

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640029

研究課題名(和文) レビー小体型認知症におけるシード依存的病原タンパク凝集反応の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) Efficient seed-dependent alpha-synuclein aggregation in real-time quaking-induced conversion assay

研究代表者

新 竜一郎 (ATARASHI, Ryuichiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：90452846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：レビー小体型認知症(DLB)はアルツハイマー型認知症に次ぐ頻度の高い認知症であり、alpha-synucleinの凝集が原因とされるが、その分子機構に関しては不明な点が多い。また本疾患固有の治療法は確立しておらず、診断もしばしば困難である。本研究では、DLBの病原タンパク質であるalpha-synucleinの試験管内シード依存的異常凝集反応系(RT-QUIC法)を開発し、DLBのシード活性を測定することが可能となった。またシード活性はalpha-synucleinのフィブリルではなく、オリゴマーが担っていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The molecular basis of seed-dependent aggregation of alpha-synuclein (aSyn) in the pathogenesis of dementia with Lewy bodies (DLB) remains unclear. We investigated whether brain tissues from DLB, which contain serine 129 (Ser129) phosphorylated insoluble aggregates of aSyn, can convert recombinant aSyn (r-aSyn) to amyloid fibrils using real-time quaking-induced conversion (RT-QUIC). Diffuse neocortical DLB type yielded 50% seeding dose (SD50) values of 107-8/g brain. The SD50 of Limbic DLB type was about 105/g brain. Further studies found that RT-QUIC assay was able to discriminate DLB from other neurodegenerative disorders. Of note, the seeding activity was reconstructed in reactions seeded with soluble r-aSyn oligomers, but not with insoluble r-aSyn aggregates, regardless its Ser129 phosphorylation status. These findings suggest that RT-QUIC using r-aSyn as a substrate can be applied to detect the pathogenic aSyn fibrils in DLB, and the potential culprit is oligomeric forms of aSyn.

研究分野：微生物学

キーワード：レビー小体型認知症 alpha-synuclein オリゴマー アミロイドフィブリル

1. 研究開始当初の背景

認知症等の神経変性疾患群は、加齢により罹患率が急上昇し、日本のみにとどまらず、老齢化の進む先進国において克服すべき、重要な医学的社会的な課題である。そのためには有効な診断・治療法の開発が必要であり、その研究も国内外で活発に行われているが、現時点では発展途上段階である。これらの疾患は進行性であるため、発症早期に正確に診断し治療を開始することが重要であると考えられ、治療法だけでなく、早期確定診断法の確立が望まれている。

レビー小体型認知症 (Dementia with Lewy bodies : 以下 DLB) はアルツハイマー型認知症 (Alzheimer's disease: 以下 AD) に次ぐ頻度の高い認知症であり、パーキンソン病にも似た運動障害や自律神経障害、幻覚など多彩な病態を示す。本疾患固有の治療法は確立しておらず、対症療法が行われている。また確定診断が困難なこともしばしばあることが知られている。さらに DLB の原因と考えられている alpha-synuclein (以下 aSyn) の異常凝集についてもその分子機構の詳細は不明な点が数多く残されている。

2. 研究の目的

我々は、DLB の病原タンパク質である aSyn のシード依存的異常凝集反応を利用した新規高感度増幅法を開発し、DLB の病態解明、さらに新規診断法・特異的治療薬探索へと臨床応用を目指すことを目的として研究を開始した。

我々は、以前、DLB と同様、タンパク質の神経系での異常凝集が原因となる神経変性疾患であるプリオン病において異常型プリオンタンパク試験管内増幅法 (RT-QUIC 法: Real-time quaking-induced conversion) の開発に成功した。このアッセイ法を用いてプリオン患者髄液中の微量な異常型プリオンタンパクを検出可能であることを明らかにし、プリオン病の診断に有用であることを示した (*Nature Medicine* 2011)。

本研究ではこの RT-QUIC 法を、aSyn を用いた系に発展させ、DLB における aSyn の凝集機構の解明と診断への応用を試みた。

3. 研究の方法

(1) RT-QUIC 法は、異常凝集タンパク質 (本研究では aSyn) を増幅反応のシード (核) として用いて、リコンビナント aSyn (r-aSyn) の凝集 (アミロイドフィブリル形成) 反応を連続的に試験管内で行わせ、検体中の異常型 PrP を増幅して検出するという方式である。この RT-QUIC 法を用いると、サンプルが多数の場合でも非常に簡便に、かつ real-time に測定可能なシステムを構築することが可能である。まず、r-aSyn を大量に精製し、RT-QUIC 法の基質として用いた。6X ヒスチジンタグと融合させた r-aSyn を大腸菌に発現誘導した後、6X ヒスチジンタグに結合するカラムを用いて、FPLC により、目的のタンパク質を精製した。タグの与える影響を除くため、ヒスチジンタグは除去した。精製したリコンビナントタンパクは液体窒素を用いて急速凍結し、-80 で保存し、使用直前に融解して用いた。さらに精製 r-aSyn の 2 次構造は CD (circular dichroism: 円二色性スペクトル) で解析した。

(2) 精製した r-aSyn をシード依存的フィブリル形成反応の基質として、RT-QUIC 反応の条件検討を行った。シードとしては DLB 脳ホモジネートを用いた。それらのホモジネートを希釈し、反応溶液中に加えた。検討条件としては (1) 変性剤の濃度、(2) pH、(3) 塩濃度、(4) r-aSyn の濃度、(5) 攪拌の強さ、頻度、時間などである。また、AD、クロイツフェルトヤコブ病 (CJD) 等の DLB 以外の神経変性疾患間でクロスシーディング現象が関与するかどうかについて検討した。

4. 研究成果

(1) r-aSyn は大腸菌に発現すると大部分は soluble 分画に検出された。その後ニッケルイオン結合カラムを用いて精製し、その二次構造を測定したところ、ランダムコイル状であることを確認した。精製前後の電気泳動像を図 1 に、CD による解析を図 2 に示す。r-aSyn を反応基質として用いた RT-QUIC 法の条件を検討したところ、プリオンタンパクとは異なり、塩濃度がゼロであるときに最も安定して

チオフラビン T 陽性のフィブリルが形成されることがわかった。また図3のようにシード依存的なフィブリル形成反応はDLB脳ホモジネートを添加した場合にのみ起きることもわかった。RT-QUIC法ではシードとして用いた検体中のシード活性を、検体を希釈してどの段階まで陽性になるか、通常は Spearman-Kärber 法を用いて 50%が陽性となる数値を決定し、その値を SD_{50} (50% seeding dose) と呼ぶ。タイプの異なる DLB 脳組織に含まれるシード活性を測定したところ、びまん性新皮質型DLAでは $10^{7-8}/g$ brain、辺縁型DLBでは $10^5/g$ brainであった。

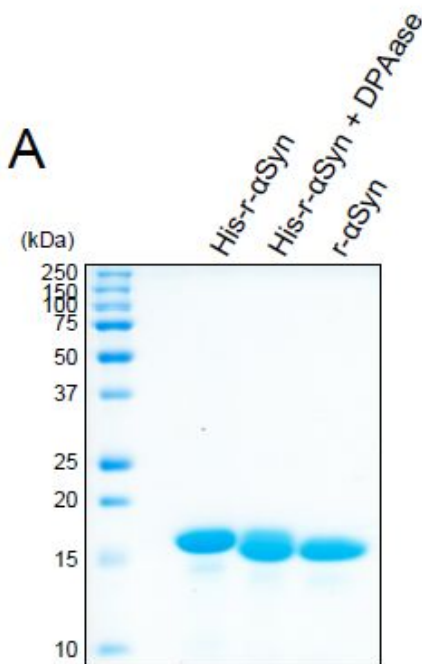


図1：r-aSynの精製前後の電気泳動像

(2) aSynの129番目のセリンはリン酸化され、フィブリル形成や凝集に影響することが示唆されている。そこで次にRT-QUIC法におけるセリン129リン酸化の影響について検討したところ、ほとんど影響せず、最も活性が高いのがr-aSynのオリゴマーであることが判明した。これらの結果はDLBの高感度試験管内増幅法開発とaSynのフィブリル形成反応、あるいは異常凝集の分子機構の解明を大きく前進させたと考えている。

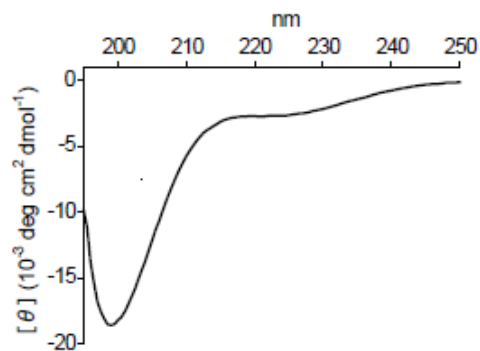


図2：r-aSynのCD解析結果

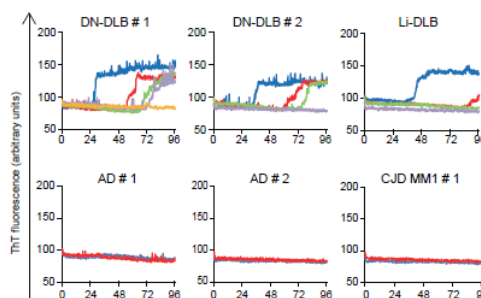


図3：r-aSynを用いたRT-QUIC法による反応例

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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Sano K, Satoh K, Atarashi R, Nishida N. A-Quic method (-synuclein- Quic method) in CSF of patients with DLB. The second JPND meeting, 2013年9月12日, Barcelona (Spain)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/cmb/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

新 竜一郎.(ATARASHI, Ryuichiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：90452846

(3)連携研究者

佐藤 克也.(SATO, Katsuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(保健学科)・教授

研究者番号：70398147

佐野 和憲.(SANO, Kazunori)

福岡大学・薬学部・講師

研究者番号：50534343