

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15731

研究課題名(和文)凝集体結合タンパク質SGTAの解析を通じた神経変性疾患の分子病態解明

研究課題名(英文)Elucidating the molecular pathology of neurodegenerative diseases through analysis of the aggregate-binding protein SGTA

研究代表者

窪田 瞬 (KUBOTA, Shun)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：60891851

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)：凝集体結合タンパク質SGTAと神経変性疾患で見られるタンパク質凝集体との関連を免疫細胞染色で検証した。培養細胞株に多系統萎縮症でグリア細胞質内封入体を形成するタンパク質であるシヌクレイン( $\alpha$ -Syn)を強制発現させ、細胞質内凝集体を形成させた。免疫細胞染色を行い、SGTAと $\alpha$ -Syn凝集体が局在するか検証したが共局在はみられなかった。野生型、疾患関連バリエーションいずれの $\alpha$ -Syn凝集体でも結果は同様であった。またALSで見られる封入体の構成成分であるTDP43、UBQLN2を用いて同様の実験を行ったがTDP43凝集体、UBQLN2凝集体いずれともSGTAの共局在はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患は慢性進行性に神経細胞が変性、脱落し神経症状を呈する神経難病の総称である。代表的な疾患としてアルツハイマー病、パーキンソン病、ALSやポリグルタミン病などがあり、いずれも根治療法はない。多くの神経変性疾患で見られる共通の特徴として神経組織へのタンパク質凝集体の沈着があり凝集体形成は神経変性疾患に共通した分子病態に関与すると考えられる。凝集体結合タンパク質の病態への関与を解明する事は神経変性疾患全般の治療開発において重要な意義を有する。本研究では申請者が独自に同定した凝集体結合タンパク質であるSGTAに着目し各種神経変性疾患で見られるタンパク質凝集体との関連を検討した。

研究成果の概要(英文)：We assessed the relationship between the aggregate binding protein SGTA and protein aggregates related to neurodegenerative diseases. We overexpressed aggregate-related protein associated with various neurodegenerative diseases in the Neuro2A cell line and induced the formation of intracellular aggregates. First, we overexpressed  $\alpha$ -synuclein, a protein that forms glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. We induced the formation of aggregates of wild-type  $\alpha$ -synuclein or disease-related variant(A53T)  $\alpha$ -synuclein. We performed the immunocytochemistry to assess the co-localization of SGTA and  $\alpha$ -synuclein aggregates. It was not observed that co-localization of SGTA and  $\alpha$ -synuclein aggregates. Next, we overexpressed TDP43 or UBQLN2, which are components of the inclusion bodies found in the neural tissue of ALS. It was observed that forming TDP43 aggregates or UBQLN2 aggregates in Neuro2A. There is no observed co-localization of SGTA with either TDP43 or UBQLN2 aggregates.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：神経変性疾患 タンパク質凝集体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

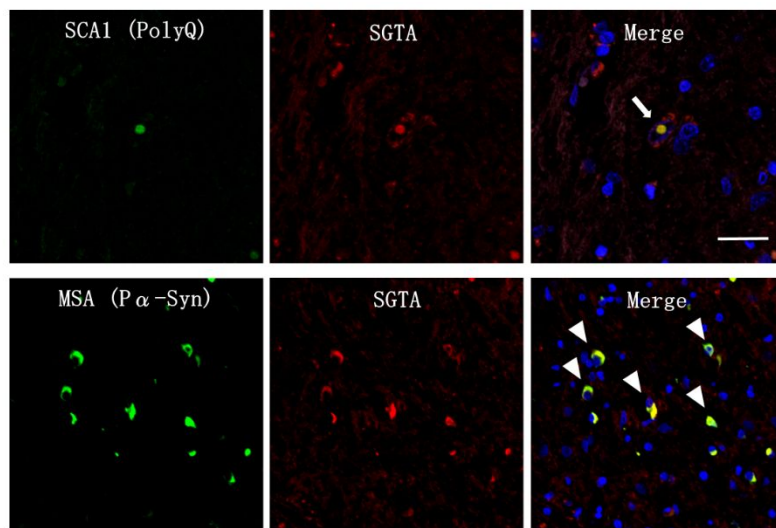
### 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は慢性進行性に疾患特有の神経細胞脱落が生じる神経難病の総称で代表的な疾患としてアルツハイマー病、パーキンソン病 (Parkinson disease: PD)、ポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS) といった疾患が挙げられる。これらの疾患は臨床的には異なる特徴をもつ独立した疾患であるにも関わらず、多くの神経変性疾患に共通して神経組織において凝集体ないし封入体の沈着がみられ、病理学的には神経細胞内の核内・細胞質内封入体、神経原線維変化、神経細胞外への老人斑沈着などとして観察される。変性した神経組織で共通して凝集体形成がみられることは、これらの異なる神経変性疾患に共通した分子病態機序が存在することを示唆するものとして注目されている。

### 2. 研究の目的

凝集体の構成成分には各疾患を特徴づける特異的な分子と多疾患に共通して認められ、神経変性疾患で共通する凝集体形成プロセスや病態機序を反映する分子がある。代表者らは、これまでの研究でポリグルタミンタンパク質凝集体を形成するハンチントン病 (Huntington disease: HD) モデル細胞において、ポリグルタミン凝集体の構成分子として、fusion in liposarcoma/translocated in liposarcoma (FUS/TLS) (Doi H, et al, J Biol Chem, 2008), Matrin 3 (Tada M, et al., Am J Pathol, 2018.)などの RNA 結合タンパク質に加え、Ubiquilin 2 (Doi H, et al., FEBS Lett, 2004) や small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein alpha (SGTA) などタンパク質品質管理機構に

関与する分子を同定してきた。その中で代表者は近年 SGTA が実際に神経変性疾患症例の剖検脳の凝集体中に存在するかどうかを検討し (図1)、HDのみならず脊髄小脳変性症1型 (Spinocerebellar Ataxia type1: SCA1) をはじめとする各種ポリグルタミン病にも共通して凝集体内に蓄積を認め、さらに多系統萎縮症 (Multiple system atrophy: MSA) 症例の



scale bar = 20  $\mu$ m

矢印: 神経核内封入体 矢頭: グリア細胞質内封入体

図1 SCA1ならびにMSA剖検脳切片に対する抗SGTA抗体を用いた免疫組織染色

Synuclein ( $\alpha$ -Syn) で形成されるグリア細胞質内封入体 (glial cytoplasmic inclusions: GCI) にも存在することを明らかにした (Kubota S, et al., Mol Brain, 2021). 一方 GCI と同じく  $\alpha$ -Syn で構成される PD の Lewy 小体や TDP-43 で構成される ALS 症例の運動神経細胞質内封入体とは共局在せず、非特異的にすべての凝集体へ結合する分子ではないことを確認している。特に PD, MSA ではともに  $\alpha$ -Syn を主成分とした凝集体が形成されるが、PD でみられる Lewy 小体と MSA でみられる GCI では凝集体の立体構造、性質は異なり、これが2つの疾患の病態の違いに関与する因子として大きく注目されている (Peng C, et al., Nature, 2018) が、2つの  $\alpha$ -Syn 凝集体の性質の違いが何に起因するのかは不明である。しかしなが

ら、タンパク質品質管理に関わる SGTA が Lewy 小体とではなく GCI とのみ共局在するという代表者らの発見は、SGTA が両者の差に何らかの関与を及ぼしていることを強く示唆するものである。本研究の目的は、凝集体結合タンパク質である SGTA が  $\alpha$ -Syn, TDP-43 といった各種疾患特異的タンパク質の凝集体形成、凝集体の構造や毒性にどのような影響を及ぼすのかを検証することである。

### 3. 研究の方法

培養細胞株に神経変性疾患で凝集体を形成する各種病原タンパク質をプラスミドベクターを用いて過剰発現させ、細胞内にタンパク質凝集体を形成させた。これらの細胞に対して抗SGTA抗体と各種病原タンパク質に対する抗体で蛍光免疫細胞染色を行い、SGTAが凝集体に共局在するかを共焦点顕微鏡で観察した。また、これらの凝集体を形成させた培養細胞に対してSGTAを過剰発現させ、SGTAが凝集体形成や細胞毒性に影響を与えるかを検証した。

### 4. 研究成果

(1)まず、SGTAと  $\alpha$ -Syn凝集体の関連を培養細胞株に対する免疫染色で検討した。神経系の培養細胞株であるNeuro2aにプラスミドベクターを用いて  $\alpha$ -Synを過剰発現させ、さらに  $\alpha$ -Syn fibrilを加えて  $\alpha$ -Syn凝集体を形成させた。野生型  $\alpha$ -Syn fibril、疾患関連バリエーション  $\alpha$ -Syn (A53T) fibrilをそれぞれ凝集体形成の鋳型として用い、いずれも細胞内での凝集体形成がみられた。これらの細胞に抗SGTA抗体と抗リン酸化  $\alpha$ -Syn抗体を用い蛍光免疫細胞染色を行ったが、SGTAと  $\alpha$ -Syn凝集体の共局在

は認められなかった。凝集体の性質には凝集体構成因子の他に凝集体が形成される環境(細胞の種類)も影響することが報告されていることから神経細胞由来 (Neuro2a cell line) のほかに グリア細胞由来の細胞株 (BV2 cell line) でも同様の実験を行ったが、いずれもSGTAの  $\alpha$ -Syn凝集体への共局在は確認できなかった (図2)。

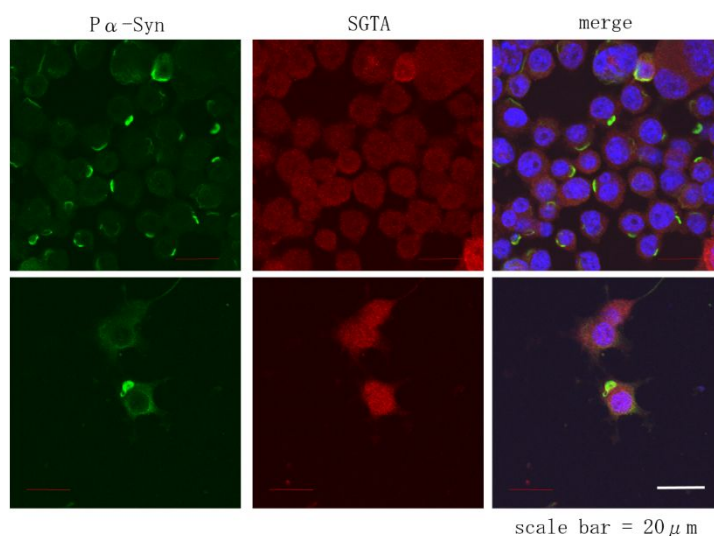


図2 培養細胞を用いた  $\alpha$ -Syn凝集体発現実験

(2)次に、ALSで神経細胞質内封入体を構成するTDP43, ALSの責任遺伝子の一つで変異により家族性ALSを発症し、神経細胞質内凝集体を形成することが知られているUBQLN2を培養細胞に過剰発現させて凝集体を形成させた。Neuro2aに野生型TDP43または疾患関連バリエーションTDP43 (A382T)を過剰発現させ、抗SGTA抗体と抗TDP43抗体で免疫細胞染色を行った結果、野生型TDP43, バリエーションTDP43いずれを導入した細胞でもTDP43陽性凝集体が観察された。バリエーションTDP43を導入した細胞では、より細胞毒性が高く、導入後48時間でより多くの細胞死がみられた。SGTAとTDP43陽性凝集体との共局在はみられなかった。次にNeuro2aに野生型UBQLN2、疾患バリエーションUBQLN2 (P497H)を過剰発現させたところ細胞質内にUBQLN2陽性凝集体の形成が観察

されたがSGTAとUBQLN2陽性凝集体との共局在は認められなかった (図3). (3) 次に、これらの凝集体を形成させた培養細胞に対してプラスミドベクターを用いてSGTAを過剰発現させてSGTAが凝集体形成に与える影響を評価したが、蛍光免疫細胞染色を実施しての観察で凝集体形成細胞数に変化はみられなかった. 疾患関連バリエーション  $\alpha$ -Syn凝集体はSGTA過剰発現で凝集体形成が減少する傾向がみられたが有意差は認められなかった (図4).

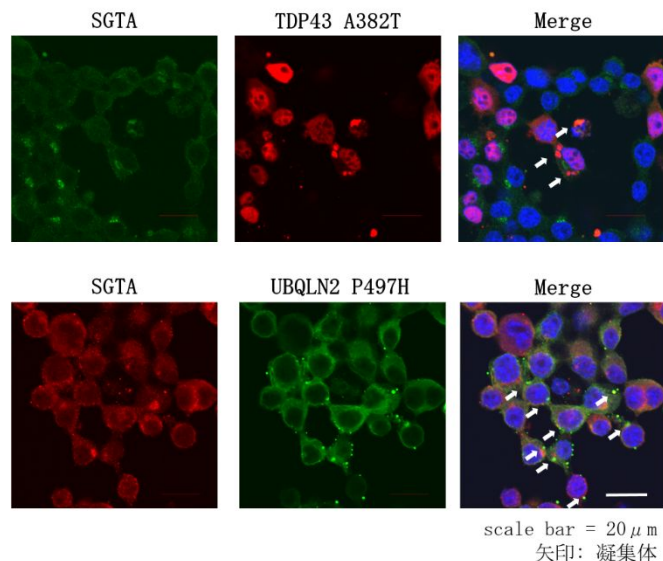


図3 培養細胞を用いたTDP43, UBQLN2凝集体発現実験

本研究は、凝集体結合タンパク質SGTAが各種疾患特異的タンパク質の凝集体形成に与える影響を検証することを目的としたが、 $\alpha$ -Syn凝集体, TDP43凝集体, UBQLN2凝集体いずれともSGTAと凝集体の共局在は観

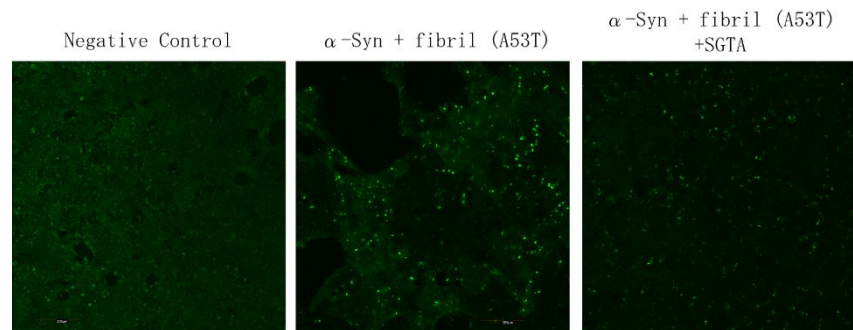


図4  $\alpha$ -Syn凝集体形成細胞へのSGTA過剰発現

察されなかった. 先行研究でMSA剖検脳のGCIでSGTAと  $\alpha$ -Synの共局在がみられていたにも関わらず、培養細胞でSGTAと  $\alpha$ -Syn凝集体の共局在がみられなかった原因として、培養細胞で形成させた  $\alpha$ -Syn凝集体がGCIを再現できていなかった可能性が考えられる. PDにおけるLewy小体とMSAにおけるGCIはいずれも  $\alpha$ -Synを主構成成分とする凝集体ではあるが性質が異なることが近年報告されている. 凝集体形成の鋳型となるタンパク質 (seeds) と凝集体が形成される場 (細胞の環境, 細胞の種類など) の双方が凝集体の性質に影響していると考えられている. 今回の実験ではグリア細胞株としてBV2細胞を用いたがBV2はミクログリア由来の細胞であることからオリゴドンドロサイトで形成されるGCIを再現できていなかった可能性が考えられる. 凝集体形成過程や性質に凝集体構成因子と環境がどのように影響を及ぼしているかは未解明な点が多い. 今後の展望としては、凝集体構成因子が凝集体に与える影響だけでなく、環境要因がどのように影響を与えるかも含めて検討を進めていく. また、凝集体にはタンパク質だけでなくRNAも多数含まれており凝集体形成の過程にはタンパク質だけでなくRNAも関連していることが想定される. 各種病原タンパク質凝集体を精製し、凝集体に含まれるRNAをRNAシーケンスにより包括的に解析し、各種凝集体に取り込まれるRNAの特徴を明らかにし、これらの凝集体RNA構成がSGTAを含めた凝集体結合タンパク質によりどのような変化を示すかを今後、検証していく.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------