of the GST-polyglutamine proteins by the use of SDS-PAGE. SDS-PAGE gel is a 4-20% gradient gel, and CBB stains the protein band. One μg of protein was applied to each lane. The MW marker represents the molecular weight marker.

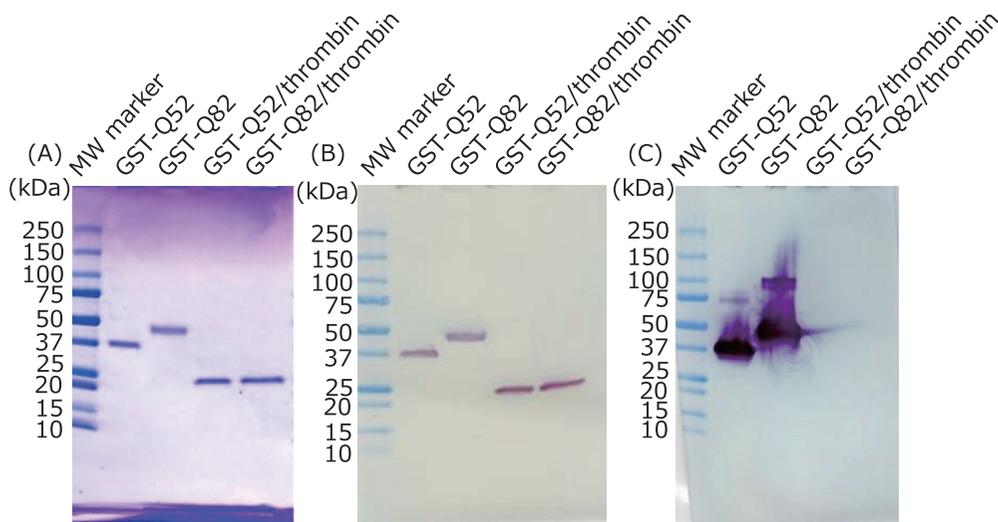


Fig. 3 Results of the Western blot analysis for the GST connecting polyglutamine tracts. (A) SDS-PAGE gel stained with CBB. Samples show the molecular weight marker (MW marker, left), GST connecting 52 polyglutamine protein (GST-Q52), GST connecting 82 polyglutamine protein (GST-Q82), and their thrombin digested sample (GST-Q52/thrombin and GST-Q82/thrombin). Gel is stained by CBB solution. (B) Western blotting analysis of GST connecting polyglutamine tract using anti-GST polyclonal antibody. (C) Western blotting analysis of GST connecting polyglutamine tract using anti-polyglutamine monoclonal antibody.

びGST-Q82がそれぞれ29.9 kDa、32.0 kDa、34.5 kDa、38.4 kDaである。アミノ酸配列から計算される理論的分子量とSDS-PAGEのそれぞれの実測値には解離があり、実測値は理論値に比較してそれぞれ1.1 kDa、3.0 kDa、5.5 kDaおよび8.6 kDa大きかった。データは示さないが、25 kDaにあるGSTのバンドは、GSTタンパク質であることをウエスタンブロット法で確認した。また、産生したGST結合ポリグルタミン鎖のタンパク質がポリグルタミン鎖を有することを確認するため、抗ポリグルタミンモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロットを行い検討した (Fig. 3)。それぞれの解析では、GST-Q52、GST-Q82及びGST-Q52もしくはGST-Q82をトロンピンで切断した試料を使用した。SDS-PAGE解析を行った結果、ポリグルタミン鎖の長さに比例して分子量の異なるバンド (GST-Q52とGST-Q82) と25 kDaの切断されたGSTのバンド (GST-Q52/thrombinとGST-Q82/thrombin) が確認できた (Fig. 3 A)。次に抗GSTモノクローナル抗体を用いて、GST結合ポリグルタミン鎖の解析をウエスタンブロット法で行った結果、SDS-PAGE解析と同様の結果であり、GSTタンパク質が検出できた (Fig. 3 B)。

また、抗ポリグルタミンモノクローナル抗体を用いて、ポリグルタミン鎖の検出をウエスタンブロット法で検討した。GST結合ポリグルタミン鎖である、GST-Q52とGST-Q82では、予測されたバンドを検出することができたが、トロンピンで切断したGST-Q52/thrombinとGST-Q82/thrombinのポリグルタミン鎖 (Q52とQ82)を検出することはできなかった (Fig. 3 C)。

## 2. ポリグルタミン鎖の長さ依存的に形成するアミロイド様線維の経時的変化

この試料を用いて、GST、GST-Q17、GST-Q32、GST-Q52およびGST-Q82のアミロイド様線維形成について透過型電子顕微鏡で観察した。それぞれのタンパク質を4℃、50日間静置した結果、GST (Fig. 4 A) とGST-Q17 (Fig. 4 B) は特長な形態は観察されなかったが、GST-Q32は枝状の形態が観察された (Fig. 4 C, D)。また、GST-Q52は、矢印で示すように一部線維化した構造が確認できた (Fig. 4 E)。さらに、GST-Q82では、タンパク質の塊の中に線維化した形態が観察され、アミロイド様線維の形成が確認できた (Fig. 4 F, G)。

また、精製GST結合ポリグルタミン鎖がアミ

ロイド様線維を形成するのに要する時間を経時的に観察するために、タンパク質精製後、4℃に静置し、3日、7日、14日および21日間の観察を行った。GST-Q17、GST-Q32、GST-Q52および

GST-Q82のタンパク質濃度はそれぞれ129.2 mg/L、138.2 mg/L、149.0 mg/L、165.9 mg/L（それぞれ4.32 μM）に調整し、観察した。GST-Q17、GST-Q32では、アミロイド様線維の

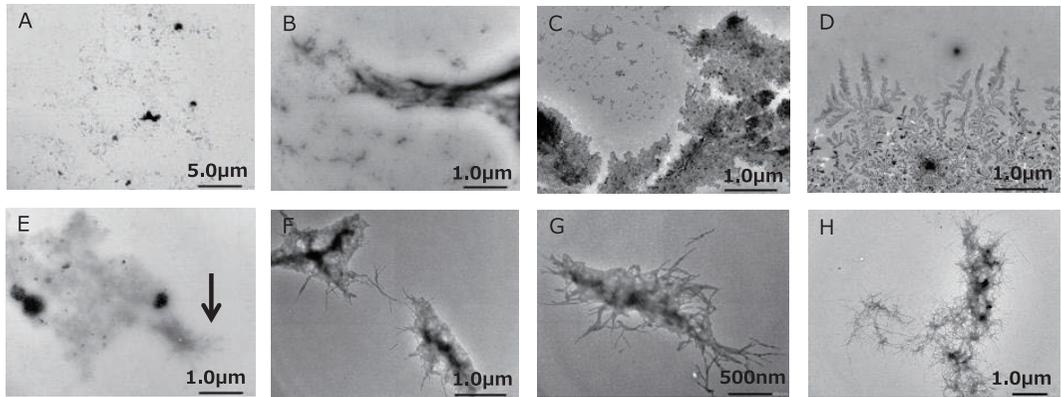


Fig. 4 Amyloid-like fibrils formation of the GST connection polyglutamine tract. All of samples were left on 4℃ for 50 days. A β40 was left on 4℃ for 2 hours. Protein concentrations of GST protein (A), GST-Q17 (B), GST-Q32 (C and D), GST-Q52 (E), GST-Q82 (F and G), and A β40 (H) are 6.85 μM, 13.37 μM, 12.07 μM, 8.06 μM, 7.55 μM and 57.72 μM, respectively. The black arrow points to polyglutamine fibrils-like formation (E).

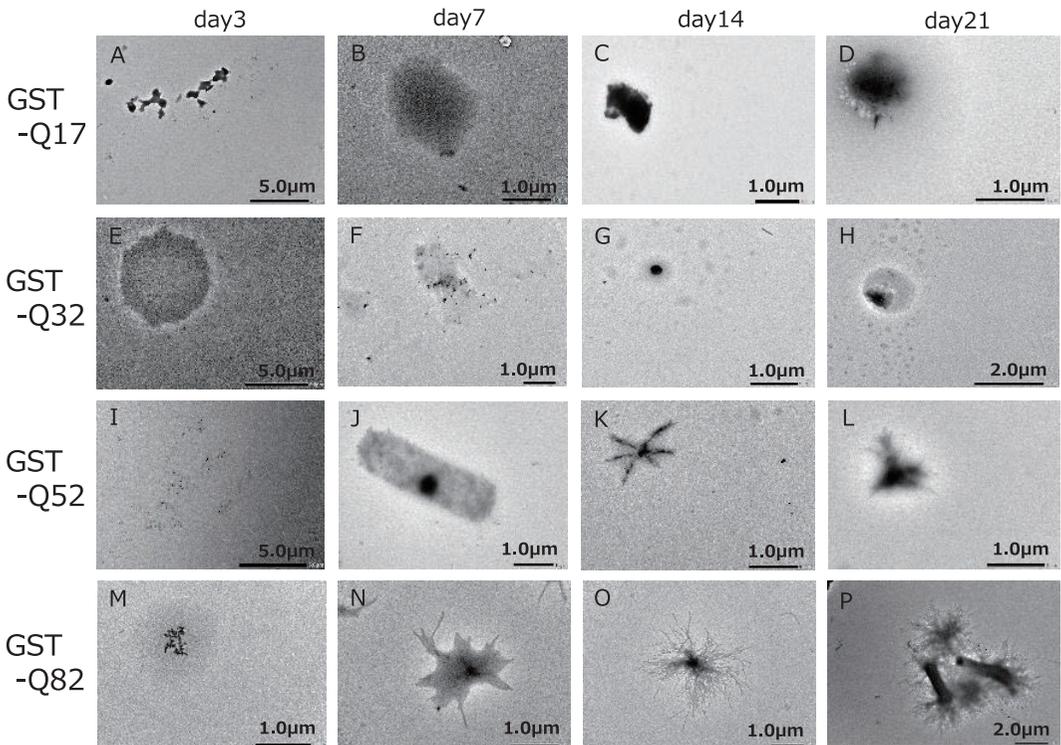


Fig. 5 Chronological changes of amyloid-like fibrils formation dependent on the length of polyglutamine tract. All of these protein concentrations are 4.32 μM and were left for a predetermined time at 4℃. GST connecting polyglutamine tract shows GST-Q17 (A, B, C, D), GST-Q32 (E, F, G, H), GST-Q52 (I, J, K, L), GST-Q82 (M, N, O, P).

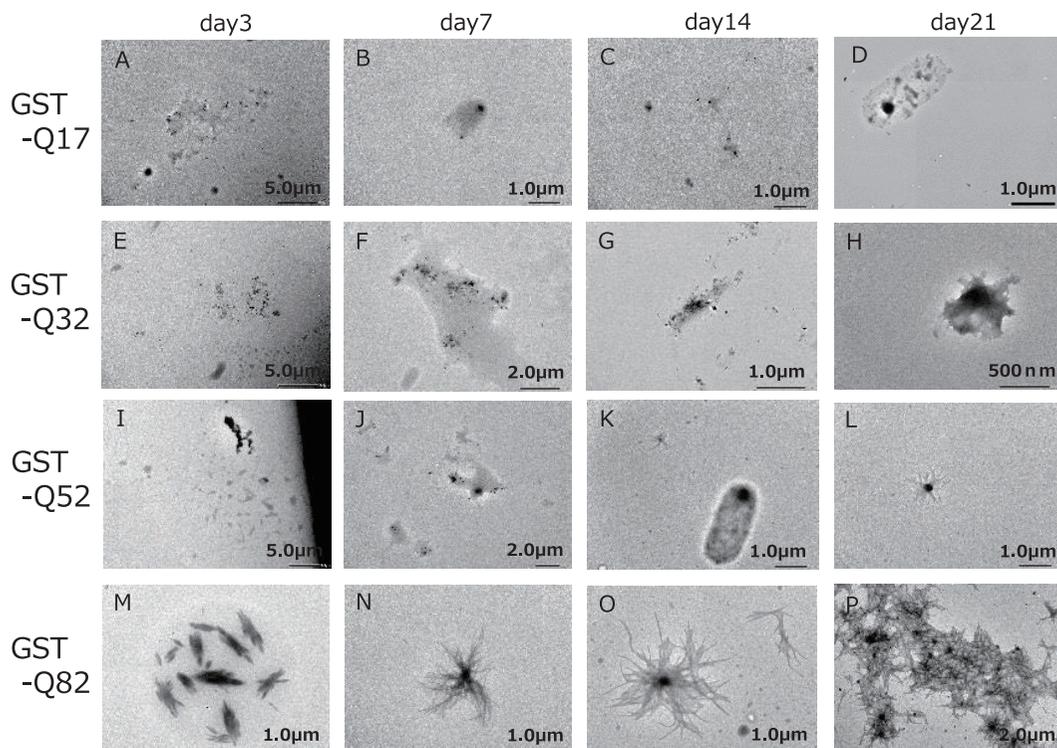


Fig. 6 Chronological changes of amyloid-like fibrils formation dependent on the temperature of polyglutamine tract. All of these protein concentrations are  $2.89 \mu\text{M}$  and were left for a predetermined time at  $26^\circ\text{C}$ . GST connecting polyglutamine tract shows GST-Q17 (A, B, C, D), GST-Q32 (E, F, G, H), GST-Q52 (I, J, K, L), GST-Q82 (M, N, O, P).

特徴的な形態は観察されなかった (Fig. 5 A-H)。GST-Q52では、静置後21日に、アミロイド様線維が観察された (Fig. 5 L)。さらに、GST-Q82では、静置後7日以降に、明確なアミロイド様線維が観察された (Fig. 5 N-P)。

### 3. 温度依存的に形成するアミロイド様線維の経時的変化

線維化が温度依存的であるか検討するため、静置温度を $26^\circ\text{C}$ に設定し、3日、7日、14日および21日間、経時的に観察した。GST-Q17、GST-Q32、GST-Q52およびGST-Q82のタンパク質濃度はそれぞれ $86.4 \text{ mg/L}$ 、 $92.5 \text{ mg/L}$ 、 $99.7 \text{ mg/L}$ 、 $111.0 \text{ mg/L}$  (それぞれ $2.89 \mu\text{M}$ ) に希釈し、 $4^\circ\text{C}$ での観察に用いた $4.32 \mu\text{M}$ よりも低濃度の試料を用いて観察した。GST-Q17とGST-Q32では、アミロイド様線維の特徴的な形態は観察されなかった (Fig. 6 A-H)。GST-Q52では、静置後14日にアミロイド様線維が観察された (Fig. 6 K, L)。さらに、GST-Q82では、静置後3日に

アミロイド様線維の形成途中と思われる線維状の形態が観察された (Fig. 6 M) その後、7日、14日、21日の観察では、明瞭なアミロイド様線維形成が観察できた (Fig. 6 N-P)。

## IV. 考察

本研究は、伸長ポリグルタミン鎖によるアミロイド様線維化の形成過程を詳細に観察した。ポリグルタミン鎖を有するリコンビナントタンパク質は不溶性になる傾向があることから、GST結合タンパク質の下流にポリグルタミン鎖が発現できるようにGST結合タンパク質発現遺伝子を構築した。この発現ではGSTがキャリアーとなり高い溶解性が期待できることと、グルタチオンとの親和性を利用して容易に精製できるなどの利点がある。

SDS-PAGEの解析による分子量と理論的な分子量には差があり、GST-Q17では、実測値が $31 \text{ kDa}$ に対し理論値は $29.9 \text{ kDa}$ であった。GST-Q32

では、35 kDaに対し32 kDa、GST-Q52では、40 kDaに対し34.5 kDa、GST-Q82では47 kDaに対し38.4 kDaであった。この原因は、長いポリグルタミン鎖がSDS-PAGEの原理に従って測定できていない可能性を示唆している。すなわち、タンパク質全体に対してグルタミンの数が多いことと連続したグルタミンの鎖が存在することが原因で、SDS化が効率的に行われなかったために、理論分子量と異なる位置にバンドが観察できたと考えられた。

さらに、抗ポリグルタミンモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析の結果では、GST-Q52及びGST-Q82のGST結合ポリグルタミン鎖は検出できた。しかし、トロンピンで切断したGST-Q52及びGST-Q82は抗ポリモノクローナル抗体でも検出することができなかった (Fig. 3 C)。このことは、GST結合ポリグルタミン鎖は、タンパク質のSDS化ができていないが、ポリグルタミン鎖のみではSDS化ができず、電気泳動できなかつたと推察された。また、SDS-PAGEの結果からもGSTのみでは、実測値 (25 kDa) と理論値 (27 kDa) がほぼ同じであるが、ポリグルタミン鎖が結合することで、実測値と理論値に差がみられたことと一致した (Fig. 2)。

本研究では、A $\beta$ 40の線維化は溶液調整後2時間以内に観察された (Fig. 4 H)。このアミロイド性線維の形成は極めて早いものに対して、GST結合ポリグルタミン鎖のアミロイド様線維形成は、26°Cで数日間が必要である。このアミロイド様線維の形成は、ポリグルタミン鎖の長さに比例して線維形成が行われており、GST-Q82は、極めてA $\beta$ 40の線維化に近い凝集塊が実験開始7日に観察された。これは、A $\beta$ 40と比べ形成時間は必要であるが確実に線維化が進むことが確認できた。また、GST-Q52は、アミロイド様線維の形成の開始過程と思われる形態が14日で観察され、A $\beta$ 40の線維化の途中過程と同様な現象であった (Fig. 6)。すなわち、このアミロイド様線維の形成は神経変性疾患の進行に特徴的な現象と考えられた<sup>9)</sup>。また、GST-Q52の観察では、4°Cでは21日、26°Cでは14日で観察できた。GST-Q82は、アミロイド様の線維化が4°Cおよび26°Cともに7日間で確認できたが、26°CによるQ82の線維化は4°Cに比較

して短時間で形成していた (Fig. 5 N, 6 M)。このことから、アミロイド様線維の形成は、温度に依存的であると考えられた。MasinoらはGSTに41個のポリグルタミンを結合させた実験を行い、電子顕微鏡で観察を行ったが、明確な線維化は報告されていない<sup>10)</sup>。しかし、本実験では、明確な線維化が観察され、ポリグルタミン鎖の長さ及び温度依存的にアミロイド様の線維化が進行していた。

また、ポリグルタミン鎖の実験では、枝状の構造から分岐状態をとる現象が観察され、A $\beta$ 40で観察した線維化の変化と同様な結果を観察した (Fig. 4-6)。枝状から分岐状への変化は、Robert H. Walters and Regina M. Murphyの仮説において、不安定構造モノマーからオリゴマーへの構造変化であると考えられることができると推察した<sup>9)</sup>。この仮説は、不安定構造の立体構造変化メカニズムを提唱しており、不安定構造モノマーが急速に大きなオリゴマーを形成して、そのオリゴマーが疎水性部分同士で相互作用するようになると考えている。この大きなオリゴマーが、立体構造の再構築で $\beta$ シート構造に変化して、この $\beta$ シート構造はオリゴマーから不溶性の線維状の沈着が生じるとされている<sup>11)</sup>。

本実験の観察では、短いGST結合ポリグルタミン鎖のアミロイド様線維化の構造変化は観察できなかったが、長いポリグルタミン鎖を持つGST-Q82は、アミロイド様の線維化が観察できた。また、短いポリグルタミン鎖は、特徴的な枝状の形態を示したが、長時間を必要としており、長いポリグルタミン鎖はこれに比較して、短い時間で同様の形態変化を示した。これらのことから、長いポリグルタミン鎖は不安定構造モノマーが急速に大きなオリゴマーを比較的短時間で形成すると考えられた。これまでの研究から、HDをはじめとするポリグルタミン病では、ポリグルタミン鎖の長さが疾患の発症年齢と相関することが報告されており、ポリグルタミンの長さと同様に沈着物形成が関連していることが推察された<sup>3)</sup>。すなわち、ポリグルタミン鎖の長さに比例して発症年齢は低年齢化することが原因遺伝子発見の当初から報告されており、GST結合ポリグルタミン鎖は物理化学的な再構成を、生体内でも起こし、そのメカニズムを使って凝集が進行している可能性を示唆した。

これまでの実験結果 (Fig. 4-6) において、ポリグルタミン鎖の長さおよび温度に依存して、不安定構造から分岐状もしくは線維状の形態へ変化していることが明確になった。このような結果から以下に示すポリグルタミン鎖の形態変化が考えられた。すなわち、ポリグルタミン鎖はGSTタンパク質と結合しており、不安定構造をとっている。ポリグルタミン鎖が互いに接近して、構造変化を起こし、その一部が $\beta$ シート構造をとることにより、その $\beta$ シート構造がGSTタンパク質全体に広がる。このことが、ポリグルタミン鎖が互いに接して連続的な構造をとるようになると考えられる。さらに、周辺の不安定構造を持つGST結合ポリグルタミン鎖は巻きこまれながら、大きな $\beta$ シート構造の構造体へ変化して、アミロイド様の線維化の形態変化が起こると考えられた。このような報告は合成ペプチドを用いた実験でも同様な報告をしており、本研究では、長いポリグルタミン鎖をもつGSTタンパク質で明確な実験結果を示すことができた<sup>12)</sup>。

この結果から、伸長ポリグルタミン鎖による神経変性の原因を明らかにする基礎的検討ができたと考えており、今後のHDを代表とするポリグルタミン病の治療薬を開発する基礎的研究になると考えた。

## V. 結語

伸長ポリグルタミン鎖による線維化の形態変化は、透過型電子顕微鏡により確認することができた。この形態変化は、GST-Q82においてA $\beta$ 40と同様にアミロイド様の線維化が温度依存的にできることが確認された。また、GST-Q52では線維化の開始変化と思われる形態が観察でき、GST-Q82と比較して線維化の開始はポリグルタミン鎖の長さで温度依存性であった。しかし、GST-Q17とGST-Q32では観察できなかった。本研究から、ポリグルタミン鎖のオリゴマー仮説をGST結合ポリグルタミン鎖で検証することができ、不安定構造から $\beta$ シート構造への構造変化を示唆する実験結果を得ることができた。今後は、ポリグルタミン鎖による凝集反応を応用して、ポリグルタミン鎖凝集抑制活性がある物質の探索を行う基礎的な研究が重

要であると考えている。

## VI. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、透過型電子顕微鏡の指導をしていただいた名古屋大学大学院医学系研究科 名古屋大学附属医学教育研究支援センター分析機器部門、技術職員 板倉広治氏に心より感謝申し上げます。本研究の一部は岐阜医療科学大学学内特別研究費の助成を受けて行ったものです。

本論文内容に関連する著者(ら)の利益相反: なし

## 文献

- 1) Tiffany W. Todd, and Janghoo Li. Aggregation formation in the polyglutamine diseases: Protection at a cost? *Mol. Cells*, 36: 185-194, 2013.
- 2) The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72: 971-983, 1993.
- 3) Ross CA. Intracellular neuronal inclusions: a common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases? *Neuron*, 19: 1147-1150, 1997.
- 4) Michalik A. and Broeckhoven CV. Pathogenesis of polyglutamine disorders. *Human Molecular Genetics*. 12: R173-186, 2003.
- 5) Ho CS, Khadka NK, She F. et al, Polyglutamine aggregates impair lipid membrane integrity and enhance lipid membrane rigidity. *Biochim Biophys Acta*, 1858: 661-670, 2016.
- 6) Bates GP, Mangiarini L, Mahal A. et al, Transgenic models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 6: 1633-1637, 1997.
- 7) Ishiguro H, Yamada K, Sawada H. et al, Age-dependent and tissue-specific CAG repeat instability occurs in mouse knock-in for a mutant Huntington's disease gene. *J Neurosci Res*, 65: 289-297, 2001.
- 8) Huang CC, Faber PW, Persichetti F. et al, Amyloid formation by mutant huntingtin: threshold, progressivity and recruitment of normal polyglutamine proteins. *Somat Cell Mol Genet*, 24: 217-233, 1998.
- 9) Walters RH and Murphy RM. Examining polyglutamine peptide length: a connection between collapsed conformations and increased aggregation. *J Mol Biol*, 393: 978-992, 2009.
- 10) Masino L, Kelly G, Leonard K. et al, Solution struc-

- ture of polyglutamine tracts in GST-polyglutamine fusion proteins. FEBS Lett, 513: 267-272, 2002.
- 11) Robert HW and Regina MM. Aggregation kinetics of interrupted polyglutamine peptides. J Mol Biol, 412: 505-519, 2011.
- 12) Ashwani K. Thakur, Jayaraman M, Mishra R. et al, Polyglutamine disruption of the huntingtin exon1 N-terminus triggers a complex aggregation mechanism. Nat Struct Mol Biol, 16: 380-389, 2009.