

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07000

研究課題名（和文）脳組織に定着した神経細胞内における認知症病原タンパク質のMRI解析

研究課題名（英文）MRI analyses of neuronal proteins causing dementia in brain tissues

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：レヴィ小体型認知症の患者においては、シヌクレイン（Syn）の凝集体であるレヴィ小体が見つかる。通常 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、Synのオリゴマーおよび不溶性線維が、神経毒性を示す。従来、aSynの構造解析は、試験管内の試料を対象として研究されてきたのに対し、本課題では生理条件下の構造解析を視野にいれて、細胞内環境での解析系の構築に取り組んだ。その第一歩として、In-cell NMRによる解析系の構築を実施した。HeLa細胞に対して、電気穿孔法利用してタンパク質を導入するシステムを構築し、モデルタンパク質としてユビキチン変異体を導入した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では、細胞内におけるaSynの解析システムを構築した。従来の認知症病原タンパク質の構造解析は試験管内で行われてきたが、これらは生理条件下における分子間相互作用やクラウディング効果を反映していない。生理条件下における病原タンパク質の構造情報を得ることで、認知症の発症機序の理解や病原タンパク質を標的とした新規薬剤の開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In the brain of patients with Lewy body dementia, the aggregates of alpha-synuclein(aSyn) are often found. aSyn normally exists as non-toxic monomer, but in pathological conditions it aggregates into toxic oligomers and/or fibrils. So far, studies of aSyn in terms of its structure have been performed in vitro. In this project, we worked on the establishment of In-cell NMR system towards studying the structure of the aSyn oligomer in vivo. We established an in-cell NMR system in which target proteins are introduced into HeLa cells by electroporation.

研究分野：構造生物学

キーワード：認知症 MRI

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在アルツハイマー型に次いで主要な認知症であるレヴィ小体型認知症の患者においては、シヌクレイン (Syn) の凝集体であるレヴィ小体が見つかる (*Neuron* (1995) 14, 467-75, *Nat. Rev. Neurosci.* (2013) 14, 38-48)。Syn は、140 アミノ酸残基からなる蛋白質である。通常 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。神経培養細胞を用いた実験より、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、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。Syn の不溶性線維は、平行型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、試験管内で Syn オリゴマーの生成が行われており、それらを解析した結果、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* と同様の様式で重合が生じているかは明らかでない。

(2) 哺乳培養細胞に単量体 Syn を導入して NMR を用いて細胞内に存在する同タンパク質を観測した報告例がある。本実験の結果に基づいて、Syn は *in vitro* に比べてコンパクトな単量体として存在するとの議論がなされている (*Nature* (2016) 530, 45-50)。この結果より、Syn の構造は周囲の生理環境の影響を受けることが示された。生きた個体内に存在する Syn の構造は、培養細胞内に置かれた状態とも異なる可能性がある。

(3) 研究代表者は、核磁気共鳴 (NMR) および小動物用磁気共鳴イメージング (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 シグナルを観測して帰属できれば、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。しかし、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。従来の ^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。一方、 ^{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、MRS により蛋白質由来の NMR シグナルを *in vivo* で観測した例はない。その理由として、細胞、個体内における蛋白質に由来する MR 信号の検出感度が低いことが挙げられる。

(4) 申請者の所属機関である熊本大学が管理する動物用 MRI 装置には、 ^{13}C 極低温検出器が備えられている。本プローブを利用すると通常の検出プローブに比べて ^{13}C シグナルの検出感度が 2 - 3 倍向上する。また、近年タンパク質の位置選択的同位体標識技術の進歩により、タンパク質に含まれる特定の標的炭素のシグナルの検出感度を向上させることも可能となってきた。

2. 研究の目的

我々は ^{13}C 標識 Syn をマウスの脳に移植・注入し、 ^{13}C MRS 法により Syn 由来のシグナルを検出することで、生理条件下における同タンパク質の二次構造情報を得ることを最終目標としている。しかし、生きた動物個体の脳に 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 を哺乳培養細胞に導入し NMR 測定を行うシステムを構築する。そのための解析基盤として、細胞内に導入した Syn の磁気共鳴法を利用した観測を行う。次段階として、その神経細胞を脳に移植して MRS 測定を行う。長時間測定に耐えうる培地灌流システムの構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞内へのタンパク質導入法の検討：研究代表者は、タンパク質の細胞内への導入法として、膜孔形成毒素であるストレプトリジン O を用いた導入 (*J. Am. Chem. Soc.* 131, 10834 (2009)) および NEPAGENE 社のエレクトロポレーターを用いた電気穿孔法 (*Nature*, 530, 45-50 (2016)) のシステムを確立している。各導入法について細胞の密度、導入時のタンパク質の濃度などの最適化を行い、タンパク質の細胞内への導入効率の最適化を図ることとした。本課題では、子宮頸がん細胞である HeLa 細胞あるいはその亜種で浮遊性細胞である HeLa S3 細胞に対して導入を試みた。導入効率の評価は、蛍光標識したリゾチームタンパク質を導入してフローサイトメトリーによる導入率の評価、および、 ^{15}N 標識したコピキチン変異体 (Ub3A) を導入して、導入効率を評価した。Ub3A は、天然のコピキチンタンパク質に含まれる 3 残基のかさ高い疎水性残基をアラニンに置換しており、細胞内に導入した際に細胞内因子との相互作用が抑えられることで NMR での検出が可能となるようにデザインされたモデルタンパク質である。Ub3A

を HeLa 細胞に導入後、細胞を破碎して得られた上清の 1 次元 SOFAST-HMQC 測定を行うことで、そのピーク強度から、HeLa 細胞内に導入された Ub3A の濃度を評価した。神経細胞内の Syn の濃度に相当する 10 μ M を目標値とした。

(2) In-cell NMR システムの構築: ^{15}N 標識した Ub3A を HeLa 細胞に導入して NMR SOFAST-HMQC スペクトルを取得した。測定は、極低温検出プローブ(クライオプローブ)を備えた 600 MHz NMR マシン (Bruker Biospin) を用いて実施した。測定は 37 度で実施した。5 時間にわたり測定を行ったのち、上清を回収して細胞内の Ub3A が細胞外に漏れ出していないか確認した。

(3) 培地灌流システムの構築: 神経細胞内における Syn のクリアランスの時間は約 50 時間と報告されている (*Nature*, 530, 45-50 (2016))。In-cell NMR 実験では、細胞を $\sim 2.0 \times 10^7$ cells/300 μ l と高密度の状態では懸濁して測定を行う。そのため、培地内の栄養分が 12 時間程度で枯渇して細胞内の ATP 濃度が減少してくる (*Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 1208-1211 (2013))。生きた状態を保ちながら NMR により捉えるため、培地を灌流させるバイオリアクターシステムを採用する (*Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 1208-1211 (2013))。カルシウムによりゲル化するアルギン酸ゲルを用いて細胞を保持しつつ培地を灌流して置き換えることで長時間にわたり細胞を生きたまま観測可能とする。細胞の寿命として 70 時間を目標とする。

4. 研究成果

(1) 細胞内へのタンパク質導入法の検討: 膜孔形成毒素を用いた導入法と電気穿孔法を利用した方法について、蛍光標識リゾチームの導入効率をフローサイトメトリーによる評価を行い比較した。同じ濃度のリゾチーム溶液を利用すると、導入率は電気穿孔法の方が 2 ~ 5 倍程度高い結果となった。いずれの方法においても、リゾチームの濃度を高めることで導入される濃度を高めることができた。ただし、電気穿孔法の場合、導入率が細胞とタンパク質の混合溶液の電気伝導度に依存し、電気伝導度が高すぎると死滅する細胞の割合が増えて、逆に電気伝導度が低いと導入効率が悪い結果となった。続いて、電気穿孔法を用いて ^{15}N 標識した Ub3A を導入して導入率を評価した。当初、得られたシグナルの強度は、過去に報告された同タンパク質の In-cell NMR 観測の結果に比べて 10 分の 1 程度しかなかった。原因として、タンパク質導入操作の過程において、多くの細胞が容器に吸着あるいは死滅するなど、全体の細胞数がロスしてしまい、試料管に封入した細胞の数が少なくなってしまうことが挙げられる。Syn タンパク質試料の精製度を向上させるとともに、電気パルスを与える際の電気伝導度の調整を進めた。細胞へのタンパク質導入についてノウハウを持つ研究者と意見交換をしながら条件検討の見直しを行い、そのため、濃度、電気穿孔法パルスの電圧値の最適化を進めた。最終的に Ub3A を 50 マイクロモルのオーダーで導入する条件を確立した。この結果は、先行研究と比較して同程度であり、妥当な値と考えられた。また、神経細胞内の α Syn の濃度は 20 ~ 40 マイクロモルと報告されている (*Nature*, 530, 45-50 (2016))。 α Syn についても、同様の操作で生理条件下に近い濃度レベルの細胞内導入状態の NMR 解析が可能と考えられる。

(2) In-cell NMR 実験: 電気穿孔法を用いて ^{15}N 標識した Ub3A を HeLa 細胞に導入して NMR SOFAST-HMQC スペクトルを 5 時間にわたり取得した。得られたスペクトルは、試験管内と比べて各シグナルは顕著に広幅化していたが、シグナルの位置は概ね変わらず細胞内においても試験管内と同様の 3 次元立体構造が保持されていることが確認できた。続いて、細胞を回収して上清を測定した結果、細胞が死んで細胞膜が壊れることで細胞外に漏出した Ub3A が検出限界以下のレベルでしか存在しないことを確認した。回収した細胞を破碎して得た溶液の SOFAST-HMQC 測定を実施した結果、試験管と似たスペクトルが得られたが、C 末端の Asp77 の信号が消失して、Gly76 のシグナルもシフト変化していた。これは、細胞内において、ユビキチンヒドラーゼにより、C 末端の Gly76-Asp77 の切断が起きたためと考えられる。

(3) 培地灌流システムの構築: NMR あるいは MRS による培養細胞内のタンパク質の測定において克服すべき課題として、細胞の生存状態の維持が挙げられる。細胞は絶えず栄養素を球種しつつ生きているため、孤立した状態で長時間にわたる測定を続けても、細胞が死滅してしまう。一方で、MRS 測定には数時間程度の細胞の生存が必要となる。そのため、細胞をゲルに埋包して培地を灌流させるバイオリアクターシステムの構築を試みた。細胞埋包ゲルとして、メビオルゲルおよびアルギン酸ゲルの使用が報告されている。メビオルゲルは 25 度以上でゲル化し低温ではゾル化する特性を持つ。Syn は高温で MRS 測定をしても、構造揺らぎのため、信号が検出できない。そのため、今回は、アルギン酸ゲルを利用することとした。HeLa

細胞をアルギン酸ゲルに埋包して DMEM 培地を灌流させた。ゲルに埋包せず灌流しない状態に比べて、ゲルを利用して培地を灌流させた状態では細胞の生存率が 1.5 倍改善する結果が得られた。細胞を長時間にわたり測定することが可能になることで、NMR に加えて MRI 装置にセットした細胞に対する MRS 測定も可能となる。細胞内に導入したタンパク質の MRS 測定は、生きた個体に注入したタンパク質の MRS 測定への重要な中間ステップとなることが期待される。タンパク質の MRS 検出は、非臨床 MRI の分野において極めて新規性の高い内容となる。また、構造生物学の観点から見ると、従来の *in vitro* から *in vivo* へと研究の幅を広げる第一歩となり、大きな意義を持つ。また、*in vitro* の研究を通じてこれまで得られてきた構造学的知見が、実際の *in vivo* の構造を反映しているのかを検証する上で、本研究から得られる *in vivo* の二次構造情報は大変有用である。創薬の観点から見ると、生体内に生じる病原タンパク質のオリゴマーの構造情報は、それを標的とした治療薬の開発に利用できる。また、本申請課題の内容は、病原タンパク質の代謝分解などの解析にも展開出来る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeda Mitsuhiro, Miyanoiri Yohei, Terauchi Tsutomu, Kainosho Masatsune	4. 巻 2
2. 論文標題 Conformational features and ionization states of Lys side chains in a protein studied using the stereo-array isotope labeling (SAIL) method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Magnetic Resonance	6. 最初と最後の頁 223 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5194/mr-2-223-2021	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 Tsuji Tatsuichiro, Yoshinaga Sosuke, Takeda Mitsuhiro, Sato Takafumi, Sonoda Akihiro, Ishida Norihito, Yunoki Kaori, Toda Etsuko, Terashima Yuya, Matsushima Kouji, Terasawa Hiroaki	4. 巻 59
2. 論文標題 Rational Design of Monodispersed Mutants of Proteins by Identifying Aggregation Contact Sites Using Solubilizing Agents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 3639 ~ 3649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00414	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 金子千紗、武田光広、吉永壮佐、寺沢宏明
2. 発表標題 生理条件下の -シヌクレインを標的とする阻害剤探索に向けたNMR/MRI評価システムの確立
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshinaga, S, Sato, T, Higashi, A, Takeda, M, Terashima, Y, Toda, E, Matsushima, K, Terasawa, H
2. 発表標題 In-cell NMR analysis of an anticancer candidate compound against a chemokine-signaling protein FROUNT
3. 学会等名 日本生物物理学会第58回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sato, T, Yoshinaga, S, Higashi, A, Takeda, M, Terashima, Y, Toda, E, Matsushima, K, Terasawa, H
2. 発表標題 In-cell analysis of an inhibitory compound against a chemokine-signaling protein with the in-cell NMR method
3. 学会等名 第48回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Higashi, A, Takeda, M, Yoshinaga, S, Terasawa, H
2. 発表標題 NMR and MRS studies of proteins delivered into cultured cells, towards MR analyses of proteins under physiological conditions
3. 学会等名 2020 ISMRM (International Society for Magnetic Resonance in Medicine) & SMRT (Society for MR Radiographers & Technologists) Virtual Conference & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究分担者	吉永 壮佐 (Yoshinaga Sosuke) (00448515)	熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・講師 (17401)	
研究分担者	寺沢 宏明 (Terasawa Hiroaki) (10300956)	熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授 (17401)	

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
---------	---------