

＜シンポジウム 9—3＞ポリグルタミン病への分子生物学的アプローチ

ポリグルタミン病に対する蛋白質ミスフォールディング・凝集を 標的とした分子治療

永井 義隆

(臨床神経, 49 : 913—916, 2009)

Key words : ポリグルタミン病, ミスフォールディング, 凝集, β シート, 分子シャペロン

1. はじめに

近年の分子遺伝学的・分子生物学的研究の進展から、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ポリグルタミン (PolyQ) 病などの神経変性疾患のうちの遺伝性疾患について、大部分の原因遺伝子異常が明らかにされ、いずれの遺伝子異常によってもミスフォールディング・凝集しやすい異常蛋白質が産生されることが明らかになった。これらの遺伝性疾患のみならず孤発性疾患においても、従来から異常蛋白質をふくむ様々な封入体が患者脳内の神経細胞内外に蓄積していることが知られており、これらの多彩な神経変性疾患において、異常蛋白質のミスフォールディング・凝集が神経変性をひきおこすという共通の発症分子メカニズムが想定されるようになった (Fig. 1)¹⁾。このうち PolyQ 病は、様々な原因遺伝子内のグルタミンをコードする CAG リピートの異常伸長 (>35~40) という共通の遺伝子異常により発症するハンチントン病、脊髄小脳失調症 1, 2, 3, 6, 7, 17 型、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、球脊髄性筋萎縮症など 9 疾患の総称である。PolyQ 病に共通の発症分子メカニズムとして、PolyQ 鎖の異常伸長により原因蛋白質のミスフォールディングを生じ、その結果可溶性のオリゴマー、難溶性の凝集体を形成して神経変性をひきおこすと考えられている (Fig. 2)¹⁾。

2. 蛋白質ミスフォールディング・凝集を標的とした治療法開発

私達は、PolyQ 病の発症カスケードのもっとも上流に位置する異常伸長 PolyQ 蛋白質のミスフォールディング・凝集が、病因を抑制する根本的治療法の標的として最適であると考へた。まず、異常伸長 PolyQ 蛋白質が凝集体形成にいたる過程での構造異常、そして神経毒性を発揮する構造体を特定し、治療標的を明らかにするために、蛋白質構造解析を試みた。PolyQ 鎖の溶解度を改善するために、Thioredoxin を融合させたモデル蛋白質 Thioredoxin-PolyQ (Thio-PolyQ) をデザインし、円偏光二色性分散、Native PAGE、ゲルろ過クロマト

グラフィー、超遠心分析、フーリエ変換赤外分光、電子/原子間力顕微鏡などをもちいて詳細な生化学的・構造生物学的解析をおこなった。その結果、Thio-PolyQ は溶液状態で PolyQ 鎖長依存的な α ヘリックス構造の増加を示すが、異常鎖長の Thio-Q62 ではモノマーレベルで経時的に β シート構造への異常コンフォメーション変移を生じて、難溶性のアミロイド線維状凝集体を形成した。さらに COS-7 細胞へのマイクロインジェクション実験から、Thio-Q62 のアミロイド線維状凝集体のみならず可溶性 β シートモノマーも細胞毒性を発揮することをみいだした。以上の結果から、異常伸長 PolyQ 蛋白質はアミロイド状凝集体を形成する前のモノマーの段階で、 β シート構造への異常コンフォメーション変移を経て細胞毒性を獲得すると結論した²⁾。

そして、私達は異常伸長 PolyQ 蛋白質のミスフォールディング・凝集を標的とした治療法として、1) 異常伸長 PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1 の応用、2) PolyQ 凝集阻害化合物のスクリーニング、3) 分子シャペロン発現誘導剤の応用の 3 つの方法で研究をおこなっている (Fig. 2)¹⁾。私達は異常伸長 PolyQ 鎖に特異的に結合する分子によってそのミスフォールディング・凝集を阻害できる可能性を考え、ファージディスプレイ法をもちいて異常伸長 PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1 (SNWKWPGIFD) を同定した³⁾。そして実際に QBP1 が *in vitro* での異常伸長 PolyQ 蛋白質の毒性 β シート構造変移・凝集体形成を阻害し²⁾³⁾、細胞内でのオリゴマー形成を阻害することを明らかにした⁴⁾。そして QBP1 の発現により PolyQ 病モデルショウジョウバエの複眼変性、寿命短縮が抑制されることをみだし、*in vivo* での治療効果を明らかにした⁵⁾。さらに、細胞膜透過性ペプチド PTD を付加した PTD-QBP1 を体外から投与して PolyQ 病モデル動物に対する治療効果を明らかにし、分子治療の可能性を示した⁶⁾⁷⁾。現在、QBP1 を応用した PolyQ 病の創薬へ向けて、QBP1 の構造活性相関から低分子化・化合物アナログの設計をめざしている⁸⁾。

また、私達は体外からの投与により高い脳内移行性が期待される低分子化合物に着目し、QBP1 と同様に異常伸長 PolyQ 蛋白質の凝集阻害活性を持つ化合物のスクリーニングをおこなっている。これまでに約 46,000 化合物からなる低分

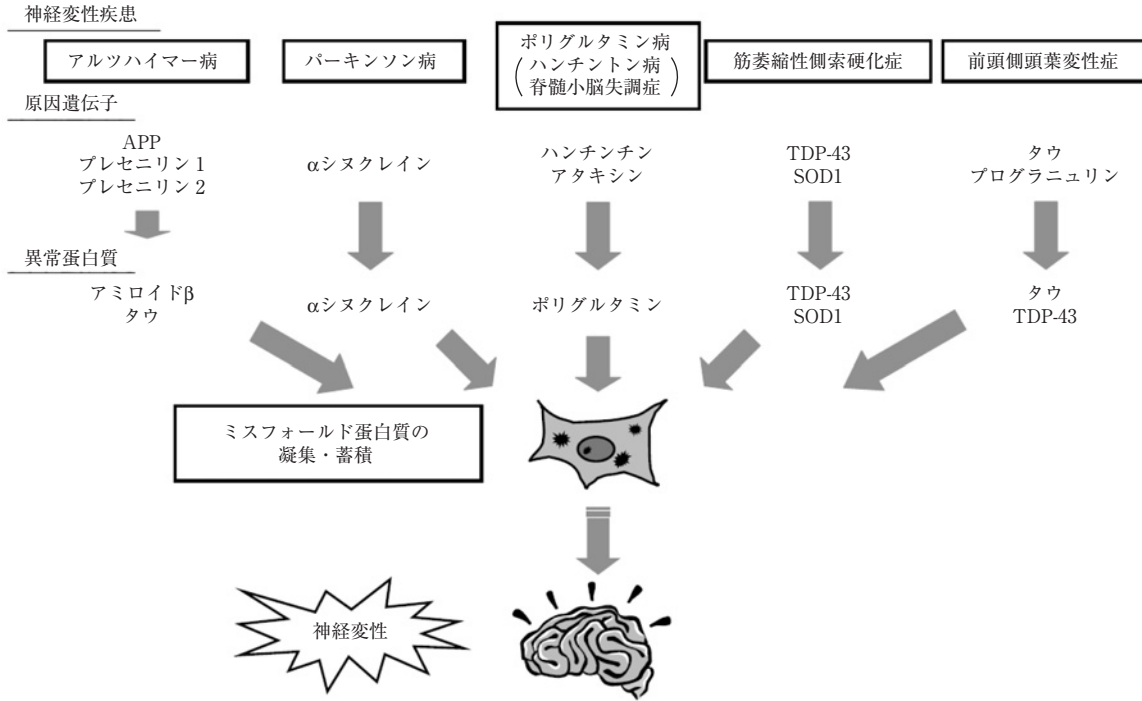


Fig. 1 神経変性疾患共通の発症分子メカニズムとしての異常蛋白質のミスフォールディング・凝集

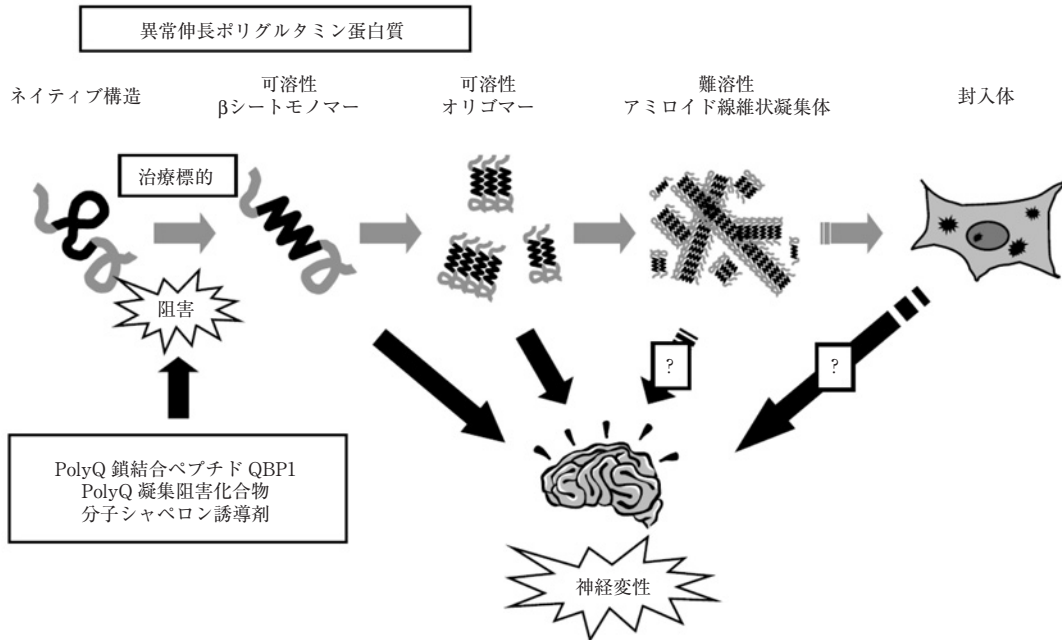


Fig. 2 蛋白質ミスフォールディング・凝集を標的としたポリグルタミン病の治療法開発

子化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニングをおこない、約 100 種類の新規 PolyQ 凝集阻害化合物を同定した。しかしながら、1 次ヒット化合物の中には非特異的結合を示す偽陽性ヒットも多くふくまれているため、現在表面プラズモン共鳴法をもちいて異常伸長 PolyQ 鎖特異的な凝集阻害化合物の選別をおこなっている⁹⁾。そして一部の化合物につ

いては、PolyQ 病モデルショウジョウバエの神経変性を抑制することをすでにみだしている (未発表)。

一方、元來生体内に備わっている蛋白質ミスフォールディングに対する防御システムである分子シャペロンの発現誘導剤をもちいた治療法開発研究もおこなっている。これまでに、分子シャペロン群の発現制御をおこなっている熱ショック転

写因子 (HSF1) の活性化に着目して, ゲルダナマイシンやその誘導体 17-AAG が内在性の Hsp70 や Hsp40 などの分子シャペロン群の発現を誘導し, 脊髄小脳失調症やハンチントン病など複数の PolyQ 病モデルショウジョウバエの神経変性を抑制することを明らかにした¹⁰⁾.

3. おわりに

冒頭で述べたように, 神経変性疾患の多くは異常蛋白質のミスフォールディング・凝集に起因すると考えられるため, 私達の治療戦略はポリグルタミン病のみならず, アルツハイマー病, パーキンソン病, 筋萎縮性側索硬化症など他の神経変性疾患にも広く応用できると考えられる. 神経変性疾患をひきおこす様々な異常蛋白質は, 一次構造はまったくことなるにもかかわらずいずれも β シート構造に富んだアミロイド線維状凝集体を形成することが明らかにされており, さらに異常伸長 PolyQ 蛋白質の凝集阻害化合物は, 他の異常蛋白質の凝集阻害活性をも併せ持つことが実際に示されている. 一方, 分子シャペロンの発現誘導剤もパーキンソン病, 筋萎縮性側索硬化症などの動物モデルにおいて治療効果が示されている. 以上のことから, 蛋白質ミスフォールディング・凝集を標的とした治療戦略から, これらの難治性神経変性疾患に広く共通の治療薬が開発されることが期待される.

文 献

- 1) Nagai Y, Popiel HA: Conformational changes and aggregation of expanded polyglutamine proteins as therapeutic targets of the polyglutamine diseases: exposed β -sheet hypothesis. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 3267—3279
- 2) Nagai Y, Inui T, Popiel HA, et al: A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14: 332—340
- 3) Nagai Y, Tucker T, Ren H, et al: Inhibition of polyglu-

tamine protein aggregation and cell death by novel peptides identified by phage display screening. *J Biol Chem* 2000; 275: 10437—10442

- 4) Takahashi Y, Okamoto Y, Popiel HA, et al: Detection of polyglutamine protein oligomers in cells by fluorescence correlation spectroscopy. *J Biol Chem* 2007; 282: 24039—24048
- 5) Nagai Y, Fujikake N, Ohno K, et al: Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 1253—1259
- 6) Popiel HA, Nagai Y, Fujikake N, et al: Protein transduction domain-mediated delivery of QBP1 suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration *in vivo*. *Mol Ther* 2007; 15: 303—309
- 7) Popiel HA, Nagai Y, Fujikake N, et al: Delivery of the aggregate inhibitor peptide QBP1 into the mouse brain using PTDs and its therapeutic effect on polyglutamine disease mice. *Neurosci Lett* 2009; 449: 87—92
- 8) Tomita K, Popiel HA, Nagai Y, et al: Structure-activity relationship study on polyglutamine binding peptide QBP1. *Bioorg Med Chem* 2009; 17: 1259—1263
- 9) Okamoto Y, Nagai Y, Fujikake N, et al: Surface plasmon resonance characterization of specific binding of polyglutamine aggregation inhibitors to the expanded polyglutamine stretch. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 378: 634—639
- 10) Fujikake N, Nagai Y, Popiel HA, et al: Heat shock transcription factor 1-activating compounds suppress polyglutamine-induced neurodegeneration through induction of multiple molecular chaperones. *J Biol Chem* 2008; 283: 26188—26197

Abstract**Molecular therapy targeting protein misfolding and aggregation for the polyglutamine diseases**

Yoshitaka Nagai, M.D., Ph.D.

Department of Degenerative Neurological Diseases, National Institute of Neuroscience,
National Center of Neurology and Psychiatry

Abnormal aggregation and deposition of misfolded proteins have been recognized as a common molecular pathogenesis of various neurodegenerative diseases including Alzheimer's, Parkinson's, and the polyglutamine (polyQ) diseases. The polyQ diseases, including Huntington's disease and various spinocerebellar ataxias, are caused by abnormal expansions of the polyQ stretch (> 35-40) within disease-causative proteins, which are thought to trigger their misfolding and aggregation, leading to their deposition as inclusion bodies, and eventually resulting in neurodegeneration. We found that the expanded polyQ protein undergoes a conformational transition to a β -sheet dominant structure in the monomeric state, triggering cytotoxicity, and subsequently resulting in formation of insoluble amyloid-like fibrillar aggregates. Targeting misfolding and aggregation of the expanded polyQ protein, we demonstrated that QBP1 (PolyQ-Binding Peptide 1: SNWKWWPGIFD) prevents the toxic β -sheet transition and aggregation of the expanded polyQ protein *in vitro* and suppresses polyQ-induced neurodegeneration in *Drosophila*. From high-throughput screening of a chemical compound library (46,000), we have identified approximately 100 polyQ aggregate inhibitors as therapeutic candidates so far. We also found that 17-AAG, an HSF1-activating compound, suppresses polyQ-induced neurodegeneration in *Drosophila* through induction of endogenous molecular chaperones. We propose that our therapeutic strategy targeting protein misfolding and aggregation can also be applied to other neurodegenerative diseases.

(Clin Neurol, 49: 913—916, 2009)

Key words: polyglutamine diseases, misfolding, aggregation, β -sheet, molecular chaperone
