

機関番号：32659
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20550083
 研究課題名（和文） パーキンソン病原因遺伝子産物の初期アミロイド形成機構の高精度
 検出法の開発
 研究課題名（英文） Studies of an early stage amyloid formation for Parkinson's Disease casual
 protein.
 研究代表者
 田代（下高原） 櫻子（TASHIRO SAKURAKO）
 東京薬科大学・薬学部・講師
 研究者番号：40328555

研究成果の概要（和文）：

本研究では、パーキンソン病（PD）特有のアミロイド斑を構成するタンパク質 α -synuclein に着目し、そのアミロイド形成機構の分子レベルでの解析と疾患との関連性の解明を目的とした。特に、脳内情報伝達物質でありパーキンソン病の治療薬の一つでもあるドパミンと α -synuclein との相互作用を中心に、アミロイド線維形成への影響を蛍光、CD、クロマトグラフィー、核磁気共鳴および質量分析を用いて検討した。その結果、ドパミンはアミロイド線維化に対して抑制効果があることが明らかになった。また、ドパミンの添加によりオリゴマー中間体の形成が促進されることが明らかになった。さらに、ドパミンは α -synuclein と結合し1～3分子単位で複合体を形成することが確認された。以上の結果から、本研究ではアミロイド線維形成機構とドパミンの影響を示したモデルを提示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have focused on α -synuclein, the major component of amyloid plaque in Parkinson's Disease (PD). The relationship between a detailed mechanism of amyloid formations and PD has been investigated. In particular, an interaction between α -synuclein and dopamine, a neurotransmitter and well known treatment for PD, has been elucidated in terms of its effect on amyloid formation, using fluorescence, CD, gelfiltration chromatography, NMR and MS. As a result, we have shown that the presence of dopamine suppresses the formation of amyloid fibrils, while the formation of oligomer intermediates is stabilized by addition of dopamine. Furthermore, the complex formation between α -synuclein and dopamine has been confirmed, with a binding ratio of 1 to 3 dopamine molecules per α -synuclein molecule. In conclusion, we have proposed a schematic model for the mechanism of α -synuclein oligomer intermediates and amyloid formations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：生物学的分析

1. 研究開始当初の背景
 パーキンソン病（PD）はアルツハイマー病（AD）に次いで罹患率の高い神経変性疾患で

あり、我が国では約1000人に1人という報告がされている。病理学的には、ドパミン神経細胞の変性・脱落とLewy body（LB）と呼

ばれる細胞質内封入体の出現が特徴である。PDの大部分は弧発型であるが家族性PDも5~10%存在し、現在までに原因遺伝子として α -synuclein, parkin, α -synuclein triplication, ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH-L1), PTEN induced putative kinase 1 (PINK1), DJ-1の6つが同定されている。しかし、未だ根本的な治療法が確立されておらず重要な課題となっている。

脳内可溶性タンパク質の約0.1%を占める α -synucleinは当初、ADの不溶性アミロイドタンパク質の精製過程においてアミロイド β タンパク質以外の未知ペプチド前駆体(NACP)として同定された。その後染色体優性遺伝子変異体(A30P, E46K, A53T)が家族性PDの原因遺伝子として同定され、さらに弧発型PDにおけるLBの主要構成タンパク質であることが報告された。またPDだけでなくLB型痴呆症(dementia with Lewy bodies; DLB)などの神経変性疾患患者の脳において、出現部位や細胞種は異なるものの α -synucleinが細胞内凝集体の構成成分として存在していること、およびこれらの凝集体は神経細胞が脱落する部位に多く認められていることから、 α -synucleinの凝集が神経細胞死と密接に関連することが予想されている。 α -synucleinの機能については未知であったが、近年シナプス前末端に豊富なコシヤペロン分子cystein-string protein- α (CSP- α)の機能を補う事が報告された。CSP- α はSNARE複合体の形成に必要なタンパク質であることから、 α -synucleinがシナプス前末端においてSNARE複合体形成に関与している可能性も示唆されている。

α -synucleinは140アミノ酸残基からなる比較的小さなタンパク質で生理的条件下ではランダムコイル様の構造をとる。アミノ酸配列はN末端領域にKTKEGVを含む不完全な繰り返し配列が存在しており、その配列の二次構造予測から α -helixを形成する傾向が示唆されている。中央部にはNAC(Non-Amyloid β -component of AD amyloid)領域と呼ばれる疎水性領域、C末端領域には強い酸性領域を持つ。*In vitro*においては、ミセルとの相互作用により α -synucleinはN末端から中央部にかけて α -helix構造をとるが、繊維化する事で他のアミロイドタンパク質と同様に β -sheet構造に変化することが報告されている。一方、速度論的解析から部分的に構造を持つ中間体の存在や原子間力顕微鏡の研究より、微細孔様の構造を持つ線維中間体の形成などの報告があり、アミロイド線維形成過程における中間体の存在が明らかにされた。

*In vitro*でのアミロイド繊維化過程の中間体の存在は、当研究グループの研究結果からも明確であるが、未だその構造的詳細は明らかにされていない。更には、アミロイド繊維形

成における中間体は繊維よりもそれ自身が細胞毒性を与える本体であるという仮説も報告されており、 α -synucleinのアミロイド線維形成機構の解明はPDおよび他の神経変性疾患の解明において有用な知見をもたらすものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではアミロイド線維形成の初期段階において中間体の存在が必須であるという仮説を検証し、その構造的詳細を明らかにするために、種々の分析方法を用いて線維形成初期段階の構造変化およびアミロイド線維形成機構の解明を試みる。さらに家族性PDの原因遺伝子変異体と野生型とを比較し、(i)アミロイド線維形成における中間体への点変異の影響、(ii)アミロイド線維形成過程における中間体の分子間相互作用および分子形状の解析を試みる。一般に中間体の研究においては、その不安定な性質のため、より広範な条件検討が必須となる。既に変異体タンパク質としてA30P, E46K, A53Tの大腸菌大量発現系は構築されており、WTおよびこれらの変異体についてThT蛍光を用いたアミロイド線維形成の速度と線維量の観察、およびCDスペクトルの経時変化から二次構造変化を観察し、中間体形成の条件検討を試みる。またSVD解析を用いてCDスペクトルの経時変化をより詳細に分析する。更にNMRを用いてアミロイド線維形成過程と α -synucleinの構造変化との関連性を解析する。アミロイド線維形成過程の初期段階での分子形状についてはSAXSおよび電子顕微鏡を用いて観察し、分子レベルでの変化をモニターする。

本研究の目的は、核磁気共鳴法(NMR)、X線解析法、電子顕微鏡などの分析手法により、 α -synucleinの初期段階におけるアミロイド生成機構を原子レベルで解明することにある。これまでに行ったCD、蛍光およびX線小角散乱の結果からアミロイド化初期段階における中間体の存在が示唆された。この結果を踏まえて、初期段階における中間体の構造様式を解明し、中間体形成への点変異体の影響を検証する事で、中間体の存在とPD発症との関連性についても明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

1) X線小角散乱解析法および電子顕微鏡などによるアミロイド線維中間体の確認

① α -synucleinの大量発現および精製：既に当研究グループにより確立されている

② アミロイド線維形成：アミロイド線維形成時間を短くし、初期段階における中間体形成の条件検討を行う。右図に示すようにこれまでの研究から、野生型 α -synucleinの円偏光二色性(CD)スペクトルの経時変化の

観測より、アミロイド線維形成の進行に伴い、 β -シート構造を取ることを確認している。本研究では、更に早い段階もしくは低濃度でのアミロイド線維化における経時変化を測定し、中間体の形成をモニターする。

③ X線小角散乱によるアミロイド線維化初期段階における分子形状の解析 ④ 電子顕微鏡による分子形状変化の観察。⑤ 変異体 (A30P, A53T, E46K) に関しても①-④の操作を行い、変異がアミロイド線維形成の中間体に及ぼす影響を調べる。

2) 核磁気共鳴法による DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) スペクトルの測定。

DOSY スペクトルより溶存分子の拡散係数が判り、溶存状態における分子の挙動に関する情報を得ることができる。 α -synuclein が単量体または多量体であるかの状態解析が可能となり、アミロイド化初期段階における中間体を詳細に解析する上でも、DOSY スペクトルによる解析は有効な手段になるものと期待できる。以下に示すように研究実施の手順は(1)と同様に行う。DOSY スペクトル測定では、アミロイド線維形成を行いながら経時的にスペクトル測定を行う。一つのスペクトル測定に要する測定時間は0.5~1時間程度である。アミロイド線維化がかなり進行した段階では不溶になることが予想されるが、初期段階では可溶性と考えており、タンパク質濃度を下げてアミロイド線維形成を行うなど、線維化速度を下げる条件検討が必要となる。

① α -synuclein の大量発現および精製 (変異体を含む) ② 線維化速度を下げた条件下でのアミロイド線維形成 ③ DOSY スペクトル測定および分子挙動解析

(3) アミノ酸特異的安定同位体標識によるアミロイド線維形成の解析

特定のアミノ酸を安定同位体(^{13}C , ^{15}N)標識することにより、核磁気共鳴法(NMR)による選択的検出が可能になる。部位特異的な構造解析に有効な手法であり、当研究にも応用を試みる。アミノ酸特異的にタンパク質を標識し、アミロイド化初期段階における主鎖の化学シフト変化を測定していく。標識するアミノ酸は含有する残基数が2以下である His, Ile を対象とする。位置特異性があるため、帰属のための NMR スペクトルを測定することなく、1次元スペクトルのみで構造変化に関する知見を得ることが可能となる。

① 安定同位体(^{13}C , ^{15}N)標識 α -synuclein の大量発現および精製 (変異体を含む) ② 線維化速度を下げた条件下でのアミロイド線維形成 ③ 溶液および固体 NMR 測定

(4) ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルによるアミロイド線維初期過程の解析

アミロイド線維形成における分子・原子相互作用の変化を観察するために ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した結果、野生体および変異

体シグナル強度の著しい減少が KTKEGV モチーフに集中していたことが明確となり、このモチーフがアミロイド線維形成に関わっている可能性が示唆された。平成 21 年度以降の研究では、初期段階における分子・原子間相互作用を観察するため、実験手順 2)-②で検討した条件下で線維化を行い、経時的に ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定する。化学シフト変化およびシグナル強度変化を観察する。① ^{15}N 標識 α -synuclein の大量発現および精製 (変異体を含む) ② 線維化速度を下げた条件下でのアミロイド線維形成 ③ ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル測定

4. 研究成果

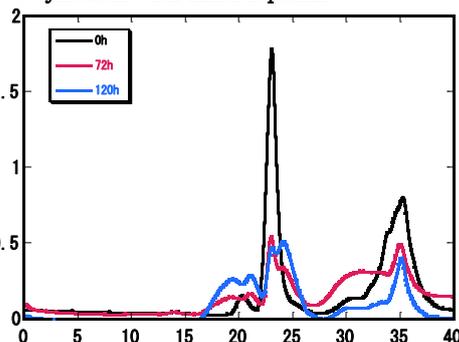
α -Synuclein アミロイド線維形成

タンパク質の濃度や温度がアミロイド線維形成に与える影響を、ThT 蛍光および CD を用いて観測した。その結果タンパク質濃度や線維化温度の低下により、アミロイド線維量および線維形成速度は共に減少し、試料の分解も少なくなった。WT 及び点変異体のアミロイド線維化を比較すると、相対的なアミロイド線維量は E46K > A30P > WT であった。しかし、線維形成速度は WT > E46K > A30P となった。またアミロイド線維形成に伴う β -sheet 含有量は E46K > A30P = WT の順に増加した。これらの結果から、線維化条件は線維形成速度に影響するが、相対的な線維量には影響しないことが分かった。また、点変異によって影響されるパラメーターが異なることが明らかになった。

ドパミンが α -synuclein 線維形成に及ぼす影響

ドパミンの添加によってアミロイド線維量および形成速度が、WT、点変異体において共に減少した。しかしドパミンの存在は WT、A30P の β -sheet 含有量に影響を及ぼさない、もしくは E46K においては逆に増加させる効果がある。またサイズ排除クロマトグラフィーにより、単量体よりも分子量の大きいオリゴマーの存在が確認できた。以上の結果をまとめると、ド

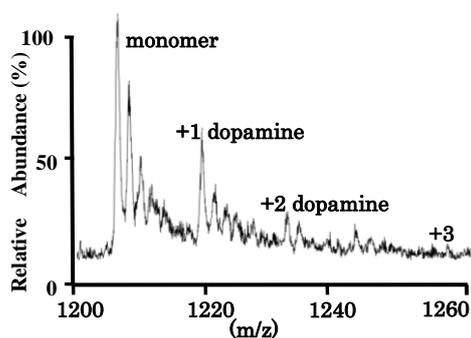
Gelfiltration chromatography of wt α -synuclein with 1mM dopamine



パミンによってアミロイド線維量は減少したにも拘らず β -sheet 含有量は増加もしくは変化していないことから、アミロイド線維とは別の β -sheet 構造を有する物質が形成されていると考えられる。なお、この物質がオリゴマーである可能性が示唆された。

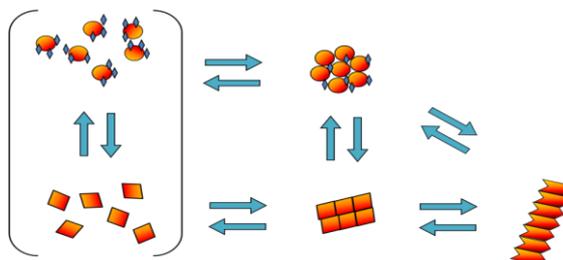
ドパミンと α -synuclein の相互作用

ドパミン 100 μ M 存在下でのアミロイド線維化を、WT を用いて ESI-MS 測定により観測した。結果、経時的に 2 量体や 3 量体が形成し、同時にオリゴマー形成に伴うベースラインの異常な盛り上がりを観測した。またドパミン 1 mM を添加した直後の試料において、 α -synuclein 単量体より分子量がドパミン 1~3 分子増加したイオンピーク (Figure 1) が観測された。これはドパミンと α -synuclein の複合体の形成を示しており、 α -synuclein 1 分子に対してドパミンが 1~3 分子結合することを示唆する。更に、ドパミンによる構造変化を検討するため、NMR 法をもちいて ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定したところ、WT の H50 残基において経時的な化学シフトの変化が観測された。これはドパミンの影響で WT の H50 付近に構造変化が生じたことが示唆された。



ESI-MS of monomer and dopamine complexes.

本研究では、ドパミンと α -synuclein の相互作用を考慮したアミロイド線維形成機構のモデルを構築した。まず、 α -synuclein はオリゴマー中間体を形成しアミロイド線維へと進行する。一方ドパミンが存在する場合、 α -synuclein 単量体はドパミンと相互作用することで構造変化が生じ、オリゴマー複合体が形成されアミロイド線維形成は抑制される。このモデルでは、オリゴマー複合体がアミロイド線維形成における中間体である説と、アミロイド線維形成とは別経路の生成物であるという 2 つの説が考えられる。しかし現時点ではオリゴマー複合体の明確な存在は示されておらず、更なる検証が必要である。



Model of α -synuclein amyloid fibrinogenesis.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) Furihata, Kazuo; Shimotakahara, Sakurako; Shibusawa, Yoichi; Tashiro, Mitsuru, "An Effective Pulse Sequence for Detecting a Ligand Binding with a Protein Receptor Using a WET Sequence and the Repeated A-Filters" (2010) *Anal. Sic.* **26**, 1107 - 1110
- 2) Furihata, Kazuo; Shimotakahara, Sakurako; Shibusawa, Yoichi; Tashiro, Mitsuru, "Application of WET sequence for the detection of the ligand signals resonating close to water" (2009) *Magn Reson Chem*, **47**(11), 971-976
- 3) Furihata K, Shimotakahara S, Tashiro M. "An efficient use of the WATERGATE W5 sequence for observing a ligand binding with a protein receptor." (2008) *Magn Reson Chem*. Jun 6.
- 4) Shimotakahara (Tashiro), S. "Review: Protein Sample Preparation for Structural Biology" (2008) *Bunseki*, **4**, p178-182.
- 5) Tashiro M, Kojima M, Kihara H, Kasai K, Kamiyoshihara T, Ueda K, Shimotakahara S. "Characterization of fibrillation process of alpha-synuclein at the initial stage." (2008) *Biochem Biophys Res Commun*. **369**(3):910-914.

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 笠井 恒希, 田代 充, 小島 正樹, 木原 裕, 上田 健治, 上吉原 智晃, 田代 (下高原) 櫻子 「パーキンソン病原因タンパク質 α -synuclein の初期段階アミロイド形成機構の解明」第 31 回日本分子生物学会年会 2008 年 12 月 9 日 (神戸)
- 2) 城山 祐樹, 原田 卓哉, 坂本 茂, 田代 充, 上田 健二, 渋沢 庸一, 田代 (下高原) 櫻子 「 α -Synuclein アミロイド形成初期段階におけるオリゴマー中間体の構造解析」日本薬学会 第 132 年会 2010 年 3 月 30 日 (岡山)

3) 城山 祐樹, 原田 卓哉, 藤本 崇, 田代 充, 上田 健二, 町並 智也, 渋沢 庸一, 田代 (下高原) 櫻子「質量分析を用いた α -Synuclein アミロイド形成初期段階のオリゴマーな中間体の構造解析」日本分子生物学会 第 32 回年会 2009 年 12 月 9 日 (横浜)

4) 吉田 清香, 田代 (下高原) 櫻子, 城山 祐樹, 坂本 茂, 上田 健二, 渋沢 庸一, 田代 充, 関 宏子「質量分析を用いた α -Synuclein アミロイド形成機構の解析」日本分析化学会第 59 年会 2010 年 9 月 15 日 (仙台)

5) 城山 祐樹, 尾上 貴也, 赤井 麻衣, 吉田 清香, 関 宏子, 田代 充, 渋沢 庸一, 田代 (下高原) 櫻子「 α -Synuclein アミロイド化反応におけるオリゴマー中間体の構造解析」第 54 回日本薬学会関東支部大会 2010 年 10 月 2 日 (東京)

6) 城山 祐樹, 尾上 貴也, 赤井 麻衣, 田代 充, 上田 健二, 吉田 清香, 関 宏子, 渋沢 庸一, 田代 (下高原) 櫻子「 α -Synuclein アミロイド形成初期段階におけるオリゴマー中間体に対するドパミンの寄与とその構造的特徴についての解析」第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 7 日 (神戸)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 (下高原) 櫻子 (TASHIRO SAKURAKO)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 40328555

(2) 研究分担者

小島 正樹(KOJIMA MASAKI)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号: 90277252

研究分担者

田代 充 (TASHIRO MITSURU)

明星大学・理工学部・准教授

研究者番号: 40315750

(3) 連携研究者

()

研究者番号: