

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06936

研究課題名(和文) ヒト末梢神経突起における軸索輸送メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism involved in axonal transportation in human peripheral nerve

研究代表者

金 明月 (Mingyue, Jin)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60740404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々の解析から、神経細胞の非定形微小管の構築に関わる因子として  $\alpha$ -synuclein (Syn)、Tau、TPPP1、CRMP2とMAP1のLC2を同定した。その中、SynとTauが脳への異常蓄積は重い神経変性疾患を引き起こすが、その発症メカニズムは未だに解明されていなく、生理機能にも不明な点が多い。その理由の一つが、SynとTauの単独ノックアウトマウス(KO)がほとんど表現型を示さなかったことである。そこで、我々はin vivoにおける機能解析を行うため、SynとTauを同時に欠損させたダブルKO (DKO) マウスを作成した。その結果、DKOの神経発生とグリア新生に異常を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで SynとTau生理機能を解析するため、それぞれの単独KOを用いた解析が数多く行われたが、ほとんど表現型を示さなかった。また、神経変性疾患患者の脳病変部の死後解剖では、Synとtauと一緒に異常蓄積することが多数報告されていることから、機能的な関連性が示唆されている。我々は、生理機能とその関連性を解明するため、SynとTauを同時に欠損させたDKOマウスを作成し、神経発生とグリア新生に異常を発見した。DKOマウスの解析から中枢神経系の構築における SynとTauの生理機能を解明すれば、神経変性疾患の発症機構の解明や臨床治療法の開発に新しい科学的根拠を提供することになる。

研究成果の概要(英文)：To find out factors involved in unconventional microtubule formation, we performed LC MS/MS analysis and determined  $\alpha$ -synuclein (Syn), Tau, TPPP1, CRMP2 and LC2 (MAP1). Among them, Syn and Tau are highly expressed microtubule associated proteins in central nervous system, and their abnormal intracellular aggregates in the human brains define multiple neurodegenerative diseases including AD and PD. This indicates that Syn and tau play important roles in both cognition and movement. In addition, coexistence of Syn and tau aggregates in tauopathies and synucleinopathies indicates a strong functional cross-talk between two proteins. Despite their disease relevance, the normal physiological functions of Syn and tau have remained elusive. This is attributable to each single knockout (KO) mouse has not presented overt phenotype or malformations. To address this, we have generated Syn and tau double knockout (DKO) mouse and found abnormal neurogenesis and gliogenesis in DKO mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：alpha-synuclein Tau 脳の発生

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、「細胞質ダイニンの順行性の運搬には“荷台”として機能する特殊な transportable microtubule (tMT)が関わっている」との仮説を立て、“荷台”として機能する特殊な微小管フラグメントが本当に存在するかどうかを検証した。その結果、パーキンソン病の原因遺伝子である  $\alpha$ -synuclein が *in vitro* で 14-pfs の微小管の重合を促進・安定化し、マウス後根神経節(Dorsal root ganglion: DRG)の軸索では  $\alpha$ -synuclein が細胞質ダイニンや神経特異的な  $\beta$ III-tubulin フラグメントと一緒に順向性に移動することを発見した。さらに、ラット大腿神経を用いて結紮(ligation)実験を行い、電子顕微鏡で微小管の構造を解析したところ、14-pfs の微小管の存在が確認され、結紮によりこれらの微小管が 19 倍も増えたことから可動性であることを証明した。我々の発見は、 $\alpha$ -synuclein が選択的に結合する 14-pfs の微小管は可動性で、神経軸索輸送に関わる“荷台”として機能する tMT であることを強く示唆する。興味深いことに、ヒトの坐骨神経における微小管の構造を解析した結果、ラットよりずっと複雑な形状を取っている unconventional 微小管の構造が確認された。そこで、ラットとヒトの間の中間動物であるイヌとブタの坐骨神経も調べ、ラットでは 0.3%ほどしかいなかった unconventional 微小管がイヌは 10%、ブタでは 20%、さらにヒトでは 25%となり、神経機能の高度化とともに増加する傾向をみせ、高度な神経機能の維持に重要な役割を果たしていることを強く示唆した。これらの結果から、「ヒトのように長い神経軸索内の物質輸送を迅速且つ効率よく行なうため、より複雑な構造に進化している」との仮説を立て、本申請課題では、生化学的手法を用いた機能解析と電子顕微鏡法を用いた構造学的解析を行い、ラットからヒトまでの神経組織における 14-pfs の微小管を含む unconventional 微小管の構造学的特徴、細胞内及び神経組織での分布とその制御機構を解明して生体内、特にヒトの神経組織における生理的な役割を解明することを目指した。

## 2. 研究の目的

本研究課題を遂行する当初は、ラット、イヌ、ブタとヒトの坐骨神経を用いた生化学的機能解析と電子顕微鏡法を用いた構造学的解析を行い、神経機能の高度化に伴う unconventional 微小管の生理的な機能及び神経の軸索輸送機構を解明することだった。ラット大腿神経を用いた解析で、我々は 13 本の protofilament (13-pfs) で構成された従来の微小管骨格とは異なる 14-pfs で形成された可動性微小管を発見し、神経軸索輸送時の“荷台”として機能することを報告した。さらに、イヌ、ブタとヒトの坐骨神経では、14-pfs の微小管以外にも特異なフック構造を持つものなどが確認され、神経機能の高度化とともに増加する傾向を見せ、高度な神経機能の維持に重要であることが示唆された。これらの結果に基づいて、哺乳類の神経組織における unconventional 微小管の形成機構、神経の軸索輸送における生理的な役割を明らかにし、神経軸索輸送異常により発症する神経変性疾患の原因究明を目指した。

哺乳類の神経組織における unconventional 微小管の形成機構を解明するため、ブタ、日本ザルとヒトの脳組織抽出液を用いたプロテオーム解析を行い、有力な候補因子として  $\alpha$ -synuclein、Tau、TPPP1 (Tubulin polymerization promoting protein 1)、CRMP2 (collapsing response mediator protein 2) と MAP1 の LC2 (Light chain 2)を同定した。そのうち、 $\alpha$ -synuclein と Tau の脳への異常蓄積はパーキンソン病とアルツハイマー病を含む重い神経変性疾患を発症させることが明らかになっている。しかし、それぞれのシングルノックアウトマウスははっきりした表現型を示していなかったことから、神経変性疾患の発症メカニズムと生理機能には不明な点が多い。そこで、我々は  $\alpha$ -synuclein と Tau を同時にノックアウトさせたダブルノックアウトマウスを作成し、中枢神経系の構築における生理機能の解析を目指した。

## 3. 研究の方法

神経組織における unconventional 微小管の形成機構を解析するために、新鮮なブタ、日本ザルとヒトの脳抽出液から微小管結合タンパク質をイオン交換カラムで精製・分離しプロテオーム解析を行った。その結果、有力な微小管結合タンパク質候補として $\alpha$ -synuclein、Tau、TPPP1 (Tubulin polymerization promoting protein 1)、CRMP2 (collapsing response mediator protein 2)と MAP1 の LC2 (Light chain 2)を検出した。これらのタンパク質の中、 $\alpha$ -synuclein と Tau は、中枢神経系に高発現している微小管結合たんぱく質で、細胞間の情報伝達や神経軸索輸送にきわめて重要な役割を果たす。 $\alpha$ -synuclein と Tau の遺伝子変異や過剰リン酸化などにより脳組織に異常蓄積するとパーキンソン病(PD)やアルツハイマー病(AD)などの神経変性疾患を引き起こす。しかし、これらの神経変性疾患の発症メカニズムは未だに解明されていなく、 $\alpha$ -synuclein と Tau の生理機能にも不明な点が多い。その理由の一つが、 $\alpha$ -synuclein と tau の単独ノックアウトマウスがほとんど表現型を示さなかったことである。これらの結果は、生体内の微小管結合たんぱく質間には機能的な重複性が存在していることを示唆している。そこで、我々は *in vivo* における機能解析を行うため、 $\alpha$ -synuclein と Tau を同時に欠損させたダブルノックアウト(double knockout: DKO)マウスを作成し、中枢神経系の構築と機能維持に与える影響を調べた。

- (1) マウス胎児 E14 における神経幹細胞の分裂に与える  $\alpha$ -synuclein と Tau の影響を明らかにするため、分裂マーカーである BrdU、PH3 と Ki67 を用いて解析した。
- (2) マウス胎児 E14 における神経幹細胞の分化に与える  $\alpha$ -synuclein と Tau の影響を明らかにするため、神経幹細胞のマーカー Pax6、Tbr2 と神経細胞のマーカー Tbr1、Tuj1 と DCX を用いて解析した。
- (3) 新皮質の層構造形成への影響を解明するため、皮質層構造のマーカー CUX1 (II-IV)、Ctip2 (V-VI)、Tbr1 (II-III と VI)を用いて P0 マウスの解析を行った。
- (4) 胎生期における神経幹細胞の分裂・分化と神経細胞の遊走への影響を確認するため、E12 マウスに EGFP 遺伝子を *in utero* 電気穿孔法で導入し、E13 と E14 の脳組織のスライス培養を行い、*in vivo* 観察により解析を行う予定である。
- (5) P0、P3、P7 と P11 の DKO マウスにおける gliogenesis の解析を行った。まずは、E16 における Sox2 と Tbr2 のマーカーを用いて、グリア細胞の前駆細胞の状況を調べた。その後、生後マウスでは、アストロサイトのマーカー GFAP と S100 $\beta$ 、オリゴデンドロサイトマーカーである Myelin basic protein、NG2 と Olig2 を用いて詳細に解析を行った。

#### 4. 研究成果

我々は、脳の発生期における  $\alpha$ -synuclein ノックアウトマウス、Tau ノックアウトマウスと両方を同時にノックアウトさせた DKO マウスの解析を行い、 $\alpha$ -synuclein と Tau が中枢神経系の構築と機能維持に重要な役割を果たすことを発見した。

- (1) E14 マウスの解析から、 $\alpha$ -synuclein と Tau の欠損が神経幹細胞(Pax6+ cells)から神経細胞(Tbr1+ cells)への直接分化を促進したが、intermediate progenitor (Tbr2+ cells)への分化は抑制された。
- (2) 脳の皮質の形成を調べたところ、DKO マウスの新皮質の層構造はそろっているものの、II-V の神経細胞の減少が確認された。
- (3)  $\alpha$ -synuclein と Tau の欠損により P0、P3、P7 と P11 のマウスの gliogenesis が抑制されていることを発見した。非常に面白いことに、DKO マウスの gliogenesis の抑制により P11 の脳のサイズが小さくなっていることが判明された。

これらの結果をもとに、*in utero* の解析と *live imaging* などの手法を用いて  $\alpha$ -synuclein と Tau が神経発生と gliogenesis における生理的機能と機構を調べる。我々の研究を通じて、中枢神経系の構築における  $\alpha$ -synuclein と Tau の生理機能が明らかになれば、PD や AD を含む神経変性疾患の発症機構の解明や臨床治療法の開発に新しい科学的根拠を提供することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirotsune Shinji, Kiyonari Hiroshi, Jin Mingyue, Kumamoto Kanako, Yoshida Kayo, Shinohara Miki, Watanabe Hitomi, Wynshaw-Boris Anthony, Matsuzaki Fumio	4. 巻 10
2. 論文標題 Enhanced homologous recombination by the modulation of targeting vector ends	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鳥羽 菜, 金 明月, 山田 雅巳, 松本 早紀子, 安永 卓生, 福永 優子, 宮澤 淳夫, 小嶋 寛明, 新井 由之, 永井 健治, 広常 真治
2. 発表標題 微小管結合タンパク質アルファシヌクレインの神経軸索内輸送における機能解析
3. 学会等名 日本認知症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mingyue Jin, Shengming Wang and Shinji Hirotsune
2. 発表標題 Functional cross-talk between aSyn and tau during brain development
3. 学会等名 日本神経科学学会
4. 発表年 2020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
---------	---------