

令和元年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19480

研究課題名(和文)光酸素化触媒による細胞内タンパク質凝集体の時空間的動態制御の試み

研究課題名(英文) Spatial and temporal control of intracellular aggregates by photo-oxygenation catalyst

研究代表者

富田 泰輔 (Tomita, Taisuke)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：30292957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：異常に線維化したタンパク質が細胞内に蓄積する細胞内凝集体は、神経変性の原因であると考えられている。加えて近年、凝集した異常タンパク質が細胞間を移動し正常細胞を病変細胞に変える「細胞間伝播」が注目されている。申請者はこれまでに開発した、光照射下で凝集タンパク質を酸素化し無毒化する光酸素化触媒を利用し、アルツハイマー病において蓄積しているタウをモデルタンパク質として解析を行い、光酸素化によってタウの凝集が抑制されること、また酸素化されたタウ線維は細胞間伝播能を失っていることを明らかにし、この化合物を用いることで細胞内凝集体を時空間的に制御できる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な神経変性疾患発症の原因となる細胞内凝集体の動態機構の解明は、多くの疾患治療を考える上で重要な研究課題である。しかし現在までに時空間的にその動態を解析した例はなく、光酸素化触媒による細胞内凝集体の時空間的制御は、神経変性疾患発症メカニズム研究においてインパクトのある実験系を提示できたと言える。さらに光酸素化触媒の応用は時空間的に制御された画期的治療法の開発に繋がる可能性があり、我が国の科学技術イノベーションに大きく資するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Several lines of evidence suggest that the intracellular aggregates comprised of fibrillized proteins are involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. In addition, recently intercellular propagation mechanism of aggregated protein that transform the normal cells to the pathological cells has been highlighted. In this research, applicants examined the effect of photo-oxygenation catalyst, which detoxifies the aggregated proteins by oxygenation reaction under light, on the tau protein aggregation and propagation. Tau is deposited in the brains of Alzheimer disease. We found that the photo-oxygenation inhibited the tau aggregation and the propagation activity of tau fibril. These results indicated that the dynamics of intracellular aggregates can be regulated by these small compounds.

研究分野：病態生化学

キーワード：神経変性疾患 タンパク質凝集 光触媒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに申請者は、神経変性疾患の病理学的特徴であり疾患発症の原因であると考えられている細胞内凝集体に着目し、その形成における普遍的な分子機構を明らかにするために、CRISPR/Cas9 システムによる細胞内タンパク質凝集・乖離に關与する遺伝子のゲノムワイドスクリーニングを行ってきた (H28 年度挑戦的萌芽研究において採択)。しかし一方で、ヒト病変においても培養細胞を用いた細胞内凝集体形成モデルにおいても、凝集体の形態や数、凝集体が形成される場所などに違いがあり、一言で細胞内凝集体と言っても様ではないことが知られている (Sanders et al., Neuron, 2014)。このことは、細胞内凝集を引き起こす普遍的な分子機構以外に、「いつ」「どこで」「どのように」形成されるのかを規定するメカニズムがあることを示唆しているが、その詳細な機構は明らかではなく、そもそも細胞内凝集体の動態を時空間的に制御可能な実験系も確立されていない。

一方で申請者は、タンパク質の凝集抑制及び無毒化を可能とする光酸素化触媒の開発に成功している (Taniguchi et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2014; Taniguchi et al., Nat. Chem., 2016)。この触媒は、光エネルギーを利用することで凝集タンパク質を酸素化する低分子化合物である。実際に、これまでの研究で申請者は、アルツハイマー病患者脳において細胞外に蓄積するアミロイド β タンパク質 ($A\beta$) に対して用い、酸素化による凝集抑制および無毒化の proof of concept を確立した。そこで、さらにこの触媒が光エネルギーを利用することに着目し、レーザー顕微鏡を利用したイメージングおよび光操作技術を組み合わせることで本触媒を応用することにより、細胞内凝集体を構成するタンパク質の凝集プロセスを時空間的に制御することが可能ではないかと考えた。

2. 研究の目的

様々な神経変性疾患における病理学的特徴の一つである、異常に線維化したタンパク質が細胞内に蓄積する細胞内凝集体は、神経変性の原因であると考えられている。加えて近年、病態の進行 (広がり) を説明するものとして細胞内凝集体を構成する異常タンパク質が細胞間を移動し正常細胞を病変細胞に変える「細胞間伝播」が提唱されており、細胞内凝集体動態の分子機構およびその病的役割を解明することの重要性が示唆されている。しかし、細胞内凝集が「いつ」「どこで」形成され、「どのように」細胞間伝播するのか、その凝集体形成のタイミングと場所が「どのような」細胞応答をひき起こすのかという、細胞内凝集体の細胞内における時空間的な動態変化に関する詳細な知見は未だ不明のままであり、またその解析のためには適切な新規実験系の構築が必須である。

そこで本研究において申請者は、細胞内凝集体動態の時空間的な制御法を新規に確立し、その制御によって引き起こされる細胞応答を検証することを目的に研究を行う。

3. 研究の方法

これまでに申請者が見出していた $A\beta$ を光酸素化する触媒を利用し、アルツハイマー病患者脳内で神経細胞内に凝集体として蓄積するタウタンパク質の凝集及び伝播が光酸素化反応で制御可能であるかどうかについて検討する目的で、以下の実験を行った。

1) リコンビナントタウタンパク質の凝集過程に対する光酸素化反応の影響の検討

大腸菌に発現させたリコンビナントタウタンパク質を精製し、ヘパリン存在下で線維化反応を起こす。その際に光酸素化触媒の有無、光照射の有無によって線維化が影響を受けるかどうかについて検討する。

2) リコンビナントシードタウの線維化誘導能に対する光酸素化反応の影響の検討

タウを始めとする異常凝集タンパク質の線維化プロセスにおいては、初めに短い線維が形成され、その短い線維をシード (種) として更にモノマーが加わっていく、シード依存性凝集過程が想定されている。そこで線維化したタウを超音波破碎し得られたシードを酸素化し、さらなる線維化誘導能が存在化するかどうかについて検討した。

3) リコンビナントシードタウによる細胞間伝播に対する光酸素化反応の影響の検討

線維化したタンパク質の細胞内凝集体病理が伝播していく過程において、短い線維が凝集体保持細胞から放出され、隣接した細胞に取り込まれた後にシードとして新たな凝集を誘導することが想定されている。そこで酸素化したリコンビナントシードタウが細胞間伝播能を示すかどうか、タウ恒常的発現細胞を用いてプロテイントランスフェクションにより検討を行った。

4. 研究成果

タウに対する光酸素化触媒による選択的酸素化がタウの凝集およびシード能、伝播能にどのように影響を与えるかについて、上記 3. に記載された方法により検討を行い、以下の結果を得た。

1) リコンビナントタウタンパク質の凝集過程に対する光酸素化反応の影響の検討

ヘパリン存在下で凝集させたリコンビナントタウに対し光酸素化触媒を加え 660 nm の光照射を行い、MALDI-TOF MS にて解析したところ、酸素付加が確認された。光酸

素化部位は主に、凝集体構成に重要なヒスチジン残基、メチオニン残基であった。そしてタウ凝集に対する光酸素化の効果を検証したところ、酸素化反応によりタウの線維化が抑制されることが明らかになった。

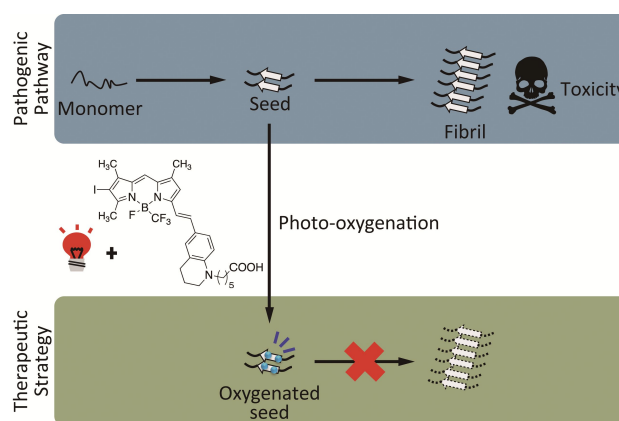
2) リコンビナントシードタウの線維化誘導能に対する光酸素化反応の影響の検討

次に凝集したタウのシード能に対する酸素化の影響を検討する目的で、リコンビナントタウを凝集、線維化させたものを超音波破碎しシードとした後に、光酸素化反応を行った。その後更にリコンビナントタウを加え、更にタウ凝集が誘導されるかどうかについて検討した。その結果、光酸素化反応を行ったシードタウでは有意に線維形成が阻害されていることが明らかとなった。

3) リコンビナントシードタウによる細胞間伝播に対する光酸素化反応の影響の検討

タウの恒常的発現細胞ではタウの凝集体は観察されないが、凝集タウ由来のシードをプロテソトランスフェクションにより導入することで、タウ凝集体形成が誘導されることが示されており、タウ病態の細胞間伝播モデルとして広く使用されている。そこで酸素化されたシードに細胞内タウ凝集体誘導形成能が存在するかどうかについて検討を行った。その結果、光酸素化反応を行ったシードタウには凝集体を誘導する能力が失われていることが明らかとなり、タウの酸素化は細胞内タウ凝集体伝播を抑制する可能性が示された。

本研究を通じ、アルツハイマー病や様々な神経変性疾患の原因と考えられているタウタンパク質の凝集および細胞間伝播機構は光酸素化反応により抑制できることが示唆された。このように様々な神経変性疾患発症の原因となる細胞内凝集体の動態機構の解明は、多くの疾患治療を考える上で重要な研究課題である。しかし現在までに時空間的にその動態を解析した例はなく、光酸素化触媒による細胞内凝集体の時空間的制御は、神経変性疾患発症メカニズム研究においてインパクトのある実験系を提示できたと言える。さらに光酸素化触媒の応用は時空間的に制御された画期的治療法の開発に繋がる可能性があり、我が国の科学技術イノベーションに大きく資するものと考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

1. Suzuki T, Hori Y, Sawazaki T, Shimizu Y, Nemoto Y, Taniguchi A, Ozawa S, Sohma Y, Kanai M, Tomita T*: Photo-oxygenation inhibits tau amyloid formation. Chem Comm 55: 6165-6168, 2019. doi: 10.1039/C9CC01728C. PMID: 31049495
2. Ni J, Taniguchi A, Kuninobu Y, Ozawa S, Hori Y, Kuninobu Y, Saito T, Saido TC, Tomita T, Sohma Y, Kanai M: Near-infrared photoactivatable oxygenation catalysts of amyloid protein. Chem 4(4):807-820, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2018.02.008>.

〔学会発表〕(計 4件)

1. Taisuke Tomita, Shuta Ozawa, Youhei Sohma, Motomu Kanai, Yukiko Hori: Photooxygenation by biocompatible catalyst reduces the A β level in the brains of Alzheimer disease model mice. AD/PD 2019, March 26-31, 2019, Lisbon, Portugal
2. Yukiko Hori, Shuta Ozawa, Youhei Sohma, Motomu Kanai, Taisuke Tomita: Photooxygenation reduces the A β level in the brains of Alzheimer disease model mice. 9th FAOPS Congress, March 28-31, 2019, Kobe, Japan
3. Shuta Ozawa, Yukiko Hori, Youhei Sohma, Motomu Kanai, Taisuke Tomita: Photooxygenation by biocompatible catalyst reduces the A β level in the brains of Alzheimer disease model mice. Neuroscience 2018, November 3-7, 2018, San Diego, USA
4. Yukiko Hori, Shuta Ozawa, Atsuhiko Taniguchi, Yusuke Shimizu, Ryuto Kino, Takashi Saito, Takaomi C. Saido, Youhei Sohma, Motomu Kanai, Taisuke Tomita: Biochemical analysis of oxygenated A β by photooxygenation system. Neuroscience 2017, November 11-15, 2017, Washington DC, USA

〔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：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~neuropsych/tomita/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：堀 由起子

ローマ字氏名：Hori Yukiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。