

2023年5月11日

報道機関 各位

国立大学法人東北大学

神経変性疾患原因タンパク質の 液-液相分離と凝集のプロセスを観測 発症機構の理解と治療法開発へ期待

【発表のポイント】

- 筋萎縮性側索硬化症(ALS)やパーキンソン病に代表される神経変性疾患^{注1}の発症の原因とされるタンパク質について、液-液相分離状態を経由した凝集過程を観測することに成功しました。
- 神経変性疾患の一つであるマシヤドジョセフ病^{注2}の原因タンパク質アタキシン3が、液-液相分離後、複数の構造変化のステップを経て凝集することがわかりました。
- 液-液相分離状態をターゲットとした創薬への展開が期待されます。

【概要】

液-液相分離とは水と油のように二相の液相に分かれる現象であり、細胞内では生体分子が高濃度に存在する液相(液滴)を形成します。液滴は様々な生理機能を発揮しますが、タンパク質が液滴を形成すると凝集を引き起こし、神経変性疾患等を誘起することも提案されています。

東北大学大学院薬学研究科の中林孝和教授らは、紫外蛍光寿命顕微鏡を製作し、液滴内のタンパク質の構造変化を液滴のままの状態で測定する手法を確立しました。この手法を用いて、小脳の神経細胞の機能不全により引き起こされるマシヤドジョセフ病^{注2}の原因タンパク質、アタキシン3について、液滴から凝集体になる過程の構造変化を観測することに成功しました。

本手法により、薬剤添加に伴う液滴内のタンパク質の構造変化を観測することも可能です。今後、本手法は疾患に対する薬剤効果の検証など、創薬に応用できると期待されます。

本成果は2023年4月19日(水)に科学誌 Scientific Reports に掲載されました。

【詳細な説明】

研究の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)やパーキンソン病に代表される神経変性疾患は、特定のタンパク質の凝集体が神経細胞に蓄積することにより生じると考えられています。タンパク質の凝集がなぜおこるのか、未だに明らかにされていませんが、近年では液-液相分離と呼ばれる現象を介して凝集体が生じることが提案されています。液-液相分離は単一の液相が水と油のように二相の液相に分かれる現象です。細胞内においても液-液相分離が起こり、タンパク質や核酸などが高濃度に存在する液相(液滴)が生じることが知られています。液滴は様々な生理現象に重要な役割を果たしますが、タンパク質の液滴は時間経過や何らかの刺激により凝集体へと変化します。このことから神経変性疾患に関与するタンパク質が液滴状態を経て凝集することで、神経変性疾患を生じるモデルが提示されました。凝集体をターゲットとした神経変性疾患の薬剤を開発するためには、液滴中においてタンパク質がどのような構造を持ち、どのような構造変化を経て凝集するのかを明らかにすることが重要です。しかし、液滴の状態ではタンパク質の構造変化をその場観測する適切な手法がありませんでした。

今回の取り組み

上記の背景をもとに、私達はタンパク質内のアミノ酸残基から放出される蛍光(自家蛍光)を観測できる紫外光励起蛍光寿命顕微鏡を構築しました。アミノ酸残基からの蛍光はアミノ酸の周囲の環境によって変化します。特にトリプトファン(Trp)からの蛍光は、周囲の環境変化に対して鋭敏に変化し、タンパク質の構造変化を捉えることができます。このため液-液相分離を生じたタンパク質内の Trp 蛍光を観測することにより、タンパク質の構造変化の過程を追跡することに着目しました。また、本装置では蛍光強度のみではなく蛍光寿命^{注3}も観測できる仕様となっており、定量性を増加させています。製作したシステムを用いて、液滴から凝集体への変化に伴うタンパク質の構造変化を前処理なくその場で測定することができます。

本研究ではこの装置を用いて、遺伝性の神経変性疾患マシヤドジョセフ病の原因タンパク質アタキシン 3 に応用しました。アタキシン 3 の凝集体が神経を圧迫し、病気を引き起こすことが提案されています。私達は過去の研究においてアタキシン 3 が液滴を形成することを示しており、今回、液滴から凝集体形成までの構造変化の観測を行いました。アタキシン 3 には C 末端側にグルタミンが多数連結したポリグルタミン鎖(polyQ)があり、この polyQ が 40 残基を越え異常伸張することで凝集が促進されることが知られています。

PolyQ の長さが 28 残基(Q28、非病原性)のアタキシン 3 が形成した液滴の顕微鏡画像および Trp 由来の自家蛍光画像を図 1 に示します。液-液相分離直後は円形の液滴が観測されましたが、時間とともに歪んだ形状のものやモザイク状の構造体が増加しました。この結果は、液滴内のタンパク質が徐々に凝集体となることを示しています。Q28 の自家蛍光寿命およびスペクトルの時間変化を図 2 に示します。自

自家蛍光寿命と波長は時間とともに長くなりました。このことは液滴内の Q28 が凝集する過程で徐々に立体構造が解消することを意味しています。Trp を他のアミノ酸に置換した Q28 の変異体を用いて同様の測定を行うことで、立体構造変化の詳細を明らかにし、複数の構造変化の過程を経て凝集することがわかりました(図 3)。また、液滴を経由して生成した凝集体と経由しないで生成した凝集体を比較すると、凝集体内部のタンパク質の構造が異なることがわかりました。液滴を経由しない凝集は polyQ の伸長によって促進されることが知られていますが、液滴を経由する凝集では、polyQ の長さを 2 倍以上に増加させても同じ時間スケールで構造変化を示しました。これらの結果は、液滴内部でのアタキシン 3 の凝集機構が水溶液中とは異なることを示しています。

今後の展開

本研究では液滴内部のタンパク質の構造変化をあるがままの状態を観測する手法を確立しました。液滴は神経変性疾患の原因となるタンパク質凝集体の中間体であると提案されています。液滴内部のタンパク質の構造変化を理解できれば、液滴を解消するような治療法開発の手掛かりとなります。

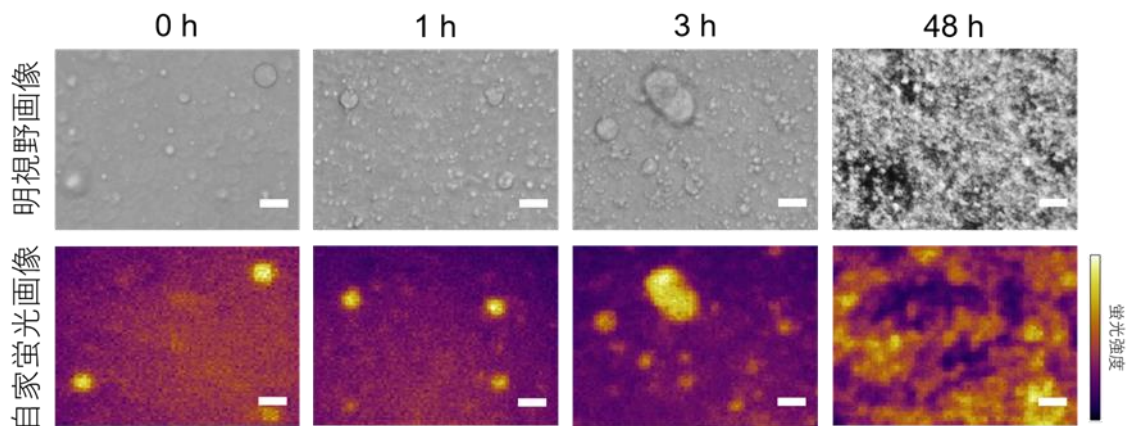


図 1. 液-液相分離により生成したアタキシン 3(Q28)の液滴の明視野画像と自家蛍光画像。時間の経過とともに液滴が真円形から歪んだ形状となり、最終的に凝集体となりました。液滴や凝集体に強い自家蛍光が観測されることから、それらの内部にタンパク質が局在していると考えられます。

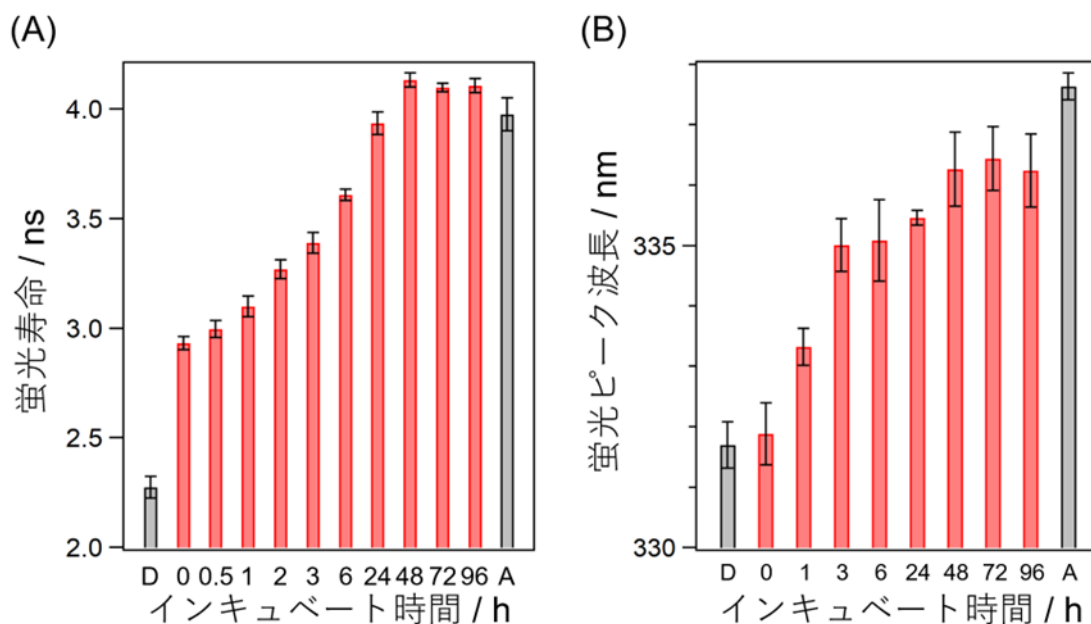


図 2. アタキシン 3(Q28) の自家蛍光寿命と自家蛍光スペクトルのピーク波長の時間変化。横軸の数値は液滴のインキュベート時間、D は液滴を形成していない水溶液中、A は凝集体を示す。蛍光寿命とピーク波長が時間とともに長くなることから、液滴内の Q28 が凝集の過程で立体構造の解消を起こすことが示されました。

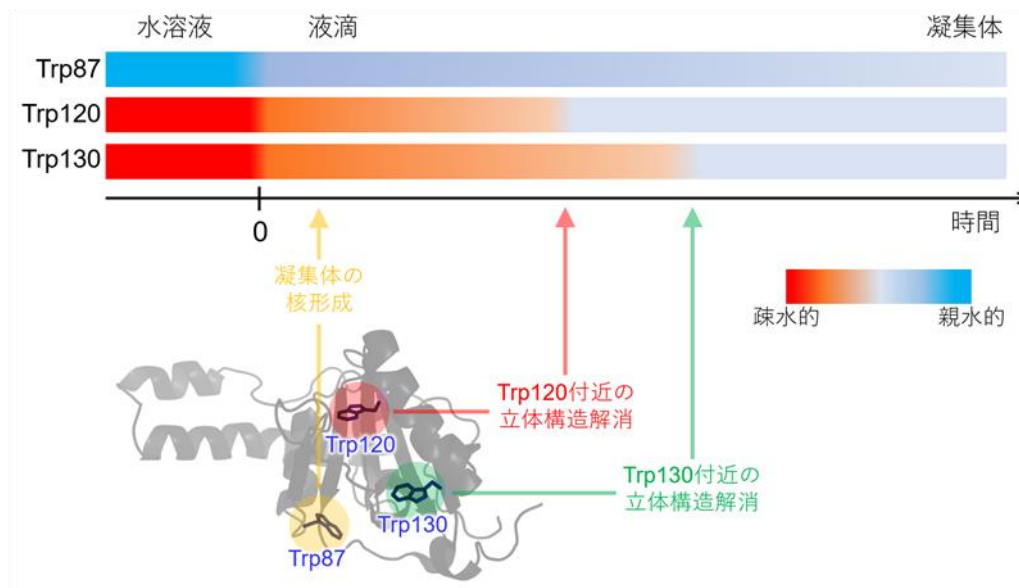


図 3. アタキシン 3(Q28) のタンパク質構造変化。時刻 0 でアタキシン 3(Q28) が液-液相分離を起こします。数時間以内に Trp87 付近の構造変化を伴う凝集体の核形成が起こり、その後 Trp120 周囲の立体構造の解消が生じ、続いて Trp130 周辺の立体構造の解消が起こることが明らかとなりました。

【謝辞】

本研究は科学研究費補助金若手研究(課題番号 JP21K15238)、挑戦的研究(萌芽)(課題番号 JP20K21468)、基盤研究(B)(課題番号 JP22H02594)の支援を受けて行われました。

【用語説明】

注1. 神経変性疾患

脳や脊髄の神経細胞の機能不全を原因とする疾患の総称です。運動障害や記憶障害が主たる症状であり、代表的なものに筋萎縮性側索硬化症(ALS)やパーキンソン病、アルツハイマー病などがあります。いずれの疾患においても特定のタンパク質の凝集体が神経細胞内に堆積することが原因であると言われています。

注2. マシヤドジョセフ病

小脳の神経細胞の機能不全により引き起こされる脊髄小脳変性症の一つです。マシヤドジョセフ病はその中でも日本人に最もよく見られる疾患です。歩行時のふらつきやろれつが回らないなどといった運動失調を特徴とした疾患であり、根本的な治療法はまだ確立していません。

注3. 蛍光寿命

分子は光を吸収した後、数ナノ秒程度の短い時間の中に蛍光を放出します。蛍光寿命はその放出時間の長さを示す物理量です。観測される蛍光寿命の値は、光による試料の損傷の影響を受けにくい長所があり、分子周囲の環境を定量的に評価することに用いられます。

【論文情報】

タイトル: Label-Free Autofluorescence Lifetime Reveals the Structural Dynamics of Ataxin-3 Inside Droplets Formed via Liquid-Liquid Phase Separation

著者: Uchu Matsuura、Shinya Tahara*、Shinji Kajimoto、Takakazu Nakabayashi*

*責任著者: 東北大学大学院薬学研究科 助教 田原進也、教授 中林孝和

掲載誌: Scientific Reports

DOI: 10.1038/s41598-023-33268-y

URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-023-33268-y>

【問い合わせ先】

(研究に関すること)

東北大学大学院薬学研究科

教授 中林孝和

TEL: 022-795-6855

E-mail: takakazu.nakabayashi.e7@tohoku.ac.jp

(報道に関すること)

東北大学大学院薬学研究科

総務係

TEL: 022-795-6801

E-mail: ph-som@grp.tohoku.ac.jp