

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293210

研究課題名(和文) パーキンソン病における  $\alpha$ -シヌクレインの構造及び機能解析

研究課題名(英文) Structure and function analysis of alpha-synuclein in Parkinson's disease

研究代表者

望月 秀樹 (Mochizuki, Hideki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90230044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：レビー小体はパーキンソン病の発症に深く関与しているが、その微細構造はよくわかっていない。本研究では、大型放射光施設SPring-8のX線・赤外線および大強度陽子加速器施設J-PARCの中性子線を用いて、パーキンソン病患者の剖検脳内のレビー小体の微細構造解析を行った。画期的な手法を用いた本研究により、レビー小体の微細構造が明らかにされたことで、早期診断法や根本的治療法の開発の新たな手がかりが得られた。

研究成果の概要(英文)：Lewy bodies are deeply involved in the onset of Parkinson's disease. However, its fine structure is not well understood. We analyzed the fine structure of Lewy bodies in the brain of Parkinson's disease patients using X-ray or infrared ray at a large synchrotron radiation facility (SPring-8) and neutron beam at Japan Proton Accelerator Research Complex (J-PARC). This research using innovative methods revealed the fine structure of Lewy bodies and provided new clues to the development of early diagnosis method and fundamental treatment method.

研究分野：神経内科学

キーワード：神経変性疾患 パーキンソン病 レビー小体 シヌクレイン 生物物理学 SPring-8 J-PARC

### 1. 研究開始当初の背景

日本における神経変性疾患の患者数は超高齢化に伴って増加の一途をたどっている。アルツハイマー病 (AD) に次いで 2 番目に多いとされるパーキンソン病 (PD) は 65 歳以上においては 10 万人あたり 200 人程度存在すると推定されており、決して稀な難病というわけではない。しかし、PD の発症機序はいまだ不明であり、PD に対する L-DOPA 補充療法も対症療法に過ぎず、発症予防や進行抑制を期待できる根本的な治療法はまだ存在しない。今後、これら疾患の患者数がさらに増加することは明白であり、患者や家族の肉体的および精神的苦痛のみならず、介護費用を含めた医療経済的な観点からも早急に発症機序を解明し、治療法を確立することが望まれる。

PD の根本治療戦略の一つとしてレビー小体の主要構成成分である  $\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$  Syn) の凝集を抑制する方法がある。通常、この凝集過程の観察には、抗体を利用した間接的な手法が用いられるが、これは抗体の特性にかなり依存し、また凝集機序の解明に重要と考えられる構造変化の情報もほとんど得られない。

また、近年、 $\alpha$  Syn が生体内では安定な四量体として存在するという四量体仮説や脳内で伝播するという伝播仮説が注目されているが、そのようなことがヒトの生体内で実際に起きているという証拠に乏しく、これらの仮説の検証には *in vivo* での構造解析が重要である。

### 2. 研究の目的

我々は、 $\alpha$  Syn の凝集過程における構造変化や患者剖検脳に形成されたタンパク質凝集体の微細構造に対して、SPring-8 の放射光や J-PARC の中性子線を用いて直接的な観察を行うことで、凝集体形成機序の解明や凝集阻害剤の発見、少量体仮説や伝播仮説の検証を行い、それにより PD の根本治療への手がかりを得ることを目指す。

### 3. 研究の方法

#### SPring-8 における構造解析

SPring-8 (図 1) では、患者剖検脳内の蛋白質凝集体に対して、放射光顕微赤外分光法 (BL43IR) とマイクロビーム X 線回折 (BL40XU) による構造解析を行った。また、ヒトから精製した  $\alpha$  Syn に対しては、小角散乱法 (BL40B2) を用いた構造解析を行い、 $\alpha$  Syn の多量体に対しては、ビームラインに限外ろ過カラムを連結し、流出直後に測定するという工夫も施した (BL45XU)。



図 1

#### J-PARC における構造解析

J-PARC では中性子線を用いた小角散乱による構造解析と準弾性散乱 (図 2, ダイナミクス解析装置 (DNA)) による蛋白質側鎖のゆらぎの測定を行った。



図 2

#### 全自動蛋白質凝集検出装置” HANABI”

HANABI は HANdai Amiloid Burst Inducer の略であり、大阪大学蛋白質研究所の後藤研究室がエレコン科学(株)、コロナ電気(株)と共同で開発した全自動で多数の蛋白質凝集を、しかも短時間で検出できる装置である。この装置は超音波発生装置とマイクロプレートリーダーを組み合わせたものであり、超音波の照射によってアミロイド原性蛋白質のアミロイド線維形成が促進されることを応用することで実現されたアミロイド線維のハイスループットアッセイ装置である (図 3)。

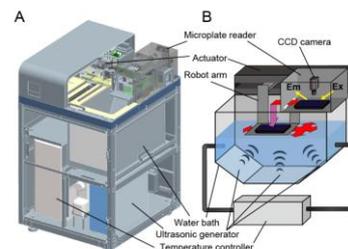


図 3

この装置を用いると、一度に最大 96 サンプルのアミロイド線維形成を同時測定することができ、短時間で大規模なスクリーニングを行うことが可能となる。本研究では、本装置を用いて、 $\alpha$  Syn の凝集阻害剤のスクリーニングを行った。

### 4. 研究成果

#### 剖検脳内のレビー小体に対する構造解析

SPring-8 の BL43IR では、放射光顕微赤外分光法による解析を行い、 $\beta$  シート構造に特有の吸収ピークに着目することで、患者脳内のレビー小体が *in vitro* で作成された  $\alpha$  Syn のフィブリルと同様に  $\beta$  シート構造を多く有していることを世界で初めて確認した (図 4)。

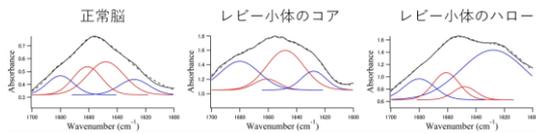
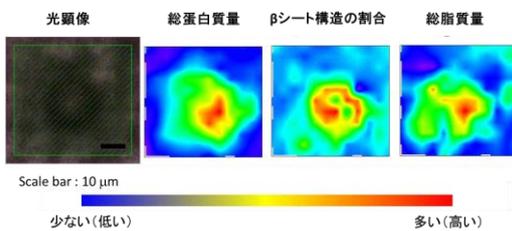


図 4

また、典型的なレビー小体では、その中心(コア)よりも周囲(ハロー)の方がβシート構造の割合が高いこともわかった(図4, 5)。

レビー小体を含む範囲を2次元的にスキャンして得たデータに対して、βシート構造の割合や総蛋白質量、総脂質量に注目して解析し、マッピングしたものが図5であり、これより蛋白質や脂質はコアに多いというこ

**放射光顕微赤外分光法 (FTIRM) による  
剖検脳のレビー小体に対する構造解析**



ともわかった。

図 5

この結果からレビー小体は神経毒性を有する変性蛋白質や脂質をαSynの硬いフィブリルで閉じ込めたカプセルのような構造であることが推察され、レビー小体は神経細胞に対して保護的な役割を果たしている可能性が示唆された。

一方、BL40XUではX線のマイクロビームを用いたX線回折による剖検脳内のαSyn凝集体の構造解析を行った。

予備実験として行った人工的に作成したαSynフィブリルやアルツハイマー病モデルマウスの老人斑においては、予想した通り、クロスβ構造に由来する4.7Åの回折パターンが得られた(図6)。

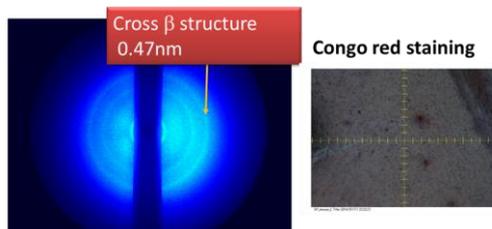


図 6

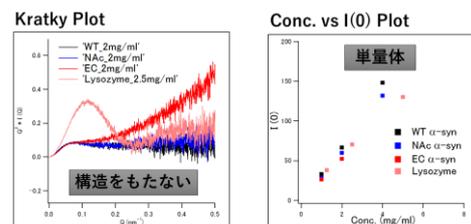
しかしながら、パーキンソン病患者の剖検脳内のレビー小体では、上記のクロスβ構造由来の回折像が明瞭には得られなかった。

この結果は、患者の脳内に実際に蓄積しているレビー小体がαSynのフィブリルの塊とは異なる可能性を示唆しており、また、電子

顕微鏡で見られるレビー小体の線維様構造物が、*in vitro*で作成されたフィブリルと形態的には似ているものの、蛋白質レベルでは構造が異なる可能性があることも示している。モデルマウスの老人斑ではクロスβ構造由来の回折像が得られていることから、技術的には大きな問題はないと思われるが、事実であれば、定説を覆す重要な成果となり得るため、追加実験を行いながら、論文発表に向けて慎重に準備を進めている。

**ヒト赤血球から精製したαSynの構造解析**

αSynは、大腸菌から精製した蛋白質を用いた実験から、特定の構造を持たない単量体とされていたが、2011年に生体内では安定な四量体で存在するとの報告がなされた。我々はその真偽を確かめるため、生体内と同じくN末端がアセチル化されたαSynとヒト赤血球から精製したαSynに対して、Spring-8のBL40B2において小角散乱による構造解析を行った。その結果、いずれのαSynもこれまでの報告と同様に特定の構造を持たない単量体であることがわかった(図7)。



WT: 野生型 NAc: N末端アセチル化 EC: ヒト赤血球由来

図 7

また、αSynは溶液のバッファー条件で構造がかなり変化する可能性が示唆され、限外ろ過カラムを通した直後に測定を行うと、その大きさ(慣性半径)が小さくなることから、αSynの一部は溶液中で多量体として存在するものと考えられた。このことから、αSynは主として単量体として存在するが、一部は多量体として存在し、それらの間の平衡状態にあるものと推察された。

これの成果をもとに、現在多量体の存在や凝集初期の構造変化についての研究を継続している。

**中性子線を用いたαSynの構造解析**

αSyn蛋白質分子の「動きやすさ」に着目し、フィブリル状態と天然状態の蛋白質の動きをJ-PARCの中性子準弾性散乱装置を用いて調べた。その結果、フィブリルでは蛋白質同士が強く結合して動きが制限されているにもかかわらず、内部における蛋白質の原子の運動は正常な状態よりも大きくなることわかった(図8)。

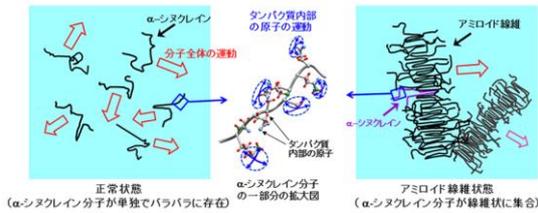


図 8

これまで、 $\alpha$  Syn は中央に近い部分 (NAC 領域) が規則的に積み重なることでフィブリルを形成することがわかっていたが、それ以外の部分の構造や動きについてはほとんどわかっていなかった。本研究成果は中性子線の特徴をうまく利用することで、フィブリルの表面部分の運動 (ゆらぎ) を解析した画期的な成果であり、 $\alpha$  Syn の凝集機序の解明に有用なツールとして発展する可能性を秘めている。

#### 凝集阻害剤のスクリーニング

近年、 $\alpha$  Syn の凝集を抑制することで、PD の発症や進行を抑制しようとする試みが世界中で行われている。

今回我々は前述した HANABI を用いることで、 $\alpha$  Syn の凝集を抑制する低分子化合物のスクリーニングを行った。その結果、複数の候補の中から凝集抑制効果の高いものを半日程度で選別することができた (図 8)。

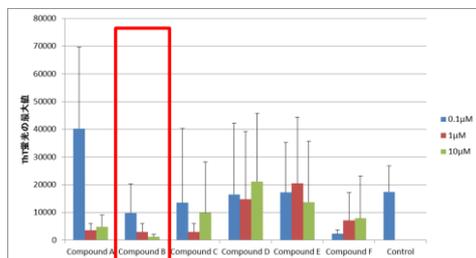


図 8

その後、装置の改良や測定条件の検討を重ね、現在は数千種類の薬剤ライブラリを用いた大規模スクリーニングが進行中である。

#### PD の早期診断技術への応用

SPring-8 における剖検脳内のレビー小体に対する構造解析で、レビー小体が実際に  $\beta$  シート構造多く有していることが確認された。クロス  $\beta$  構造を有するフィブリルであるか否かは検討中ではあるが、異常型の  $\alpha$  Syn が実際の PD 患者脳内に蓄積している可能性が高いことを確認した意義は大きい。なぜなら、この異常型  $\alpha$  Syn を検出することで PD の診断ができる可能性が見いだされたからである。

具体的には、微量の異常型  $\alpha$  Syn を含むと思われる脳脊髄液を少量採取し、これを HANABI を用いて増幅することによって異常型  $\alpha$  Syn を定量する。この手法により、PD の診断が可能となれば、診断精度の向上はもちろ

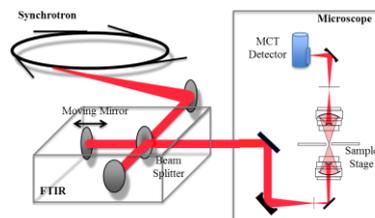
んとして、早期診断や治療効果を反映するバイオマーカーとなることが期待される。

我々は、すでにこの革新的な PD 診断技術の開発を進めており、まだ少数例ではあるが、PD の診断に有用である可能性を見出している。

#### 次世代の病理学を担う顕微赤外分光法

我々が、本研究を通じて、SPring-8 の BL43IR で確立した放射光顕微赤外分光法による生体試料に対する構造解析手法 (図 9) は他の疾患や臓器にも流用可能である。しかも、直径  $10 \mu\text{m}$  程度のレビー小体を 2 次元スキャンする必要があった経緯から、すでに空間分解能は数  $\mu\text{m}$  に達しており、また比較的扱いの難しい脳組織で試料調整に成功していることから、他の生体試料への応用は容易であると思われる。

今後は、神経変性疾患のみならず、脳卒中や癌などの研究にも応用していくことで、従来の抗体に強く依存した古典的病理学では解明できなかった難題への解決の糸口が多くもたらされるのではないかと期待される。



Optical layout of microspectroscopic station at BL43IR. The infrared synchrotron light is injected into FTIR (BRUKER VERTX70) interferometer and then goes into microscope (BRUKER HYPERION2000). Infrared light transmitted through a sample is detected by an MCT (HgCdTe) detector.

図 9

#### 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 4 件)

(1) Synchrotron FTIR micro-spectroscopy for structural analysis of Lewy bodies in the brain of Parkinson's disease patients. Katsuya Araki, Naoto Yagi, Yuka Ikemoto, Hisashi Yagi, Chi-Jing Choong, Hideki Hayakawa, Goichi Beck, Hisae Sumi, Harutoshi Fujimura, Taro Moriwaki, Yoshitaka Nagai, Yuji Goto, Hideki Mochizuki. Scientific Reports. 5, 17625 (2015)

DOI: 10.1038/srep17625

(2) Ultrasonication-dependent formation and degradation of  $\alpha$ -synuclein amyloid fibrils. Hisashi Yagi, Aiko Mizuno, Masatomo So, Miki Hirano, Masayuki Adachi, Yoko Akazawa-Ogawa, Yoshihisa Hagihara, Tatsuya Ikenoue, Young-Ho Lee, Yasushi Kawata, Yuji Goto. Biochim Biophys Acta. 1854(3), 209-17 (2015)

DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.12.014

(3) Dynamical Behavior of Human  $\alpha$ -Synuclein Studied by Quasielastic Neutron Scattering. Satoru Fujiwara, Katsuya Araki, Tatsuhito Matsuo, Hisashi Yagi, Takeishi Yamada, Kaoru Shibata, Hideki Mochizuki. PloS One. 11, e0151447 (2016)

DOI: 10.1371/journal.pone.0151447

(4) A small-angle X-ray scattering study of alpha-synuclein from human red blood cells. Katsuya Araki, Naoto Yagi, Rie Nakatani, Hiroshi Sekiguchi, Masatomo So, Hisashi Yagi, Noboru Ohta, Yoshitaka Nagai, Yuji Goto, Hideki Mochizuki. Scientific Reports. 6, 30473 (2016)

DOI: 10.1038/srep30473

〔学会発表〕(計9件)

(1) 剖検脳のレビー小体に対する SPring-8 の高輝度放射光マイクロビームを用いた構造解析. 荒木克哉, 八木直人, 鯨井仁, 早川英規, 別宮豪一, 隅寿恵, 望月秀樹. 第 55 回日本神経学会学術大会 2014 年 5 月 23 日 福岡国際会議場

(2) 中性子散乱によるヒト  $\alpha$ -シヌクレインのダイナミクス変化の検出. 藤原悟, 荒木克哉, 松尾龍人, 八木寿梓, 山田武, 柴田薫, 望月秀樹. 第 52 回日本生物物理学会年会. 2014 年 9 月 27 日 札幌コンベンションセンター

(3) 剖検脳のレビー小体に対する SPring-8 の赤外線微分光法を用いた 2 次構造解析. 荒木克哉, 八木直人, 池本夕佳, 早川英規, 別宮豪一, 隅寿恵, 森脇太郎, 望月秀樹. 第 8 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres 2014 年 10 月 3 日 京都ホテルオークラ

(4) The structure analysis for alpha-synuclein and Lewy bodies with synchrotron radiation. Katsuya Araki, Naoto Yagi, Rie Nakatani, Hideki Hayakawa, Kousuke Baba, Yuji Goto, Hideki Mochizuki. 第 56 回日本神経学会学術大会 2015 年 5 月 22 日 新潟コンベンションセンター

(5) パーキンソン病の新しい治療に向けて～凝集阻害因子のハイスループットスクリーニング～. 荒木克哉, 藪本大紀, 宗正智, 馬場孝輔, 後藤祐児, 望月秀樹. 日本神経治療学会・2015 年 11 月 27 日 名古屋国際会議場

(6) Synchrotron FTIR micro-spectroscopy for structural analysis of Lewy bodies in the brain of Parkinson's disease patients. Katsuya Araki. Australian National University (ANU) & IPR Joint Symposium 2015 "PROTEIN STRUCTURE AND FUNCTION". 2015 年 11 月 15 日 キャンベラ (オーストラリア)

(7) The structure analysis for alpha-synuclein and Lewy bodies of

Parkinson's disease patients with synchrotron radiation. Katsuya Araki, Naoto Yagi, Rie Nakatani, Hideki Hayakawa, Kousuke Baba, Yuji Goto, Hideki Mochizuki. AOPMC・2016 年 3 月 13 日 マニラ (フィリピン)

(8) The structure analysis for alpha-synuclein and Lewy bodies with synchrotron radiation. Katsuya Araki, Naoto Yagi, Rie Nakatani, Hideki Hayakawa, Kousuke Baba, Yuji Goto, Hideki Mochizuki. 第 57 回日本神経学会学術大会 2016 年 5 月 21 日 神戸コンベンションセンター

(9) 放射光顕微赤外分光法を用いた剖検脳のグリア細胞内嗜銀性封入体の構造解析. 荒木克哉, 八木直人, 池中健介, 早川英規, 永井義隆, 藤村晴俊, 望月秀樹. 第 10 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres 2016 年 10 月 7 日 京都ホテルオークラ

〔その他〕

ホームページ等

① 大阪大学大学院医学系研究科神経内科学 <http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/neuro1/myweb6/Top.html>

② SPring-8

<http://www.spring8.or.jp/ja/>

③ J-PARC

<http://www.j-parc.jp/>

④ 全自動蛋白凝集検出装置 HANABI

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/physiocal/HANABI/jp.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

望月 秀樹 (MOCHIZUKI, Hideki)

大阪大学大学院医学系研究科神経内科学・教授

研究者番号：90230044

### (2) 研究分担者

八木 直人 (YAGI, Naoto)

公益財団法人高輝度光科学研究センター (JASRI)・利用研究促進部門 副部門長

研究者番号：80133940

藤原 悟 (FUJIWARA, Satoru)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所 高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター・上席研究員

研究者番号：10354888

八木 寿梓 (YAGI, Hisashi)

鳥取大学工学部附属グリーン・サステイナブル・ケミストリー研究センター・助教

研究者番号：10432494

荒木 克哉 (ARAKI, Katsuya)

大阪大学大学院医学系研究科神経内科学・特任研究員

研究者番号：50649431