

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08241

研究課題名(和文) MRIによる認知症病原蛋白質のオリゴマー構造の解析

研究課題名(英文) MRI structural studies of structures of dementia-associated pathogenic proteins

研究代表者

武田 光広 (TAKEDA, MITSUHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・助教

研究者番号：90508558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：レヴィ小体型認知症の特徴として、病原蛋白質である シヌクレイン (Syn) が脳内に蓄積することが挙げられる。Synは無毒な単量体として脳神経細胞内に存在しているが、クリアランス異常等により蓄積すると、重合して可溶性のオリゴマーとなり、更に不溶性線維へと変化する。これら、オリゴマーが、神経毒性を示す事が報告され、認知症治療の標的となるが、実際生体内に生じるオリゴマー、線維の構造情報が得られていない。本課題では、Synを導入した神経細胞をマウスの脳に移植してMRIにより観測する展望の元、その基盤となるタンパク質の細胞導入、細胞内タンパク質のNMR, MRI観測システムの構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知症の患者数は増加の一途を辿っており、喫緊の解決すべき課題となっている。現状、認知症の治療は対症療法が主であり根源的な治療法は開発されていない。認知症の治療において、病原タンパク質の毒性オリゴマーを標的とする戦略は有望視されているが、実際に生体内に生じるオリゴマーの構造情報が無い点が問題となっている。本課題は、生体内オリゴマーの構造解明にむけた第一歩となる。

研究成果の概要(英文)：Lewy Body Dementia is characterized by the deposition of alpha synuclein (aSyn) in the brain. Normally, aSyn exists as non-toxic monomer, but under pathological conditions, it aggregates into insoluble fibril, via the soluble oligomer, which is reported to be toxic. Thus, the oligomer is the therapeutic target and information on the structure is valuable, but the in vivo structure is yet to be elucidated. With a vision that neuronal cells delivered with a-Syn is transplanted to the brain of mouse for MRI detection, we explored delivering aSyn into cells and establishing NMR/MRS system for observing proteins in cells.

研究分野：構造生物学

キーワード：認知症 シヌクレイン MRI NMR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 認知症の患者数は増加の一途を辿っている。近年注目されているレヴィ小体型認知症の特徴として、病原蛋白質である α シヌクレイン(α Syn)が脳内に蓄積することが挙げられる(*Neuron* (1995) 14, 467-75, *Nat. Rev. Neurosci.* (2013) 14, 38-48)。 α Syn は、パーキンソン病、レヴィ小体型認知症患者の脳神経細胞内に見られるレヴィ小体の主成分であり 140 アミノ酸残基からなる蛋白質である。通常 α Syn は無毒な単量体として脳神経細胞内に存在しているが、クリアランス異常等により蓄積すると、重合して可溶性のオリゴマーとなり、更に不溶性線維へと変化する(図1)。神経培養細胞を用いた実験より、 α Syn のオリゴマーおよび不溶性線維が、神経毒性を示す事が報告されている(*Sci. Rep.* (2015) 5, 9228; *Nature Struct. Mol. Biol.* (2016) 23, 409)。そのため、 α Syn オリゴマーおよび線維の立体構造の解明は、病態解明や創薬に向けて極めて重要な研究課題である。 α Syn の不溶性線維は、平行型 β シートの立体構造をもつことが、固体 NMR 解析によって解明されている(*Nature Struct. Mol. Biol.* (2016) 23, 409)。一方、 α Syn オリゴマーは、不溶性線維と異なり、ヘリックス構造を形成することが、CD と 溶液 NMR を用いた解析に基づいて報告されている(*Sci. Rep.* (2015) 5, 9228)。しかし、生体内において *in vitro* と同様の重合が生じているかは明らかでない。最近、神経細胞内に導入された単量体 α Syn の *in-cell* NMR 観測が報告され、 α Syn は疎水性コアを内部とするコンパクトな単量体に近い状態で存在する事が報告されている(*Nature* (2016) 530, 45-50)。*in vivo* において α Syn の構造を捉える事ができれば、 α Syn の構造情報に関する決定的な知見となる事が期待される。

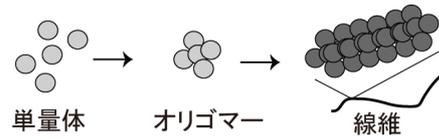


図1 α Syn の重合

(2) 申請者は、核磁気共鳴(NMR)および小動物用MRIを用いた研究に従事している。蛋白質のNMR 研究では、蛋白質由来の ^{13}C シグナルの化学シフト値を利用した二次構造解析法が汎用されている。そのため、*in vivo* でも蛋白質の ^{13}C シグナルを観測できれば、その二次構造を調べる事が可能となる。その観測手法として、MRI 法の一つである磁気共鳴スペクトロスコピー(MRS)法が挙げられる。これまで生体内においてMRSにより蛋白質由来のシグナルを検出した報告例はない。従来 ^1H 検出型のMRS 実験では、蛋白質の信号は、周囲の組織に由来する膨大な数の ^1H 信号に埋もれてしまうため、特定の蛋白質を検出する事は難しい。申請者は、 ^{13}C 標識を施した蛋白質を動物の脳に導入し、蛋白質に由来する ^{13}C シグナルを観測することで、*in vivo* での蛋白質の二次構造情報を得る事が出来ると着想した。本課題では ^{13}C 標識 Syn をマウスの脳に移植・注入し、MRS 法により Syn 由来の ^{13}C シグナルを検出する事で、*in vivo* における Syn のオリゴマー形成を検出し、その二次構造情報を得る事を目的とする。 ^{13}C MRS 法は低分子量の代謝産物の検出に利用されているが、蛋白質に適用するには検出感度の向上が必要不可欠である。本課題では、通常の検出プローブに比べて測定感度が2 - 3倍向上する ^{13}C 極低温検出器を利用して、高感度かつ選択的な蛋白質由来 ^{13}C シグナルの検出を図る。

2. 研究の目的

(1) α Syn ファントム(標準試料)実験によるMRI 測定感度の解析

生理的濃度で調製した ^{13}C 標識 Syn 溶液のファントムを利用して、Syn の ^{13}C シグナルがMRSにより検出できるか、測定感度の点から検証する。 ^{13}C 極低温検出器と、蛋白質試料の ^{13}C 標識法とを利用して、検出感度の向上を図る。神経細胞内における Syn の生理的濃度は5~50 μM であり、Syn の半減期は50時間と報告されている(*Nature* (2016) 530, 45-50)。本項目では、10 μM の Syn ファントムを用いて10時間以内に ^{13}C シグナルを検出する事を目標とする。

(2) 細胞に導入した ^{13}C 標識 α Syn の ^{13}C MRS 検出システムの構築

脳に Syn の溶液を直接注入しても神経細胞内に移行せず希釈される可能性があるため、第一段階として、Syn を神経培養細胞に導入し(*Nature* (2016) 530, 45-50)、その神経細胞を脳に移植してMRS 測定を行うことを計画した。そのため、培養細胞に対する Syn の導入方法を検討する。導入法を確立した後、安定同位体標識を施した Syn を導入した培養細胞を調製して、NMR による観測を行い、細胞内における Syn 観測について検証する。次段階として、Syn タンパク質を導入した培養細胞を、MRI 装置にセットしてMRS 観測するシステムを構築する。

3. 研究の方法

(1) α Syn ファントム(標準試料)実験によるMRI 測定感度の解析：神経内の Syn の濃度は5~50 μM で、また半減期は約50時間と報告されている(*Nature*, 530, 45-50 (2016))。大腸菌を利用して均一 ^{13}C 標識 Syn を発現させて精製を行い、50 mM リン酸バッファー (pH 7.4) に溶解した10 μM の Syn 溶液を調製する。調製試料 1 ml を細胞凍結保存用のチューブに詰めてファントムとした。MRI 装置は、7テスラ小動物用MRI 装置(Bruker Biospin)を用いた。作製したサンプルを、 ^{13}C 極低温検出器の検出部に取り付けて空間選択を行わずに ^{13}C MRS 測定を行った。測定は4時間にわたり積算測定を行った。また、細胞内に近い緩和を生む擬似媒体とし

て、温度可変性ゲルであるメビオールゲルおよびカルシウムによりゲルゾル転移を制御できるアルギン酸ゲルを用いたファントムも調製した。 ^{13}C 標識 $\alpha\text{-Syn}$ を埋包したゲルと埋包しないゲルの MRS 差スペクトルを測定して、 $\alpha\text{-Syn}$ の検出を図った。

(2) 培養細胞への αSyn 蛋白質の導入するため、膜孔形成毒素ストレプトリジン 0 を用いた導入法 (*J. Am. Chem. Soc.* (2009)**131**, 10834-10835) および電気穿孔法を用いた導入法を試した。培養細胞として、ストレプトリジン 0 を用いてタンパク質が導入された実績を持つ、浮遊性細胞 HeLa S3 細胞を用いた (*J. Am. Chem. Soc.* (2009)**131**, 10834-10835)。ストレプトリジン 0 を用いた導入検討では、 1.0×10^8 個の HeLa S3 細胞を 5-20 ng/ml の毒素で処理して細胞に膜孔を形成させた後、5 μM の FITC 標識リゾチームを混合して濃度勾配により細胞内に FITC 標識リゾチームを導入させた。導入後、カルシウムで処理することで膜孔を閉じさせた。その後、細胞の生存率、タンパク質の導入効率を、フローサイトメトリーにより評価した。電気穿孔法を用いた導入検討では、NEPAGENE 社のエレクトロポレーターを用いた。NEPAGENE 社の推奨値に従い電気パルスを与え、FITC 標識リゾチームタンパク質を HeLa S3 細胞に導入した。電気パルスを与えたのち、3 時間インキュベーションしてパルスによる損傷を回復させた。フローサイトメトリーにより、生存率と導入効率を評価した。

(3) In-cell NMR 測定は、 ^{15}N 標識した導入した αSyn を導入した HeLa S3 細胞を用いた。シゲミ管に細胞を詰めて、TCI 極低温検出プローブを備えた 600 MHz NMR マシン (Bruker Biospin) を使用し 10 分で測定を行った。 ^1H - ^{15}N HSQC 測定を行い、細胞に導入した αSyn に由来するシグナルを観測した。測定後、細胞懸濁液を遠心して、上清を回収し測定を行うことで、細胞外に $\alpha\text{-Syn}$ が漏れていないことを確認した。また、回収した細胞を破砕して細胞内の αSyn を回収して測定した。

(4) MRI を用いた培養細胞の観測システムの構築は、HeLa S3 細胞を 5 ml のテルモシリンジに詰め、 ^{13}C 極低温検出器の検出部に張り付けた。培養細胞は、培地中の栄養分を消費するため養分が枯渇すると死んでしまい、導入されたタンパク質が細胞外へと放出されてしまう。そのため、パイオリアクターを利用して測定中の培地を新しい培地で灌流させる形にする (*Angew. Chem. Int. Ed Engl.* (2013)**52**, 1208-1209)。

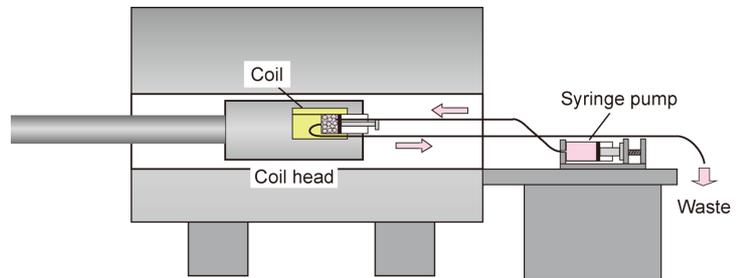


図2 灌流下での培養細胞の MRS 観測システム

具体的には、細胞を入れたシリンジの片側に新鮮な DMEM 培地を入れたシリンジポンプを取り付け、もう一方は廃液ラインと繋げた (図2)。この場合、細胞を可変性の水和ゲルに埋包することで、灌流により細胞が流れていかないようにする。また、灌流により生存率が改善するか調べるため、 2.0×10^7 個の HeLa S3 細胞を 200 μl の DMEM 培地に懸濁した状態、および同密度であるが、細胞をアルギン酸ゲルに埋包して培地を灌流させた状態とで、室温でインキュベーションして、6 時間、および 24 時間の時点でそれら生存率を比較した。

4. 研究成果

(1) αSyn ファントム (標準試料) 実験による MRI 測定感度の解析

大腸菌を利用して発現させ精製した均一 ^{13}C 標識 αSyn を、神経細胞内濃度に相当する 50 μM にて調製した。同試料を MRI 用ファントム (標準試料) として、 ^{13}C 極低温検出器を備えた 7 テスラ小動物用 MRI (Bruker Biospin) に取り付けて、 ^{13}C MRS 測定を行った。その結果、1 時間の積算で αSyn に由来する ^{13}C シグナルを検出できた。生体内における $\alpha\text{-Syn}$ の半減期は 50 時間と報告されているので、 αSyn が分解を受けずに信号を観測することが可能と考えられる。得られたシグナルの線幅は、溶液 NMR のスペクトルと比較して広幅化していた。2 次構造解析に用いる α 、 β 位のシグナルも観測されたが、140 残基のシグナルが互いに重なり観測されたため、アミノ酸選択標識を利用して、個別のシグナルを分離観測することで解消できると考えられる。次に、生体内環境に近い状態を模倣するため、 αSyn をゲルに埋包したファントムを調製した。ゲルの種類として、不可逆的にゲル化するアガロースに加えて、カルシウム濃度によりゲル化が可逆的に制御できるアルギン酸ゲル、および温度によりゲル化を制御できるメビオールゲルを試した。いずれも、信号を観測する事ができて、その線幅は溶液中よりもさらに広幅化していた。しかし、化学シフト変化は見られず、ゲルとの間の相互作用は認められなかった。細胞に導入しない状態のシヌクレイン溶液を DEME 培地に溶解してメビオールゲルとともに測定したが、ゲルおよび培地 MRS 測定したシグナルがバックグラウンドノイズとして観測されて、目的の αSyn の信号を検出出来なかった。そこで、 αSyn を含まない状態にて測定を行い、 αSyn 存在下とのスペクトルから差し引く、差スペクトル処理をおこなった。その結果、バックグラウンド

ノイズが取り除かれ、ゲルに埋包された Syn 由来の ^{13}C シグナルが検出された。本手法を用いることで、細胞に導入した Syn の信号も検出することが可能になると期待される。

(2) 浮遊細胞である HeLa S3 細胞に対して膜孔形成毒素ストレプトリジン 0 を用いて、FITC 標識リゾチームを導入した。ストレプトリジン 0 を用いて HeLaS3 細胞に形成させた膜孔を介して、FITC 標識リゾチームを導入後、フローサイトメトリーによる生存率および導入効率の評価を行った。その結果、生きたまま Syn が導入された細胞を確認できたが、その割合は全体の 10% 以下であった。次に、電気穿孔法を用いた導入を行った。その結果、生きたまま FITC 標識リゾチームが導入された HeLa S3 細胞の割合は、10 - 40% となった。以上から、電気穿孔法を利用して Syn タンパク質の導入を行うこととした。

(3) ^{15}N 標識した Syn を HeLa S3 細胞に導入後、600 MHz の NMR マシンを用いて 10 にて、細胞内に導入された Syn の ^1H - ^{15}N HSQC 測定を行った。細胞内の Syn の NMR スペクトルは、溶液およびゲルのファントム実験と異なり、広幅化だけでなく、化学シフト変化も生じていた。これらは、細胞内分子との相互作用に由来すると考えられる。また、測定に用いた導入細胞の上清の測定も行い、観測したシグナルが細胞内に存在する Syn に由来したものであることを確認した。また、細胞を破碎して取り出した Syn のシグナルを観測すると、細胞内では広幅化して観測出来なかった、N 末端、C 末端のシグナルが観測され、N 末端のアセチルメチオニンに由来するシグナルも観測された。

(4) 標識タンパク質を導入した培養細胞の MRI 観測システムを構築した。ゲルを詰めたシリンジに詰めて、極低温検出器に取り付けた。シリンジを MRI にセットして培地を灌流させることができることを確認した。また、アルギン酸ゲルに HeLa S3 細胞を埋包して灌流させた結果、6 時間の時点では、生存している細胞の割合は、灌流なし、有りの場合とも 3 割であった。しかし、24 時間の時点では、灌流なしの場合生存細胞は 1 割以下に減少したのに対して、灌流有りの場合は 3 割が生じた状態が保たれていた。

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 2件）

1. 著者名 Yoshida Hideki, Tanimoto Eiichi, Hirai Takaaki, Miyanoiri Yohei, Mitani Rie, Kawamura Mayuko, Takeda Mitsuhiro, Takehara Sayaka, Hirano Ko, Kainosho Masatsune, Akagi Takashi, Matsuoka Makoto, Ueguchi-Tanaka Miyako	4. 巻 115
2. 論文標題 Evolution and diversification of the plant gibberellin receptor GID1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E7844 ~ E7853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1806040115	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 Kainosho Masatsune, Miyanoiri Yohei, Terauchi Tsutomu, Takeda Mitsuhiro	4. 巻 71
2. 論文標題 Perspective: next generation isotope-aided methods for protein NMR spectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biomolecular NMR	6. 最初と最後の頁 119 ~ 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10858-018-0198-x	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 Yoshinaga Sosuke, Ishida Norihito, Tsuji Tatsuichiro, Sonoda Akihiro, Yunoki Kaori, Takeda Mitsuhiro, Toda Etsuko, Terashima Yuya, Matsushima Kouji, Terasawa Hiroaki	4. 巻 12
2. 論文標題 1H, 13C and 15N resonance assignments for a chemokine receptor-binding domain of FROUNT, a cytoplasmic regulator of chemotaxis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomolecular NMR Assignments	6. 最初と最後の頁 259 ~ 262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12104-018-9819-2	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 Terashima Y, Toda E, Itakura M, Otsuji M, Yoshinaga S, Okumura K, Shand F H. W., Komohara Y, Takeda M, Kokubo K, Chen M, Yokoi S, Rokutan H, Kofuku Y, Ohnishi K, Ohira M, Iizasa T, Nakano H, Okabe T, Kojima H, Shimizu A, Kanegasaki S, Zhang M, Shimada I, Nagase H, Terasawa H, Matsushima K	4. 巻 11
2. 論文標題 Targeting FROUNT with disulfiram suppresses macrophage accumulation and its tumor-promoting properties	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14338-5	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 Miyanoiri Yohei, Takeda Mitsuhiro, Terauchi Tsutomu, Kainosho Masatsune	4. 巻 1864
2. 論文標題 Recent developments in isotope-aided NMR methods for supramolecular protein complexes ?SAIL aromatic TROSY	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129439 ~ 129439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.129439	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 Tsukiashi Asami, Min Kil Sik, Kitayama Hikaru, Terasawa Hiroaki, Yoshinaga Sosuke, Takeda Mitsuhiro, Lindoy Leonard F., Hayami Shinya	4. 巻 8
2. 論文標題 Application of spin-crossover water soluble nanoparticles for use as MRI contrast agents	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-33362-6	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 -

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 東 愛理、武田光広、吉永壮佐、寺沢宏明
2. 発表標題 生理条件下でのMRS解析に向けた培養細胞内へのタンパク導入法の検討
3. 学会等名 ISMRM日本支部第3回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keika Saito, Mitsuhiro Takeda, Sosuke Yoshinaga, Hiroaki Terasawa
2. 発表標題 NMR and MRS studies of the neurotoxic oligomer of a-Synuclein toward investigating its in vivo structure
3. 学会等名 25th ISMRM (International Society for Magnetic Resonance in Medicine) annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Keika Saito, Mitsuhiro Takeda, Sosuke Yoshinaga, Hiroaki Terasawa
2. 発表標題 生体内における β -シヌクレインの神経毒性オリゴマーの構造解明にむけたNMRおよびMRS解析
3. 学会等名 第45回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Keika Saito, Mitsuhiro Takeda, Sosuke Yoshinaga, Hiroaki Terasawa
2. 発表標題 NMR とMRS による β -シヌクレインの生体内オリゴマー化の解析
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会
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