

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03232

研究課題名（和文）パーキンソン病発症と関連する天然変性蛋白質 -シヌクレインの「非構造生物学」

研究課題名（英文）"Unstructural biology" of alpha-synuclein, an intrinsically disordered protein related to the pathogenesis of Parkinson's disease

研究代表者

藤原 悟 (Fujiwara, Satoru)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・専門業務員

研究者番号：10354888

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：パーキンソン病発症と深く関係する蛋白質 -シヌクレイン (Syn) の線維状異常凝集体 (アミロイド線維) 形成機構の解明を目指して、重水素化技術を駆使した中性子小角散乱及び中性子準弾性散乱の新しい測定・解析法を開発し、Syn単量体の構造分布の導出及び構造ゆらぎの分子内領域レベルでの特徴づけを行った。測定結果から、この新しい解析法の有用性を示すと共に、アミロイド線維のなりやすさが異なる様々な条件での結果から、線維化の分子機構解明の手掛かりとなる、線維化開始のカギとなるふるまいを特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発された新しい解析法により、パーキンソン病発症に深く関係する Syn のアミロイド線維形成開始のカギとなるふるまいが特定された。これは Syn のアミロイド線維形成機構解明に向けた重要な手掛かりとなり、将来のパーキンソン病の予防・治療戦略策定に大きな貢献をなす重要な成果である。また、この解析法は、-シヌクレインのみならず様々な蛋白質のアミロイド線維形成機構解明や変性状態の蛋白質の解析など、様々な展開へとつながる解析法であり、蛋白質科学の更なる発展に大きく貢献しうる方法である。

研究成果の概要（英文）：Formation of abnormal filamentous aggregates (amyloid fibrils) of the protein, -synuclein (Syn), which is an intrinsically disordered protein (IDP), is closely related to the pathogenesis of Parkinson's disease. To elucidate how amyloid fibrils of Syn form, the behavior of the Syn monomers is investigated using small-angle neutron scattering and quasielastic neutron scattering. In particular, a new method, by which the detailed characterization of the structural distribution and the dynamical behavior of the IDPs such as Syn is possible, is developed. This new method, utilizing the protein-deuteration techniques, is applied to various deuterated Syn under various conditions, showing distinct propensity to fibril formation. The results obtained demonstrate the feasibility of the method, and provide the clues to specify the key behavior of Syn leading to fibril formation.

研究分野：生物物理学

キーワード：シヌクレイン 天然変性蛋白質 蛋白質重水素化 中性子散乱 パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

重篤な神経変性疾患パーキンソン病(PD)の発症には、脳神経細胞に多く存在する天然変性蛋白質(IDP) α -シヌクレイン(α Syn)の繊維状異常凝集体(アミロイド線維)形成が深く関係する。PD発症機構解明には α Synのアミロイド線維形成機構の解明が不可欠である。アミロイド線維は、蛋白質の(部分)変性が引き金となり、様々な中間体形成を経て形成されるが、数多くの研究にもかかわらず、線維形成の分子機構は未だ明らかになっていない。線維形成の経路中のどの状態が細胞毒性を持つかは明らかとなっていないが、凝集過程初期に形成される会合体が発症に関与すると示唆されていることを考慮すると、如何に凝集開始が起こるかの解明が特に重要である。

溶液中で α Synは、単量体として存在するが、通常で変性状態にあるIDPであるため、自然に引き金がかかった状態にある。従って、 α Syn単量体のふるまいを調べることで、凝集開始機構解明の手掛かりが得られることが期待できる。特に、塩の添加などの溶液条件や変異の導入により線維形成のしやすさが変化するため、これらの条件の変化に対する α Synのふるまいの変化を調べることが重要である。我々は、線維のなりやすさが異なる様々な溶液条件中での α Syn単量体のふるまいを、X線小角散乱(SAXS)及び中性子準弾性散乱(QENS)により調べた(1)。SAXS測定により、線維のなりやすさの変化に対応して平均構造が変化すること、QENS測定により、この構造変化と対応して構造ゆらぎの速さと振幅が変化することを明らかにした。このようなゆらぎ(ダイナミクス)の変化を検出したことは線維形成機構解明への重要な手掛かりとなり得るが、得られた情報は分子全体について平均されたふるまいである。 α Synは、1-60残基のN末端領域、61-95残基のNAC領域、96-140残基のC末端領域という3つの領域からなり、それぞれ電荷分布が異なるために線維化に際してそれぞれ異なった役割があると言われている。従って凝集開始のカギとなるふるまいを明らかにするためには、分子全体の平均的ふるまいのみではなく、これら各領域のふるまいを明確に特徴づける必要がある。そのためには、 α Synの各領域を特定できる構造分布の導出(SAXSでは分子のN末端側とC末端側を区別できない)、及び各領域のダイナミクスの特徴づけを可能とする方法を開発しなければならない。

2. 研究の目的

本研究は、蛋白質のN末端側とC末端側を区別しうる変性状態の構造分布の導出と蛋白質の内部領域のダイナミクスの詳細な特徴づけを可能とする新しい方法を開発し、様々な条件下での α Syn単量体に適用することで、アミロイド線維形成、特にその初期過程である凝集開始の機構解明の手掛かりを得ることを目的とする。

そのために、中性子小角散乱(SANS)及びQENSを用いる。SANSシグナルをもたらす蛋白質の中性子散乱長密度は、ほぼ一様であるが、水素原子と重水素原子の中性子散乱長が大きく異なる(水素: $-0.374 \times 10^{-12} \text{cm}$, 重水素: $0.667 \times 10^{-12} \text{cm}$)ため、蛋白質中の特定のアミノ酸残基を重水素化する(あるいは重水素化蛋白質中の特定アミノ酸残基を「軽水素化」する)ことで、蛋白質内部に散乱長密度分布を作り出すことができる。異なったアミノ酸残基を重水素化(あるいは軽水素化)することで異なった分布を持つ複数の試料を調製し、それらのSANS測定を行うことにより、構造分布の導出が可能となる。一方、QENSシグナルは水素原子のダイナミクスに由来するので、重水素化蛋白質中で特定のアミノ酸残基のみ軽水素化されれば、そのアミノ酸残基のみのダイナミクスを測定することができる。 α Synのアミノ酸配列は偏りが大きい(図1参照)ため、軽水素化するアミノ酸残基の種類により、N末端領域、NAC領域、C末端領域それぞれの軽水素ラベルが可能である。こうした試料のQENS測定により、それぞれの領域のダイナミクス情報が得られる。

このようなSANS及びQENS測定を、アミロイド繊維のなりやすさが異なる溶液条件下の α Synについて実施し、凝集開始に関係する α Synのふるまいを分子内領域のレベルで明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、完全重水素化蛋白質中で、特定のアミノ酸残基のみを軽水素化した試料を調製し、それらのSANS及びQENS測定を行う。そのために我々が初めて日本に導入した重水素化法(2)をさらに発展させた方法を用いて、蛋白質重水素化を行った。即ち、光独立栄養条件下で重水中で培養した緑藻(重水素化されている)から重水素化緑藻ペプトンを調製し、それを重水中で培養する大腸菌の栄養源とし、目的の蛋白質を発現させる方法である。特定アミノ酸の軽水素化はこの培地に過剰の通常アミノ酸を添加すること(3)で行った。図1に示すように、N末端領域を主にラベルするLys残基を軽水素化した重水素化 α Syn(H-Lys-D- α Syn)、N末端領域および

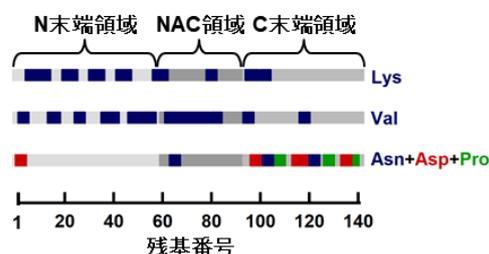


図1. α Syn配列中のアミノ酸残基の位置

NAC領域を軽水素ラベルした H-Val-D- α Syn、C末端領域を軽水素化ラベルした H-(Asn+Asp+Pro)-D- α Syn を調製した。

これらの重水素化試料に加えて、標準試料として通常の軽水素化試料 (H- α Syn) 及び軽水素化アミノ酸を含まない完全重水素化試料 (D- α Syn) を調製し、低塩濃度 (50 mM HEPES, pH 7.5) 及び高塩濃度 (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl) 条件 (塩の添加により線維のなりやすさが増大する) の重水溶液中に懸濁し、SANS 及び QENS 測定を行った。SANS 測定は研究用原子炉 JRR-3 の中性子小角散乱装置 SANS-J を用いて実施した。また、QENS 測定は、J-PARC センターのダイナミクス測定装置 BL02 (DNA) を用いて実施した。また、これらの重水素化試料測定に先立ち、基礎データとして、線維形成のキネティクスが異なる種々の変異 α Syn について、通常の H- α Syn の SAXS 及び QENS 測定を行った。SAXS 測定は、高エネルギー加速器研究機構放射光施設の X 線小角散乱装置 BL-6A、QENS 測定は上記装置 BL02 (DNA) を用いて実施した。

4. 研究成果

図 2 に α Syn の種々の変異体の QENS 測定で得られたスペクトルの例を示す。変異によりスペクトルが変化すること、特に、塩の添加による線維化のキネティクスが異なる変異体 A 及び B (変異体の種類は論文化の際に特定する) でふるまいが異なることが明らかとなった。エネルギー移動の大きい領域での変化が顕著なことは、線維化における局所運動の重要性を示唆している。また、SAXS 測定で得られた散乱曲線も、野生体と変異体、そして変異体同士で、塩の添加による散乱曲線の変化が異なることが明らかとなった。この結果は、変異により構造分布及びその変化の様態が異なることを示唆している。

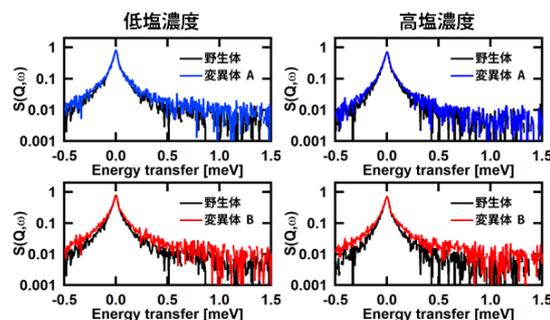


図 2. α Syn 野生体と変異体 A 及び B の QENS スペクトルの例。低塩濃度と高塩濃度条件のそれぞれについて、野生体と変異体のスペクトルを重ねてある。

重水素化試料調製のために、緑藻を用いた重水素化法を発展させ、以前の半分の日程で同様の重水素化率を達成できる方法を確立した。この方法を用いて、上述の重水素化試料、D- α Syn、H-Lys-D- α Syn、H-Val-D- α Syn、H-(Asn+Asp+Pro)-D- α Syn を調製した。重水素化率及び軽水素化アミノ酸残基の導入は質量分析により確認した。

α Syn 野生体及び変異体 A について、これらの重水素化試料を調製し、QENS 測定を実施した。図 3 に得られたスペクトルの例を示す。野生体と変異体 A の塩の添加に対するふるまいが大きく異なること、さらに、試料 1 と 2 (重水素化試料 3 種類のうちの 2 種類、どの試料かは論文化の際に特定する) においてもふるまいが大きく異なることが明らかとなった。これは軽水素ラベルされた領域ごとにダイナミクスが異なることを示す。特に図 3 に示したように、試料 1 でラベルされた領域のふるまいが線維化開始の上で重要であることが示唆された。現在、スペクトルの詳細な解析中であり、その結果から、線維化開始のカギとなるふるまいを特定する。

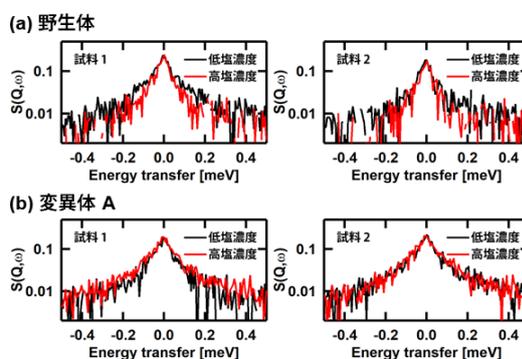


図 3. α Syn 野生体及び変異体 A の重水素化試料 1 及び 2 の QENS スペクトル。低塩濃度及び高塩濃度のスペクトルを重ねてある。

さらに、これらの重水素化試料についての SANS 測定を実施した。低塩濃度と高塩濃度重水溶液中で測定を行い、各試料の SANS 曲線を取得した。低塩濃度と高塩濃度において、また、各試料において異なった SANS 曲線を得ることができた。これは、塩の添加により構造分布が変化すること、そして軽水素ラベルされた重水素化 α Syn の SANS 曲線から詳細な構造分布の導出が可能であることを示している。現在、得られた曲線の解析中である。

実験的な手法の確立、実験データの取得を最優先としたために、これらの成果の論文化はこれからであるが、 α Syn 変異体の QENS 及び SAXS 測定、蛋白質重水素化技術、種々の重水素化 α Syn の QENS 測定、種々の重水素化 α Syn の SANS 測定のそれぞれについて順次、論文化していく予定である。本研究により α Syn の線維化のカギとなるふるまいが特定される。これは α Syn のアミロイド線維形成機構解明、ひいては将来の PD の予防・治療戦略策定に大きな貢献をなす。さらに、本研究で開発した解析法は、 α Syn のみならず様々な蛋白質のアミロイド線維形成機構解明や、広く変性状態の蛋白質の解析に貢献する方法であり、蛋白質研究における中性子散乱の有効性を示している。

<引用文献>

- (1) Fujiwara et al. *J. Mol. Biol.* (2019) **431**, 3229-3245.
- (2) Matsumoto et al. *J. Mol. Biol.* (2004) **342**, 1209-1221.
- (3) Réat et al. *PNAS* (1998) **95**, 4970-4975.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4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 藤原悟	4. 巻 3月号
2. 論文標題 蛋白質異常凝集機構解明に向けた蛋白質変性状態の解析－天然変性蛋白質 -シヌクレインの「非構造生物学」－	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 72～74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Yokoyama Takeshi, Kusaka Katsuhiko, Mizuguchi Mineyuki, Nabeshima Yuko, Fujiwara Satoru	4. 巻 66
2. 論文標題 Resveratrol Derivatives Inhibit Transthyretin Fibrillization: Structural Insights into the Interactions between Resveratrol Derivatives and Transthyretin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 15511～15523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jmedchem.3c01698	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 Fujiwara Satoru	4. 巻 58
2. 論文標題 Dynamical Behavior of Disordered Regions in Disease-Related Proteins Revealed by Quasielastic Neutron Scattering	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medicina	6. 最初と最後の頁 795-1～795-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/medicina58060795	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 藤原悟	4. 巻 5月号
2. 論文標題 量子ビームでパーキンソン病関連蛋白質 -シヌクレインのふるまいを探る- -シヌクレインの「非構造生物学」－	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 88～91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Chatake Toshiyuki, Tanaka Ichiro, Kusaka Katsuhiko, Fujiwara Satoru	4. 巻 78
2. 論文標題 Protonation states of hen egg-white lysozyme observed using D/H contrast neutron crystallography	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology	6. 最初と最後の頁 770 ~ 778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2059798322004521	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 Furuike Yoshihiko, Ouyang Dongyan, Tominaga Taiki, Matsuo Tatsuhito, Mukaiyama Atsushi, Kawakita Yukinobu, Fujiwara Satoru, Akiyama Shuji	4. 巻 5
2. 論文標題 Cross-scale analysis of temperature compensation in the cyanobacterial circadian clock system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Physics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42005-022-00852-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 藤原悟	4. 巻 8月号
2. 論文標題 パーキンソン病関連蛋白質 -シヌクレインの「非構造生物学」構築	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 70 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤原悟、西久保開、富永大輝
2. 発表標題 Internal dynamics of α -synuclein revealed by quasielastic neutron scattering
3. 学会等名 第61回生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原悟、西久保開、池中健作、Cesar Aguirre、望月秀樹
2. 発表標題 Structural and dynamical properties of the disease-related mutants of α -synuclein
3. 学会等名 第60回生物物理学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------