

## 第 I 章

**Ataxin-3** の凝集体形成性と細胞死に対する

ケミカル・シャペロンの効果に関する研究

(1). 目的.

Machado-Joseph 病(MJD)は, MJD 遺伝子によってコードされたタンパクである ataxin-3 におけるポリグルタミンの伸長によって引き起こされる遺伝性の神経変性疾患である. 変異 ataxin-3 が凝集体形成と細胞死を引き起こすメカニズムは明らかにはされていないけれども, 伸長ポリグルタミン鎖の存在は正常タンパクのコンフォメーションを不安定にし, 異常なタンパク・タンパク間の相互作用を通じて  $\beta$ -sheet (ベータシート)構造を変化させるに至ることが仮定されている (1).

最近の研究では, 細胞毒性において伸長ポリグルタミンを含むタンパクのミスフォールディングと凝集体形成を促進するコンフォメーション変化の重要性が強調されている (2-4). Perutz らは, より長くなったポリグルタミンの繰り返しが, タンパク構造を不安定化する hydrogen-bonded hairpins を形成し, その結果, polar-zipper action を介して凝集体形成を引き起こすという仮説を提唱した (1). 後に, 通常条件下及びストレス条件下の両方でミスフォールドタンパクを認識し, タンパク凝集体を抑制するシャペロンタンパクの過剰発現が, 培養細胞及びトランスジェニックアニマルにおいて凝集体形成と細胞死の頻度を減少させることが示されてきた (5-11). また, 分子シャペロンの発現は伸長ポリグルタミン鎖を持つ短縮型 ataxin-3 を過剰発現している細胞においてアップレギュレートされていることも報告されている (6). これらのデータは, 伸長ポリグルタミンドメインを含むタンパクフラグメントのミスフォールディングが細胞に凝集体形成と細胞死をもたらす, 従って, タンパクのミスフォールディングの抑制がポリグルタミン病に対する有効な治療戦略になる可能性があることを示唆している.

我々は, インビトロで細胞培養系を使うことによって, タンパクをそれら本来のコンフォメーションに安定化させる低分子量化合物が, 伸長ポリグルタミン鎖を持つ短縮型 ataxin-3 によって誘発される凝集体形成と細胞死に関して, 分子シャペロンの発現と同様の効果があるかどうかを検討した. これらの試薬には dimethyl sulfoxide (DMSO), Glycerol, trimethylamine N-oxide (TMAO)等があり, タンパクのコンフォメーションに影響を与えるためにケミカル・シャペロ

ンと呼ばれている (12).

我々は、ポリグルタミン鎖の伸長した異常 ataxin-3 フラグメントを培養細胞に発現させることで細胞凝集体と細胞死を誘導するモデル細胞系を開発した。このモデル系は、凝集体形成性と細胞死に影響を及ぼす物質のスクリーニングに使用可能と考えられるが、本研究では、第一段として、ケミカル・シャペロンの効果について検討した。

## (2). 対象及び方法.

### 2-1. 細胞培養 :

ハムスター腎臓由来 BHK-21 細胞(Baby Hamster Kidney cell)を、10%胎児牛血清(fetal bovine serum; FBS, Gibco BRL)及び 100 µg/ml の濃度の penicillin-streptomycin(Gibco BRL)が添加された Dulbecco's modified Eagle's medium(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)にて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> / 95% air の条件下でインキュベーター内で培養した。

### 2-2. 異常(Q77)全長(full-length)MJD 遺伝子, 及び異常(Q77)短縮型(truncated form)MJD 遺伝子を発現するプラスミドの作製 :

C 末側に myc エピトープを付けた 77 個のポリグルタミンを持つ全長 ataxin-3 (Fig. 1A)発現ベクターは、両端に *Bam* HI 及び *Kpn* I site を有し、かつ、77 回の CAG リピートを持つ全長 MJD cDNA を pcDNA3.1-Myc-His C(Invitrogen, San Diego, CA)に *Bam* HI 及び *Kpn* I site で組み込み作製した (pMJD-FL-Q77-myc). さらに、N 末側のアミノ酸の数を 286 個欠損させた ataxin-3 (Fig. 1B)発現ベクターも同様に作製した。すなわち、pMJD-FL-Q77-myc をテンプレートとして、センスプライマーにはイニシャルコドンとともに *Bam* HI site を導入し、アンチセンスプライマーには *Kpn* I 認識 site を入れて PCR にて増幅後、pcDNA3.1-Myc-His C の *Bam* HI-*Kpn* I site に挿入し、短縮型 pMJD-Q77(ΔN286)-myc を構

築した。

### 2-3. 遺伝子導入：

BHK-21細胞は、ポリ-D-リジンでコートした2-ウェルのスライドガラスチェンバー(Poly-D-lysine coated slide glass chamber 2-well; Beckton-Dickenson, Bedford, MA)の各ウェルに1 mlの培養液を入れ、 $2.5 \times 10^4$ 個の細胞密度で播種した。播種後8時間の時点で、各ウェルにつき総計1.76 $\mu$ gのプラスミドDNAをリン酸カルシウム法(共沈)によって一過性に遺伝子導入(トランスフェクション)した。トランスフェクション施行後4時間で、培地を各種薬剤を含む新しい培養液に交換し、さらに44時間培養後(トランスフェクション開始から48時間後)に4%パラホルムアルデヒドにて固定した。

### 2-4. 投与薬剤：

この研究では、上述したように、トランスフェクション後4時間の時点で、ケミカル・シャペロンとして、dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, St. Louis, MO), Glycerol (Wako, Osaka, Japan), 及び trimethylamine N-oxide (TMAO; Lancaster, White Lund, UK)の3剤を投与した。DMSOは0%, 0.1%, 0.5%, 1.0% (v/v)濃度, Glycerolは0%, 0.5%, 1.0%, 2.0% (v/v)濃度, TMAOは0mM, 50mM, 100mM, 150mM濃度を使用した。さらに、抗酸化剤として、glutathione monoethyl ester (GSH-MEE; Calbiochem, La Jolla, CA) と N-acetyl-L-cysteine (NAC; Calbiochem, La Jolla, CA)の2剤を投与した。GSH-MEEは0mM, 0.5mM, 1.0mM, 2.5mM濃度, NACは0mM, 1.0mM, 2.5mM, 5.0mM濃度を使用した。各薬剤は、上記濃度範囲において薬剤自体による細胞への影響は認められなかった。

2-5. 免疫蛍光染色法とDNA染色法による凝集体形成と細胞死の頻度測定:

組み換えタンパク, すなわち myc タグを付けた ataxin-3 の発現は, 抗 myc 抗体を用いた間接蛍光抗体法によって評価した. 固定した細胞を 20 分間, 0.05 % Tween 20 を含む PBS (phosphate-buffered saline) にて洗浄した後, 1 次抗体 (200 倍希釈, 抗 myc マウスモノクローナル抗体, Ab-2; NeoMarkers, Union City, CA) を乗せ, 4°C で 24 時間インキュベートした. 次いで 2 次抗体 (400 倍希釈, Cy3-conjugated 抗マウス IgG 抗体, Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) を乗せ, 室温で 1 時間インキュベートした後, さらに Hoechst dye (Hoechst 33258) で室温で 2 分間インキュベートした. そして, PBS-Glycerin (9:1) にて封入した. 核の形態はこの Hoechst dye 33258 を使った DNA 染色によって評価した.

免疫蛍光は, 蛍光顕微鏡で 420 倍で観察し, 168 倍の低倍率で写真撮影した. 凝集体形成頻度は蛍光顕微鏡下で無作為に選択された視野で myc エピトープを発現している細胞を 500 個以上解析することで評価した. つまり, myc エピトープを有する全細胞に対する明確に凝集体を形成している細胞の比率を計算した. また, 細胞死の頻度は myc 陽性細胞の中で, Hoechst 33258 で染色された核の形態に基づいて評価した. すなわち, 核の形態において, アポトーシスの指標である核の断片化・破砕化や核濃縮を来しているものを計数し, 頻度を求めた.

全てのデータは平均  $\pm$  標準偏差で表した. 統計的解析には StatView software (Ver. 4.0, Abacus Concepts) の Mann-Whitney's U-test を使用した. そして,  $P < 0.05$  を統計的有意差があると見なした.

2-6. ウェスタンブロット法による発現タンパクの検討

BHK-21 細胞に pMJD-Q77( $\Delta$ N286)-myc をトランスフェクションし, 4 時間後にコントロールと 0.5 % DMSO を添加したものを作製した. さらに 44 時間の時点でタンパクを可溶化, 抽出した. タンパクサンプルは 10 % SDS-PAGE で分画した後, ナイロンメンブレンに転写し, 1 次抗体に抗 myc 抗体 (400 倍希釈), 2 次抗体に HRP-conjugated 抗マウス IgG 抗体 (500 倍希釈) を用いてウェスタンブ

ロテイングを施行した。バンドの検出はベーリンガー化学発光システムを用い、X線フィルムに露光して検討した。

(3). 結果.

3-1. インビトロ下における変異 ataxin-3 による凝集体形成及び細胞死の細胞モデル:

我々は伸長ポリグルタミン鎖を有する N 末端短縮型 ataxin-3 の発現が BHK-21 細胞において凝集体形成と細胞死を引き起こすことを以前に報告した (13)。Figure 1 は組み換えタンパク Q77( $\Delta$ N286)-myc, すなわち 286 アミノ酸の N 末端欠失と共に 77 個のポリグルタミンを有する ataxin3 タンパクを示している。我々は BHK-21 細胞の中に一過性にトランスフェクションするために Q77( $\Delta$ N286)-myc をコードしているプラスミドを作製した。Q77( $\Delta$ N286)-myc の発現は BHK-21 細胞における凝集体形成と細胞死を誘発した。従って、これはインビトロにおける MJD の病因を解明する細胞モデル系として使用可能と考え、これを用いて凝集体形成と細胞死に影響を及ぼす物質の薬理学的効果を検討した。

3-2. DMSO の短縮型 ataxin-3(Q77)による凝集体形成と細胞死に対する効果:

結果は、凝集体は DMSO の添加によって用量依存性に減少を示した (Fig. 2A)。DMSO 無添加のコントロールでは、Q77( $\Delta$ N286)-myc を発現している細胞の  $58.9 \pm 5.5\%$  (mean  $\pm$  SD) が凝集体を含有していた。これに対し、0.5% (v/v) DMSO の存在下では、Q77( $\Delta$ N286)-myc を発現している細胞の  $35.2 \pm 2.8\%$  にまで凝集体が減少していた。両者の凝集体形成頻度には統計学的に有意差を認められた ( $p < 0.002$ )。Fig. 3 には Q77( $\Delta$ N286)-myc を発現している BHK-21 細胞の免疫蛍光像を示している。Fig. 3A は DMSO 無添加のコントロールの場合であり、Fig. 3C は 0.5% (v/v) DMSO 添加の結果である。また、凝集体の性状に関しては、

0.5 % (v/v) DMSO の存在下では大きな塊状の細胞内凝集体は著明に減少していた。DMSO 自体の毒性は、1.0 % (v/v) 濃度までは細胞死に重大な影響を与えてはいなかったが、凝集体形成の抑制効果は 0.5 % (v/v) 濃度で最大で、1.0 % (v/v) DMSO でフラットになった。

我々は、DNA 染色法における核の形態に基づいて、DMSO の存在下での Q77( $\Delta$ N286)-myc の発現によって引き起こされる細胞死を評価した (Fig. 2B)。結果は、凝集体形成の場合と同様に、DMSO は統計学的に有意に細胞死の頻度を抑制した。DMSO 無添加のコントロールの場合には、Q77( $\Delta$ N286)-myc を発現している細胞の  $19.9 \pm 1.7$  % が細胞死を呈した。0.5 % (v/v) DMSO の存在下では、細胞死の頻度は  $14.3 \pm 1.2$  % まで減少し、統計的有意差を認めた ( $p < 0.002$ )。Fig. 3B と 3D には、Hoechst dye で DNA 染色された遺伝子導入細胞を低倍率で見たものを示しているが、DMSO 投与による核の破碎・断片化や核濃縮の抑制が認められた。DMSO による細胞死の抑制もまた 0.5 % (v/v) 濃度で最大であった。

これらの結果より、DMSO は同じ濃度で Q77( $\Delta$ N286)-myc による凝集体形成と細胞毒性を効果的に抑制していると考えられた。しかしながら、これらはいずれも DMSO の投与によって完全には抑制されなかった。

なお、DMSO の効果が、組み換えタンパクの発現量を減少させているためという可能性が残る。このため、我々は、コントロール (DMSO 無添加) と 0.5 % (v/v) DMSO 条件下の培養細胞に対しウェスタンブロッティングを施行し、タンパクを定量した。結果は、DMSO の有無に拘わらず組み換えタンパクの発現量は、データは示さないが同じであった。従って、DMSO は組み換えタンパクの発現に影響を与えてはいないようであり、凝集体形成と細胞毒性に対する DMSO の効果は、Q77( $\Delta$ N286)-myc タンパクの発現量を減少させるためであるという可能性は否定的と考えた。

3-3. Glycerol 及び TMAO の短縮型 ataxin-3(Q77)による凝集体形成と細胞死に対する効果 :

我々の今回の実験は, DMSOがQ77( $\Delta$ N286)-mycの発現において凝集体形成と細胞死を抑制するのに効果的であることを示した. もし, DMSOがタンパクのコンフォメーションに作用しているとしたら, タンパクをそれらの本来のコンフォメーションに安定化させることで知られている他の試薬もまた, 凝集体と細胞死を抑制するのに有効であるはずである. こうした試薬には Glycerol や trimethylamine N-oxide (TMAO)が存在する (12). 従って, 我々は次にこれらの薬剤の投与が, DMSO同様にQ77( $\Delta$ N286)-mycによる凝集体と細胞死を減少させるかどうかを調査した.

Glycerol は, 2.0 % (v/v) 濃度までは, BHK-21 細胞の成長に関して毒性を示さなかった. 凝集体形成は Glycerol の投与によって用量依存性に減少を示した (Fig. 4A). 2.0 % (v/v) Glycerol の存在下では, Q77( $\Delta$ N286)-myc を発現している細胞の凝集体の頻度は  $36.7 \pm 4.6$  % であり, Glycerol無添加のコントロールの頻度が  $60.8 \pm 2.8$  % であるのに比較して明らかに減少を示し, 統計的有意差を認めた ( $p < 0.003$ ). Fig. 5A の免疫蛍光像には, 凝集体形成性に対する Glycerol の抑制効果が示されている. また, 細胞死の頻度も Glycerol の存在下で用量依存性に減少した (Fig 4B と 5B). Glycerol 無添加では, Q77 ( $\Delta$ N286)-myc を発現している細胞のうち  $20.6 \pm 1.2$  % が細胞死を示した. これに対して, 2.0 % Glycerol の存在下では  $14.1 \pm 1.1$  % にまで細胞死が減少し, 統計的有意差を認めた ( $p < 0.003$ ). Glycerol による凝集体形成及び細胞死の抑制はともに 2.0 % (v/v) 濃度で最大であった.

TMAO を用いた実験でも同様の結果が得られた. TMAO は 150mM の濃度まで細胞の生育に影響を与えなかったため, 我々は, 0mM から 150mM までの濃度を使用した. 凝集体形成は, やはりこの濃度範囲内で用量依存性に抑制された (Fig. 4C と 5C). 凝集体の頻度はコントロールでは  $60.8 \pm 2.6$  % であるのに対し, 150mM TMAO の存在下では  $42.3 \pm 2.0$  % と減少傾向を示した. また, 細胞死の



頻度もコントロールでは  $20.1 \pm 2.6\%$  であるのに対し, 150mMTMAO の存在下では  $15.3 \pm 1.3\%$  と減少傾向を示した (Fig. 4D と 5D). いづれの場合も, 統計的有意差を認めた ( $p < 0.04$ ). TMAO による凝集体形成及び細胞死の抑制はともに 150mM 濃度で最大であった.

上記の DMSO, Glycerol, TMAO の実験結果より, 我々はタンパクのコンフォメーションを安定化する試薬は変異短縮型 ataxin-3 によって引き起こされる凝集体形成と細胞死を抑制するのに有効であると結論づけた.

#### 3-4. 抗酸化剤である NAC 及び GSH-MEE の短縮型 ataxin-3(Q77)による凝集体形成と細胞死に対する効果:

既に述べたように, DMSO はタンパクのコンフォメーションを安定化させることで知られているが, DMSO はまた, ヒドロキシラジカルのスキャベンジャーとしての作用もある (14). 従って, 我々は, DMSO の抗酸化剤としての特性が, 変異 ataxin-3 によって誘発される凝集体形成と細胞死を抑制しているか否かを確認する必要があると考えた. そこで, 2つの抗酸化剤, すなわち N-acetyl-L-cysteine (NAC) と glutathione monoethyl ester (GSH-MEE) を選択し評価した. NAC と GSH-MEE はともにチオール成分 (基) を有し, 細胞内 GSH を変化させることによってその効果を発揮するとされている (15). NAC も GSH-MEE も両方とも, これらの試薬の直接的な細胞毒性が認められない濃度範囲において, 凝集体形成に明らかな影響を与えなかった (Fig. 6A と 6C). 同様に, NAC あるいは GSH-MEE の添加によって細胞死の頻度に重大な影響は認められなかった (Fig. 6B と 6D). これらのデータは, 酸化ストレスが必ずしも変異 ataxin-3 によって誘発される細胞死の主因ではない可能性を示唆している. 結論的には, 変異 ataxin 3 による凝集体形成と細胞死に対する DMSO の保護的効果は, DMSO の抗酸化的作用によるものというより, タンパクのコンフォメーションの安定化作用によってもたらされている可能性が高いと考えた.

## (4). 考察

我々は、インビトロ下でMJDの細胞モデルを用いて、伸長ポリグルタミン鎖を持つ短縮型 ataxin-3 により誘発された凝集体形成と細胞死に対して、タンパクをそれら本来のコンフォメーションに安定化させることで知られている薬剤であるケミカル・シャペロンを投与してその効果を評価した。ケミカル・シャペロンの由来は、その作用が、ストレス下で生じるミスフォールドタンパクをリフォールディングするのを補助し、その結果、凝集体形成を阻害することで知られている分子シャペロンに類似しているためである (12, 23, 24).

1996年、Tatzeltらは、ケミカル・シャペロンがスクレーピープリオンタンパクの形成を阻害することを報告した。まず、プリオン病は細胞内プリオンタンパク( $\text{PrP}^{\text{C}}$ )の $\alpha$ ヘリックスの1つ以上が $\beta$ シートに変換されて病的多型であるプリオンタンパクのスクレーピー・アイソフォーム( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ )となるコンフォメーション変化を持つとされている。彼らは、スクレーピーを感染させたマウスの神経芽細胞種の細胞をケミカルシャペロンに暴露すると $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 形成の頻度と程度が減少することを示した。このメカニズムとして、ケミカル・シャペロンは $\text{PrP}^{\text{C}}$ の $\alpha$ ヘリカルコンフォメーションを安定化させるように作用し、 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ を産生するコンフォメーション変化を妨げていると考えた (12)。1999年には、Perutzらは、ポリグルタミン病の一つであるハンチントン病において、伸長ポリグルタミンが hydrogen-bonded hairpins を形成し、これができる物理的な接着や極性を失うことによりタンパクは不安定な状態になり、タンパク分解酵素の作用を受けやすくなる。その後、理由はまだ不明だが核に移行し、ユビキチン化と polar-zipper action による凝集体形成が生じるという仮説を提唱している (16)。また、最近の研究は、HSP40, HSP70, HSP104等の分子シャペロンの過剰発現が、ポリグルタミンによる凝集体形成と細胞毒性をインビトロでもインビボでも非常に減少させることを示してきた (5-11)。さらに、極最近の研究会で、RIKENのNukinaらは、ポリグルタミン鎖を安定性の極めて高いタンパク質の一つであるマッコウクジラミオグロビンへ挿入し、ポリグルタミン鎖の構造及びポリグルタミン挿入に伴うタンパク質の構造についてCD, IR, 常磁性NMRを用いて検討した結果を

報告している。この報告によれば、伸長ポリグルタミンの挿入に伴いタンパク高次構造は不安定になり、分子内 $\beta$ シート構造と分子間 $\beta$ シート構造をとり、アミロイド形成を促進している可能性を示した。これらの所見は、シャペロン活性の調節がポリグルタミン病の治療に対する潜在的な架け橋になる可能性を強く示唆するものである。従って、我々は、ケミカル・シャペロンの投与が短縮型変異ataxin-3によって誘発される凝集体と細胞死を抑制する可能性があるのではないかと考えた。我々の実験結果は、ケミカル・シャペロンの条件下で、凝集体形成と細胞死の頻度は統計学的に有意な減少を示した。このデータは変異タンパクのミスフォールディングが細胞死に至る過程の少なくとも一部分を担っているという仮説を支持するものである。

我々は、ケミカル・シャペロンが分子シャペロンタンパクに比べてポリグルタミン病の治療により現実的に応用可能ではないかと考えている。その理由としては、これらの試薬は比較的容易に投与可能であるからである。実際、DMSOはアミロイドーシスの患者に臨床的改善目的に投与されたことがあった。例えば、1992年 Shibuyaらは原発性アミロイドーシスに対しDMSOの経口投与と化学療法との併用が著効を示した症例を報告し、また、1994年 Iwasakiらは多発性骨髄腫に伴う肺アミロイドーシスに対しDMSOを8週間投与し、明らかな副作用なく肺機能の改善を認めた症例を報告している。さらに、1987年 Tsukadaらは家族性アミロイドニューロパチーに投与し奏功を認めた症例を報告している (17-19)。

しかし、この治療的アプローチにも問題点がないわけではない。例えば、DMSOのようなケミカル・シャペロンの抑制効果が、試薬それ自体による細胞毒性が顕在化しない濃度範囲においては、完全ではなく部分的に限られることである。その説明の一つとしては、これらの試薬のタンパクコンフォメーションを安定化させる効果が、細胞がその代謝を維持するのに十分ではないという可能性がある。もう一つの説明としては、タンパクのミスフォールディングによる細胞死以外に他のケミカル・シャペロンでは抑制することができない細胞死の経路が存在する可能性である。こうしたジレンマにも拘わらず、中枢神経系への薬剤の投与経路が確保されれば、ポリグルタミン病を治療することにおいて、ケミ

カル・シャペロンの適用の余地がまだ残されているものと思われる。その理由として、我々はインビトロにおける過剰発現系を用いて伸長ポリグルタミン鎖の細胞毒性を評価しているが、実際のところ、モデル細胞系での変異 ataxin-3 のタンパクの発現は MJD 患者での発現よりかなり高いと考えられているためである。従って、ケミカル・シャペロンの効果は部分的であっても、インビボの MJD における凝集体形成と細胞死を抑制するのに十分である可能性がある。

我々の今回の結果は、ポリグルタミン病を治療するためにケミカル・シャペロンが使用できる可能性を示すものである。我々は、DMSO, Glycerol, TMAO の全てのケミカル・シャペロンがポリグルタミンによる細胞毒性を抑制するのを見出したが、さらに、変異蛋白の本来の構造を安定化させ、タンパクのミスフォールディングの程度を減少させるより効果的な物質を探索するべきであると考えられる。

#### (5). 結論.

<1>. 培養 BHK-21 細胞において MJD 遺伝子を一過性に発現するモデル系を用いて、MJD の原因遺伝子産物である ataxin-3 の凝集体形成性と細胞死に対するケミカル・シャペロンの効果に関して検討した。

<2>. ケミカル・シャペロン(DMSO, Glycerol, TMAO)の存在下では、変異 ataxin-3 による凝集体形成と細胞死の頻度は統計的有意差を持って減少した。この効果は、ケミカル・シャペロンによるタンパクのコンフォメーションの安定化作用によってもたらされている可能性が高いと考えた。

<3>. 本研究の結果は、MJD を含むポリグルタミン病の治療法としてケミカル・シャペロンが使用できる可能性を示すものである。

<4>. 今後、MJD をはじめとしたポリグルタミン病のモデルマウスでも、培養細胞モデル系と同様にケミカル・シャペロンの有効性を確認することが重要であると考えられる。

引用文献

1. Perutz, M. F., Johnson, T., Suzuki, M., and Finch, J. T. (1994) Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 5355-5358.
2. Paulson, H.L. (1999) Protein fate in neurodegenerative proteinopathies: polyglutamine diseases join the (mis)fold. *Am. J. Hum. Genet.*, 64, 339-345.
3. Kakizuka, A. (1998) Protein precipitation: a common etiology in neurodegenerative disorders? *Trends Genet.*, 14, 396-402.
4. Perutz, M.F. (1999) Glutamine repeats and neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Trends Biochem. Sci.*, 24, 58-63.
5. Cummings, C.J., Mancini, M.A., Antalffy, B., DeFranco, D.B., Orr, H.T., and Zoghbi, H.Y. (1998) Chaperone suppression of ataxin-1 aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat. Genet.*, 19, 148-154.
6. Chai, Y., Koppenhafer, S.L., Bonini, N.M., and Paulson, H.L. (1999) Analysis of the role of heat shock protein (HSP) molecular chaperones in polyglutamine disease. *J. Neurosci.*, 19, 10338-10347.
7. Stenoien, D.L., Cummings, C.J., Adams, H.P., Mancini, M.G., Patel, K., DeMartino, G.N., Marcelli, M., Weigel, N.L., and Mancini, M.A. (1999) Polyglutamine-expanded androgen receptors form aggregates that sequester heat shock proteins, proteasome components and SRC-1, and are suppressed by the HDJ-2 chaperone. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 731-741.
8. Kobayashi, Y., Kume, A., Li, M., Hata, M., Ohtsuka, K., and Sobue, G. (2000) Chaperones HSP70 and HSP40 suppress aggregate formation and

apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *J. Bio. Chem.* 275, 8772-8778.

9. Warrick, J.M., Chan, H.Y.E, Gray-Board, G.L., Chai, Y., Paulson, H.L., and Bonini, N.M. (1999) Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nature Genet.*, 23, 425-428.

10. Kazemi-Esfarjani, P., and Benzer, S. (2000) Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*. *Science*, 287, 1837-1840.

11. Satyal, S.H., Schmidt, E., Kitagawa, K., Sondheimer, N., Lindquist, S., Kramer, J.M., and Morimoto, R.I. (2000) Polyglutamine aggregates alter protein folding homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 5750-5755.

12. Tatzelt, J., Prusiner, S.B., and Welch, W.J. (1996) Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J.*, 15, 6363-6373.

13. Yoshizawa, T., Yamagishi, Y., Koseki, N., Goto, J., Yoshida, H., Shibasaki, F., Shoji, S., and Kanazawa, I. (2000) Cell cycle arrest enhances the in vitro cellular toxicity of the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 69-78.

14. Yu, Z.-W., and Quinn, P.J. (1994) Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology. *Biosci. Reports*, 14, 259-281.

15. Wedi, B., Straede, J., Wieland, B., and Kapp, A. (1999) Eosinophil apoptosis is mediated by stimulators of cellular oxidative metabolisms and inhibited by antioxidants: involvement of a thiol-sensitive redox regulation. *Blood*, 94, 2365-2373.

16. Perutz, M.F. (1999) Glutamine repeats and neurodegenerative diseases: molecular aspects. *TIBS*, 24, 58-63.
17. Shibuya, T., Murakawa, M., Tsuda, Y., and Harada, M. (1992) Successful treatment of primary amyloidosis with dimethylsulfoxide and cytoreductive chemotherapy. *Intern. Med.*, 31, 544-548.
18. Iwasaki, T., Hamano, T., Aizawa, T., Kobayashi, K., and Kakishita, E. (1994) A case of pulmonary amyloidosis associated with multiple myeloma successfully treated with dimethyl sulfoxide. *Acta Haematol.*, 91, 91-94.
19. Tsukada, K., Ohhashi, M., Isobe, T., and Masuko, K. (1987) Cases with familial amyloid neuropathy starting of the upper limbs and having hepatic disorder. *Jap. J. Med.*, 26, 243-248.

图·表





**Figure 1.** 作製したMJD 組み換えタンパクの構造図

Qはグルタミン残基の数を表している。全長をFLと示し、一方ΔNは truncated, N末からいくつのアミノ酸残基が欠損しているか, その数を示した。C末にはmycタグを有している。

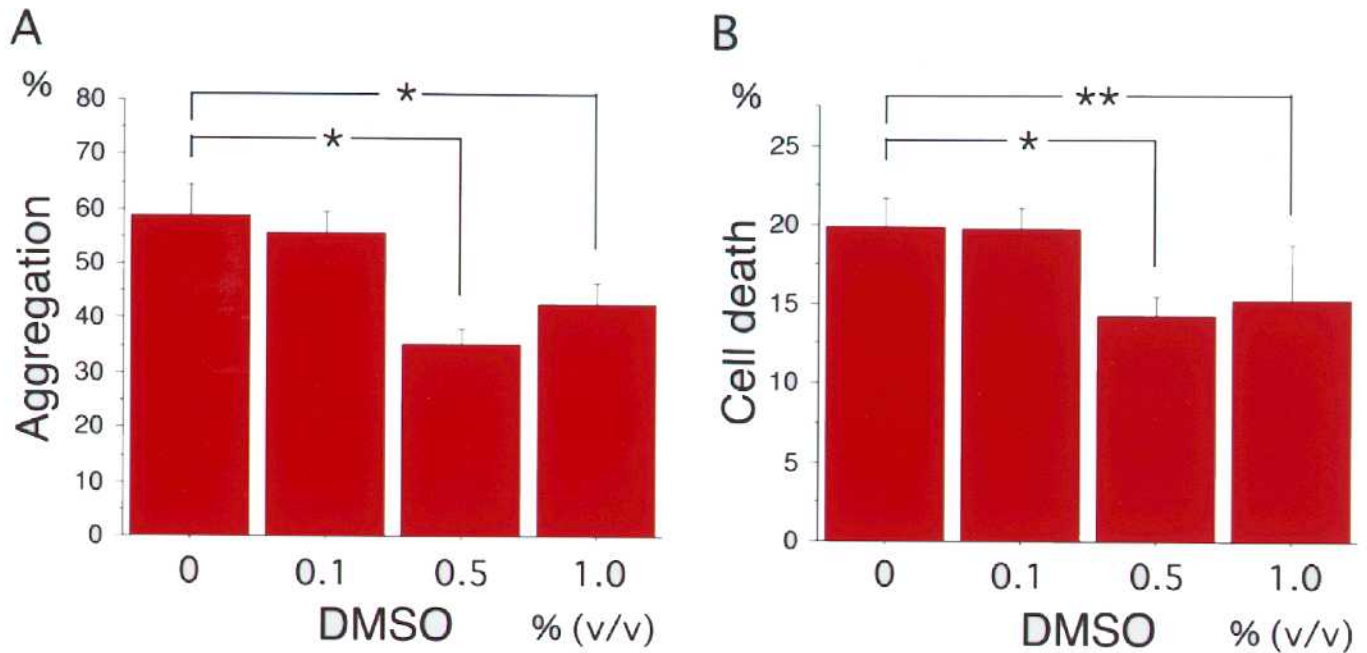
Bars: ataxin-3のアミノ酸番号を持ったタンパクをコードしているシーケンス。  
 斜線部分: ポリグルタミン鎖をコードしているCAGリピート。

黒塗り部分: 免役組織化学法による検出のためのmycエピトープシーケンス。

Q77(FL)-myc: 77個のポリグルタミン(Q77)を持つ全長組み換えataxin-3。

Q77(ΔN286)-myc: 77個のポリグルタミン(Q77)を持つ短縮型組み換えataxin-3。

Q77(ΔN286)-mycをコードしている発現ベクターのみを本研究で使用した。



**Figure 2.** DMSO 条件下における検討

抗myc-Cy3 抗体を用いた間接蛍光抗体法, およびHoechst dyeを用いたDNA染色法を行い, 蛍光顕微鏡下で観察した.

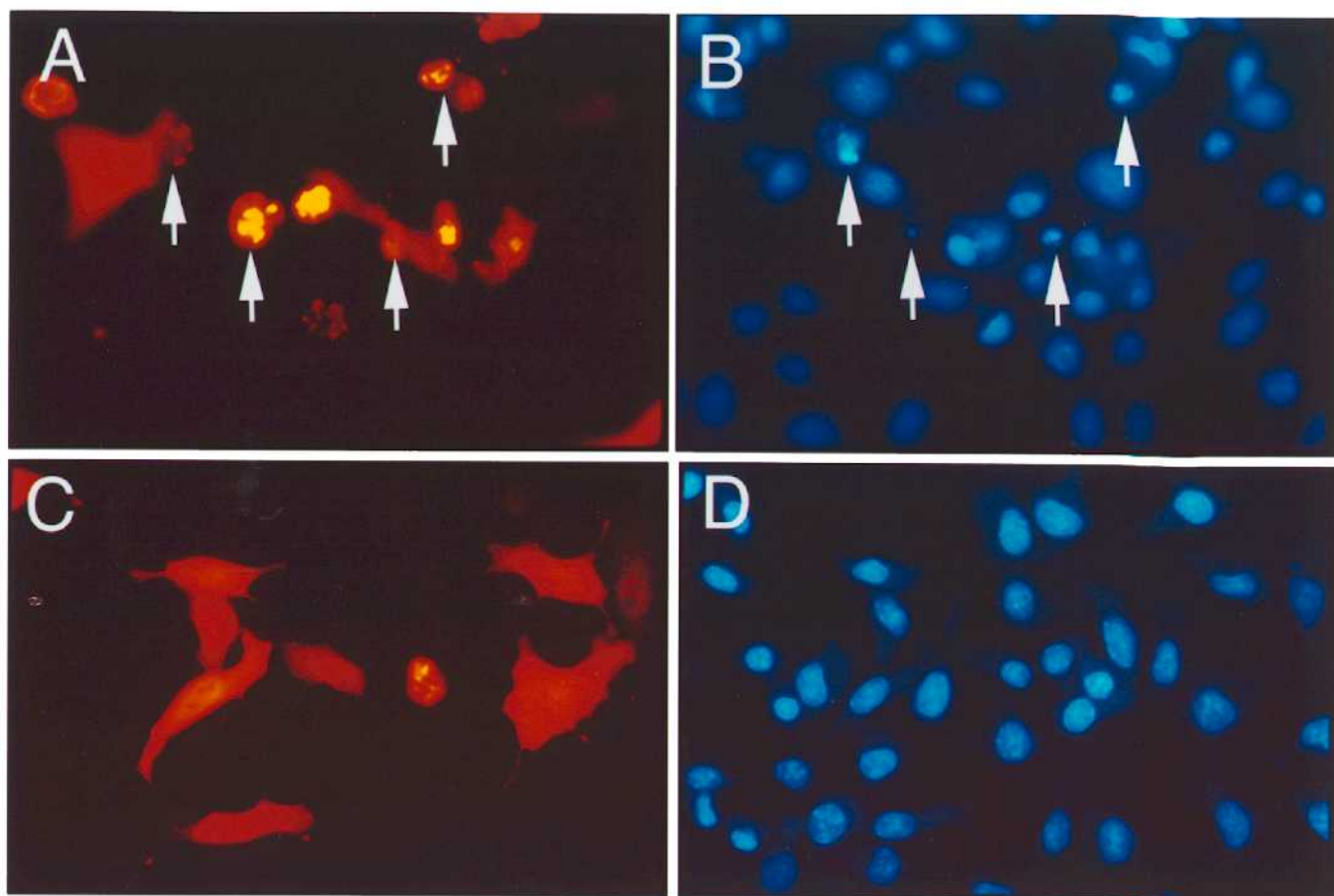
**A** 凝集体形成頻度

縦軸に凝集体形成頻度を示す (%)

**B** 細胞死の評価

縦軸に細胞死頻度を示す (%)

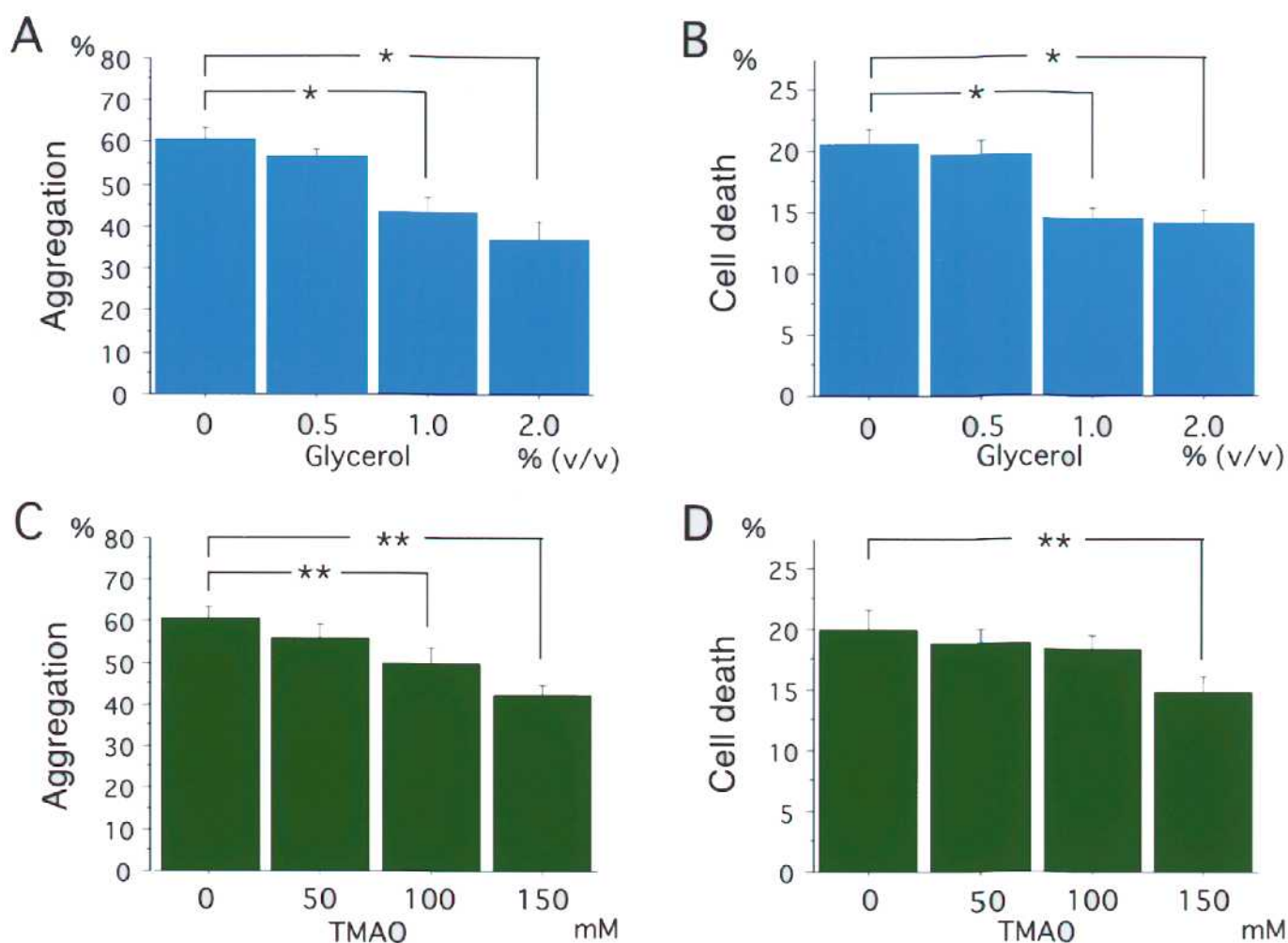
DMSOはQ77( $\Delta$ N286)-mycによって引き起こされる凝集体形成(A)と細胞死(B)を0.5%及び1.0%の濃度で著明に抑制した. DMSOの効果は1.0%の濃度でフラットになった. \* $P < 0.002$ , \*\* $P < 0.03$ . AとBの結果は別個に7回施行された実験の平均  $\pm$  標準偏差を表している.



**Figure 3.** DMSO 条件下における短縮型ataxin-3(Q77)発現プラスミドの凝集体形成と細胞死

抗myc-Cy3抗体を用いた間接蛍光抗体法(A,C), およびHoechst dyeを用いたDNA染色法(B,D)を行い, 蛍光撮影(低倍率: 168×)した.

Q77( $\Delta$ N286)-mycを発現しているBHK-21細胞はそれぞれコントロール(A,B)と0.5% DMSO条件下(C,D)で評価された. (A)の矢印で示された細胞は(B)でアポトーシスを呈している. 0.5% DMSO条件下で凝集体形成とアポトーシスの細胞死が減少した.



**Figure 4.** Glycerol 及び TMAO 条件下における検討

抗myc-Cy3抗体を用いた間接蛍光抗体法, およびHoechst dyeを用いたDNA染色法を行い, 蛍光顕微鏡下で観察した.

A, C 凝集体形成頻度

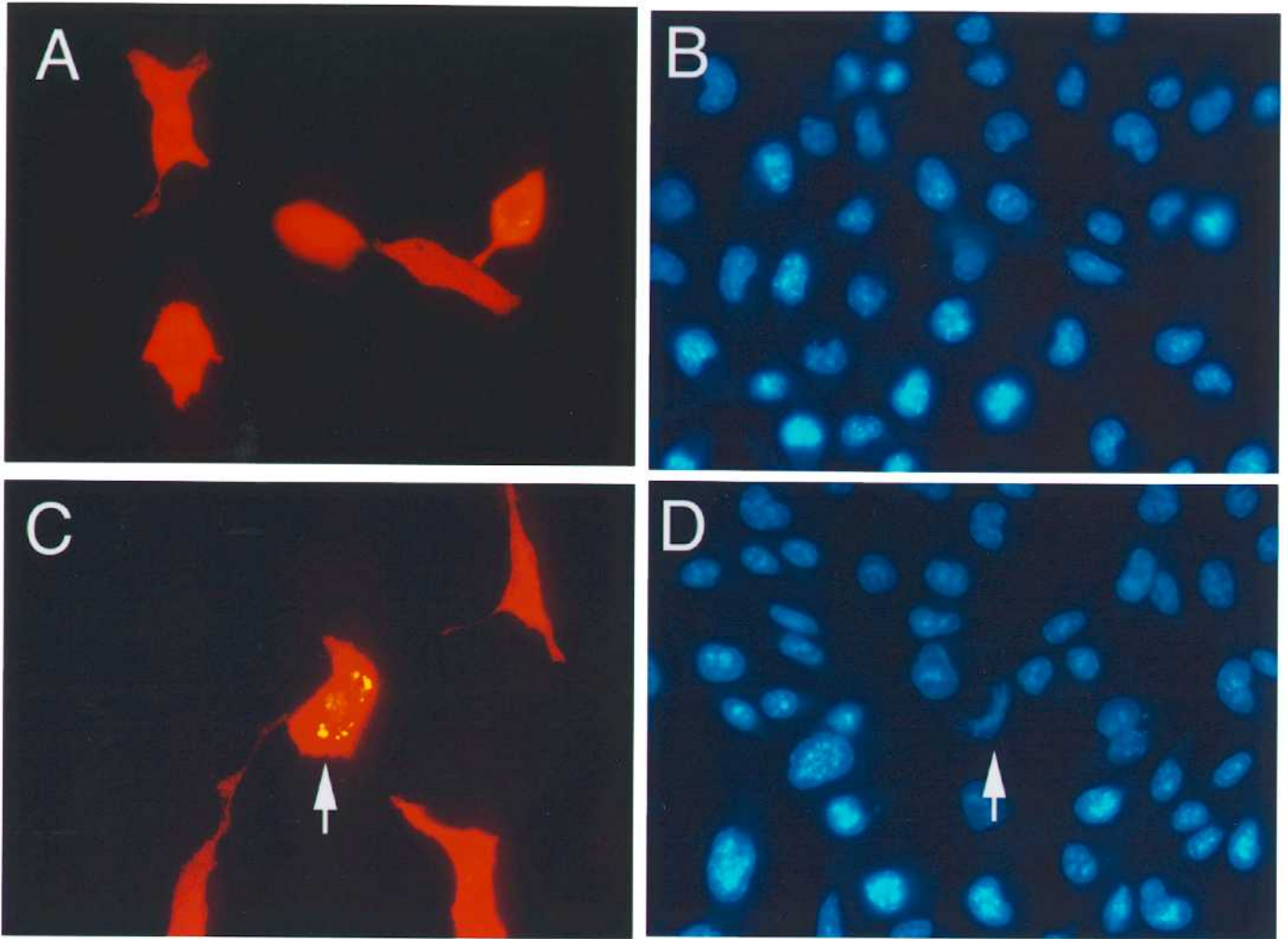
縦軸に凝集体形成頻度を示す (%)

B, D 細胞死の評価

縦軸に細胞死頻度を示す (%)

GlycerolはQ77( $\Delta$ N286)-myc 発現による凝集体形成(A)と細胞死(B)を効果的に抑制した. \* $P < 0.003$ . TMAOも凝集体形成(C)と細胞死(D)に対して同様の効果を有した. \*\* $P < 0.04$ . AとBの結果は別個に3回施行された実験の平均  $\pm$  標準偏差を表している. CとDの結果は別個に4回施行された実験の平均  $\pm$  標準偏差を表している.

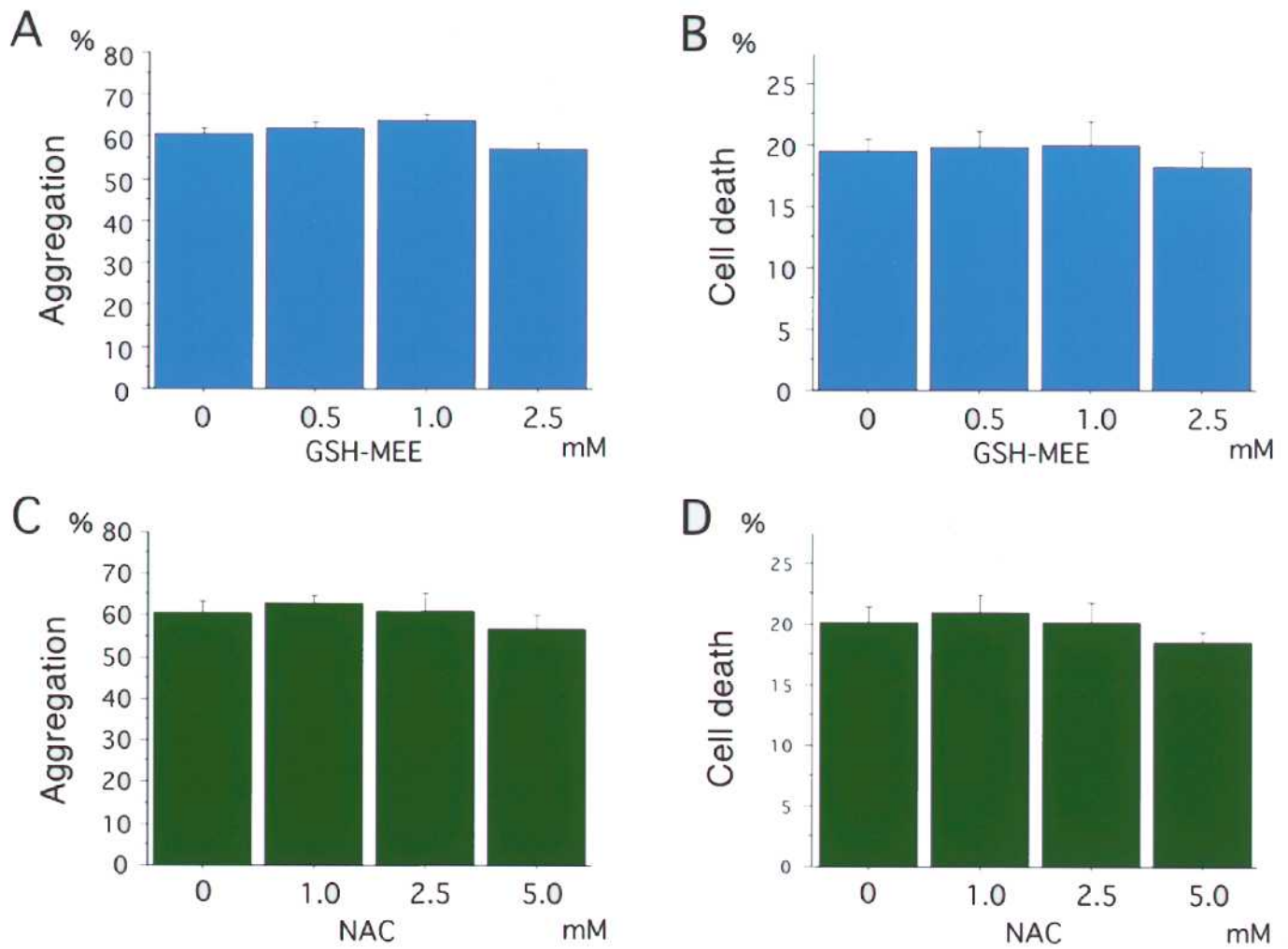




**Figure 5.** Glycerol及びTMAO条件下における短縮型ataxin-3(Q77)発現プラスミドの凝集体形成と細胞死

抗 myc-Cy3 抗体を用いた間接蛍光抗体法 (A,C), およびHoechst dyeを用いたDNA染色法(B,D)を行い, 蛍光撮影(低倍率: 168×)した.

Q77( $\Delta$ N286)-mycを発現しているBHK-21細胞は, 2.0% Glycerol(A,B)乃至150mM TMAO(C,D)の条件下で評価された. コントロールのデータは, 代表してFigure 3Aと3Bに示した. (C)の矢印で指示された細胞は(D)でアポトーシスを呈している. 凝集体形成とアポトーシス的細胞死は, Figure 3Aと3Bに示されたコントロールに比較しGlycerol及びTMAO条件下でアポトーシス的細胞死が減少した.



**Figure 6.** 抗酸化剤である GSH-MEE 及び NAC 条件下における検討

抗 myc-Cy3 抗体を用いた間接蛍光抗体法, および Hoechst dye を用いた DNA 染色法を行い, 蛍光顕微鏡下で観察した。

A, C 凝集体形成頻度

B, D 細胞死の評価

縦軸に凝集体形成頻度を示す (%)

縦軸に細胞死頻度を示す (%)

GSH-MEE は, 凝集体形成(A)も細胞死(B)も抑制するに至らなかった。

NAC も凝集体形成(C)及び細胞死(D)に影響を与えなかった。GSH-MEE の結果は別個に3回施行された実験の, NAC に関しては4回の実験の平均 ± 標準偏差を表している。