

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02442

研究課題名(和文) 液-液相分離から始まる シヌクレインのアミロイド線維化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of amyloid fibrillation of alpha-synuclein starting from liquid-liquid phase separation

研究代表者

菅瀬 謙治 (Sugase, Kenji)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：00300822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病と関連する シヌクレインは、ユビキチン化されて液-液相分離し、それが神経細胞の流れによってアミロイド線維化することが示唆されている。本研究では シヌクレインのユビキチン化と流れを試験管内に再現し、それを原子・分子レベルで解析することによって、シヌクレインの液-液相分離とアミロイド線維化の機構を解明することをめざした。希薄溶液中とPEGによって液-液相分離させた2つの状態でRheo-NMR測定を行い、それぞれのアミロイド線維化をリアルタイムかつ原子レベルで計測した。希薄溶液中でC末端が他より速く凝縮することや液滴状態では非常に速くアミロイド線維化することなどが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シヌクレインがバッファー中に分散した状態および液滴状態からアミロイド線維化する過程をRheo-NMRにより原子レベルかつリアルタイムに計測できたことが一番の学術的意義である。近年、液滴形成を経てアミロイド線維化するタンパク質がホットな研究対象であり、そのようなタンパク質全般も本研究と同様にRheo-NMRで解析できる。また、希薄溶液中でC末端が他より速く凝縮することを明らかにしたが、シヌクレインのC末端はアミロイド線維の構造の中には含まれない。一方でオリゴマー形成に関わると言われている。ゆえに、今回の結果はシヌクレインのアミロイド線維化機構をより詳細に明らかにするものである。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that α -synuclein, which is associated with Parkinson's disease, is ubiquitinated and undergoes liquid-liquid phase separation, leading to amyloid fibrillation by neuronal flow. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of liquid-liquid phase separation of α -synuclein and amyloid fibrillation by reproducing the ubiquitination and flow of α -synuclein in vitro and analyzing it at the atomic and molecular level. Rheo-NMR measurements were performed in dilute solution and in the liquid-liquid phase separated by PEG, and amyloid fibrillation was measured in real time and at the atomic level. We found that the C-terminus aggregated faster in dilute solution than in the liquid-liquid phase, and that amyloid fibrillation occurred much faster in the droplet state.

研究分野：生物物理学

キーワード：液-液相分離 アミロイド線維化 シヌクレイン 剪断流 Rheo-NMR

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は、神経細胞が脱落していく疾患で、加齢に伴い罹患率が上昇するため高齢化が進む日本の社会問題となっている。いずれの疾患でもアミロイド線維化したタンパク質が患者脳内に沈着しており、このことと疾患との関連性が指摘されている。しかし、そもそも、どのようにタンパク質がアミロイド線維化するのがよく分かっていない。神経変性疾患の治療法が未だ確立できてないのは、このことが一因と言える。生体内でタンパク質がアミロイド線維化する機構を解明するためには、その原因因子を試験管内に再現して詳細に研究する必要がある。申請者らは、この因子の1つとしてアミロイド線維化するタンパク質が軸索輸送(神経細胞内の流れ)や血流により流れることに着目した。軸索や血管のように細い管に流れがあると強い剪断力が生じる。この剪断力がタンパク質に及ぼす影響を原子レベルで解析するために、申請者らは Rheo-NMR 装置を開発した。この装置では NMR 管にガラス棒を挿入し、NMR 管だけを回転させることによって軸索輸送や血流と同等の剪断力を発生させる。

現在、同装置を用いて種々のタンパク質のアミロイド線維化の研究に取り組んでおり、その1つに α シヌクレインがある。このタンパク質はパーキンソン病に関連し、軸索輸送により神経細胞を流れることが知られている。もともと、極めて安定であるため剪断力などの摂動を与えないとアミロイド線維化しない。すでに Rheo-NMR で α シヌクレインがアミロイド線維化する過程を、シグナル強度の変化としてリアルタイムに計測し、アミロイド線維化の起点である核形成の速度が、アミノ酸残基ごとに異なることが分かった。

一方、最近、 α シヌクレインが培養細胞中で液-液相分離してアモルファス凝集体を形成し、それがアミロイド線維に変化することが報告された。ここで観察されたアモルファス凝集体はアグリソームであると言う。この報告は神経細胞の病理観察とも整合する。 α シヌクレインは、通常、神経細胞のシナプス前終末にモノマーとして存在するが、パーキンソン病患者では軸索内でアモルファス凝集体を形成し、それが軸索輸送により移動しながらアミロイド線維を含む凝集体(レビー小体)へ変化すると言われている(この変化からも軸索輸送に伴う剪断力の関与が示唆される)。このアモルファス凝集体とレビー小体には、ユビキチン化 α シヌクレインが多量に含まれていることが知られている。

このような知見に加えて、最近、申請者らはポリユビキチンだけでも液-液相分離することを見出した。ゆえに、ユビキチン化が、 α シヌクレインの液-液相分離/アモルファス凝集化の因子と推察される。しかし、上述の研究ではユビキチン化については何も調べられていない。そのため、ユビキチン化 α シヌクレインがどのように液-液相分離してアモルファス凝集体を形成するのか、また、アモルファス凝集体がどのようにアミロイド線維に変化するのかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、神経細胞内で実際に起こっている α シヌクレインのユビキチン化と軸索輸送(に伴う剪断力)を試験管内に再現し、それを原子・分子レベルで解析することによって、 α シヌクレインの液-液相分離/アモルファス凝集化とアミロイド線維化の機構を解明する。アミロイド線維の研究全般で、ユビキチン化と剪断力を試験管内に再現するという発想は他にはないため、この発想が本研究の学術的独自性と言える。そもそも、剪断力がタンパク質に及ぼす影響を研究した例が極めて少ない。チオフラビン T (アミロイド線維に特異的に結合する蛍光分子)の蛍光によりアミロイド線維化過程を追跡する実験があるが、これでは原子レベルの情報は得られな

い。一方、Rheo-NMR では、剪断力がタンパク質に及ぼす影響を、まさに力がかかった状態、かつ原子レベルで解析できる。

3. 研究の方法

本研究では、ユビキチン化 α シヌクレインがアモルファス凝集化し、それが剪断力によってアミロイド線維化する機構を解き明かす。ユビキチン化 α シヌクレインは、レビー小体に含まれるものを調製し、NMR や顕微鏡などを用いて、液-液相分離の観点からアモルファス凝集体の構造的特徴を原子・分子レベルで明らかにする。剪断力によるアミロイド線維化には、主に Rheo-NMR を使い、ユビキチン化 α シヌクレインのどの部位からアミロイド線維化していくのかを明らかにする。

(1)ユビキチン化 α シヌクレインの調製

レビー小体には、 α シヌクレインの Lys12・Lys21・Lys23 のうち 1 または 2 箇所がモノユビキチン化されたものが見つかっている。また、Lys96 でポリユビキチン修飾されたものの存在も示唆されている。これらのユビキチン化 α シヌクレインを酵素で選択的に調製した例はないため、ここではジスルフィド結合でユビキチン化を模倣する。ジスルフィド結合によるユビキチン化の模倣は、 α シヌクレインで有効であることが報告されている。具体的には、 α シヌクレインのユビキチン化部位の Lys とユビキチンのカルボキシ末端 Gly を Cys に置換したものを大腸菌発現系で調製し、それらをジスルフィド結合で繋ぐ。ポリユビキチン鎖は酵素でユビキチンを重合し、重合したユビキチンの数ごとに分画した後に、ジスルフィド結合で α シヌクレインと連結する。NMR 用試料は、NMR シグナルの重なりを減らすために、 α シヌクレインとユビキチンを個別に安定同位体標識したユビキチン化 α シヌクレインを調製する。

(2)アモルファス凝集体の構造的特徴と液-液相分離としての性質の解析

調製した各ユビキチン化 α シヌクレインとポリエチレングリコールを種々の濃度で混合し、液-液相分離するか否かを顕微鏡で判別することによって、どのユビキチン化が α シヌクレインを液-液相分離させやすいのかを明らかにする。なお、 α シヌクレインは、自身と PEG が高濃度のときに液-液相分離することが知られている。また、レビー小体の全ての α シヌクレインがユビキチン化されているわけではないため、ユビキチン化したものと、していないものを混ぜた試料でも同様な実験を行う。さらに、液-液相分離した状態の流動性など、液-液相分離の研究で一般に解析される物性を調べる。加えて、通常、タンパク質の液-液相分離はゆっくりと進行するため、その過程を NMR でモニターし、NMR シグナルの変化から液-液相分離における相互作用やその構造的特徴などを明らかにする。

(3)剪断力によるアミロイド線維化機構の解析

^{15}N 標識ユビキチン化 α シヌクレインを液-液相分離し、その二次元 ^1H - ^{15}N 相関スペクトルを Rheo-NMR で連続測定することによって、アミロイド線維化過程をリアルタイムに計測する。また、Rheo-NMR 測定後に NMR 管内に溜まるアミロイド線維を電子顕微鏡で観察し、ユビキチン化の違いによるアミロイド線維の形態の差異も明らかにする。

4. 研究成果

(1)ユビキチン化 α シヌクレインの調製

Gly76 を Cys に置換したユビキチン、および Lys12・Lys21・Lys23・Lys96 のそれぞれを 1 つずつ Cys に置換した α シヌクレインの発現ベクターを調製した。本研究ではまずは G76C ユビキチンと K12C α シヌクレインをジスルフィド結合で連結させたユビキチン化 α シヌクレインを調製することとした。G76C ユビキチンに対して、15 倍モル過剰の DTNB を加えて室温で 1 時間反応させた。濃縮、脱塩後にこれに ^{15}N 標識 K12C α シヌクレインを加えて室温で 1 時間反応させ、陰イオン交換カラムで精製した。

調製したユビキチン化 α シヌクレインの 2 次元 ^1H - ^{15}N 相関スペクトルを測定したところ、図 1 赤のスペクトルが得られた。ユビキチンは ^{15}N 標識されていないため、ここで観測されているのは α シヌクレインだけである。黒色のスペクトルはユビキチン化されていない α シヌクレインのものである。ゆえに、赤色と黒色のスペクトルで変化が見られたのは、ユビキチン化の効果によるものである。このユビキチン化 α シヌクレインは Lys12 でユビキチン化されたものを模倣しているため、Lys12 近辺の NMR シグナルの変化が観測されたが、それ以外にも一次配列上で遠く離れたアミノ酸残基でもシグナルの位置が変化していた。このことは、そのようなアミノ酸残基とユビキチンが相互作用することを意味する。ここでの実験でユビキチン化 α シヌクレインの収量があまり上げられなかったため、NMR シグナルの帰属の NMR 測定や Rheo-NMR 測定はこの

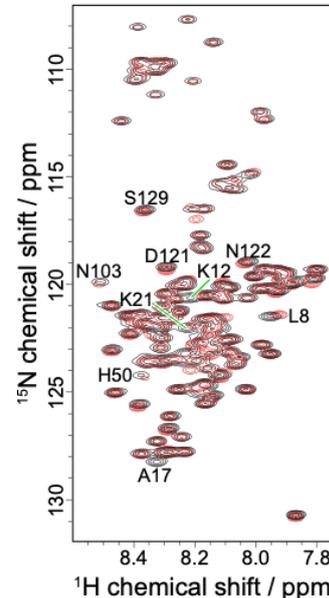


図 1 ユビキチン化 α シヌクレインの NMR スペクトル

時点では断念した。その代わりに、 α シヌクレインの収量を上げるための調製方法の最適化および野生型の α シヌクレインに対して液-液相分離実験と Rheo-NMR 実験に集中することとした。なお、試料調製法については、細胞破碎液を酸性にし、 α シヌクレイン以外の夾雑物を沈殿させることが有効であることが分かった。

(2) アモルファス凝集体の構造的特徴と液-液相分離としての性質の解析

NHS-Rhodamine 標識 α シヌクレインを 10% 含む測定溶液 500 μM をスライドガラス上に 10 μL 移し、共焦点顕微鏡を用いて観察した。その結果、10% PEG の条件において、 α シヌクレインが液滴を形成することが確認できた (図 2)。この液滴は、サイズの成長や液滴同士の融合など液滴に特有の挙動を示した。

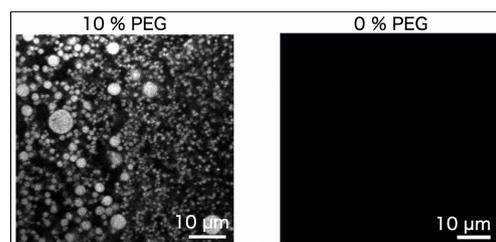


図 2 共焦点顕微鏡による α -シヌクレインの液滴観察結果

(3) 剪断力によるアミロイド線維化機構の解析

室温条件、剪断流下において、0% PEG 条件および 10% PEG 条件で Rheo-NMR 測定を実施した。その結果、0% PEG 条件では、長時間の測定にも関わらず、測定の前後でサンプルに変化は見られなかった。一方、10% PEG 条件では、測定後にサンプルが白濁していた。また、0% PEG 条件では、NMR シグナル強度は低下しなかった (図 3 a)。一方、10% PEG 条件では、速やかにシグナル強度の低下が見られ、13 時間程度経過するとシグナル強度が一定となるプラトー状態になった (図 3 b)。Rheo-NMR 測定後のサンプルに対するチオフラビン T 蛍光測定では、10% PEG 条件においてアミロイド線維に由来する蛍光が観測で

き、また TEM による観察では、アミロイド線維に特徴的な形態が観察できた。これらの結果より、0% PEG 条件では α -シヌクレインがアミロイド線維化しかつたが、10% PEG 条件では α シヌクレインのアミロイド線維化が残基レベルで確認できた。また、静置条件では、10% PEG 条件でもアミロイド線維化は生じないことを確認した。

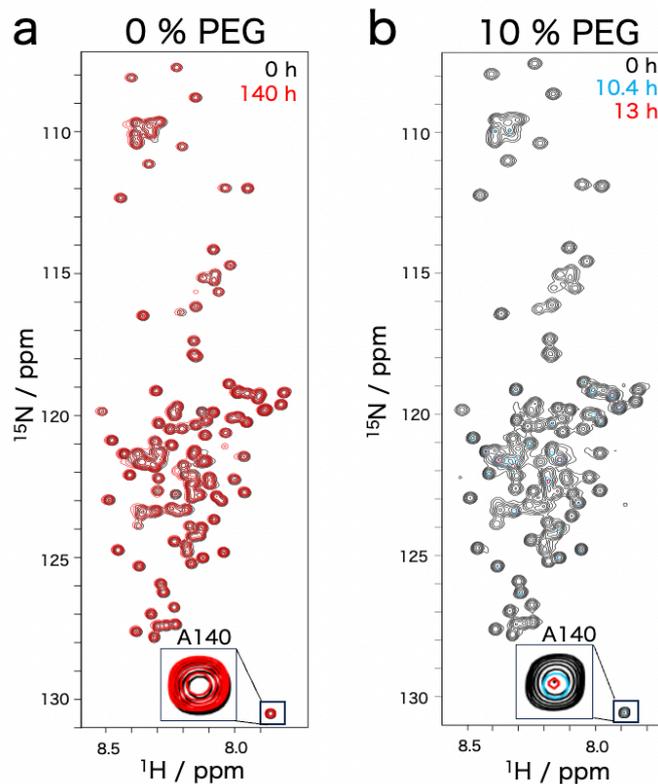


図3 剪断流下における α シヌクレインの NMR スペクトルの変化

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Morimoto Daichi, Walinda Erik, Yamamoto Akihiko, Scheler Ulrich, Sugase Kenji	4. 巻 2
2. 論文標題 Rheo NMR Spectroscopy for Cryogenic Probe Equipped NMR Instruments to Monitor Protein Aggregation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Protocols	6. 最初と最後の頁 e617
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cpz1.617	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究内容 研究室ホームページ https://tenko.kais.kyoto-u.ac.jp/research/

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	森本 大智 (Morimoto Daichi) (40746616)	京都大学・工学研究科・助教 (14301)	

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