

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21579

研究課題名（和文）GPIアンカー修飾はアルファシヌクレイノパチーの病原性・伝達性を促進するか？

研究課題名（英文）Does GPI-anchored modification promote the pathogenicity and transmissibility of alpha-synucleinopathies?

研究代表者

新 竜一郎（Atarashi, Ryuichiro）

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：90452846

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）：本研究ではレビー小体病の病原タンパク質 シヌクレイン（Asyn）にGPIアンカーやプリオンタンパク（PrP）のC末側配列を付加し、その凝集様式・伝達への影響を解析し、その機構の理解を深めることを目的とした。発現ベクターの培養細胞への一過性導入によりGPI(+)Asynの発現が確認されたが、恒常的発現細胞を得ることはできなかった。後の解析により、GPI(+)Asynはプロテアソームでの分解が促進していることが見出された。一方、Asyn-PrP(100-231)融合リコンビナントタンパクをRT-QuIC法の基質として使用したところ、高い変換効率を示すことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プリオン病以外のタンパク質異常凝集性神経変性疾患（アルツハイマー病、レビー小体病等）の伝達性や病原性はプリオン病と比較すると相対的に低く、そのメカニズムに質的な違いがあることが想定される。本研究により、PrPの翻訳後修飾の一種であるGPIアンカーをAsynに人工的に付加した影響と、Asyn-PrP(100-231)融合リコンビナントタンパクを用いた異常凝集タンパク質試験管内増幅法であるRT-QuIC法によってアミロイド形成に関わる病原タンパク質は主に、N末側にあることが判明するなどの研究成果が得られた。これらにより病原タンパク質凝集体の伝達性機構の共通性と特異性についての理解がより深まった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to add the C-terminal sequence of GPI-anchor and prion protein (PrP) to α -synuclein (Asyn), a pathogenic protein of Lewy body disease, and to analyze its effect on aggregation patterns and transmission to better understand its mechanism. Transient transfection of the expression vector into cultured cells resulted in expression of GPI(+) Asyn, but permanent expression cells could not be obtained. Later analysis revealed that GPI(+)Asyn promotes degradation in the proteasome. The Asyn-PrP(100-231) fusion recombinant protein was used as a substrate for the RT-QuIC method and was found to have a high conversion efficiency.

研究分野：微生物学、神経変性疾患

キーワード：シヌクレイン プリオンタンパク GPIアンカー 融合タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病、レビー小体病、プリオン病などのタンパク質異常凝集が引き起こす神経変性疾患群は、加齢と共に罹患率が上昇し、日本を筆頭に高齢化の進む先進諸国において克服すべき重要な医学的社会的課題である。その解決にはそれら神経変性疾患の病態機構の解明が必要である。その研究も国内外で活発に行われているが、現時点では発展途上といえる。近年、これらの疾患の多くは、プリオン病と類似したメカニズムによって体内伝播されることが示されている。つまり、原因タンパク質が何らかの要因によりシード構造に富んだ異常凝集体(オリゴマー~アミロイドフィブリル)を神経系のある部位で自然形成する。それらが、正常構造の単量体の原因タンパク質を巻き込んで同様な異常構造の多量体を増幅し、体内に拡がっていくというドミノ反応に似た現象である。実際、プリオン病の原因タンパク質であるプリオンタンパク(PrP)以外にも、シヌクレイン(Asyn)、アミロイド(A)、タウタンパク(Tau)等の異常凝集体がプリオン様伝播を示すことを試験管内、培養細胞、動物への接種実験等により報告されている。すなわち、プリオン病で得られた知見がそれら様々なタンパク質凝集性神経変性疾患へと応用される可能性が広がっている。

一方、プリオン病と比較するとその他の神経変性疾患の伝達性や病原性は低く、そのメカニズムに質的な違いがあることも明らかである。その違いをもたらす要因と考えられるものとしてはまず、PrPのC末端に翻訳後修飾として付加されるGPIアンカーが考えられる。GPIアンカー修飾によりPrPは、細胞外に露出した状態で細胞膜表面のラフトに濃縮して存在するとされる。それに対してAは細胞外に分泌され、Asyn、Tauは細胞内に存在する。プリオン病においてはGPIアンカーの有無がその病理像に大きな影響を与えることが報告されている。次に原因タンパク質のアミノ酸配列自体が伝達性や病原性に与える影響が考えられる。PrPのC末領域は3つのヘリックスから成る安定的な構造を形成しているのに対して、Asyn、Tau、Aは通常、不安定なランダムコイル状で存在していることが知られている。

2. 研究の目的

本研究では、神経変性疾患の一種であるレビー小体病の原因タンパク質であるAsynにGPIアンカー修飾やPrPのC末領域を人工的に導入することによって凝集様式・疾患伝達性が変化するかについて解析する。それらによって、神経変性疾患の伝達性や病原性のメカニズムの共通性と特異性を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではAsynにGPIアンカー修飾を導入あるいはPrPのC末領域を融合することによってAsyn凝集体の伝達性メカニズムの共通性と特異性についての解明を目指し、次に掲げる項目について研究した。

(1) GPIアンカー修飾型Asyn発現ベクターの構築

GPI付加シグナルペプチドをAsynのN末とC末に導入し、それぞれのタンパク質へのGPIアンカー修飾型を構築した。GPI付加シグナルペプチドとしてはPrP由来のものを用いた。コントロールとしてのGPIアンカー修飾のない野生型のベクターも同時に作製した。

(2) GPIアンカー修飾型Asyn培養細胞での発現と解析

まず、構築した発現ベクターを培養細胞(N2a)に一過性に導入し、Asynの発現をウェスタンブロット等により確認した。次にPiggyBac Transposonシステムと薬剤(G418)セレクションによる安定発現細胞株の樹立を試みた。

(3) Asyn-PrP(100-231)融合タンパク質の発現・精製

Asyn の C 末に PrP(100 - 231) 配列を付加した融合タンパク質の大腸菌発現ベクターを構築した。大腸菌に発現誘導し、6M グアジニン塩酸塩で可溶化した後、金属アフィニティカラムに結合させ、FPLC を用いて On Column Refolding 法によってリコンビナントタンパク質を精製した。

(4) Asyn-PrP(100-231)融合タンパク質を反応基質とした RT-QuIC (Real-time Quaking-induced conversion) 法

反応基質として Asyn-PrP(100-231)融合タンパク質を、反応シードとしてはレビー小体病患者由来の脳乳剤を希釈したものをを用いて、試験管内異常凝集タンパク質増幅法 RT-QuIC を行い、その反応性について検証した。

4 . 研究成果

構築した GPI アンカー修飾型 Asyn 発現ベクターを培養細胞 (N2a 細胞) に一過性に遺伝子導入し、Asyn の発現をウェスタンブロットにより確認したところ、GPI アンカーが導入されたことを反映し、GPI アンカーのない通常の Asyn より分子量は上昇していた。また、発現細胞の抽出液から Triton X-114 による相分離で界面活性剤相において回収され、この結果も GPI アンカー修飾型 Asyn の一部が、GPI アンカーが付加され、界面活性剤相に回収されたことを示唆していると考えられた。

次に、安定発現細胞株を得るため、G418 による薬剤セレクションを行った。GPI アンカー修飾型でない通常の Asyn を安定的に発現する細胞株を得た一方、GPI アンカー修飾型 Asyn の安定発現細胞株を得ることはできなかった。一方、しかし、遺伝子レベルの導入は PCR で確認できたため、何らかの機構によって GPI アンカー修飾型 Asyn の発現が抑えられている可能性が考えられた。第一にプロテアソームで急速に分解されている可能性を考え、プロテアソーム抑制剤を投与して細胞抽出液を回収したところ、GPI アンカー修飾型 Asyn と想定されるタンパク質の発現の上昇を認めた。この結果は、おそらく GPI アンカー修飾型 Asyn は人工合成タンパク質であるため、プロテアソーム系での分解が上昇しており、そのためにウェスタンブロット上でシグナルを観察できないと考えられた。

Asyn の C 末に PrP(100 - 231) 領域を融合させた大腸菌由来リコンビナントタンパク質を精製し、反応基質、レビー小体病患者由来の脳乳剤をシードとした RT-QuIC 法を行った。その結果、Asyn 単独のリコンビナントタンパク質を反応基質とした場合と比較して、反応感度の上昇を認めた。一方、シードとしてプリオン病患者由来脳乳剤を用いた場合、陽性反応は起こらなかった。これらの結果は、シード依存的なアミロイド形成においては N 末側のアミノ酸配列によって規定されることを示唆している。

以上の結果により、タンパク質異常凝集性神経変性疾患の原因タンパク質である Asyn の凝集・伝達機構のプリオン病との共通性と特異性の一端が明らかとなった。

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
研究分担者	今村 守一 (Imamura Morikazu) (10391442)	宮崎大学・医学部・准教授 (17601)	

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