

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「細胞外微粒子に起因する生命現象の解
明とその制御に向けた基盤技術の創出」
研究課題「神経変性の原因となるタンパク質微粒子
の形成と伝播機構」

研究終了報告書

研究期間 2018年10月～2024年03月

研究代表者：長谷川 成人
(東京都医学総合研究所 脳・神経科
学研究分野 分野長)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

1) 病原性タンパク質微粒子の形成と伝播機構 (代表 長谷川グループ)

長谷川グループは、神経変性疾患の患者脳に蓄積する病原タンパク質微粒子の形成機構を解明するため、実際の患者に蓄積するタンパク質線維(微粒子)の解析に取り組むと共に、患者由来のタンパク質微粒子を用いた培養細胞モデル、動物モデルの構築と解析を進めた。認知症や神経難病の特徴的病理を構成するタンパク質微粒子は、その病態形成の根幹をなし、その構造解明は本研究の最終目標であるタンパク質微粒子の形成、伝播機構の解明に直接つながるものである。英国 MRC 分子生物学研究所の Goedert、Scheres、Falcon 博士らとの国際共同研究により、様々な神経変性疾患脳に蓄積する異常タンパク質線維の構造解析を行った。タウが蓄積する疾患として知られているタウオパチーについては、主な疾患についてタウの折りたたみ構造を解明することに成功した。また、パーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症の患者脳に蓄積する α シヌクレインについても構造解明に成功し、パーキンソン病とレビー小体型認知症は同じ構造であり、同類の疾患に分類されるのに対し、多系統萎縮症の α シヌクレインは異なる構造をとっていることが示された。また、ALS や FTLD 脳に蓄積する TDP-43 については、タウや α シヌクレインより量的に少なく困難であったが、TDP-43 線維を抽出し、A 型と B 型の FTLD-TDP 患者に蓄積する線維の構造解明に成功した。また、様々な疾患脳や脳疾患のない剖検脳の不溶性画分の解析から、リソゾーム膜タンパク質の一種である TMEM106B がリソゾームの内腔側で切断を受け、アミロイド線維の形となって蓄積していることがクライオ電顕解析によって明らかとなった。TMEM106B は FTLD のリスクファクターとして知られていたが、老化に関連してアミロイド線維を形成することが示唆された。これら患者由来の異常タンパク質線維が培養細胞内で正常型タンパク質を異常型に変換するのか、またそれはどこまで正確かについて、培養細胞に患者脳由来の異常タンパク質線維を導入、増幅し、その生化学、超微細形態、原子構造、翻訳後修飾について解析した。解析の結果、疾患脳から単離したタウ線維は、培養細胞に発現させた正常型タウをほぼ同じ折りたたみ構造のタウ線維に変換することが示された。また、異常リン酸化についても患者脳のタウ線維にみとめられるものと同じものが再現された。タウオパチーの動物モデルについては、3R タウと 4R タウをヒトと同じ割合で発現するマウスを CRISPR-Cas9 の技術を駆使して作出し、患者由来のタウ線維をシードとして接種することで各種タウオパチーの病態を再現することに成功した。

2) 細胞内のタンパク質微粒子に対する品質管理機構 (分担 吉田グループ)

吉田グループは、病原性タンパク質微粒子のユビキチン化に着目し、病原性タンパク質微粒子の形成や放出型への転換のユビキチン化の寄与を調べることを目的として研究を行った。病原性タンパク質微粒子の形成を迅速に定量化するシステムとして微粒子形成を可視化する細胞を樹立した。 α シヌクレインとタウに蛍光タンパク質を融合したタンパク質を恒常的に発現する SH-SY5Y と HeLa 細胞を樹立した。

ユビキチン化が微粒子形成に及ぼす影響を調べるために、 α シヌクレインでユビキチン化が起こることが報告されている 7 カ所のリジン残基をすべてアルギニンに置換した 7KR を作成し、ユビキチン化されない α シヌクレインを発現させ、微粒子形成能の比較を行った。HeLa 細胞において、ユビキチン化が起こらない 7KR の α シヌクレインにおいて有意に形成効率が向上した。また、プロテアソーム活性を減弱させた細胞においては、7KR α シヌクレインで形成効率が高まることから、ユビキチン化は微粒子形成に負に働くと考えられた。

新たな微粒子形成時に α シヌクレインと相互作用する分子の取得のために、split-TurboID 法により検討を行った結果、中間径フィラメントやヘリケースなど新規相互作用分子が得られたものの、これらのノックダウンによる微粒子形成への影響は残念ながら認められなかった。

3) タンパク質微粒子の神経活動依存的放出機構 (分担 山田グループ)

山田グループでは、5 年間の研究期間内に異常型タンパク質微粒子を脳細胞外液におい

て特異的かつ鋭敏に検出する新規実験系の構築を達成した。

また、新たな展開として、細胞外タウタンパク質の *glymphatic system* によるクリアランス経路を同定することに成功した。*Glymphatic system* によるタウタンパク質除去経路が、長期的に抑制されるとタウ蓄積や神経変性が増悪することから、*glymphatic system* は、本研究課題で目指す細胞外微粒子伝播機構の解明においても重要であると考えられた。研究全体を通じて、異常タウタンパク質微粒子の細胞外動態の理解が飛躍的に進んだだけでなく、 α シヌクレインや TDP-43 など、タウ同様に細胞間を伝播する異常タンパク質の検出にも広く応用可能な実験系を構築することができた。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. タウ線維の異常構造による神経変性タウオパチーの分類 (*Nature 2020a, Nature 2021*)

概要: 微小管結合タンパク質タウが線維化し細胞内に蓄積する疾患はタウオパチーと総称され、アルツハイマー病を含め、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺など様々な疾患がある。今回、クライオ電顕解析の国際共同研究により、これら疾患脳のタウ線維の構造を世界ではじめて明らかにし、疾患病型の違いがタウの立体構造の違いによって分類されることを提唱した。異常型タンパク質の構造が疾患病型を規定し、プリオン様に増幅、伝播することで同じ構造が脳内に広がり病気が進行する考えを強く支持するものである。

2. ALS 患者脳に蓄積する TDP-43 線維構造の解明 (*Nature2022a*)

概要: 神経難病 ALS や若年性認知症 FTLD 患者脳には核タンパク質の一種である TDP-43 が線維化して蓄積し、神経変性を引き起こす。今回、研究代表者は医学研、愛知医大、MRC の 3 施設の国際共同研究により、認知症を伴う ALS 患者脳に蓄積する TDP-43 線維のクライオ電顕解析を実施し、その異常構造を世界で初めて明らかにすることに成功した。難病 ALS の原因解明や治療法の開発に極めて重要で、社会的にも大きなインパクトを与える成果である。

3. A 型病理を示す FTLD 患者脳に蓄積する TDP-43 線維の構造解明 (*Nature 2023*)

概要: TDP-43 の異常蓄積を認める TDP-43 プロテインオパチーはその病理学的特徴によって、少なくとも A-D の 4 型が知られており、ALS は B 型に分類される。A 型の病理をとる *GRN* 変異の 2 例の患者と 1 例の孤発例から TDP-43 線維を抽出し、MRC とクライオ電顕解析の共同研究を実施し、その構造を解明した。TDP-43 線維は、ALS とは異なるシェブロンバジ様の折りたたみをとって線維を形成していることが判明し、TDP-43 の異なる折りたたみ構造によって異なる疾患が引き起こされることが示唆された。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. パーキンソン病とレビー小体型認知症、及び多系統萎縮症患者脳に蓄積する α シヌクレイン線維の構造解析 (*Nature 2020b, Nature2022b*)

概要: パーキンソン病(PD)、レビー小体型認知症(DLB)、及び多系統萎縮症(MSA)は α シヌクレインの異常蓄積病変を伴う疾患であり、 α シヌクレインは線維構造をとって蓄積することが知られている。今回、それぞれの疾患脳から α シヌクレイン線維を調製し、クライオ電顕解析によってそれらの構造解析を解明した。PD と DLB 患者の α シヌクレイン線維はいずれも同じ折りたたみ(レビーフォールド)構造をとって一本の線維を形成していたのに対し、MSA 患者の α シヌクレイン線維はそれと異なり、2 本の異なるプロトフィラメントがコファクターを介して結合し、ねじれた線維を形成していることが判明した。本成果は α シヌクレインオパチーの診断、治療につながることを期待される。

2. タウオパチー患者脳由来のタウ線維による鋳型依存的タウ線維形成(*Brain 2021, FEBS Open Bio2023, Brain2023*)

概要: タウオパチー患者脳には、疾患ごとに特徴的なタウ線維からなる病理構造物が知られている。培養細胞に HA や FLAG タグを付加したタウを発現し、患者由来のタウ線維を細胞に導入すると、それを鋳型として細胞内に発現した正常型タウが線維化することを見出した。培養細胞内で線維化しタウの構造をクライオ電顕で解析すると、元の構造が反映された構造に変換されていること、タウの異常リン酸化も患者脳に近いものに再現されることが明らかとなった。培養細胞内でタウの異常構造が増幅、伝播することを再現するものであり、病態機序の解明だけでなく、診断薬や凝集阻害薬などの開発に有用と思われる。

3. ALS/FTLD 患者脳に蓄積する TDP-43 線維構造の解明 (*Nature* 2022, 2023)

概要: ALS や FTLD の原因となる TDP-43 の異常に関して、TDP-43 もタウや α シヌクレインと同じようにアミロイド様線維を形成し、細胞内に蓄積していること、またその折りたたみ構造を解明することができた。細胞間を伝播して同じ病理構造が広がるメカニズムを構造化学的に説明しうるものであり、今後の診断法の開発や治療薬開発につながることを期待される。

<代表的な論文>

1. ALS 患者脳に蓄積する TDP-43 線維の構造

Structure of pathological TDP-43 filaments from ALS with FTLD. Diana Arseni, Masato Hasegawa, Alexey G Murzi, Fuyuki Kametani, Makoto Arai, Mari Yoshida, Benjamin Ryskeldi-Falcon. *Nature* 2022 (601) 139-143.

概要: 神経難病 ALS や若年性認知症の FTLD 患者脳には核タンパク質の TDP-43 が線維化して蓄積し、神経変性を引き起こす。今回、研究代表者は医学研、愛知医大、MRC の 3 施設の国際共同研究により、認知症を伴う ALS 患者脳に蓄積する TDP-43 線維のクライオ電顕解析を実施し、その異常構造を世界で初めて明らかにすることに成功した。難病 ALS の原因解明や治療法の開発に極めて重要で、社会的にも大きなインパクトを与える成果である。

2. タウ線維の異常構造による神経変性タウオパチーの分類

Structure-based classification of tauopathies. Yang Shi, Wenjuan Zhang, Yang Yang, Alexey G Murzin, Benjamin Falcon, Abhay Kotech, Mike van Beers, Airi Tarutani, Fuyuki Kametani, Holly J Garringer, Ruben Vidal, Grace I Hallinan, Tammarnyn Lashley, Yuko Saito, Shigeo Murayama, Mari Yoshida, Hidetomo Tanaka, Akiyoshi Kakita, Takeshi Ikeuchi, Andrew C Robinson, David M A Mann, Gabor G Kovacs, Tamas Revesz, Bernardino Ghetti, Masato Hasegawa, Michel Goedert, Sjors H W Scheres. *Nature* 2021 (598) 359-363.

概要: 微小管結合タンパク質タウが線維化し細胞内に蓄積する疾患はタウオパチーと総称され、アルツハイマー病を含め、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺など様々な疾患がある。今回、クライオ電顕解析の国際共同研究により、これら疾患脳のタウ線維の構造を世界ではじめて明らかにし、疾患病型の違いがタウの立体構造の違いによって分類されることを証明した。異常型タンパク質の構造が疾患病型を決定し、プリオン様に増幅、伝播することで同じ構造が脳内に広がり病気が進行する考えを強く支持する。

3. パーキンソン病とレビー小体型認知症患者脳に蓄積する α シヌクレイン線維の構造解析

Structures of α -synuclein filaments from human brains with Lewy pathology. Yang Yang, Yang Shi, Manuel Schweighauser, Xianjun Zhang, Abhay Kotecha, Alexey G. Murzin¹, Holly J. Garringer, Patrick W. Cullinane, Yuko Saito, Tatiana Foroud, Thomas T. Warner, Kazuko Hasegawa, Ruben Vidal, Shigeo Murayama, Tamas Revesz, Bernardino Ghetti, Masato Hasegawa, Tammarnyn Lashley, Sjors H W Scheres, Michel Goedert. *Nature* 2022 (610) 791-795.

概要: パーキンソン病やレビー小体型認知症(DLB)の患者脳にはレビー小体と呼ばれる特徴的な病理構造物が認められ、線維化した α シヌクレインが主要構成成分である。今回、パーキンソン病、認知症を伴うパーキンソン病、レビー小体型認知症の患者脳から α シヌクレイン線維を調製し、クライオ電顕解析によってその構造を世界ではじめて解明することに成功し

た。その線維中心は α シヌクレインの31番目のグリシンから100番目のロイシンが特徴的な折りたたみ(レビーフォールド)をとり、積み重なって一本の線維を形成していることが判明した。

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「長谷川」グループ

研究代表者:長谷川 成人(公益財団法人 東京都医学総合研究所 脳・神経科学研究分野 分野長)

研究項目

- ・培養細胞におけるタンパク質微粒子結合タンパク質の同定
- ・病態モデル及び患者脳脊髄液のタンパク質微粒子の解析
- ・患者脳に蓄積する異常タンパク質の構造解析

② 「吉田」グループ

主たる共同研究者:吉田 雪子(公益財団法人 東京都医学総合研究所 生体分子先端研究分野 主席研究員)

研究項目

- ・タンパク質微粒子のユビキチン化の解析
- ・ユビキチン化によるタンパク質微粒子の品質管理機構の解析
- ・タンパク質微粒子の可視化による生細胞イメージング

③ 「山田」グループ

主たる共同研究者:山田 薫(東京大学大学院 医学系研究科 助教)

研究項目

- ・病原性タンパク質微粒子の放出・伝播の *in vivo* 検出系の確立
- ・タンパク質微粒子伝播の神経活動依存性に関する検討

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

長谷川グループ:クライオ電顕解析を用いたタンパク質線維(微粒子)の構造解析については、英国 MRC Laboratory of Molecular Biology の Michel Goedert 博士、Sjors Scheres 博士、Benjamin Falcon 博士らと連携して進めている。

また、患者剖検脳については、愛知医大の吉田眞理教授、大阪大学の村山繁雄教授、日本ブレインバンクネット、マンチェスターブレインバンクなど、多くの神経病理研究者との連携、共同研究が実施されており、患者脳に蓄積する異常タンパク質の病理、生化学、構造、遺伝子などを統合的に解析していくネットワークが形成されている。

山田グループ: Glymphatic system を介した細胞外タウ動態に関しては、慶応大学安井正人教授と連携して進めている。