

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07858

研究課題名（和文）プリオン様伝播モデルによるレビー小体型認知症病原蛋白質の本体解明と創薬基盤の構築

研究課題名（英文）Identification of pathogenic alpha-synuclein species that exhibit prion-like properties in Lewy body dementia, and basic research for drug development

研究代表者

佐野 和憲 (Sano, Kazunori)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：50534343

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：レビー小体型認知症脳では -シヌクレイン（Syn）の立体構造変換で伝播性を有する異常 Syn が生じる。異常 Syn の新規リン酸化部位として Y136 を同定した。疾患モデルでは、伝播性を有する異常 Syn はオリゴマー構造を呈していること、Casein kinase（CK2）による S129 リン酸化は異常 Syn 形成を促し、Y136 リン酸化は S129 リン酸化、異常 Syn 形成を抑制することを明らかにした。CK2 阻害剤は S129 リン酸化減弱、Y136 リン酸化増強により異常 Syn 形成を抑制した。以上より異常 Syn への構造変換に関わる因子、新規創薬標的として Y136 リン酸化、CK2 を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2002年にレビー小体型認知症（LBD）脳における異常 Syn の S129 リン酸化が同定されたものの、そのリン酸化機序や役割は不明確なままである。このことは S129 リン酸化に影響する因子の存在を示唆しており、本研究ではその因子として Y136 リン酸化を世界で初めて同定した。S129 リン酸化が見られる疾患にはパーキンソン病（PD）もあり、LBD や PD に対する現在の治療法は対症療法のみである。根治療法が確立されない要因として、異常 Syn 本体が未解明なことが挙げられ、本研究成果で見出した異常 Syn の Y136 リン酸化やオリゴマー構造は、LBD、PD の病態解明、根治療法開発への基盤になりうると考える。

研究成果の概要（英文）：We found that -synuclein (Syn) aggregates are predominantly phosphorylated at Y136 in the Lewy body dementia (LBD) brain. Aggregate formation with S129 and Y136 phosphorylation of recombinant Syn (r-Syn) were induced by Casein kinase 2 (CK2) but abolished by replacement of S129 with alanine (S129A) in vitro. Mutation of Y136 to alanine (Y136A) promoted aggregate formation and S129 phosphorylation of r-Syn by CK2 in vitro. Introduction of Y136A r-Syn oligomers into cultured cells exhibited increased levels of aggregates with S129 phosphorylation compared to wild-type r-Syn oligomers. In addition, aggregate formation with S129 phosphorylation induced by introduction of wild-type r-Syn oligomers was significantly attenuated by CK2 inhibition, which resulted in an unexpected increase in Y136 phosphorylation in cultured cells. Our findings suggest the involvement of CK2-related Syn Y136 phosphorylation in the pathogenesis of LBD and its potential as a therapeutic target.

研究分野：神経内科学

キーワード：レビー小体型認知症 -シヌクレイン プリオン様伝播 S129リン酸化 Y136リン酸化 Casein kinase

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レビー小体型認知症 (LBD) では、内在性蛋白質である正常な β -シヌクレイン (β -Syn) から構造変換した異常 β -Syn が病原蛋白質として脳内を広がり、凝集した異常 β -Syn を主要構成成分としたレビー小体と呼ばれる封入体が形成され病変が進展する。脳内における異常 β -Syn の出現分布や広がり、認知症の程度と相関することから、異常 β -Syn が LBD の発症を引き起こしているのではと考えられているが、異常 β -Syn の発生機序および本体の定義ははまだ不明確なままである。異常 β -Syn の広がり方は、プリオン病の感染性蛋白質であるプリオンの伝播性に類似しており、プリオンが内在性の正常なプリオン蛋白質を次々に異常な立体構造へと変換することで脳内を伝播するように、異常 β -Syn もまた、内在性の正常な β -Syn を異常型へ構造変換し自己増幅しながら脳内を広がると考えられている。脳内における異常 β -Syn のプリオン様伝播は現象としては報告されているものの、そのプリオン様伝播機構について「異常 β -Syn への構造変換に関与する因子」、「異常 β -Syn の正体」の 2 つの基礎的問題がまだ明確になっておらず、このことが LBD の病態解明・治療開発を遅らせている大きな原因の一つであると考えられる。

2. 研究の目的

「異常 β -Syn への構造変換に関与する因子」、「異常 β -Syn の正体」の 2 つのまだ明確になっていない基礎的問題を明らかにし、LBD の病態解明・治療へと研究を展開するための研究基盤を確立することが目的である。

3. 研究の方法

(1) 神経疾患脳における β -Syn のリン酸化解析:

皮質型 LBD (DN-LBD)、辺縁型 LBD (Li-LBD)、アルツハイマー型認知症 (AD) 及びクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者由来脳各々から脳ホモジネートを作製し、SDS-PAGE 後、抗 β -Syn 抗体、抗 S129 リン酸化 β -Syn 抗体、抗 Y125 リン酸化 β -Syn 抗体、抗 Y133 リン酸化 β -Syn 抗体あるいは抗 Y136 リン酸化 β -Syn 抗体を用いてウエスタンブロット (WB) 解析した。また、上記抗体を用いて免疫組織化学染色による解析を行った。

(2) リコンビナントヒト β -Syn (r- β -Syn) のリン酸化解析:

ニッケルアフィニティークロマトグラフィーを用いて、大腸菌に発現させた野生型 (WT) -r- β -Syn、S129 をアラニンで置換した変異体 (S129A-r- β -Syn)、Y136 をアラニンで置換した変異体 (Y136A-r- β -Syn) を精製した。r- β -Syn 各々に、 β -Syn において特異的に S129 リン酸化する酵素とされる Casein kinase (CK2) 及び ATP を混和しリン酸化反応を行った。反応後のサンプルを SDS-PAGE により分離し、CBB 染色後、16kDa 付近の単一バンドを含むゲル片を切り出し、LC-MS/MS を用いてリン酸化部位を解析した。また反応後のサンプルを SDS-PAGE 後に上記 (1) の抗体を用いて WB 解析した。

(3) Thioflavin-T (ThT) アッセイ:

WT-r- β -Syn、Y136A-r- β -Syn 各々に CK2、ATP の存在下、非存在下で ThT を混和し攪拌条件下で反応させた。

(4) 異常 r- β -Syn の作製及び Real-time Quaking-Induced Conversion (RT-QuIC) 解析:

WT-r- β -Syn、Y136A-r- β -Syn 各々を様々な条件下で凝集化させ、RT-QuIC を用いて試験管内におけるプリオン様伝播性を評価した。

(5) 異常 r- β -Syn の構造解析:

透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて異常 r- β -Syn の形態を観察した。また Native-PAGE 後に WB を行い、分子サイズの解析を行った。

(6) 培養細胞における異常 r- β -Syn のプリオン様伝播性評価:

異常 r- β -Syn をヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に暴露後、回収した細胞ライセートを上記 (1) の抗体を用いて SDS-PAGE 後 WB 解析し、細胞におけるプリオン様伝播性を評価した。

4. 研究成果

(1) 神経疾患脳ホモジネートの WB 解析において、全検体で抗 β -Syn 抗体により 20 kDa、50 kDa 付近にバンドが検出された。20 kDa バンドは β -Syn モノマー、50 kDa バンドは β -Syn ダイマーもしくはコピキチン修飾を受けた β -Syn であると推測された。さらに DN-LBD、Li-LBD では > 250 kDa にも β -Syn 凝集体が認められ、その発現量は DN-LBD の方がより顕著であった。その DN-LBD の β -Syn 凝集体は、抗 S129 リン酸化 β -Syn 抗体、抗 Y136 リン酸化 β -Syn 抗体によっても検出され、一方、抗 Y125 リン酸化 β -Syn 抗体、抗 Y133 リン酸化 β -Syn 抗体では検出されなかった。

免疫組織化学染色法においても、DN-LBD では抗 S129 リン酸化 Syn 抗体、抗 Y136 リン酸化 Syn 抗体陽性の Syn 沈着物が認められた。これらの結果は DN-LBD における異常 Syn は S129 のみならず Y136 もまた特異的にリン酸化されていることを示唆する。

(2) CK2 によりリン酸化された WT-r- Syn の LC-MS/MS 解析では、S129 リン酸化ペプチドが 9 個、Y136 リン酸化ペプチドが 7 個検出されたのに対し、Y125 リン酸化ペプチドは 1 個のみ検出され、Y133 リン酸化ペプチドは検出されなかった。一方、S129A-r- Syn では、いずれのリン酸化ペプチドも検出されなかった。WB 解析において、リン酸化反応後の WT-r- Syn は DN-LBD 脳と同様に > 250 kDa に凝集体が認められ、一方、S129A-r- Syn では凝集体は認められなかった。WT-r- Syn の > 250 kDa 凝集体は DN-LBD 脳と同様に抗 S129 リン酸化 Syn 抗体、抗 Y136 リン酸化 Syn 抗体によって検出され、S129A-r- Syn ではいずれのリン酸化も検出されなかった。これらの結果は、CK2 による S129 リン酸化は Syn の凝集形成を促進し、また S129 リン酸化は Y136 リン酸化を誘導することを示唆する。また CK2 によりリン酸化された Y136A-r- Syn について同様の実験を行った場合、WT-r- Syn と比較して、Y136A-r- Syn 凝集形成及び S129 リン酸化の有意な促進が示された。このことは Y136 リン酸化は Syn の S129 リン酸化及び凝集形成に対して抑制的に働くことを示唆する。

(3) ThT アッセイにおいて、WT-r- Syn では CK2 によるリン酸化反応開始後 7 日以内に ThT 陽性は認められなかった。一方、Y136A-r- Syn では ThT 陽性が認められ、TEM 解析により ThT 陽性を示した Y136A-r- Syn はアミロイド線維構造を呈していた。これらの結果は、Y136 リン酸化は Syn のアミロイド線維形成に対して抑制的に働くことを示唆する。

(4) 様々な条件下で凝集させた複数種の r- Syn の伝播性について RT-QuIC を用いたハイスループットアッセイで評価した結果、高回転の攪拌条件下で凝集させた r- Syn が最も強い伝播性を示した。一方、非攪拌条件下で凝集させた WT-r- Syn は伝播性を示さなかった。Y136A-r- Syn もまた同様に、攪拌条件下で作製した凝集体は強い伝播性を示し、非攪拌条件下で作製した凝集体は伝播性を示さなかった。これらの攪拌条件下で凝集させた WT-r- Syn、Y136A-r- Syn を異常 r- Syn として (5) (6) の実験に用いた。

(5) TEM 解析において、WT-r- Syn、Y136A-r- Syn 共に、攪拌条件下で作製した、伝播性を有する異常 r- Syn はオリゴマー様構造に呈しており、非攪拌条件下で作製した、伝播性を示さなかった凝集 r- Syn はアモルファス様構造に呈していた。WT-r- Syn の Native-PAGE 後の WB 解析において、攪拌条件下、非攪拌条件下共に 1,048 kDa 付近に抗 Syn 抗体陽性の凝集体が認められたが、その量は伝播性を示さなかった凝集 r- Syn の方がより顕著であった。これらの結果は、比較的重合度の低いオリゴマー構造が異常 r- Syn のプリオン様伝播性に密接に関与する蛋白質構造であることを示唆する。

(6) 抗 Syn 抗体を用いた WB 解析において、異常 WT-r- Syn 曝露後の SH-SY5Y 細胞では内在性 Syn の凝集化が起こりプリオン様伝播性が示され、さらに抗 S129 リン酸化 Syn 抗体、抗 Y136 リン酸化 Syn 抗体により凝集 Syn の S129、Y136 リン酸化が認められた。異常 Y136A-r- Syn を使用した同様の実験では、内在性 Syn の凝集化及び S129 リン酸化がより顕著に示され、更なる病態の悪化が認められた。これらの結果は、細胞において Y136 リン酸化は Syn の S129 リン酸化及び凝集形成に対して抑制的に働くことを示唆する。この細胞モデルにおいて、CK2 阻害剤である 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) は濃度依存的に有意な S129 リン酸化の減弱を示し、CK2 が細胞モデルにおいても S129 をリン酸化する酵素であることが示唆され、さらに内在性 Syn 凝集の抑制もまた認められたことから、TBB は異常 Syn の伝播に対して治療効果を示すことが示唆された。TBB は S129 リン酸化を減弱させたのにもかかわらず、Y136 リン酸化を濃度依存的に有意に増強した。この予期もしない Y136 リン酸化の増強もまた、TBB の治療効果に寄与することが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kazunori Sano, Yasushi Iwasaki, Yuta Yamashita, Keiichi Irie, Masato Hosokawa, Katsuya Satoh, Kenichi Mishima	4. 巻 9
2. 論文標題 Tyrosine 136 phosphorylation of α -synuclein aggregates in the Lewy body dementia brain: involvement of serine 129 phosphorylation by casein kinase 2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta neuropathologica communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-021-01281-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kazunori Sano	4. 巻 139
2. 論文標題 Real-time Quaking-induced Conversion Analysis of Prion-like Seeding Activity of Pathological α -Synuclein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 999 ~ 1005
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.18-00165-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kazunori Sano, Masato Hosokawa	4. 巻 139
2. 論文標題 Prion and Prion-like Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 987 ~ 987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.18-00165-F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐野和憲
2. 発表標題 プリオンとプリオン様タンパク質の シード依存的凝集反応
3. 学会等名 第32回 創薬・薬理フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀 有美子, 佐野 和憲, 森山 祐平, 窪 香澄, 山下 郁太, 入江 圭一, 三島 健一
2. 発表標題 In vitroプリオン様伝播モデルによるシヌクレイノパチー病原蛋白質の本体解明
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

〔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