

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22539

研究課題名（和文）-シヌクレインをモデルとした病原性アミロイドのストレイン多様性・細胞毒性の解明

研究課題名（英文）Investigation of strain diversity and cytotoxicity of pathogenic amyloids by using alpha-synuclein as a model

研究代表者

田口 謙（Taguchi, Yuzuru）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員研究員

研究者番号：20772552

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：我々は、構造が決定された シヌクレイン（aSyn）の平行 シートアミロイドに分子動力学（MD）シミュレーションで種々の変異の影響を分析し、第84残基がグリシンからイソロイシンに置換された変異体（aSyn(G84I)）に注目した。この変異体を実際に培養細胞に発現したところ凝集体形成と細胞死が観察された。細胞内でのaSynアミロイドの構造の知見を得るため、この変異体に更に家族性パーキンソン病関連変異を組合せ凝集能を観察した。また、aSynアミロイドによる細胞毒性の機序解明のため、凝集体の遺伝子発現への影響の評価も計画したが、安定発現株では細胞毒性が一貫せず、その機序は想定以上に複雑と思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

aSyn(G84I)の効率良い凝集能を利用して、細胞内aSynアミロイドの凝集抑制または細胞死抑制効果のある薬剤のスクリーニングに利用できると思われ、現在その系の確立を試みている。今回は細胞死の機序解明には至らなかったが、安定発現株で細胞死がコンスタントに生じる条件を同定できれば、遺伝子発現プロファイルの変化の解析によって、aSynアミロイドによる細胞死の機序の手掛かりとなりうる。また、in-register平行 シートアミロイドの分子動力学シミュレーションの過程で今回開発した手法や知見は、プリオン蛋白を含む他のアミロイド原性蛋白の研究にも応用可能と思われ、研究の発展への寄与が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed influences of various mutations on structures of an in-register parallel β -sheet amyloid of an alpha-synuclein (aSyn) by molecular dynamic (MD) simulation and focused on a substitution mutant at residue 84 to isoleucine, aSyn(G84I). We actually expressed aSyn (G84I) on cultured cells and discovered that the mutant was rather prone to aggregate in the cells. We utilized it to collect clues to the structures of aSyn amyloid in live cells by observing how the aggregation tendency of aSyn(G84I) in the cultured cells are affected by various mutations associated with familial Parkinson diseases. We also attempted to investigate molecular mechanisms of cytotoxicity of aSyn amyloids by analyzing gene-expression profiles of the cells harboring aSyn aggregates, although it was not successful. Finally, exploiting analogy of local amino acid sequences between aSyn and prion protein, we modeled a local structure of an abnormal isoform of prion protein and studied it with MD simulation.

研究分野：分子生物学

キーワード：シヌクレイン in-register平行 シート アミロイド 分子動力学シミュレーション 細胞毒性 プリオン蛋白 プリオン

1. 研究開始当初の背景

シヌクレイン (aSyn) は生体内で病原性アミロイドを形成することが知られている蛋白の1つで、そのアミロイドはレビー小体としてレビー小体型認知症やパーキンソン病の病態で中心的役割を演じると考えられている。aSyn アミロイドは、プリオン蛋白 (PrP) のアミロイドである異常型 PrP (PrP^{Sc}) と同様に、複数の構造 / 形態をとり、それぞれが異なる疾患に関連する。また、aSyn 変異による家族性パーキンソン病も変異の種類により臨床像が異なることが知られている。この様に、aSyn アミロイドは他の病原性アミロイドと共通の性質を持ち、その研究を通じて複数のアミロイド性神経変性疾患の株多様性や病態への手掛かりを得られる可能性がある。aSyn は PrP などと異なり翻訳後修飾も少なく、その組換え蛋白は精製が比較的容易であり、*in vitro* で形成した aSyn アミロイドを動物に接種することで疾患を惹起しうるなど、実験に適している。また、*in vitro* で形成した aSyn アミロイドであるが、cryo-EM により高分解能の構造が最も早く決定され *in-register* 平行 シートアミロイドと証明されたアミロイドの1つでもある。現時点ではマウスやハムスター由来の PrP^{Sc} の構造が Cryo-EM により同定されているが、本研究を始める際には、PrP^{Sc} が aSyn アミロイドや A β アミロイドの様に *in-register* 平行 シートアミロイド構造をとっているか、ソレノイド構造をとっているか不明な状況だった。aSyn アミロイドは *in-register* 平行 シートアミロイドの一般的な性質を研究することを可能とした。

これらの点に着目し、病原性アミロイドの構造や病態の研究のモデルとして aSyn を用いることとした。既に報告された aSyn アミロイドの構造を基に分子動力学的 (MD) シミュレーションを用いて、aSyn の第 84 残基が aSyn アミロイドの安定性に寄与する可能性を見出し、実際に細胞内で強い凝集傾向を持つ変異体 aSyn(G84I) を作成した。凝集体形成の翌日には細胞死が見られ、この変異体は aSyn の細胞毒性の研究にも応用可能と思われた。G84I 変異は独自に見出したものだが、その後、海外の他の研究者が同変異または近傍の変異 (例: E83Q) が aSyn の凝集促進することを報告した。それらの報告でも培養細胞またはトランスジェニックマウスで細胞毒性が生じることも報告しており、この現象は普遍的なものと思われた。

2. 研究の目的

今回見出した、この興味深い性質を持つ変異 aSyn(G84I) を以下の研究に応用した

- (1) 組換え蛋白を用いて、培養細胞内の aSyn アミロイドの構造に関する情報の獲得。
In vitro での aSyn アミロイド形成の系での交差反応効率に影響する条件の同定。
- (2) 細胞内 aSyn 凝集体による細胞毒性 (つまり、レビー小体による神経毒性) のメカニズムの手掛かりの獲得。
- (3) 構造が既知の aSyn アミロイドを *in-register* 平行 シートアミロイドのモデルとして用いて、PrP^{Sc} もまた *in-register* 平行 シートアミロイドであると仮定して、プリオン株の多様性のメカニズムの手掛かりの獲得。

3. 研究の方法

(1) 上記目的のために、種々の変異 aSyn を作成して培養細胞 N2a 中に一過性発現させ、培養細胞内での凝集効率・交差反応効率を評価した。細胞内での凝集体 / アミロイド形成を促進あるいは阻害しない変異は、細胞内で形成されるアミロイドの構造維持に有利であり、阻害する変異はアミロイドの構造を不安定化するものである、との仮説に基づくものである。また、細菌に種々の変異 aSyn を発現・精製した組換え変異 aSyn を *in vitro* でアミロイド形成させる系で、substrate と seed の組合せに種々の変異 aSyn を用い、基質変異 aSyn のアミロイドへの変換効率を観察することで、第 84 残基周辺の領域が aSyn のアミロイドへの変換に重要かどうかを評価した。

(2) aSyn 凝集体により生じる細胞死のメカニズムの解明のため、aSyn(G84I) を発現する細胞と野生型 aSyn を発現する細胞の間で遺伝子発現パターンをマイクロアレイ等を用いて比べ、細胞毒性に関与していると思われる遺伝子の同定を行うこととした。そのためには、aSyn(G84I) 以外に細胞毒性を生じる要素を排除する必要があるため、ドキシサイクリン誘導発現ベクタに変異 aSyn と野生型 aSyn をそれぞれ組み込み、それらの安定発現株を作成した後に、ドキシサイクリンで発現誘導して変異 aSyn の凝集体形成・細胞死が生じるタイミングで回収して遺伝子発現パターンを比較する計画を立てた。

(3) RCSB Protein Data Bank に登録されている *in-register* 平行 シート構造の aSyn アミロイド (PDB ID: 2n0a) の Greek-key モチーフの部分モデルとして、PrP^{Sc} の局所的構造のモデリングを行った。aSyn の当該領域は glycine-rich であり U 型ループを形成している。PrP にも glycine-rich な配列があり、この領域にバリンへの変異が導入されると PrP^{Sc} への変換が阻害される可能性があるなど、aSyn の MD シミュレーションでの当該領域との類似性が示唆される。そこで、PrP^{Sc} でもこの領域は U 型ループを形成していると仮定し、PrP の配列を用いて比較的

安定な in-register 平行 シートアミロイドのモデルを作成した。この PrPSc の局所的構造モデルの安定性に、種々の変異がその構造に与える影響を評価することで、プリオン株の多様性のメカニズムを考察した。

4. 研究成果

(1) aSyn(G84I)と種々の変異を組合せた変異体の培養細胞内での凝集傾向を観察し、結果の一部を表に示した。aSyn(G84I)は効率良く凝集体形成するのにに対し、G84I と G51D または A30P を併せ持った変異 aSyn は凝集体形成能を失った。これは第 51 残基や第 30 残基が培養細胞内での aSyn アミロイドの構造には重要な位置にあり、これらの変異がアミロイド構造の安定性を著しく阻害するためであると考えられる。また、N 末端 10 残基程度の欠失変異との組合せでも aSyn(G84I)は凝集能を喪失するなど、MD シミュレーションで原型とした aSyn アミロイド (N 末端が無構造)とは異なる構造を取る可能性が示唆された。興味深いことに、他の家族性パーキンソン病に関連する変異 E46K や A53T との組合せでは aSyn(G84I)の凝集体形成能は維持された。これらの結果は、aSyn(G84I)の凝集体が単なるランダムコイルの寄集めではなく、特定の構造をとっており、各変異に関連した家族性パーキンソン病で変異 aSyn は異なるアミロイド構造を取る可能性が示唆される。培養細胞内での aSyn 凝集体形成は、aSyn 凝集体形成を阻害する薬剤つまりパーキンソン病などの治療薬のスクリーニングにも応用できると思われ、系の確立を進めている。

細菌に発現した変異 aSyn を精製し in vitro での凝集体形成を行う実験では、幾つかの技術的な困難に直面した。aSyn(G84I)は、細菌と培養細胞内に発現した場合のいずれでも強い凝集体形成傾向を示し、細胞内で凝集形成し易い変異 aSyn は細菌内でも凝集体形成傾向が強く、通常の細菌からの組換え aSyn 精製の方法では極僅かしか回収できないという問題が生じたため、比較的弱い凝集傾向を持つ aSyn 変異体を細菌に発現・精製し、in vitro での凝集体形成の実験に用いた。第 84 残基周辺のアミノ酸配列が同じ変異 aSyn 同士は凝集体の性質が似ていて交差反応効率が良いだろうと仮説をたてていたが、それを積極的に支持する結果は得られなかった。これは、in vitro で形成された aSyn アミロイドの構造は反応時の条件によりかなり多様性が生じるため、今回の条件で形成された aSyn アミロイドでは、第 84 残基を含む領域が必ずしも報告された様な構造をとっていなかった可能性もあると思われる。

Mutation	Aggregates	Mutation	Aggregates
ΔN10/G84I	-	G84I	+++
ΔN20/G84I	-	G84I + A30P	-
ΔN30/G84I	-	G84I + E46K	+++
G84S	-	G84I + G51D	-
G84L	+++	G84I + A53T	+++

表：培養細胞内での変異 aSyn の凝集体形成

- or +, 凝集体形成無 or 有り。

N10-30, N 末端 10-30 残基の欠失変異

(2) 上述のように、変異 aSyn(G84I)を利用した細胞毒性のメカニズムの研究のために、ドキシサイクリンで発現誘導できる発現ベクタに aSyn(G84I)と野生型 aSyn の ORF を載せ、N2a 細胞にトランスフェクトした後に安定発現株を用いた系を作成した。ドキシサイクリンでそれらの発現を誘導したところ、aSyn(G84I)の凝集体形成は見られたものの、一過性発現で認められた程の細胞死が見られず、培養細胞での aSyn 凝集体による毒性のメカニズムは単純ではない可能性が示唆された。ATG5 が CRISPR により欠損した、つまり ATG5 依存的なマクロオートファジーが機能しない N2a 細胞では、aSyn(G84I)による細胞毒性はある程度は強くなったが、それでも野生型 aSyn 発現細胞との差は小さく、遺伝子発現解析での比較には不適と思われたため、両者の発現プロファイルの比較は実行しなかった。

(3) 研究の方法に記載したように、PrP の glycine-rich 領域周辺のアミノ酸配列を用いて、比較的安定な glycine-rich 領域が U 型ループになる様な in-register 平行 シート構造の局所構造モデルを作成した。この局所構造モデルに、クロイツフェルト・ヤコブ病に抵抗性を与えることで知られる変異 G125V を導入すると、構造が非常に不安定となった。アミロイドの構造維持が困難と言うことは、G125V を持つ正常型 PrP が PrPSc に変換しにくい、と言うことであり、G125V がどの様にクロイツフェルト・ヤコブ病に対し抵抗性を与えるかを証明すると考えられた。このモデルに、ヒト・プリオン病の病態に影響を与えることが知られているヒト PrP の正常多形 (例: M129 や V129) や変異などを導入し、それらの変異がアミロイド構造の安定性にどの様に影響を与えるかを検証した。

今回のモデルと細部の構造は異なるものの、2021 年にハムスターとマウスの PrPSc の構造が海外のグループにより同定され、glycine-rich 領域は U 型ループを形成していることが確認された。MD シミュレーションでのアプローチはプリオン株の多様性 / 種特異性のメカニズムに

役立つと思われる。

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