

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～2025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 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おこなった。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 $\alpha$ 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、レビー小体型認知症は同じ構造であり、同じ疾患単位として分類されるのに対し、多系統萎縮症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 についても、タウや $\alpha$ 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 TDP-43 線維の構造解明に成功した。また、様々な疾患脳や正常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解明された。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していることが示唆された。これら患者由来の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タンパク質線維を導入して生化学、超微細形態、原子構造、翻訳後修飾について解析した。その結果、疾患脳から調製したタウ線維は、培養細胞内で発現した正常型タウを自身とほぼ同じ折りたたみ構造のタウ線維に変換すること、またそこに検出されるリン酸化などの翻訳後修飾も患者脳のタウ線維にみられるものが再現されることが示された。タウオパチーの動物モデルについては、ヒトと同じ割合で 3R タウと 4R タウを発現するマウスを 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。TDP-43 線維の構造解明を目指として、1 年間研究期間を延長し、C 型 FTLD-TDP 患者脳に蓄積する TDP-43 線維の精製、組織生化学、構造解析を実施し、TDP-43 だけではなくアネキシン A11 が共重合して線維を形成していることを明らかにした。

#### 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へ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。 $\alpha$ 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、 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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。これまでに $\alpha$ シヌクレインのユビキチン化に関わることが報告されている複数のユビキチンリガーゼ遺伝子をノックダウンし、微粒子形成の定量解析を行った結果、STUB1 による $\alpha$ シヌクレインのユビキチン化は微粒子の形成に抑制的に働くことが判明した。

微粒子の放出型への転換へのユビキチン化の寄与を調べるために、細胞増殖中に形成

微粒子を分配できる可視化微粒子維持細胞を SH-SY5Y 細胞でかなり多くのクローンを樹立した。膜がラベルされた細胞へ微粒子が伝播されるかどうかを検討したが、現在までの所、STUB1 のノックダウンの有無にかかわらず、分裂に伴う微粒子の分離は認められているものの、別の細胞への伝播は残念ながら見られていない。

新たな微粒子形成時に  $\alpha$  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、ビメンチンや HELLs(ヘリケース)、USP7 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つた。

### 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、microdialysis による変性タンパク質検出の実績を活かし、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 *in vivo* 実験系を確立することを目的として研究を行った。5 年間の研究期間内に既存の microdialysis 実験系を改良し、FRET タウバイオセンサー細胞によるタウシード能検出系と組み合わせることで、自由行動下にあるマウス脳細胞間質液 (ISF) 中の異常タウタンパク質微粒子のシード能を半定量的に検出する新規実験系の構築を達成した。また、タウトランスジェニックマウスに適用することで、ISF におけるタウ異常タンパク質微粒子のシード能はタウ蓄積や神経変性の度合いに応じて増加することを明らかにした。山田グループでは、タウ病変の伝播が慢性的な神経活動亢進によって増悪することを見出していたため、神経活動と異常タウ微粒子放出の関係についても検討を行ったが、意外にも一過性の神経活動亢進では、ISF 中のシード能は増加しないことが明らかになった。

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、 $\alpha$  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初めて明らかにし、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 (*Nature* 2022a)

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 プロテイノ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ッジ様の折りたたみをとつ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つて異なる疾患が引き起こされることが示唆された。

#### 4. C 型 FTLD-TDP 患者脳に蓄積する TDP-43 線維の構造解明 (*Nature* 2024)

概要: C 型の病理をとる FTLD-TDP 患者脳から TDP-43 線維を精製、生化学解析を行うと共に、MRC との共同研究でクライオ電顕解析を実施した結果、TDP-43 だけでなく、アネキシン A11 の一部が共重合し、ヘテロアミロイド線維を形成していることが判明した。2種類のタンパク質からなるアミロイド線維の存在が構造解析から初めて明らかとなった。

#### <科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

##### 1. パーキンソン病やレビー小体型認知症と多系統萎縮症患者脳に蓄積する $\alpha$ シヌクレイン線維の構造解析 (*Nature* 2020b, *Nature* 2022b)

概要: レビー小体型認知症(DLB)及び多系統萎縮症(MSA)は  $\alpha$  シヌクレインの異常蓄積病変を伴う疾患であり、 $\alpha$  シヌクレインは線維構造をとつ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  $\alpha$  シヌクレイン線維を調製し、クライオ電顕解析によって MSA 患者脳の  $\alpha$  シヌクレイン線維の構造を世界ではじめて解明することに成功した。また DLB 患者の  $\alpha$  シヌクレイン線維は MSA 患者の線維とは異なる構造をとっていることも明らかにした。本成果は  $\alpha$  シヌクレイン蓄積病の診断、治療につながることが期待される。

##### 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 Bio* 2023, *Brain* 2023)

概要: タウオパチーでは、疾患特徴的なタウ線維が蓄積し特徴的な病理病態を形成している。培養細胞に HA や FLAG タグを付加したタウを発現させ、患者由来のタウ線維を細胞に導入すると、患者由来のタウ線維を鋳型として細胞内の正常型タウが同じ形態に線維化して増幅されることを見出した。そして培養細胞内で増幅された原子構造を解明し、元の構造をかなり反映した構造に変換されていることや、リン酸化などの翻訳後も患者脳に近いものに再現されていることを明らかにした。タウの異常構造が増幅、伝播することを示す証拠であり、病態機序の解明、診断法の開発、凝集阻害薬、核酸医薬などの治療法開発、評価に有用と思われる。

##### 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 の異常に關して、TDP-43 もタウや  $\alpha$  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や、実際の患者脳に蓄積したもののが折りたたみ構造を解明し、細胞間を伝播して広がる可能性を構造化学的にも示すことができ、今後の診断法の開発や治療薬開発につながることが期待される。

##### 4. C 型 FTLD-TDP 患者脳に蓄積する TDP-43 線維の構造解明 (*Nature* 2024)

概要: C 型の病理をとる FTLD-TDP 患者脳から TDP-43 線維を精製、生化学解析を行うと共に、MRC との共同研究でクライオ電顕解析を実施した結果、TDP-43 だけでなく、アネキシン A11 の一部が共重合し、ヘテロアミロイド線維を形成していることが判明した。2種類のタンパク質からなるアミロイド線維の存在が構造解析から初めて明らかとなった。

#### <代表的な論文>

##### 1. ALS 患者脳に蓄積する TDP-43 線維構造の解明 (*Nature* 2022a)

概要: 神經難病 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、神經変性を引き起す。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. タウオパチー患者脳由来のタウ線維による鉄型依存的タウ線維形成(*Brain 2021, FEBS Open Bio 2023, Brain 2023*)

概要: タウオパチーでは、疾患特徴的なタウ線維が蓄積し特徴的な病理病態を形成している。

培養細胞に HA や FLAG タグを付加したタウを発現させ、患者由来のタウ線維を細胞に導入すると、患者由来のタウ線維を鉄型として細胞内の正常型タウが同じ形態に線維化して増幅されることを見出した。そして培養細胞内で増幅された原子構造を解明し、元の構造をかなり反映した構造に変換されていることや、リン酸化などの翻訳後も患者脳に近いものに再現されていることを明らかにした。タウの異常構造が増幅、伝播することを示す証拠であり、病態機序の解明、診断法の開発、凝集阻害薬、核酸医薬などの治療法開発、評価に有用と思われる。

## 3. 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証明した。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。

## 4. C 型 FTLD-TDP 患者脳に蓄積する TDP-43 線維の構造解明 (*Nature 2024*)

概要: C 型の病理をとる FTLD-TDP 患者脳から TDP-43 線維を精製、生化学解析を行うと共に、MRC との共同研究でクライオ電顕解析を実施した結果、TDP-43 だけでなく、アネキシン A11 の一部が共重合し、ヘテロアミロイド線維を形成していることが判明した。2種類のタンパク質からなるアミロイド線維の存在が構造解析から初めて明らかとなった。

## § 2 研究実施体制

### (1) 研究実施体制

#### (1) 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。今後は日本国内のクライオ電顕研究者、全国の大学や研究施設の神経病理研究者との共同研究も検討している。

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