

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15606

研究課題名（和文）アルツハイマー病危険因子PICALMのTau凝集体伝播における役割の解明

研究課題名（英文）The role of Alzheimer's disease risk factor PICALM on the propagation of Tau aggregates

研究代表者

下中 翔太郎（Shimonaka, Shotaro）

順天堂大学・医学（系）研究科（研究院）・特任助教

研究者番号：90778747

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究においては当初、Alzheimer病(AD)の原因タンパクとされるTauの異常凝集体の細胞間伝播とPICALMの関係について、細胞にTauとPICALMを共発現させるモデルを用いて解析していた。その過程で、tauの353-368の配列がAD由来のtauを核とする凝集のプロセスに特異的に関わっているという想定外の発見をした。その後、配列における重要部分の絞り込みと他のtauopathy由来のtauを用いた検証を行い、最終的に368番目のAsparagine残基がAD-tauにおいて見られる特有の線維構造の形成に必要であることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Tauタンパクの蓄積を特徴とするtauopathyにおいて、tauの蓄積する部位や凝集tauの取る高次構造などに疾患ごとの差異があり、その分子病態については十分理解されていない。本研究ではAsn368という特定のアミノ酸の側鎖の構造が僅かに変わるだけで、AD-typeのtau凝集のみが選択的に阻害されることを示した。このアミノ酸のtau凝集における分子動態を解析することで、疾患ごとのtauの違いに関する新たな知見の獲得が期待される。また、本研究で見出した、AD-tau特異的な変異を応用することで、tauopathyの分子病型診断法の開発に繋げることも考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, initially we have analyzed the molecular relationship between cell-to-cell propagation of tau aggregates and PICALM using tau/PICALM co-expression cellular model. During the series of experiments, unexpectedly we found that 353-368 aa sequence of tau is specifically involved in the AD-tau seeded tau aggregation. Subsequently, we tried to narrowing-down the important sites within 353-368 aa sequence and verified the AD-tau specificity using tau from other tauopathy cases. Finally, we found that Asparagine 368 residue of tau plays important role on the formation of AD-tau specific fibril core structure.

研究分野：生化学

キーワード：Alzheimer病 Tau Tauopathy タンパク凝集

1. 研究開始当初の背景

Alzheimer 病(AD) 患者の脳では、微小管結合蛋白であるタウ蛋白(Tau)が構造に異常をきたし凝集、不溶化して脳の細胞内への蓄積が常にみられる(タウオパチー)。異常リン酸化された Tau が互いに凝集し、神経原線維変化(NFT)と呼ばれる病理構造物を形成して病変部位に蓄積することが知られている。しかし、Tau が如何なる機構で凝集するのか、また NFT 形成と神経細胞死との繋がりなど、疾患の詳細な発症・進行メカニズムについては、未だに明らかになっていない。最近行われたゲノムワイド関連解析(GWAS)により、Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein (PICALM)が、Alzheimer 病(AD) の危険因子であるとの報告がなされた。PICALM は clathrin と相互作用することで被覆ピット構造の形成を制御し、エンドサイトーシスの過程に関わるタンパクであり、これまでに、AD 患者脳で発現が上昇していることや、オートファジーの活性を調節することで Tau のターンオーバーに影響することなどが報告されている。

2. 研究の目的

(1)申請者は当初、PICALM がエンドサイトーシスの制御を通して Tau 凝集体の取込みに関与することで、病変の拡大に繋がる「Tau 凝集体の伝播」の過程に影響している可能性を考えた。以上のことから本研究では当初、培養細胞及びマウスモデルを用いることで、Tau 凝集体の伝播における PICALM の関与およびその役割を明らかにすることを目指した。

(2)PICALM と Tau との相互作用部位の同定を目的として作成した Tau の部分欠損変異体の中にあつた 353-368aa 欠損体において、AD seed では凝集が低下するが、構造の違う Recombinant (Rec)-tau seed では低下しないという予想外の性質が見いだされた。この現象を分子的に考察するという形で、PICALM とは一旦切り離し、当初のテーマを軌道修正した。

3. 研究の方法

(1)Tau 凝集体伝播の細胞モデルに対して PICALM の過剰発現を行い、Tau 凝集体の取り込みと、それによって引き起こされる Tau の細胞内凝集に与える影響を検討する。具体的には[1]細胞ライセートの界面活性剤不溶性画分のウェスタンブロット、[2]蛍光免疫染色による Tau 凝集と局在の確認、[3]Tau 凝集体蓄積による細胞毒性の LDH assay による測定を各条件で行い、比較する。また PICALM はオートファジーにも関与し、形成された Tau 凝集体の分解に関わるという報告から、必要に応じて chloroquine, Bafilomycin A1 等のオートファジー阻害剤を培養系に添加して、オートファジーの影響を排除した実験系の構築を行う。

(2)Tau の 353-368 配列の一部を欠損した部分欠損変異体の系列を作成して SH-SY5Y 細胞に発現させた後、AD 患者脳由来の tau を seed として投与し、AD-tau による seeding が起こらない変異体を特定する。その後、その変異体が欠損している配列により小さな欠損部位を設計し、同様に AD-tau seeding を行うことで、seeding に不可欠なアミノ酸残基を特定する。

その後、特定されたアミノ酸残基を別のアミノ酸に置換し、側鎖の性質によって AD-tau seeding に影響が出るかどうかを確かめる。また、AD 以外の各種 tauopathy(CBD、PSP、FTDP-17)由来の tau も用いて、配列およびアミノ酸残基の AD-tau seeding 特異性を検証する。

4. 研究成果

(1)Tau 発現細胞に「凝集核(Seed)」として試験管内で凝集させた Recombinant Tau の線維を導入する AD 細胞モデルに対して、PICALM を共発現させたところ、発現なしのものと比較して異常凝集 Tau の量が低下することが明らかになった。この結果を詳細に検討するため、PICALM の N 末端(PIC-NT: 1-413)および C 末端(PIC-CT: 414-652)の発現コンストラクトを作成して上記の細胞モデルに発現させ、全長(PIC-FL: 1-652)発現時の結果と比較した。その結果、PIC-FL 発現時と同程度の異常凝集 Tau の低下が PIC-CT 発現細胞において観察された。PIC-NT を発現させた細胞においては、異常凝集 Tau の低下は見られなかった。以上のことから、AD 細胞モデルにおける異常凝集 Tau の減少には、PICALM の C 末端側が働いていることが示唆された。

(2)Tau の細胞内への取り込みを観察するため、蛍光標識 Recombinant Tau 線維の調製を行った。その後、線維を培養上清に添加してインキュベートした後に細胞を固定することで、蛍光顕微鏡で Tau 線維を観察することができる。しかし、PICALM 発現細胞に対して蛍光標識線維を加えて

観察を行ったところ、発現の有無で Tau 線維の取り込み量の差は認められなかった。以上のことから、PICALM が Tau 線維の取り込みを阻害するという仮説については、もう一度様々な視点から検討する必要がある。

(3) SH-SY5Y に発現させた tau-CTF24 (243-441) を tau seed で凝集させる系において、tau-CTF24 の欠損体系列を用いて凝集責任部位を Asn368 と同定した。加えて、Asn368 の変異は Rec-tau だけでなく、CBD、PSP および FTDP-17(N279K) といった他種のもた Tauopathy 由来 seed による seeding には影響せず、AD 由来 seed で処理した時のみ tau の凝集能を低下させたことから、異種 tauopathy 間に見られる tau の seed 能の差異 (tau strain) への関与が示唆された。また、AD-tau の cryo-EM 構造において Asn368 の対側に位置する Ser320 の変異も、同様に AD 由来 seed 特異的な凝集低下を示した。Tau の Asn368 残基は AD 由来 seed 依存性の異常凝集に重要な役割を果たしていることが示唆された。以上の結果は *The Journal of Biological Chemistry* 誌に掲載された。本研究の結果は、症状や病理の異なる各種 tauopathy の分子的な相違点が生じる機構を解く鍵となり得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shimonaka Shotaro, Matsumoto Shin-Ei, Elahi Montasir, Ishiguro Koichi, Hasegawa Masato, Hattori Nobutaka, Motoi Yumiko	4. 巻 295
2. 論文標題 Asparagine residue 368 is involved in Alzheimer's disease tau strain-specific aggregation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13996 ~ 14014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Taniguchi Daisuke, Takanashi Masashi, Hatano Taku, Kishikawa Satsuki, Shimonaka Shotaro, Motoi Yumiko, Yao Takashi, Hattori Nobutaka	4. 巻 79
2. 論文標題 Astrocytic 3-Repeat Tau Pathologies in Progressive Supranuclear Palsy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuropathology & Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 1015 ~ 1018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nlaa073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Tetsuo, Shimonaka Shotaro, Elahi Montasir, Matsumoto Shin-Ei, Ishiguro Koichi, Takanashi Masashi, Hattori Nobutaka, Motoi Yumiko	4. 巻 79
2. 論文標題 Learning Deficits Accompanied by Microglial Proliferation After the Long-Term Post-Injection of Alzheimer's Disease Brain Extract in Mouse Brains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 1701 ~ 1711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/jad-201002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uddin Mohammad Nasir, Elahi Montasir, Shimonaka Shotaro, Kakuta Soichiro, Ishiguro Koichi, Motoi Yumiko, Hattori Nobutaka	4. 巻 543
2. 論文標題 Strain-specific clearance of seed-dependent tau aggregation by lithium-induced autophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 65 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.12.113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 下中 翔太郎、Elahi Montasir、松本 信英、石黒 幸一、本井 ゆみ子、服部 信孝
2. 発表標題 TauのAsn368変異はアルツハイマー病由来seedによる凝集のみを低下させる
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下中 翔太郎、松本 信英、本井 ゆみ子、服部 信孝
2. 発表標題 TauのC末端領域における凝集責任配列の同定とその性質の解析
3. 学会等名 第37回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shotaro Shimonaka, Shin-ei Matsumoto, Yumiko Motoi, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 The Identification of the Tau C-terminal Sequences Involved in Aggregates Formation.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2018 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下中 翔太郎、松本 信英、本井 ゆみ子、服部 信孝
2. 発表標題 Tauopathy培養細胞モデルを用いたTauの凝集・伝播に関わるアミノ酸配列の同定
3. 学会等名 第36回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------