

## 論文内容の要旨

# ポリアラニン鎖によるミトコンドリアを介した毒性誘導機構の解明

鳥海 和也

### [背景と目的]

真核生物内では、単一アミノ酸の繰り返し領域（ポリアミノ酸）をもつタンパク質が、数多く存在することが報告されている。その中でも、ポリアラニン領域をもつタンパク質は多く、5残基以上のポリアラニン鎖は、ヒトでは494ものタンパク質内に存在しており、それぞれ特徴的なコンフォメーションをとりながら、タンパク質の機能にさまざまな形で関わっている。

一方で、ポリアラニン鎖は疾患を引き起こす原因ともなり得る。1996年、手足の指に形成不全が見られる優性遺伝疾患の合多指症（SPD）の患者の遺伝子内で、ポリアラニン鎖をコードする部分が伸長しているのが発見された。これを機に、眼咽頭性筋ジストロフィー（OPMD）、鎖骨頭蓋形成異常症（CCD）、X連鎖性精神遅滞・癲癇（XLMR-E）、手足性器症候群（HFGS）など、全9疾患において、次々に原因タンパク質内のポリアラニン鎖異常伸長が確認され、その総称として、先に発見されていたポリグルタミン病に対しポリアラニン病と名付けられた。このポリアラニン病の特徴としては、ポリアラニン鎖の長さや症状の重篤度との間に相関が見られること、また、患部組織の細胞内において凝集体が確認されることが挙げられる。異常に伸長したポリアラニン鎖がどのような機構を介し患部細胞において毒性をもたらすのかについては未知の点が多く、早急なる解明が求められている。

そこで、私は修士課程での研究において、このポリアラニン鎖が引き起こす毒性をもたらす因子としてポリアラニン鎖に直接結合するタンパク質の同定を試みた。GST pull down法およびマスマスペクトロメトリーを用いたスクリーニングの結果、多くのミトコンドリアタンパク質が同定された。

現在までに、ポリアラニン鎖とミトコンドリアの関連した細胞死誘導とを詳細に検討した報告はない。ただ、ポリアラニン病のひとつである OPMD の患者筋組織においては、ミトコンドリアが膨張し、異常な形態を示しているという病理学的な知見が報告されている。このミトコンドリアを介した毒性機構が詳細に解析されれば、新規の知見であるのみならず、ポリアラニン病の治療に直接結びつくことは想像に難くない。そこで本研究では、ポリアラニン鎖による細胞毒性にミトコンドリアの関与はあるのかを明らかにし、また、その詳細な機構を解析することを目的として、実験を行った。

## [結果と考察]

### (1) ポリアラニン鎖による細胞毒性

まず、YFP の C 末端側にアラニン 29 リピート (YFP-A29) と 70 リピート (YFP-A70) を付加したコンストラクトを COS-7 細胞にトランスフェクションし、局在と毒性の検討を行った。その結果、YFP-A29 及び YFP-A70 の局在は、核以外の主に細胞質に見られ、YFP-A70 においてはポリアラニン病共通の特徴である複数の小さな凝集体が確認された。さらに、ポリアラニン鎖の長さに依存的な細胞毒性も観察された。この結果は、先行研究とも一致し、ポリアラニン鎖自体に毒性が備わっていることを示すものであった。

### (2) ポリアラニン鎖とミトコンドリアの相互作用

修士課程での研究において、ポリアラニン鎖に結合するタンパク質をスクリーニングしたところ、同定に至った 5 つのタンパク質のうち、4 つまでもがミトコンドリアタンパク質であった。この結果は、ポリアラニン鎖がそれらひとつずつと結合しているというよりむしろ、ミトコンドリア自体に直接結合していることを示しているのではないかと考え、その可能性を検討することにした。

YFP に様々な長さのポリアラニン鎖を付加したコンストラクトを COS-7 細胞に導入し、その細胞からミトコンドリアを単離した結果、23 残基以上のポリアラニン鎖がミトコンドリアと相互作用する可能性が示された。ポリアラニン病を発症させるポリアラニン鎖の長さの閾値が約 20 残基であることを考えると、この結果はポリアラニン病の発症にミトコンドリアが関与している可能性を強く示唆するものであった。

### (3) ポリアラニン鎖によるアポトーシス誘導

次に、ポリアラニン鎖がその相互作用を介して、ミトコンドリアにどのような影響を与えるのかを検討するため、ミトコンドリア全体の機能活性の指標となりうる膜電位の比較をフローサイトメトリーにより行った。その結果、ポリアラニン鎖を発現したものでは、YFP を発現したものに比べ、ミトコンドリア膜電位が約 70% にまで低下していた。この膜電位の低下は、ミトコンドリアのエネルギー産生能の低下を意味している。

また、このミトコンドリア膜電位の低下は、ミトコンドリアを介したアポトーシス誘導の初期の現象としても知られている。そこで、次に、ポリアラニン鎖によるミトコンドリア膜電位の低下を受け、アポトーシス誘導因子であるシトクロム c が放出されているかどうかを確認することにした。その結果、ポリアラニン鎖の発現により、その長さ依存的にシトクロム c がミトコンドリアから細

胞質へ放出されていることが分かった。

さらに、このシトクロム c の放出はポリアラニン鎖の直接的な作用によるものかどうかを検討するために、*in vitro* 下でのシトクロム c の放出実験を行った。マウス肝臓より単離したミトコンドリアに GST 融合ポリアラニン鎖 29 リピート (GST-A29) を様々な濃度で添加したところ、1.5 $\mu$ M 以上加えたミトコンドリアからシトクロム c の放出が引き起こされていた。また、4.0 $\mu$ M、8.0 $\mu$ M 添加したとき、本来ミトコンドリア内膜に存在するはずの COX4 がミトコンドリア外でも検出された。この結果は、高濃度のポリアラニン鎖がミトコンドリアの膜構造を破壊した可能性を示唆するものである。伸張したポリアラニン鎖の発現は、その濃度依存的に疎水性の強いオリゴマー形成を引き起こす。このオリゴマーを形成したポリアラニン鎖が、その強い疎水性効果によりミトコンドリア膜を破壊するようになるのかもしれない。その膜構造の破壊の際、シトクロム c の放出が引き起こされている可能性が考えられた。

前述したように、シトクロム c の放出を受けてアポトーシスは促進される。そこで、次に、ポリアラニン鎖発現によるシトクロム c の放出を受け、アポトーシスを実行するカスパーゼ 3 が活性化されているかを蛍光基質により検討した。その結果、ポリアラニン鎖の長さ依存的に活性化されているのが分かった。

以上の結果より、ポリアラニン鎖はミトコンドリアと相互作用し、直接シトクロム c の放出を誘導することで、アポトーシスを引き起こしていることが明らかになった。この一連の毒性誘導機構は、新規の知見であるだけでなく、ポリアラニン病共通の発症機構の解明、さらには治療法の開発に直接結びつく成果であった。

#### (4) ポリアラニン鎖によるミトコンドリア機能障害

ポリアラニン鎖結合タンパク質のスクリーニングの結果から、ポリアラニン鎖とミトコンドリアが相互作用している可能性を示してきたが、ポリアラニン鎖とこれらタンパク質とが直接相互作用している可能性も検討する必要がある。そこで、スクリーニングにおいて、マウスの脳と骨格筋の両方で同定された SDHA というタンパク質に注目した。SDHA はミトコンドリアの内膜に存在するコハク酸脱水素酵素 (SDH) のサブユニットのひとつであり、核にコードされ、転写翻訳後、ミトコンドリアに輸送される。ミトコンドリア分画により、ポリアラニン鎖の発現下におけるミトコンドリア内 SDHA タンパク質量を比較したところ、低下していることが分かった。さらに、SDH の活性も低下していた。SDH 活性の低下は ATP 合成の低下につながり、最終的には ATP が関与するすべての細胞内現象に異常をもたらすことになる。加えて、SDH は呼吸鎖の中の複合体 II でもあり、その活性の低下は膜電位の低下を引き起こす原因にもなる。この SDH の機能低下がミトコンドリアを介したアポトーシスを亢進させている可能性も考えられる。

### **[今後の展望]**

ポリアラニン鎖によるミトコンドリアを介したアポトーシス誘導機構をさらに詳細に検討するために、アポトーシス抑制タンパク質 Bcl-2 の過剰発現や、シクロスポリン A などのミトコンドリア保護薬の投与により、ポリアラニン鎖による細胞死を抑制することができるのか、また、シトクロム c の放出の直下にあたるカスパーゼ 9 が活性化されているか、などを検討していきたいと考え

ている。さらに、実際のポリアラニン病原因タンパク質を用い、ミトコンドリアとの相互作用やシトクロムcの放出、カスパーゼの活性化などが引き起こされるのかも、併せて検討していきたい。

ミトコンドリアの機能障害に関しては、ミトコンドリア内においてSDHAタンパク質量が低下していた原因を追究していきたい。加えて、ミトコンドリアの機能障害の結果として、細胞内ATPの減少が引き起こされているかも併せて検討する予定である。