

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H00501

研究課題名（和文）再構成系を用いたアミロイド伝播の統合的理解

研究課題名（英文）Amyloid propagation analysis by reconstitution system

研究代表者

田中 元雅（TANAKA, Motomasa）

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：40321781

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,500,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質が凝集して生成するシート構造に富んだ線維状凝集体であるアミロイドは多くの神経変性疾患に関与している。特に、アミロイドの脱凝集過程は疾患の発症や進行を制御し得ることが示唆されている。しかし、これまで技術的な制約もあり、アミロイドの凝集過程に比べて、脱凝集過程の解析は大きく立ち遅れていた。我々は様々な生物物理学的手法と新規な「in vitro最小数再構成系」を用いてアミロイドの脱凝集過程を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミロイドの脱凝集は凝集体を失わせるため、本研究の成果はアミロイドに関わる多くの神経変性疾患の治療に結びつく知見を与える。一方で、全ての凝集体を完全にモノマーにまで脱凝集できればよいのだが、もしそうでなければ、中途半端なアミロイドの脱凝集は細胞内にシードを多く産み出すため、それは細胞にとっては逆効果になることも考えられる。したがって今後は、本研究の成果をもとに、アミロイドの脱凝集をより深く理解することに加え、アミロイドの選択的な分解をも指向した研究を進めることで、神経変性疾患の予防や治療に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Disaggregation of amyloid fibrils is a fundamental biological process required for amyloid propagation. However, due to the lack of experimental systems, the molecular mechanism of how amyloid is disaggregated by cellular factors remains poorly understood. Here, we established a robust in vitro reconstituted system of yeast prion propagation and found that heat-shock protein 104 (Hsp104), Ssa1 and Sis1 chaperones are essential for efficient disaggregation of Sup35 amyloid. Real-time imaging of single-molecule fluorescence coupled with the reconstitution system revealed that amyloid disaggregation is achieved by ordered, timely binding of the chaperones to amyloid. Remarkably, we uncovered two distinct prion strain conformation-dependent modes of disaggregation, fragmentation and dissolution. We characterized distinct chaperone dynamics in each mode and found that transient, repeated binding of Hsp104 to the same site of amyloid results in fragmentation.

研究分野：構造神経科学

キーワード：アミロイド 脱凝集 酵母プリオン 伝播

1. 研究開始当初の背景

アミロイドが脱凝集していく速度は、アミロイドが生成する時の速度よりも、細胞の表現型（機能など）により大きな影響を与える(1)。つまり、モノマーからアミロイドが生じる際の速度も細胞へ与える影響として重要であるものの、一旦生じたアミロイドが脱凝集され、小さな断片（シード）を生じさせる速度の方が細胞の表現型に与える影響が大きい。実際に、アミロイドの脱凝集（分断）では、近隣の細胞に移ってモノマーを次々に凝集化させるための“アミロイド断片（シード）”が倍々で増えていくため、脱凝集速度が細胞全体へもたらす影響の重要性が理解できる。しかし、一旦生じたアミロイドが脱凝集されて“シード”を産み出す過程の解析は、これまで十分に行われていなかった。これまでの研究では(2)、酵母プリオン Sup35 のアミロイドが、Hsp104 という六量体をなす AAA+ ATPase であるシャペロンのみによって脱凝集されると示唆されているが、*in vitro* の実験では Hsp104 以外の細胞内因子が Sup35 アミロイドの脱凝集に必要であることや(3)、酵母の細胞を用いた *in vivo* の実験では、Hsp104 とは別の細胞内因子の発現量を変化させたり、その遺伝子に変異を導入すると、Sup35 アミロイドの伝播能が低下することが指摘されていた(4-7)。したがって、Hsp104 だけでなく他の細胞内因子も Sup35 アミロイドの脱凝集に深く関わっている可能性を示唆する(8, 9)ものの、Sup35 アミロイドの脱凝集機構を調べるための技術や優れた実験系が存在しなかったために、アミロイドの脱凝集に必要な因子およびそのメカニズムについては長い間、理解が進んでいなかった。

2. 研究の目的

Sup35 アミロイドを高効率に、再現性よく脱凝集させることができる *in vitro* (試験管内) の再構成系の開発を行い、Sup35 アミロイドの脱凝集分子機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

Hsp104 だけでなく、過去の文献から脱凝集に関わると予想されたシャペロンである Hsp70 ファミリーの Ssa1 や Hsp40 ファミリーの Sis1 に着目する。Hsp104 と併せてそれら三つのタンパク質を高純度に精製した。さらに、その品質や物性についても、生物物理学的手法を用いて厳密な評価、検査を行う。それらの確認できたシャペロン群を用いて、チオフラビン T の蛍光や全反射照明蛍光顕微鏡による解析などから、三つのシャペロン群がどのようにアミロイドに結合し、脱凝集させるのかを明らかにする。

4. 研究成果

Hsp104 だけではなく、三つのシャペロン、Hsp104/Ssa1/Sis1 が Sup35 アミロイドの脱凝集には必須であることを明らかにした。つまり、一つ、または二つのシャペロンだけでは Sup35 アミロイドに対して脱凝集活性をもたず、三つのシャペロンが存在しても ATP 非存在下や、ATPase 活性のない Hsp104 KT 変異体ではアミロイドの脱凝集は観察されなかった(10)。ATP 存在下で Hsp104/Ssa1/Sis1 の三つのシャペロンが存在するときだけ、Sup35 アミロイドを脱凝集させた。

このような新規な再構成系を開発できたため、次に、アミロイドの脱凝集過程を詳しく調べるためには、各シャペロンがどのような順序で、どれだけの時間だけアミロイド上に滞在しているのか調べた。そのため、バックグラウンドの蛍光を極力抑えた全反射照明蛍光顕微鏡(TIRF)の実

験系を立ち上げた。その結果、Ssa1 と Sis1 が予め複合体を作り、その複合体がまず Sup35 アミロイドに結合し、約 70 秒経ってから、Ssa1/Sis1 が結合した場所と同じ場所に Hsp104 が結合した。さらに、Hsp104 はその同じ部位において結合と解離を何度も繰り返すことが明らかになった。

一方で興味深いことに、Sup35 アミロイドの線維内には、各シャペロンは結合するものの、分断までは至らない箇所も観察できた。そこで、アミロイドが最終的に分断された部位と、最終的に分断には至らなかった部位との間でシャペロンの結合・解離の動態を比較した。その結果、最終的に分断された部位においては、Hsp104 が頻繁に繰り返し結合することによってアミロイドが分断されることが示唆された。

上記の研究は Sc4 と我々が呼んでいる Sup35 アミロイドを用いて行ったものである。Sc4 アミロイドとは、Sup35 のアミノ末端の約 40 アミノ酸がアミロイドのコアとなる領域を形成し、比較的脆弱な構造をしていることが我々の過去の研究から明らかになっている(11-13)。そこで、別の構造をしたアミロイドの脱凝集機構は異なるのではないかという仮説のもと、Sup35 のアミノ末端の約 70 アミノ酸がコア構造を形成するため、Sc4 よりも硬い構造である Sc37 と呼ぶアミロイドを用いて(1, 11, 14)、同様に TIRF を用いた脱凝集過程の解析を行った。その結果、興味深いことに、アミロイド線維に対して次々に穴ができて分断されるような現象がほとんど観察されず、Sc37 アミロイド全体が均一に解けてなくなっていく様子が観察され、その脱凝集様式を「溶解」と定義することにした。Sc37 アミロイドの脱凝集では、Hsp104 は結合・解離を繰り返すのではなく、Sc37 アミロイド上での Hsp104 の滞在時間は Sc4 の時に比べて長くなった。したがって、Sc37 アミロイド線維上では、Hsp104 がロックされた構造を取ってしまったことが示唆された。

以上から、本研究では、新規な再構成系を開発し、Sup35 アミロイドを効率的に、再現性よく脱凝集できる実験系を開発した。Sc4 と Sc37 という Sup35 アミロイドの構造の違いによって、脱凝集過程が大きく異なることを見出した。各シャペロンのアミロイドへの結合動態も Sc4 と Sc37 アミロイドでは異なっていた。アミロイド線維の構造をさらに詳しく調べたところ、アミロイド線維の形態が、Sc4 では波状を、Sc37 では直線状を示したことから両者で異なっており、それら構造の差異がシャペロンとの異なる結合をもたらし、ひいては異なる脱凝集様式を導いたと考えられた。

<引用文献>

- (1) Tanaka, M., Collins, S. R., Toyama, B. H. & Weissman, J. S. The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* **442**, 585-589 (2006).
- (2) Shorter, J. & Lindquist, S. Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers. *Science* **304**, 1793-1797 (2004).
- (3) Inoue, Y., Taguchi, H., Kishimoto, A. & Yoshida, M. Hsp104 binds to yeast Sup35 prion fiber but needs other factor(s) to sever it. *J. Biol. Chem.* **279**, 52319-52323 (2004).
- (4) Jung, G., Jones, G., Wegrzyn, R. D. & Masison, D. C. A role for cytosolic Hsp70 in yeast [*PSI*⁺] prion propagation and [*PSI*⁺] as a cellular stress. *Genetics* **156**, 559-570 (2000).
- (5) Jones, G. W. & Masison, D. C. *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 mutations affect [*PSI*⁺] prion propagation and cell growth differently and implicate Hsp40 and

- tetratricopeptide repeat cochaperones in impairment of [PSI⁺]. *Genetics* **163**, 495-506 (2003).
- (6) Higurashi, T., Hines, J. K., Sahi, C., Aron, R. & Craig, E. A. Specificity of the J-protein Sis1 in the propagation of 3 yeast prions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 16596-16601 (2008).
- (7) Tipton, K. A., Verges, K. J. & Weissman, J. S. In vivo monitoring of the prion replication cycle reveals a critical role for Sis1 in delivering substrates to Hsp104. *Mol. Cell* **32**, 584-591 (2008).
- (8) Doyle, S. M. & Wickner, S. Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 40-48 (2009).
- (9) Mogk, A., Kummer, E. & Bukau, B. Cooperation of Hsp70 and Hsp100 chaperone machines in protein disaggregation. *Front. Mol. Biosci.* **2**, 22 (2015).
- (10) Nakagawa Y., Shen C-h., Komi Y., Sugiyama S., Kurinomaru T., Tomabechi Y., Krayukhina E., Okamoto K., Yokoyama T., Shirouzu M., Uchiyama S., Inaba M., Niwa T., Sako Y., Taguchi H., Tanaka M. Amyloid conformation-dependent disaggregation in a reconstituted yeast prion system. *Nat. Chem. Biol.* **18**, 321-331 (2022).
- (11) Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R. & Weissman, J. S. Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* **428**, 323-328 (2004).
- (12) Ohhashi, Y., Ito, K., Toyama, B. H., Weissman, J. S. & Tanaka, M. Differences in prion strain conformations result from non-native interactions in a nucleus. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 225-230 (2010).
- (13) Shida, T., Kamatari, Y.O., Yoda, T., Yamaguchi, Y., Feig, M., Ohhashi, Y., Sugita, Y., Kuwata, K., & Tanaka, M. Short disordered protein segment regulates cross-species transmission of a yeast prion. *Nat. Chem. Biol.* **16**, 756-765 (2020)
- (14) Ohhashi, Y., Yamaguchi, Y., Kurahashi, H., Kamatari, Y.O., Sugiyama, S., Uluca, B., Piechatzek, T., Komi, Y., Shida, T., Müller, H., Hanashima, S., Heise, H., Kuwata, K. & Tanaka, M. Molecular basis for diversification of yeast prion strain conformation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **115**, 2389-2394 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Endo R., Chen Y.K., Burke J., Takashima N., Suryawanshi N., Hui K.K., Miyazaki T., Tanaka M.	4. 巻 120
2. 論文標題 Dysregulation of ribosome-associated quality control elicits cognitive disorders via overaccumulation of TTC3	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	6. 最初と最後の頁 e2211522120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2211522120	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 田中元雅、中川幸姫	4. 巻 77
2. 論文標題 アミロイドの脱凝集メカニズムを解明	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学	6. 最初と最後の頁 17-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 野村高志、田中元雅	4. 巻 94
2. 論文標題 疾患関連タンパク質の液-液相分離とアミロイドの生成・脱凝集	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 566-573
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa Y, Shen HC, Komi Y, Sugiyama S, Kurinomaru T, Tomabechi Y, Krayukhina E, Okamoto K, Yokoyama T, Shirouzu M, Uchiyama S, Inaba M, Niwa T, Sako Y, Taguchi H, Tanaka M	4. 巻 18
2. 論文標題 Amyloid conformation-dependent disaggregation in a reconstituted yeast prion system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat Chem Biol.	6. 最初と最後の頁 321-331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41589-021-00951-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hui KK, Endo R, Sawa A, Tanaka M	4. 巻 91
2. 論文標題 A Perspective on the Potential Involvement of Impaired Proteostasis in Neuropsychiatric Disorders	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biol Psychiatry	6. 最初と最後の頁 335-345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopsych.2021.09.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 玉井真悟、仲本準、田中元雅	4. 巻 60
2. 論文標題 アミロイドの代謝制御と構造多型	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 236-240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.60.236	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 Suryawanshi Nayan, Tanaka Motomasa	4. 巻 77
2. 論文標題 <scp>DISC1</scp> protein aggregates in cerebrospinal fluid as a potential diagnostic biomarker for first episode psychosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 630 ~ 630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcn.13604	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 井澤 俊明、稲葉 謙次、齊藤 知恵子、山本 林、関根 清薫、倉永 英里奈、野村 高志、田中 元雅	4. 巻 58
2. 論文標題 新たな顕微技術が明らかにする細胞内分子動態	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 66 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11410/kenbikyo.58.2_66	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 12件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 田中 元雅
2. 発表標題 新規な再構成系を用いたアミロイドの脱凝集機構解明
3. 学会等名 第63回日本神経病理学会総会学術研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 元雅、中川 幸姫、小見 悠介
2. 発表標題 アミロイド脱凝集過程の解析を通じたプロテオスタシス制御機構の解明
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Motomasa Tanaka
2. 発表標題 Cross-scale analysis of yeast prion propagation in cells
3. 学会等名 The 60th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Motomasa Tanaka
2. 発表標題 Engineered chaperone-mediated disaggregation and degradation of yeast prions
3. 学会等名 Asia Pacific Prion Symposium 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Motomasa Tanaka
2. 発表標題 Short disordered protein segment regulates cross-species transmission of a yeast prion
3. 学会等名 IUBMB Focused Meeting on Neurodegenerative Diseases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiko Nakagawa, Motomasa Tanaka
2. 発表標題 Amyloid conformation-dependent disaggregation revealed by a reconstituted yeast prion system
3. 学会等名 APPS2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Motomasa Tanaka
2. 発表標題 Engineered chaperone-mediated disaggregation and degradation of yeast prions
3. 学会等名 The 27th Biophysics Conference (Taiwan) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中 元雅
2. 発表標題 酵母に託すプリオン現象の解明
3. 学会等名 第24回酵母合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Motomasa Tanaka
2. 発表標題 Cross-scale analysis of amyloid-associated neurodegenerative disorders
3. 学会等名 The 3rd Meeting of Cross-Scale Biology: Transformative Research Area (A) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中 元雅
2. 発表標題 細胞ストレスに应答するアミロイド脱凝集酵素群の作用機序解明
3. 学会等名 第96回日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Motomasa Tanaka
2. 発表標題 Engineered chaperone-mediated disaggregation and degradation of yeast prions
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Motomasa Tanaka
2. 発表標題 Cross-scale analysis of amyloid structure and function
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Motomasa Tanaka
2. 発表標題 Engineered chaperone-mediated disaggregation and degradation of yeast prions
3. 学会等名 GRC Protein Folding (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 野村高志、田中元雅、他（日本化学会編）	4. 発行年 2023年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 173
3. 書名 生体分子環境の化学	

1. 著者名 田中元雅、遠藤良	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 「タンパク質の凝集化がかかわる精神障害の発現機構」、実験医学6月号	

1. 著者名 持田啓佑、田中元雅	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 7
3. 書名 「膜性オルガネラと非膜オルガネラのクロストーク」、実験医学増刊 -相分離 メカニズムと疾患-	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://motomasalab.riken.jp/>
アミロイドの脱凝集メカニズムを解明
https://www.riken.jp/press/2022/20220218_1/index.html
タンパク質の品質管理
<https://cbs2.riken.jp/magazine/06/#page=9>

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			
米国	カリフォルニア大学バークレー校			
米国	UCLA			