

令和元年5月23日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09716

研究課題名(和文) SPring-8におけるin vivo構造解析による  $\alpha$ -シヌクレインの伝播の研究

研究課題名(英文) Study of alpha-synuclein propagation by in vivo structural analysis at SPring-8

研究代表者

荒木 克哉 (Katsuya, Araki)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：50649431

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)：レビー小体、グリア細胞内嗜銀性封入体(GCI)はそれぞれパーキンソン病、多系統萎縮症患者の脳内に見られる特徴的な凝集体であり、 $\alpha$ -シヌクレインを主成分とする。最近、この凝集体がプリオンのように脳内を伝播すると報告されたが、これらの研究では人工的なアミロイド線維が用いられており、同様の現象が体内で起こっているという証拠はない。そこで、我々はこれまで困難とされた剖検脳内の凝集体に対する微細構造解析にSPring-8の放射光を用いることで挑んだ。その結果、レビー小体がアミロイド線維を含んでいることを世界で初めて見出し、また、レビー小体とGCIにおける蛋白質レベルでの構造の違いが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果は、これまで行われてきた人工的なアミロイド線維を用いた実験の正当性を支持するものであり、すでに進められている臨床研究を後押しする重要な成果である。また、本研究成果はパーキンソン病がアミロイドーシスの一種であるという新しい概念を提唱するものであり、革新的治療開発の手がかりとなり得るものである。

研究成果の概要(英文)：Lewy body and glial cytoplasmic inclusion (GCI) are characteristic aggregates found in the brain of patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy, respectively, and are mainly consist of  $\alpha$ -synuclein. Recently, it has been reported that these aggregates are capable of propagating within the brain in a prion-like manner. However, in these study, artificial amyloid fibrils of  $\alpha$ -synuclein are used and there is still no evidence that such propagation occurs in the patient's brain. Here, we challenged for ultrastructural analysis of aggregates in the autopsy brain using SPring-8 synchrotron radiation, which has been considered difficult until now.

As a result, it was found for the first time that Lewy body contains amyloid fibrils, and the secondary structural difference between Lewy body and GCI also was clarified.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 放射光 量子ビーム  $\alpha$ -シヌクレイン レビー小体 アミロイドーシス アミロイド線維 SPring-8 放射

### 1. 研究開始当初の背景

レビー小体 (LB), グリア細胞内嗜銀性封入体 (GCI) はそれぞれパーキンソン病 (PD), 多系統萎縮症 (MSA) 患者の脳内に見られる特徴的な蛋白凝集体であり, それらが  $\alpha$ -シヌクレインを主成分とすることがわかっている。一方で,  $\alpha$ -シヌクレインの生理的な機能はよくわかっておらず, 特定の構造をとらない天然変性蛋白質としてもよく知られている。近年, この  $\alpha$ -シヌクレインの凝集体が脳内を伝播し, その構造 (ストレイン) の違いで伝播能や毒性も異なるとの報告がなされ, 注目されている。しかしながら, これらの研究では根本的には *in vitro* 実験で作成した人工的なアミロイド線維を用いており, また, 伝播したことの確認は一般的な免疫染色法で行われているに過ぎない。このような状況下で, ごく最近, プリオンで著名な Prusiner がヒトの剖検脳を使用した実験で LB と GCI の伝播能の違いを報告したことで, *in vivo* すなわち脳内や細胞内に実際に存在する蛋白凝集体の構造解析の重要性がさらに増してきている。

生体試料に対する構造解析は光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いた研究が主流であるが, これはいずれも形態学的な観察手法であり, 薬剤開発や分子生物学で重要となる蛋白質レベルの構造 (2 次または 3 次構造) 情報をもたらさない。そこで, 私はこれまでに大阪大学と大規模放射光施設 SPring-8 を中心に医学と物理学を融合させた共同研究を行い, これまでにない手法を用いた構造解析手法を作り上げてきた。その結果, SPring-8 の放射光をうまく利用することで, これまで困難とされた患者剖検脳内の凝集体に対する微細構造解析でいくつかの成果を上げてきた。

一方,  $\alpha$ -シヌクレインが最も多く発現しているのは赤血球内 (厳密には赤芽球内) であることが分かっており, 私はヒトの赤血球から  $\alpha$ -シヌクレインを精製する手法も確立している。ヒトで発現された  $\alpha$ -シヌクレインは大腸菌リコンビナントとは異なり, N 末端がアセチル化されており, それ以外にも翻訳修飾の違いが存在するという報告もある。いずれにせよ, 赤血球内の  $\alpha$ -シヌクレインの構造や機能が何らかの重要な鍵を握っていると推察されるが, 赤血球と  $\alpha$ -シヌクレインをテーマとした研究は極めて少ない。

### 2. 研究の目的

PD や MSA の剖検脳内に実在する LB や GCI の微細構造解析を行い, それらの違いを明らかにすることで, それらの疾患の本質的な違いに迫り, 発症機序の解明や画期的な治療法開発の手がかりを得る。

### 3. 研究の方法

細胞内や脳内の蛋白凝集体の構造解析を実験室レベルの装置で行うことは不可能なため, 我々は大型放射光施設 SPring-8 を利用することとした。細胞内や脳内の蛋白凝集体は画期的な測定技術を必要とするが, 我々は 2013 年度からそのような測定法の開発を行っており, 脳切片の測定についてはすでにほぼ確立させていることから, 測定試料の準備とビームタイムの確保ができれば, 速やかに研究を開始できる。BL43IR の顕微赤外分光法, BL40XU のマイクロビームを用いた X 線回折実験により, クロス 構造の有無, ストレインの評価を中心に構造解析を行う。

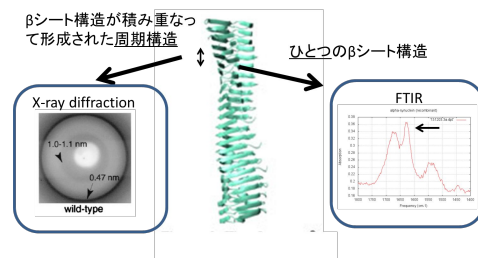
#### 大型放射光施設 SPring-8

構造解析実験は兵庫県の播磨科学公園都市にある大型放射光施設 SPring-8 で行う。顕微赤外分光法は BL43IR, マイクロビームを用いた X 線回折実験は BL40XU で行う。



#### クロス 構造を確認する方法

クロス 構造が存在すれば, その特徴的な 4.7 の周期構造を X 線回折や電子線回折にて確認することができる。また, 蛋白の 2 次構造解析に有用な赤外分光法では  $\beta$  シート構造の割合を評価することが可能であり, その割合から間接的にクロス 構造についての考察が可能である。



#### 脳切片試料の調整

PD 患者または実験動物の脳の適切な部位から, 顕微赤外分光法では厚さ 10  $\mu\text{m}$ , X 線回折では厚さ 40  $\mu\text{m}$  の切片を切り出し, パラフィン切片は脱パラフィン後, 凍結切片はそのまま, 抗  $\alpha$ -シヌクレイン抗体にて免疫染色し, 顕微赤外分光法ではフッ化カルシウム基板上, X 線回折ではマイラ 膜上にマウントする。いずれの測定も基本的には試料を乾燥した状態で行う。

#### 顕微赤外分光法

測定は SPring-8 の BL43IR にて行う。調整した試料を可動式の測定ステージにのせ、ビームラインに常設された FTIR 装置にて測定を行う。アパーチャーは  $5\mu\text{m}$  程度とし、 $3\mu\text{m}$  ステップで凝集体を含む領域の 2 次元スキャンを行う。我々は、これまでに典型的なレビー小体において、シート構造の割合が中心部分（コア）ではなく、周囲（ハロー）に多いことを確認している。このような脳切片に対する測定手法は我々がすでに確立しており、試料さえ準備できれば、ビームタイムの許す限りの測定が可能である。

#### マイクロビームを用いた X 線回折実験

測定は SPring-8 の BL40XU にて行う。調整した試料を測定ステージにマウントし、直径  $5\mu\text{m}$  程度のマイクロビームを用いた測定を行う。露光時間は 1-2 秒程度とし、凝集体を含む領域の 2 次元スキャンを行う。

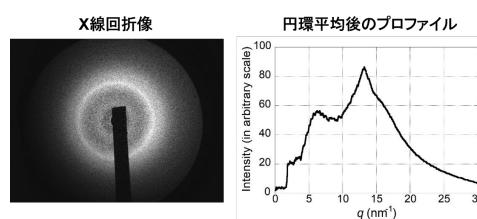
#### 赤血球内の $\beta$ -シヌクレインの解析

ヒトの赤血球から精製した  $\beta$ -シヌクレインに対する構造解析や赤血球における機能解析を行う。構造解析については、SPring-8 の BL45XU にて、限外ろ過カラムを連結した X 線小角散乱 (SEC SAXS) を行う。

### 4. 研究成果

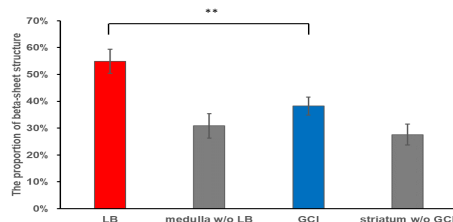
#### 患者剖検脳内のレビー小体がアミロイド線維を含んでいることを世界で初めて確認

SPring-8 の BL40XU におけるマイクロビーム X 線回折で、パーキンソン病患者の剖検脳内のレビー小体が  $4.7$  と約  $10$  のクロス構造、すなわちアミロイド線維に特徴的な回折像を示すことを確認した。本研究成果は、人工的な  $\beta$ -シヌクレインアミロイド線維を用いた多くの実験の正当性を支持するものであり、パーキンソン病がアミロイドーシスの一種であるとする新たな疾患概念を支持するものである。



#### LB と GCI の蛋白質レベルでの微細構造の違い

SPring-8 の BL43IR における顕微赤外分光で LB と GCI の微細構造の違いを見出した。具体的には、LB におけるシート構造の含有率 ( $54.9 \pm 4.5\%$ ) は、GCI のシート構造含有率 ( $38.2 \pm 3.3\%$ ) よりも有意に高いことがわかった ( $P < 0.01$ )。また、スペクトルの形状より、LB はアミロイド線維を含み、GCI はオリゴマーの可能性が高いことがわかった。



#### ヒト赤血球から精製した $\beta$ -シヌクレインは特定の構造をもたない単量体である

SPring-8 の BL43IR における X 線小角散乱で、ヒト由来の  $\beta$ -シヌクレインに対する構造解析を行うことで、やはり特定の構造をもたない単量体であることを示し、一時期注目を浴びた四量体仮説を否定する報告を行った。

#### $\beta$ -シヌクレインは赤血球膜の安定化や脱核に關与する可能性がある

秋田大学との共同研究で、 $\beta$ -シヌクレインが赤血球膜の安定化や脱核に關与する可能性があることを報告した。最近になって、 $\beta$ -シヌクレインと脂質の關係が注目されており、本成果はすでに複数の論文に引用されている。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文](計3件)

The localization of  $\beta$ -synuclein in the process of differentiation of human erythroid cells. Katsuya Araki, Kotomi Sugawara, Eri H Hayakawa, Kumi Ubukawa, Isuzu Kobayashi, Hideki Wakui, Naoto Takahashi, Kenichi Sawada, Hideki Mochizuki, Wataru Nunomura. International journal of hematology. 108, 130-138 (2018) 査読有 DOI: 10.1007/s12185-018-2457-8

Dynamical Behavior of Human  $\beta$ -Synuclein Studied by Quasielastic Neutron Scattering. Satoru Fujiwara, Katsuya Araki, Tatsuhito Matsuo, Hisashi Yagi, Takeshi Yamada, Kaoru

Shibata, Hideki Mochizuki. PLoS One. 11(4), e0151447 (2016) 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0151447.

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) 査読有 DOI :10.1038/srep30473

〔学会発表〕(計4件)

Evaluation for the strains of alpha-synuclein fibrils in the autopsy brain by synchrotron FTIRM. Katsuya Araki, Hideki Hayakawa, Kensuke Ikenaka, Naoto Yagi, Hideki Mochizuki. 第59回日本神経学会学術大会・2018年5月23日 ロイトン札幌

Fine structure analysis of alpha-synuclein aggregates in the patient's brain with synchrotron radiation. Katsuya Araki, Naoto Yagi, Kensuke Ikenaka, Hideki Hayakawa, Kosuke Baba, Yoshitaka Nagai, Hideki Mochizuki. 第23回世界神経学会議・2017年9月17日 京都(日本)

The structure analysis for alpha-synuclein and Lewy bodies in the brain of Parkinson's disease patients with synchrotron radiation. Katsuya Araki, Naoto Yagi, Kensuke Ikenaka, Hideki Hayakawa, Kousuke Baba, Yoshitaka Nagai, Yuji Goto, Hideki Mochizuki. 第60回日本神経化学会大会・2017年9月7日 仙台国際センター

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23日 神戸国際展示場

〔図書〕(計1件)

Secondary structure analysis of Lewy bodies in the brain of Parkinson's disease patients. Araki K, Naoto Y, Mochizuki H. SPring-8/SACLA Research Frontiers.(2016) [http://www.spring8.or.jp/pdf/en/res\\_fro/16/034\\_035.pdf](http://www.spring8.or.jp/pdf/en/res_fro/16/034_035.pdf)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕(計4件)

Secondary structural analysis of Lewy bodies in the brain of Parkinson's disease patients. Journal Of Synchrotron Radiation. 23, facility information. (2016)

パーキンソン病根本治療への鍵,脳内レビー小体の構造解析に成功.SPring-8 NEWS 87号.(2016)

[http://www.spring8.or.jp/pdf/ja/SP8\\_news/no87\\_16/no87.pdf](http://www.spring8.or.jp/pdf/ja/SP8_news/no87_16/no87.pdf)

[https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/tag\\_view?tag=%E8%8D%92%E6%9C%A8%E5%85%8B%E5%93%89](https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/tag_view?tag=%E8%8D%92%E6%9C%A8%E5%85%8B%E5%93%89)

<https://www.jaea.go.jp/02/press2016/p16042101/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 藪本 大紀

ローマ字氏名:(YABUMOTO, Taiki)

所属研究機関名: 大阪大学

部局名: 医学系研究科

職名: 医員

研究者番号(8桁): 20774227

### (2)研究協力者

研究協力者氏名: 望月 秀樹

ローマ字氏名:(MOCHIZUKI, Hideki)

研究協力者氏名: 八木 直人

ローマ字氏名:(YAGI, Naoto)

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。