

博士学位論文審査要旨

2020年1月28日

論文題目: Preserved structural property after amplification of alpha-synuclein aggregates from brains of synucleinopathies (シヌクレイノパチー脳における α -シヌクレイン凝集体の増幅と増幅後の構造特性)

学位申請者: 吉永 早希

審査委員:

主査: 脳科学研究科 教授 藤山 文乃

副査: 脳科学研究科 教授 高森 茂雄

副査: 脳科学研究科 教授 元山 純

要旨:

神経変性疾患には異常な構造をもったタンパク質が凝集し、脳のある特定の場所の神経細胞内に蓄積して細胞死を引き起こすという共通の特徴がある。そのタンパク質として、 α -シヌクレイン(α -syn)、タウなどが挙げられる。 α -synが蓄積する神経変性疾患(シヌクレイノパチー)にはパーキンソン病(PD)の他、レビー小体型認知症(DLB)や多系統萎縮症(MSA)などがある。同じタンパク質にも関わらず異なる部位に異常タンパク質となって蓄積し、神経変性疾患を患うが生化学的にも構造学的にも原因は明らかとなっていない。

本学位研究では、「同じタンパク質由来の疾患でも異なるタンパク質構造を持つ」という仮説のもと、シヌクレイノパチー脳であるDLB脳とMSA脳を用いて疾患脳由来の異常 α -synの構造解析を行った。まず、微量な異常型 α -synを検出出来る系の構築を可能にし、次に、疾患脳由来の異常 α -synに富んだ分画を得るためにリコンビナント異常型マウス α -synをインジェクションしたマウス脳で検討を行い、分画方法を確立した。確立した分画方法でDLB脳とMSA脳由来SDS不溶性ペレットを得て、スメア標本作製しDAB染色を行ったところ、疾患脳といくつかのコントロール脳において異常 α -synの存在が確認された。疾患脳とコントロール脳において β -シート構造のアミロイド線維に結合するチオフラビンT測定下でSeeding反応を行ったところ、疾患脳由来の異常 α -synによって正常型 α -synがシードに依存した異常型 α -synへ構造変化し、増幅されたことが確認された。また、Seeding反応で得た疾患特異的な異常型 α -synを用いてProtein misfolding cyclic amplification(PMCA)を用いて増幅させたところ、高濃度の疾患脳由来異常型 α -synの獲得に成功した。

本学位論文の骨子となる成果は、国際的な学術誌であるBiochem Biophys Res Communに筆頭著者として既に公刊されている。

よって、本論文は、博士(理学)(同志社大学)の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2020年1月28日

論文題目： Preserved structural property after amplification of alpha-synuclein aggregates from brains of synucleinopathies (シヌクレイノパチー脳における α -シヌクレイン凝集体の増幅と増幅後の構造特性)

学位申請者： 吉永 早希

審査委員：

主査： 脳科学研究科 教授 藤山 文乃

副査： 脳科学研究科 教授 高森 茂雄

副査： 脳科学研究科 教授 元山 純

要 旨：

吉永氏は、2015年4月に本学大学院脳科学研究科発達加齢脳専攻一貫制博士課程に入学し、現在在籍中である。本研究科病態脳科学分野認知記憶加齢部門において細胞生物学的および構造生物学的アプローチによって、神経変性疾患に関与する異常タンパク質に関する研究活動に研鑽した。

2020年1月28日午前10時から約1時間半にわたり学位論文に関する公開発表を行い、英語によるプレゼンテーションと質疑応答を行った。プレゼンテーションでは、研究の背景、目的、方法、結果、結論、考察が過不足なく適切に述べられ、質疑応答に関しても申請者の丁寧な説明により十分な理解が得られたと評価できる。先行研究についての知識も豊富で、当該研究領域全般に亘る専門知識も十分であると認められた。

更に、公開発表後に、審査委員により論文内容および関連する脳科学分野の諸問題について、非公開の口頭試問を実施した結果、本論文提出者は研究者として十分な学力と、国際的に活躍するために語学力（英語）を有していることが認められた。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

論文題目： Preserved structural property after amplification of alpha-synuclein aggregates from brains of synucleinopathies(シヌクレイノパチー脳における α -シヌクレイン凝集体の増幅と増幅後の構造特性)

氏名： 吉永 早希

要旨：

神経変性疾患には異常な構造をもったタンパク質が凝集し、脳のある特定の場所の神経細胞内に蓄積して細胞死を引き起こすという共通の特徴がある。そのタンパク質として、 α -シヌクレイン(α -syn)、タウなどが挙げられる。 α -synが蓄積する神経変性疾患(シヌクレイノパチー)にはパーキンソン病(PD)の他、レビー小体型認知症(DLB)や多系統萎縮症(MSA)などがある。同じタンパク質にも関わらず異なる部位に異常タンパク質となって蓄積し、神経変性疾患を患うが生化学的にも構造学的にも原因は明らかとなっていない。

近年の先行研究ではリコンビナント α -syn において MS 解析やクライオ電子顕微鏡による解析を行うことで、異なる性質や構造を持った異常型 α -syn の報告が出ている(W. Peelaerts et al. Nature, 2015)(Li B et al. Nat Commun, 2018)。また、タウが蓄積する神経変性疾患(タウオパチー)において疾患脳ホモジェネートを細胞に導入したところ、疾患ごとに形状の異なる異常型タウの封入体を形成するという報告も出ている(David W. Sanders et al. Neuron, 2014)。

私は「同じタンパク質由来の疾患でも異なるタンパク質構造を持つ」と考えた。つまり、シヌクレイノパチーの中でも DLB と MSA で蓄積する異常 α -syn の構造が異なるのではないかとということである。

神経変性疾患の異常型タンパク質は正常型タンパク質と *in vitro* でインキュベートすると鑄型となって正常型タンパク質の構造変化を促進し、異常型タンパク質に変化させて短時間で凝集する性質(Seeding 反応)が知られている。また、この Seeding 反応を応用した方法として主にプリオンタンパク質で用いられている Protein misfolding cyclic amplification(PMCA)がある。PMCA を用いると超低濃度の異常型タンパク質でも基質となる正常型タンパク質の構造変化を促進し、異常型タンパク質が増幅され、多くの異常型タンパク質を得ることが出来る。

我々はこれまでリコンビナント変異型 α -syn を用いてシークエンスが異なる異常型 α -syn では凝集体のプロテアーゼ K 耐性コアの MS 解析や電子顕微鏡による解析を行うことで構造多型の異常型 α -syn が存在し、区別できることを報告した。また、Seeding 反応を介した凝集体の解析によりシード構造依存性多型フィブリルの存在も同様の解析を用いて報告した。

仮説を証明するにあたり、神経変性疾患脳に由来する異常タンパク質を用いて解析をする必要がある。そこで我々はシヌクレイノパチー脳である DLB 脳と MSA 脳を用いて疾患脳由来の異常 α -syn の構造解析を行った。

これまでの研究で疾患脳由来の異常タンパク質の構造解析が出来ていない理由として、「疾患脳に含まれる異常タンパク質の取れる量は少ない。凝集性が高く構造決定が出来る状態ではない。」という問題があった。そこで構造決定するために、疾患脳から異常タンパク質に富んだ分画を得て、Seeding 反応と PMCA を利用して疾患特異的な異常タンパク質を増幅することで解析出来ないかと考え、研究を行なった。

最初に PMCA の効率をリコンビナント異常型 α -syn を用いて調査した。自己凝集を抑える方法を考え PMCA を行った結果から、少なくとも終濃度 50 fM の異常型 α -syn をシードとした場合でも増幅が可能であることが分かった。本研究の結果は、他の先行研究以上に微量な異常型 α -syn を検出出来る系の構築を可能にした。

次に、疾患脳由来の異常 α -syn に富んだ分画を得るためにリコンビナント異常型マウス α -syn を

インジェクションしたマウス脳で検討を行い、分画方法を確立した。確立した分画方法で DLB 脳と MSA 脳由来 SDS 不溶性ペレットを得て、スメア標本を作製し DAB 染色を行ったところ、疾患脳といくつかのコントロール脳において異常 α -syn の存在が確認された。

疾患脳とコントロール脳において β -シート構造のアミロイド線維に結合するチオフラビン T 測定下で Seeding 反応を行ったところ、疾患脳由来の異常 α -syn によって正常型 α -syn がシードに依存した異常型 α -syn へ構造変化し、増幅されたことが確認された。また、Seeding 反応で得た疾患特異的な異常型 α -syn を用いて PMCA を行ったところ、CBB 染色した SDS-PAGE でも確認出来る程、高濃度の疾患脳由来異常型 α -syn の獲得に成功した。

さらに、リコンビナント α -syn を用いた増幅前後の凝集体のプロテアーゼ K 耐性コアの MS 分析結果から、増幅による異常型タンパク質のコア変化はなくコアが保存されていることも本研究で示した。

ただし、今回行った質量分析と電子顕微鏡の結果では DLB 脳と MSA 脳由来異常型 α -syn の顕著な有意差を発見出来なかった。この結果から、増幅後に得る異常型 α -syn の取り扱い方において、さらなる工夫が必要だと考えられた。

本研究は、疾患脳由来の微量の α -syn の増幅と解析を可能にした。疾患脳由来の異常タンパク質の構造を確立するにはさらなる研究が求められるが、本研究はシヌクレイノパチーだけではなく、神経変性疾患の異常タンパク質研究の発展に貢献できることを示唆した。