

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（特設分野研究）

研究期間：2017～2021

課題番号：17KT0131

研究課題名（和文）インタラクトームを基盤とした神経変性疾患の多様性を生み出す要因の解明

研究課題名（英文）Interactome analysis to understand the cause of variations in neurodegenerative diseases

研究代表者

山中 智行（Yamanaka, Tomoyuki）

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：00381575

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質凝集体の特性と相互作用に着目した解析を進め、まず、パーキンソン病やレビー小体型認知症で蓄積するシヌクレイン凝集体について、新たな構造分類法を確立することで、それぞれの疾患関連変異により特性の異なる凝集体が形成されることを見出した。またマウス脳内に注入したシヌクレイン凝集体のプロテオミクスにより、これらがシナプスへ濃縮することも明らかとした。一方、家族性の筋萎縮性側索硬化症（ALS8）では、小胞体に変異VAPBが凝集・蓄積しているが、これら小胞体の単離、プロテオーム解析により、VAPBの凝集とともに小胞体特性が変化しオルガネラとの相互作用が減少することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患で未だ解決されていない問題の一つは、なぜ疾患ごとに異なる病態・神経症状を示すのかということである。本研究でのタンパク凝集体を標的とした一連の解析により、まず、凝集部位の特異性が異なる生理機能障害に関わることが示唆され、さらに、凝集体の構造の違いも病態特異性に関連していることが明らかとなった。これらの成果は、タンパク凝集体の特定部位への集積を防ぐこと、あるいはその構造を転換させることが、これらが疾患の予防・治療に対する新たな戦略となることを強く期待させるものである。

研究成果の概要（英文）：We performed several analyses focusing on structural property and interaction of protein aggregates known to be accumulated in neurodegenerative diseases. We first established a novel method for classification of alpha-synuclein (a-syn) aggregates, and clarified formation of structurally distinct aggregates by familial PD/DLB-associated mutations (BBA 2019, BBRC 2019, 2020). By proteomics of a-syn aggregates injected into mouse brain, their accumulation into synapse has been clarified (Neurosci Res. 2020). We further focused on another protein VAPB known to be mutated in familial ALS and be aggregated/accumulated in ER. By proteomics of the ER containing VAPB and its mutant, we revealed that VAPB aggregation induced alteration of ER properties and reduction of ER-organelle interactions (Sci Rep 2020).

研究分野：分子神経病態学

キーワード：プロテオミクス 質量分析 タンパク凝集体 パーキンソン病 ALS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの神経変性疾患では、病因タンパク質が凝集し、不溶性の線維状構造体(アミロイド線維)が蓄積している。近年、このアミロイド線維がいわば鋳型(シード)となり正常なタンパク質を取り込んでいくシーディング反応が病態の拡大・進行に寄与していると考えられている。興味深いことに、最近、同一のタンパク質から異なる構造を持つアミロイド線維が形成され、これが異なる病態の形成に関与することが示唆されてきた。この現象はプリオン病におけるアミロイド線維構造の多様性から明らかになったものであるが、最近アルツハイマー病やパーキンソン病で蓄積する A β 、タウ、シヌクレインでも報告されている。よって、今後、アミロイド線維の構造の同定・解析が、病態を予測し治療法を確立する上で必須となると予測される。しかしながら、アミロイド線維構造の違いと病態多様性との因果関係についてはまだ証明されていない。

我々はこれまでに、遺伝性の神経変性疾患であるハンチントン病について、病因タンパク質凝集体の網羅的質量分析を行い、転写因子 NF-Y 等、その病態進行や多様性に関わる凝集体結合因子を同定してきた(Yamanaka T et al. EMBO J 2008, Hum Mol Genet.2010, PLoS One. 2014, Nat Commun. 2014, Sci Rep 2016)。シヌクレインやタウによるシーディング反応の病態伝播への重要性を考えると、これらの蓄積疾患でも、アミロイド線維構造に依存した異なる凝集体結合因子がその病態多様性に寄与していると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの我々の技術を踏襲・発展させ、「凝集体インタラクトーム解析」による、線維構造依存的な病態多様性の分子システムの解明及び新たなバイオマーカーの同定を行う。

3. 研究の方法

(1) シヌクレイン凝集体の構造特性解析

シヌクレインにはいくつか家族性の変異が同定されており、それぞれパーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症など、異なる疾患に関連していると報告されている。また、*in vitro*系で、野生型よりも速く凝集することも観察されている。同じく凝集速度の速いマウスシヌクレインも含め、これらについてリコンビナントタンパク質を精製し、*in vitro*で形成した凝集体について、生化学、電顕解析を行い、その特性の違いがあるかを検討した。

(2) マウス脳内に注入したシヌクレイン凝集体のプロテオーム解析

シヌクレイン凝集体をマウス脳内に注入すると、これがシードとなり内在性のシヌクレインを凝集させ、凝集病態が伝播・拡大していくことが知られている。しかしながら、この注入した凝集体が脳内のどこに分布し病態を引き起こしていくのかはよくわかっていない。これを明らかとするため、その初期の局在を組織学的に調べるとともに、さらに予め蛍光標識した凝集体を脳内注入し、数時間に脳反対側を界面活性剤の非存在下で懸濁し、移動した凝集体を FACS で回収し、質量分析を行った。

(3) 凝集体プロテオーム・インタラクトーム解析の他疾患への応用

上記の解析から、界面活性剤を使わずよりインタクトな状態で回収しプロテオーム解析することが、凝集体が存在する細胞内画分を同定・解析する上で有用であることが示された。この系を他疾患へと応用できるか検討した。具体的には、家族性 ALS で変異し小胞体に凝集する VAPB について、これを界面活性剤の非存在下で免疫沈降法により単離し、その小胞体ごと網羅的質量分析解析を行い、凝集による VAPB プロテオーム・インタラクトームへの影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 構造の異なるシヌクレインアミロイド線維の同定

凝集体をプロテアーゼ処理しその残存部分を質量分析することで、凝集体のコアとなる領域を同定できる。この領域についてマウスシヌクレイン凝集体について同定したところ、ヒトのものとは異なることが明らかとなった。さらに、電顕解析からもマウスの方はねじれの少ないストレート状の構

造を取ることも見いだされた (BBA Mol Basis Dis. 2019)。このようなマウス型の構造特性は パーキンソン病に関わる A53T 変異を持つ シヌクレイン凝集体でも観察されたが、興味深いことにレビ-小体型認知症に関わる E46K では観察されなかった (BBRC 2019)。さらに、これらのコア領域解析や電顕解析は、ヒト患者脳からシーディングにより増幅した シヌクレイン凝集体でも応用でき (BBRC 2020)、これら生化学的・構造学的解析が凝集体の特性を同定し分類する上で有用であることが明らかとなった。

(2) マウス脳内での シヌクレイン凝集体プロテオームの同定

まず、シヌクレイン凝集体をマウス脳内に注入すると、わずか1日で長距離(反対側まで)移動することを見出し、これまでの予想と異なり、神経回路を通じて非常に高速度で拡散していることが明らかとなった (Acta Neuropathol Commun. 2018)。さらに、蛍光標識した凝集体を注入し、FACSで回収後にプロテオーム解析を行った結果、シナプス関連タンパク質が有意に濃縮されており、この結果はウエスタンブロットングや免疫組織化学でも確認された。よって、注入した凝集体は数時間で神経線維を移動し、シナプスに濃縮されることが明らかとなった (Neurosci Res. 2020)。

(3) 凝集による VAPB プロテオーム・インタラクトームの変化の同定

VAPB 野生型を含む小胞体に比べ、凝集した変異型が存在すると、滑面小胞体に関連するタンパク質が特異的に減少することを見出し、凝集により小胞体の特性が変化することを明らかとした。さらに、ミトコンドリアなど他オルガネラに存在するタンパク質の含量も低下しており、小胞体-ミトコンドリア係留も減少していると示唆され、近接ライゲーションアッセイからもこの結果が支持された (Sci Rep 2020)。本成果は第93回日本生化学会、第42回日本分子生物学会年会などでも口頭発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yamanaka Tomoyuki, Nishiyama Risa, Shimogori Tomomi, Nukina Nobuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Proteomics-Based Approach Identifies Altered ER Domain Properties by ALS-Linked VAPB Mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7610
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-64517-z	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 Miyazaki Haruko, Yamanaka Tomoyuki, Oyama Fumitaka, Kino Yoshihiro, Kurosawa Masaru, Yamada-Kurosawa Mizuki, Yamano Risa, Shimogori Tomomi, Hattori Nobutaka, Nukina Nobuyuki	4. 巻 295
2. 論文標題 FACS-array based cell purification yields a specific transcriptome of striatal medium spiny neurons in a murine Huntington disease model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 9768 ~ 9785
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.012983	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 Yamanaka Tomoyuki, Miyazaki Haruko, Tosaki Asako, Maity Sankar N., Shimogori Tomomi, Hattori Nobutaka, Nukina Nobuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Gene expression profiling in neuronal cells identifies a different type of transcriptome modulated by NF- κ B	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21714
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-78682-8	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 該当する
1. 著者名 Kasahara Junya, Imamura Yukio, Hiyama Akiko, Yamanaka Tomoyuki, Miyazaki Haruko, Nukina Nobuyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Proteomic analysis of subcellular compartments containing disseminated alpha-synuclein seeds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 30494-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2020.11.009	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 Yamanaka Tomoyuki, Nishiyama Risa, Shimogori Tomomi, Nukina Nobuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Proteomics-Based Approach Identifies Altered ER Domain Properties by ALS-Linked VAPB Mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-64517-z	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 Yoshinaga Saki, Yamanaka Tomoyuki, Miyazaki Haruko, Okuzumi Ayami, Hiyama Akiko, Murayama Shigeo, Nukina Nobuyuki	4. 巻 522
2. 論文標題 Preserved proteinase K-resistant core after amplification of alpha-synuclein aggregates: Implication to disease-related structural study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 655 ~ 661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.142	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 Tanaka Goki, Yamanaka Tomoyuki, Furukawa Yoshiaki, Kajimura Naoko, Mitsuoka Kaoru, Nukina Nobuyuki	4. 巻 19
2. 論文標題 Sequence- and seed-structure-dependent polymorphic fibrils of alpha-synuclein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 30065-1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2019.02.013	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 Tanaka Goki, Yamanaka Tomoyuki, Furukawa Yoshiaki, Kajimura Naoko, Mitsuoka Kaoru, Nukina Nobuyuki	4. 巻 508
2. 論文標題 Biochemical and morphological classification of disease-associated alpha-synuclein mutants aggregates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 729 ~ 734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.200	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 Park Hongsun, Miyazaki Haruko, Yamanaka Tomoyuki, Nukina Nobuyuki	4. 巻 18
2. 論文標題 Non-coding RNA Neat1 and Abhd11os expressions are dysregulated in medium spiny neurons of Huntington disease model mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 30551-0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2018.10.013	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 Okuzumi Ayami, Kurosawa Masaru, Hatano Taku, Takanashi Masashi, Nojiri Shuuko, Fukuhara Takeshi, Yamanaka Tomoyuki, Miyazaki Haruko, Yoshinaga Saki, Furukawa Yoshiaki, Shimogori Tomomi, Hattori Nobutaka, Nukina Nobuyuki	4. 巻 6
2. 論文標題 Rapid dissemination of alpha-synuclein seeds through neural circuits in an in-vivo prion-like seeding experiment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-018-0587-0	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 Yamanaka Tomoyuki, Nukina Nobuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 ER Dynamics and Derangement in Neurological Diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 12:91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2018.00091	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11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 山中智行、西山里瑛、下郡智美、貫名信行
2. 発表標題 オルガネラ係留タンパク質VAPBのALS変異による小胞体プロテオーム変化
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山中智行、西山里瑛、下郡智美、貫名信行
2. 発表標題 Identification of ER sheet/tubule-specific proteomes and its alteration by ALS-linked VAPB mutation
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中智行
2. 発表標題 ALS関連遺伝子による小胞体病態とプロテオミクス
3. 学会等名 2019年度同志社大学ハリス理化学研究所研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中智行、下郡智美、貫名信行
2. 発表標題 神経の発生と変性を異なるメカニズムで制御する普遍的転写因子
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamanaka T, Nishiyama R, Nukina N
2. 発表標題 Immuno-isolation of different ER membrane domains from cultured cells
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamanaka T, Nukina N.
2. 発表標題 Biochemical characterization of pathological ER domain isolated from cultured cells
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamanaka T
2. 発表標題 A transcriptional factor involved in neurogenesis and degeneration
3. 学会等名 Burke Neurological Institute Special Seminar (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中智行、田中剛貴、吉永早希、古川良明、貫名信行
2. 発表標題 ヒト・マウス シヌクレインを用いたアミロイド線維多様性の解析
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 (分子生物学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamanaka T, Nukina N.
2. 発表標題 NF-Y inactivation induces differential ER chaperone downregulations and ubiquitin/p62 pathologies in the CNS
3. 学会等名 WCN 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamanaka T, Nukina N.
2. 発表標題 Neuronal type-specific regulation of ER chaperones determines the ubiquitin/p62 pathology caused by NF-Y inactivation
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山中智行、宮崎晴子、貴名信行
2. 発表標題 転写因子NF-Yを介した新規神経変性メカニズムの解明
3. 学会等名 第5回NGS研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟大学脳研究所脳病態解析分野 https://www.bri.niigata-u.ac.jp/field/neuroscience/matsui/index.html
--

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
研究分担者	下郡 智美 (Shimogori Tomomi) (30391981)	国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・ チームリーダー (82401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	貫名 信行 (Nukina Nobuyuki)	同志社大学	
研究協力者	松井 秀彰 (Mastui Hideaki)	新潟大学	

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