

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04995

研究課題名（和文）神経変性疾患の試験管内再現とその解析

研究課題名（英文）In vitro translation and analysis of neurodegenerative diseases

研究代表者

町田 幸大（Machida, Kodai）

兵庫県立大学・工学研究科・准教授

研究者番号：20553093

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 17,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、精製したヒトの翻訳関連因子群で構築した再構成型タンパク質合成系を利用して、ヒトの神経変性疾患の原因となるpolyQタンパク質の新生から凝集まで、さらにCAGリピート配列からの開始コドン非依存的な翻訳反応を再現することに成功した。これはすなわち、神経変性疾患の原因となる一連の翻訳反応は、mRNA、リボソーム、翻訳開始因子、翻訳伸長因子、翻訳終結因子などの翻訳関連因子群が存在すれば起こり得ることを明らかにしたことと同義である。従って、本研究によって、神経変性疾患に関わる因子の特定や、疾患の分子機構を明らかにするための「試験管内疾患モデル」を樹立できたと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、神経変性疾患の原因となるタンパク質凝集、具体的にはポリグルタミン病を引き起こすCAGリピート配列からの翻訳と翻訳産物の凝集をヒト因子由来の試験管内翻訳系で再現・解析するための技術基盤を確立した。リボソーム化を取り入れ細胞サイズの反応系場での解析も行えるようにした。本実験系はヒトの翻訳関連因子のみで再構築したものであり、試験管内でヒトの疾患に関連する遺伝子の一連の翻訳反応について新たな知見を得ることができるようになったため学術的意義が大きい。また、ヒト因子由来の実験系であるため、得られたデータを直接的に治療法開発へ応用できる可能性が高いという利点もあり、社会的な意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in reproducing Repeat Associated Non-AUG translation, which is an irregular protein translation depends on CAG repeat sequences that cause human neurodegenerative diseases using a reconstituted protein synthesis system constructed with purified human translation factors. These results indicating that the translation reactions that cause neurodegenerative diseases occur if there is a translation-related factors such as mRNA, ribosome, translation initiation factors, translation elongation factors, and translation termination factors. This study established the technical basis for reproducing and analyzing the irregular translation mechanism that causes neurodegenerative diseases in vitro.

研究分野：合成生物学

キーワード：再構成型タンパク質合成系 神経変性疾患 翻訳機構 バイオテクノロジー 生体分子

1. 研究開始当初の背景

ヒトの細胞内には数万種類のタンパク質が混在し、それらが正しく代謝(新生[合成] フォールディング 輸送 分解)されることで細胞の恒常性が維持されている。しかしながら、正しい代謝の経路から外れ、他のタンパク質やオルガネラ(脂質)を巻き込みながら、凝集体を形成するタンパク質も存在する。この凝集体の蓄積により、正常な細胞機能が損なわれることで、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病などの神経変性疾患が発症すると考えられている。従って、近年、これら疾患の原因となる凝集体を形成するタンパク質の凝集機構の解析と凝集抑制因子の探索が精力的に進められているが、疾患原因タンパク質の凝集の分子機構を、「タンパク質代謝経路の中」で解析した研究例はない。なぜなら、従来の生きた細胞を使った *in vivo* 実験や、疾患原因タンパク質のみを精製し、試験管内で凝集させるような *in vitro* 実験では、特定のタンパク質が新生されてから、どのタイミングで、どの因子と相互作用して、どのように凝集するのか、といった一連の反応を解析することは出来ないからである。従って、本研究で提案する細胞内と試験管内を橋渡する実験系、すなわち「試験管内疾患モデル」の構築は、特定のタンパク質の代謝反応(新生から凝集に至る一連の反応)をワンチューブで解析するための新しい技術基盤になると期待される。

2. 研究の目的

上記の様な背景の元、本研究では申請者が開発したヒト因子由来「再構成型タンパク質合成系」をベースとして、神経変性疾患の原因となるタンパク質群の凝集を試験管内で再現し、凝集の原因と凝集抑制の分子機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、疾患原因タンパク質が、細胞内で経験する反応(新生 フォールディング 凝集といった一連の反応)を試験管内で迅速に再現できるシステム「試験管内疾患モデル」を樹立する。これにより、疾患原因タンパク質の凝集機構の解析と凝集抑制因子探索の効率化を図り、新規創薬のための技術基盤を構築したい。

3. 研究の方法

本研究で提案する「試験管内疾患モデル」を樹立するために、研究のベースとなる再構成型タンパク質合成系の合成活性の向上が必要となった。このため、これまで添加していなかった翻訳関連因子群(eIF2、eIF5B、ABCE1)を新たに発現・精製し、添加量の最適化を行うことで反応系の合成活性を向上させることにした。このシステムを利用して、まずはエッペンチューブ内で CAG リピート配列の間に CAA が配置された不完全な CAG リピート遺伝子(タンパク質としては polyQ のみが合成されるように工夫されている)を合成し、その凝集状態を共焦点顕微鏡観察により解析した。これと同時に、予め反応系に Hsc70s (Hsp40, Hsc70, Hsp110) と CCT などヒトの分子シャペロンを添加しておくことで、分子シャペロンによる polyQ 凝集抑制効果を調査した。また、界面通過法を利用して、再構成型タンパク質合成系を脂質二重膜に内包することで、細胞サイズの疾患モデル(リポソーム)を作成し、その内部で生じる polyQ 凝集を解析できるようにした。さらに、上記で行った実験を、完全な CAG リピート配列を用いた解析に移行させることで、実際に疾患の原因になっている repeat associated non-AUG translation (RAN 翻訳)を試験管内で再現することに挑戦した。

4. 研究成果

(1) eIF2、ABCE1、eIF5B の添加による再構成型タンパク質合成系の合成活性の上昇

本研究を進める上で、試験管内で凝集性のタンパク質を合成できたとしても、合成量が凝集の閾値を超えないと、凝集体として検出できないことが問題となった。そこで、実験系に添加することで、合成活性を上昇させると予想される eIF2 (tRNA^{Met} をリポソームに運び入れる) ABCE1 (翻訳終了後のリポソームのリサイクルに寄与) eIF5B (40S リポソームと tRNA^{Met} の結合安定化と 60S の結合促進) を発現・精製する方法を確立し、実験系に添加することで、合成活性の上昇を試みた。いずれも、反応系に添加しているリポソームの終濃度に対し、1 倍、2 倍、4 倍量を添加して、活性上昇効果を観察した。その結果、eIF2、ABCE1 は 4 倍量の添加で、合成活性が

約2倍に上昇した。eIF5Bでは約3に活性が上昇した。これらの添加量を最適化し、最終的にはそれぞれ、リボソームの4倍量添加することで、再構成型タンパク質合成系の合成活性を約7倍に上昇させることができた(図1右下のグラフ)。

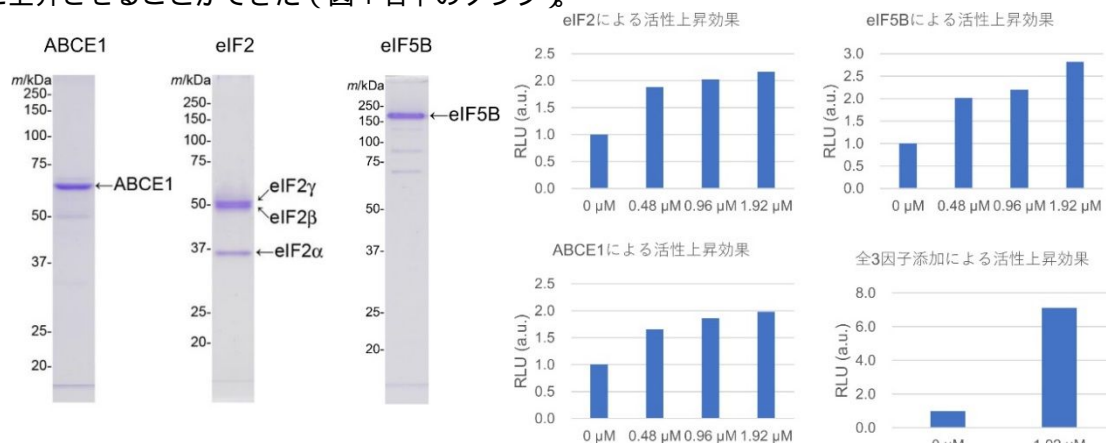


図1 合成系に新たに添加した翻訳関連因子の精製標品とそれぞれの活性上昇効果

(2) polyQ タンパク質凝集の試験管内再現

・エッペンチューブ内(バルク溶液中)で合成した場合

上記、(1)で活性上昇させた再構成型タンパク質合成系を利用して、CAGリピート配列の間にCAAが配置された不完全なCAGリピート遺伝子(タンパク質としてはpolyQのみが合成されるように工夫されている)の下流にEGFPを融合させた遺伝子を合成した。polyQ長は25個(25Q-EGFP)と96個(96Q-EGFP)で比較した。32℃で24時間インキュベートしたサンプルを共焦点顕微鏡を用いて解析した結果、polyQ長に依存した凝集体形成を検出することができた(図2、96Q-EGFPの写真では凝集体が白い塊として検出されている。)

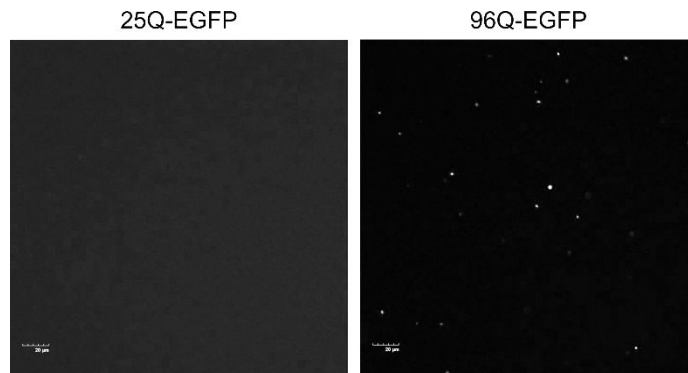


図2 再構成型タンパク質合成系を利用したpolyQタンパク質の合成と凝集

・細胞サイズのリボソーム内で合成した場合

反応系をより細胞内環境に近づけるために、界面通過法と呼ばれる手法を利用して反応溶液をリボソーム化(脂質二重膜に内包)し、反応の場に細胞サイズ:直径10-20nmの区画を与えた。このリボソームを32℃で24時間インキュベートした後に、共焦点顕微鏡による解析を行った。その結果、リボソームの内部にバルク溶液中と同様のpolyQ凝集体を観察することができた(図3上側:白い塊が凝集体)。また、それらは、細胞で見られるpolyQ凝集(図3下側)と同様のものではあった。以上の実験をHsc70s(Hsp40, Hsc70, Hsp110)とCCTなどヒトの分子シャペロン存在下でも実施したが、分子シャペロンによる凝集抑制効果は観察されなかった。予めHsc70s(Hsp40, Hsc70, Hsp110)やCCTを添加したHeLa細胞抽出液由来の試験管内タンパク質合成系で同じ実験を行った場合は、シャペロンによる凝集抑制効果が観察されたので、polyQの凝集抑制には、シャペロン群と共同して働く、何かしらの細胞内因子が必要であることが示唆さ

れた。

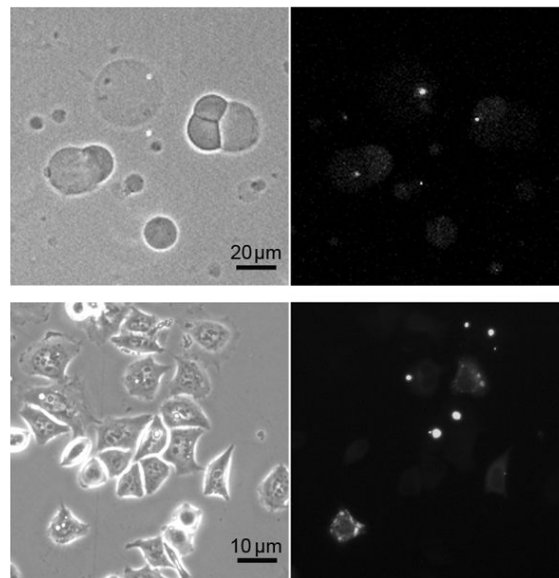


図3 リポソーム内および HeLa 細胞内における polyQ タンパク質の合成と凝集

(3) RAN 翻訳の試験管内再現

完全な CAG リピート配列から生じる repeat associated non-AUG translation (RAN 翻訳) を (1) で樹立した再構成型タンパク質合成系で再現できるか調査した。(CAG) が 81 回連続した配列を有するコンストラクトを作成し、CAG フレームで翻訳される polyQ (Gln) タンパク質を myc タグ、AGC フレームで翻訳される polyS (Ser) タンパク質を FLAG タグ、GCA フレームで翻訳される polyA (Ala) タンパク質を HA タグで検出できる様に調製した。これを HEK293T 細胞とヒト因子由来「再構成型タンパク質合成系」で合成した結果、細胞内で観察される RAN 翻訳が、再構成型タンパク質合成系でもほぼ完全に再現できることが明らかになった (図 4)。

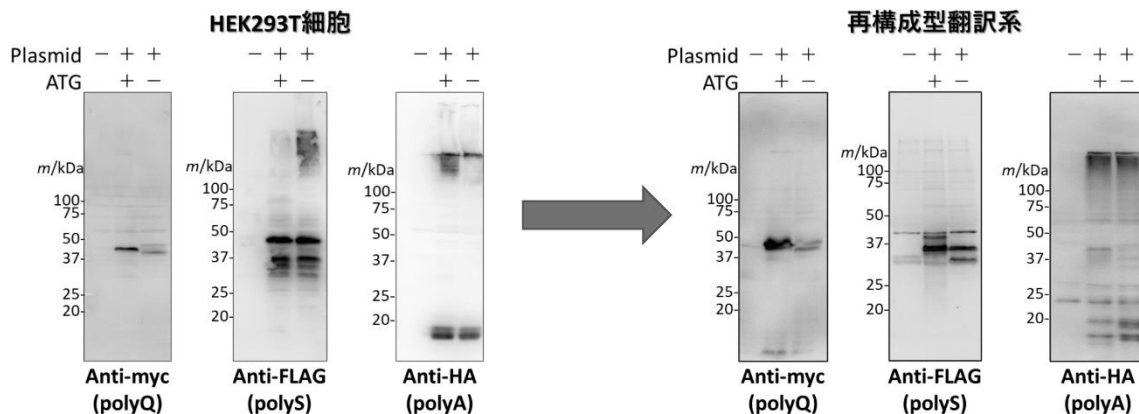


図 4 HEK293 細胞内の RAN 翻訳は再構成型タンパク質合成系で再現可能

(4) まとめ

本研究では、CAG リピート由来の翻訳反応を、ヒトの翻訳関連因子のみで再構成されたタンパク質合成系(バルク溶液中でも細胞サイズのリポソーム中でも)で再現・解析できるようにした。これはすなわち、神経変性疾患の原因となるタンパク質の「新生から凝集に至る一連の反応」は mRNA、リポソーム、翻訳開始因子、翻訳伸長因子、翻訳終結因子などの翻訳関連因子群が存在すれば起こり得ることを明らかにしたことと同義であり、本研究の目標として掲げた「試験管内疾患モデル」の樹立を達成できたと言える。

現在、本研究で得られた成果を基に、RAN 翻訳の開始点を探るため、再構成型タンパク質合成系で合成した RAN 翻訳産物の精製と質量分析を進めている。FLAG タグで検出される RAN 翻訳産物を精製することに成功しているが精製量が少ないこともあり、現段階では良好な分析結果が得られていない。今後は、精製法の見直しや実験系の最適化を行いながら、RAN 翻訳の分子機構の解明を目指した研究に発展させていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yokoyama T, Machida K, Iwasaki W, Shigeta T, Nishimoto M, Takahashi M, Sakamoto A, Yonemochi M, Harada Y, Shigematsu H, Shirouzu M, Tadakuma H, Imataka H, Ito T.	4. 巻 74
2. 論文標題 HCV IRES Captures an Actively Translating 80S Ribosome.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 1205-1214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2019.04.022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kodai Machida, Tomoaki Shigeta, Yuki Yamamoto, Takuhiro Ito, Yuri Svitkin, Nahum Sonenberg and Hiroaki Imataka	4. 巻 8
2. 論文標題 Dynamic interaction of poly(A)-binding protein with the ribosome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-35753-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yusuke Daiko, Kyohei Segawa, Kodai Machida, Hiroaki Imataka, Sawao Honda, and Yuji Iwamoto.	4. 巻 20
2. 論文標題 Palm-sized Ag ion emission gun operated at roomtemperature in non-vacuum atmosphere.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adv. Engineering Mater.	6. 最初と最後の頁 1800198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adem.201800198.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Machida K, Kanzawa K, Shigeta T, Yamamoto Y, Tsumoto K, Imataka H.	4. 巻 16
2. 論文標題 Huntingtin Polyglutamine-Dependent Protein Aggregation in Reconstituted Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Synth Biol.	6. 最初と最後の頁 377-383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.7b00372.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uemura E, Niwa T, Minami S, Takemoto K, Fukuchi S, Machida K, Imataka H, Ueda T, Ota M, Taguchi H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Large-scale aggregation analysis of eukaryotic proteins reveals an involvement of intrinsically disordered regions in protein folding.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-18977-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Daiko Y, Mizutani S, Machida K, Imataka H, Honda S, Iwamoto Y.	4. 巻 83
2. 論文標題 H ⁺ emission under room temperature and non-vacuum atmosphere from a sol-gel-derived nanoporous emitter	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Sol-Gel Sci Technol.	6. 最初と最後の頁 252-258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10971-017-4430-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 町田幸大、神澤空流、白子太紀、井寄真仁、今高寛晃
2. 発表標題 アクチン生合成の試験管内再現
3. 学会等名 第19回 日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 町田 幸大、神澤 空流、白子 太紀、宮脇 翔馬、今高 寛晃
2. 発表標題 試験管内アクチン生合成
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー：化学によるタンパク質修飾の機能解析を目指して (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 町田幸大、白子太紀、井寄真仁、今高寛晃
2. 発表標題 再構成型タンパク質合成・フォールディング共役システムを利用したin vitroアクチン生合成
3. 学会等名 第92回 日本生化学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 町田 幸大、宮脇 翔馬、白子 太紀、今高 寛晃
2. 発表標題 再構成型タンパク質合成・フォールディング共役システムを利用した in vitroアクチン生合成
3. 学会等名 第14回 無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 町田幸大、神澤空流、白子太紀、今高寛晃
2. 発表標題 アクチン遺伝病の試験管内解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 町田幸大、神澤空流、井寄真仁、白子太紀、今高寛晃
2. 発表標題 アクチン生合成の試験管内再現
3. 学会等名 第4回 デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 町田幸大、神澤空流、白子太紀、今高寛晃
2. 発表標題 アクチン遺伝病の試験管内解析
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 町田幸大、神澤空流、白子太紀、今高寛晃
2. 発表標題 アクチン遺伝病の試験管内解析
3. 学会等名 第13回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 町田幸大、神澤空流、白子太紀、今高寛晃
2. 発表標題 アクチン遺伝病の試験管内解析
3. 学会等名 細胞を創る研究会 11.0
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 町田幸大、神澤空流、白子太紀、今高寛晃
2. 発表標題 アクチン遺伝病の試験管内解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kodai Machida, Kuru Kanzawa, Taiki Hakushi, Hiroaki Imataka
2. 発表標題 In vitro analysis of actin fibrillization associated with developmental disorders
3. 学会等名 International symposium on proteins; from the cradle to the grave (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 町田 幸大, 神澤空流, 山本悠貴, 井寄真仁, 岡留壮志, 今高 寛晃
2. 発表標題 再構成型細胞様GUVを利用したポリグルタミンタンパク質の凝集と凝集抑制の解析
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 町田 幸大, 神澤空流, 山本悠貴, 井寄真仁, 今高 寛晃
2. 発表標題 再構成型ヒト細胞を利用したハンチンチン凝集解析システムの開発
3. 学会等名 第12回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 町田幸大
2. 発表標題 再構成型人工細胞を利用したポリグルタミンタンパク質凝集の解析
3. 学会等名 「新生鎖の生物学」平成29年度第1回班会議
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 町田幸大、神澤空流、山本悠貴、井寄真仁、岡留壮志、今高寛晃
2. 発表標題 人工細胞を用いた神経変性疾患の解析
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会 10.0
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 町田 幸大、神澤空流、今高 寛晃
2. 発表標題 PolyQ aggregation in GUV
3. 学会等名 「新生鎖の生物学」第4回 若手ワークショップ
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kodai Machida, Kuru Kanzawa, Yuki Yamamoto, Hiroaki Imataka
2. 発表標題 Polyglutamine-dependent protein aggregation in artificial cells
3. 学会等名 International Symposium on Protein Quality Control (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------