

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16160

研究課題名（和文）各種Tauopathyにおいて特異的な凝集体を形成するtau単位配列の役割解明

研究課題名（英文）The role of the specific tau sequence on the formation of tau strain

研究代表者

下中 翔太郎（Shimonaka, Shotaro）

順天堂大学・大学院医学研究科・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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Tauタンパクはどのような機構で凝集し、疾患ごとに異なる構造・性質を持った凝集体となるのかを理解することが、神経変性疾患の発症機構の解明及び創薬において重要である。申請者はtauのAsn-368残基が、アルツハイマー病(AD)に特有のtau凝集体構造の形成に重要であることを突き止めた。この残基の変異は、皮質基底核変性症(CBD)などの非AD tauopathyにおいてはほとんど影響を及ぼさず、よってAsn-368はAD-tau凝集に特異的に働く部位であると言える。Asn-368のAD-tau凝集における役割の解明が、凝集体構造に疾患ごとの差異が生じる機構の解明につながると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Tauが疾患ごとに異なる構造を取りながら凝集する分子機構は未だに不明である。しかし本研究では、ADにおけるtau凝集においてのみ重要な役割を果たしているtauの部位としてAsn-368を初めて同定した。今後、Asn-368がAD-tau凝集においてどのように働き、また非AD tau凝集においてはなぜ積極的な役割を持たないかを解明することが、tauの凝集多型形成の分子機構の理解へとつながるところに学術的意義がある。加えて、こうしたtau凝集の分子機構の解明は、tau凝集阻害薬のデザインにも資するものであり、認知症克服のための創薬基盤としての社会的意義も持つ。

研究成果の概要（英文）：It is important to understand how tau protein forms aggregate with different structures and properties in different tauopathy in order to elucidate the pathogenesis of neurodegenerative diseases and to develop new drugs. We found that Asn-368 residue of tau is important for the formation of tau aggregate structure, which is unique to Alzheimer's disease (AD). Mutations in this residue have little effect in non-AD tauopathies such as corticobasal degeneration (CBD), thus Asn-368 is a specific site for AD-tau aggregation. Elucidation of the role of Asn-368 in AD-tau aggregation may lead to a better understanding of the molecular mechanisms of disease-specific differences in tau aggregate structure.

研究分野：生化学

キーワード：tau tauopathy tau凝集 strain

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)を始めとする、進行性核上性麻痺(PSP)、皮質基底核変性症(CBD)といった神経変性疾患は、脳の病変部位に異常凝集したタウ蛋白(tau)の蓄積が認められることから「Tauopathy」と総称される。Tauの蓄積は、まず正常tauが構造異常を起こして互いに凝集した後、これが凝集核(seed)となってさらに他の正常tauの凝集を誘発するという prion-like な様式で起こるとされている。近年、tau凝集に関わる新たな知見として、病理も臨床症状も異なる異種 tauopathy 間では異常凝集tauの高次構造に差異があり、患者脳由来のtau seedの疾患モデルへの導入により、tauopathyごとに特有のパターンを受け継いだtau凝集体の形成が報告されている。このことから「Tauはどのような機構で凝集し、異種tauopathy間で見られるような構造・性質の異なる凝集体となるのか」という問いに取り組むことが、病理や臨床症状が異なる各種tauopathyの発症機構の総合的な理解と、tauの異常凝集という疾患の根本原因を標的にした創薬において重要である。

2. 研究の目的

本研究ではtau異常凝集の機序を解明するため、tauの353-368配列に焦点を当てる。この配列中の各種tau seedを識別する責任部位を同定し、seed依存性凝集における機能の解明を目的とする。申請者の先行研究で同定された353-368配列は新規の凝集責任配列であるだけでなく、seedを凝集の鋳型とする際にseedの種類を識別(AD tauかRec tauか)する役割が確認されている。本研究において、seed依存性凝集に必要な責任配列を353-368配列から絞り込み、こうして同定した責任部位が凝集だけでなく鋳型となるseedの識別にも機能していることを証明することが学術的独自性となる。

3. 研究の方法

(1) Tauの353-368配列における凝集及びseed識別に関わる部位の絞り込みと同定
Tauの353-368中の、凝集とseed識別に必要な最小部位の絞り込みを行う。353-368配列を3等分し、それぞれをAla置換した3変異体tau-CTF24 A1 (353-358 Ala), A2 (358-363 Ala), A3 (363-368 Ala)の発現 constructを作成する。作成した plasmid を SH-SY5Y 細胞に transfection して tau を発現させ、Rec (大腸菌に発現させ、精製した recombinant tau を heparin 存在下で in vitro で凝集させたもの) および tauopathy 患者脳由来 seed (AD, PSP, CBD) を加え、細胞 lysate の界面活性剤不溶性画分に回収された凝集 tau を western blotting により定量することで、どの配列を Ala 置換すると seed 依存性凝集が減少するかを検証する

(2) 同定された責任部位に変異を持つ遺伝子改変マウスの作出
細胞モデルにおいて同定された責任部位がtau凝集の動物モデルでも意味を持つかを確認する為に、CRISPER/Cas9システムを用いて責任部位に変異を導入した遺伝子改変マウスを作成する。部位のターゲティングの為にガイドRNAおよび相同組み換えによる変異導入の為にドナーDNAを設計、調製し、C57BL/6J系統の野生型マウスの受精卵にインジェクションする(順天堂大学大学院疾患モデルセンターに委託)。その後、目的の変異の入っているラインを選択する。

(3) Peptide、抗体による、同定された責任部位のブロック効果の検証
Tauのある部位が凝集およびseed認識に働くとすれば、そこをブロックすることで、seed依存性凝集を抑制することができると思われる。この仮説に基づいて、前年度までに作成した、同定された責任部位を含む peptide、および部位を認識する抗体を、tau凝集の細胞モデルに投与する。

4. 研究成果

(1) Tau353-368配列における凝集及びseed識別に関わる部位の絞り込みと同定
結果として、Asn-368の1残基欠損及びAla置換により、AD患者脳由来seed添加による発現tauの細胞内凝集が著しく減少することが明らかになった(図1)。非常に興味深いことに、tau凝集の減少はAD seeding時のみに見られ、RecおよびCBD、PSP患者脳由来seed添加時にはAsn-368変異tauは野生型tauと同程度の凝集を示した。このことは、Asn-368変異がseedのstrainに対して特異性を持つことを示している。さらに、Asn-368を側鎖の炭素骨格の似た別のアミノ酸(Asp, Gln, Leu)に置換した場合にも、Δ368およびN368Aと同様の結果が得られたことから、AD seed凝集には、Asn-368の側鎖のアミド基が適切な位置に存在することが重要であることが示唆された。ここまでの成果は査読付き論文において発表済みである(Shimonaka et al., *J Biol*

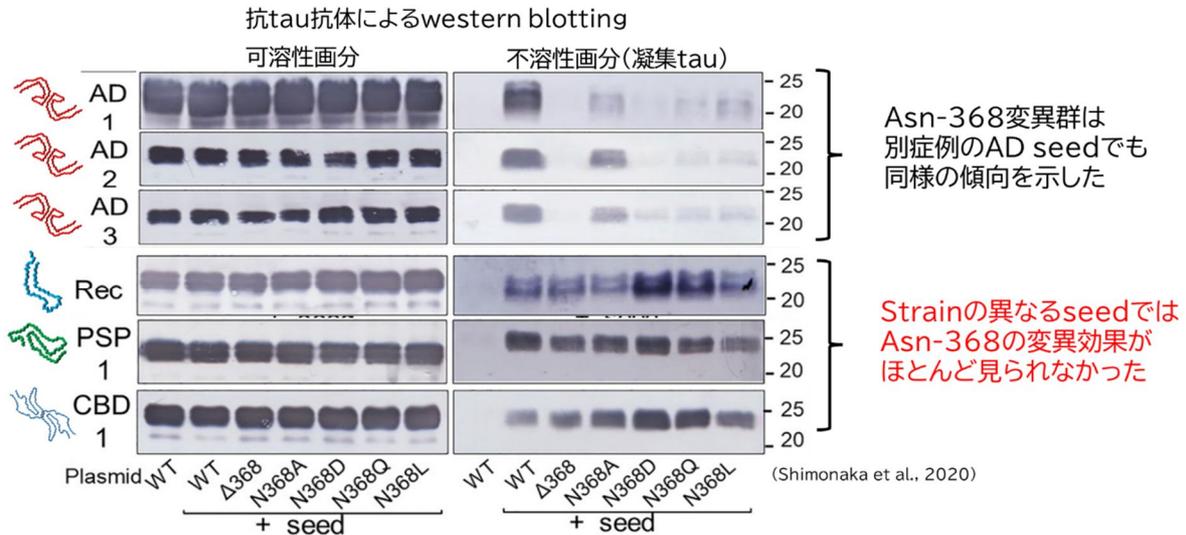


図1 Asn-368変異体系列tauのADおよび非AD seed依存性凝集の結果

(2) 同定された責任部位に変異を持つ遺伝子改変マウスの作出

マウス tau においては、ヒトでいう Asn-368 は Asn-357 に相当する。よって、マウスゲノム上の MAPT 遺伝子の Asn-357 をコードする 3 塩基を欠損させた人工配列をドナーDNA とし、ターゲティングの為にガイド RNA を適切に設計した。その後、CRISPER/Cas9 システムを用いて Δ357 変異のノックインを行った(順天堂大学大学院疾患モデルセンターに委託)。目的の変異を持ったマウスを確認した後、交配を行って Δ357 変異をホモで持つマウスを得た。Δ357 ホモマウスと野生型マウスの線条体に AD seed を脳定位固定装置を用いて注入し、その 3 ヶ月後に脳のパラフィン切片を作成、抗異常リン酸化抗体である AT8 で染色した。結果として、野生型マウスの線条体および外包領域には AT8 陽性の tau 病理が見られたが、Δ357 マウスにおいて tau 病理はほぼ認められなかった。結果として、Asn-368 は in vivo でも AD seeding において重要な役割を果たしていることが示された。

野生型(WT)、Δ357 KIの線条体にAD seedをinjectionし、3ヶ月後のAT8陽性病理を確認した

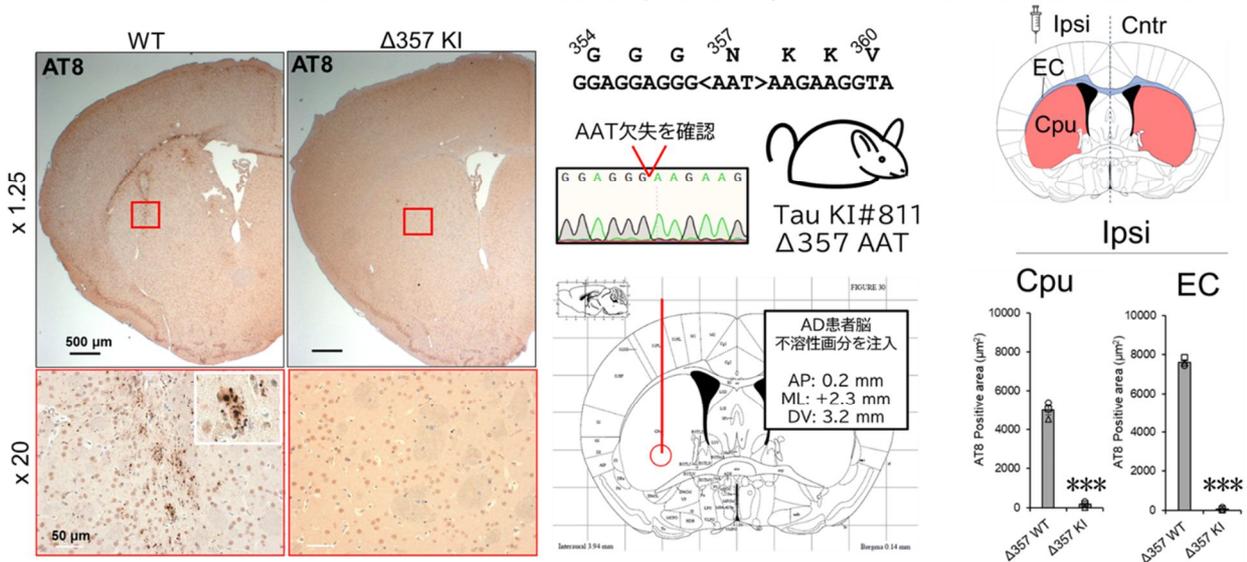


図2 Asn-368変異体系列tauのADおよび非AD seed依存性凝集の結果

(3) Peptide、抗体による、同定された責任部位のブロック効果の検証

Asn-368 を含む領域 353-368 aa が AD 凝集に重要であると明らかになったことを受けて、353-368 aa の peptide を免疫したウサギの抗血清および 353-368 aa の peptide そのものを用いてその領域をブロックし、凝集阻害が可能かどうかを細胞モデルで検証した。Tau 発現細胞に AD seed を加えた後、353-368 aa 抗血清および 353-368 aa peptide を添加し、western blotting で tau 凝集を定量した。結果として、抗血清および peptide は、tau 凝集の阻害にはほとんど効果がないことが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Daida Kensuke, Shimonaka Shotaro, Shiba Fukushima Kahori, Ogata Jun, Yoshino Hiroyo, Okuzumi Ayami, Hatano Taku, Motoi Yumiko, Hirunagi Tomoki, Katsuno Masahisa, Shindou Hideo, Funayama Manabu, Nishioka Kenya, Hattori Nobutaka, Imai Yuzuru	4. 巻 37
2. 論文標題 Synuclein V15A Variant in Familial Parkinson's Disease Exhibits a Weaker Lipid Binding Property	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Movement Disorders	6. 最初と最後の頁 2075 ~ 2085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mds.29162	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 Ogata Jun, Takemoto Daisaku, Shimonaka Shotaro, Imai Yuzuru, Hattori Nobutaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Seeding Assay Using Cultured Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in molecular biology	6. 最初と最後の頁 27 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1495-2_3	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 Elahi Montasir, Motoi Yumiko, Shimonaka Shotaro, Ishida Yoko, Hioki Hiroyuki, Takanashi Masashi, Ishiguro Koichi, Imai Yuzuru, Hattori Nobutaka	4. 巻 30
2. 論文標題 High-fat diet-induced activation of SGK1 promotes Alzheimer's disease-associated tau pathology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1693 ~ 1710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab115	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 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 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 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 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5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、石黒 幸一、本井 ゆみ子、服部 信孝
2. 発表標題 Tau-strainの分子病理と凝集阻害戦略
3. 学会等名 第41回 日本認知症学会学術集会、シンポジウム(日本語、口頭発表)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shotaro Shimonaka, Koichi Ishiguro, Yumiko Motoi, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Identification of the residue of tau involved in tauopathy strain formation
3. 学会等名 第41回 日本認知症学会学術集会、ポスター発表(英語、学会奨励賞候補演題)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shotaro Shimonaka, Koichi Ishiguro, Yumiko Motoi, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Identification of the amino-acid residue of tau involved in four-repeat tauopathy strain formation
3. 学会等名 第63回 日本神経学会学術大会、展示(英語)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shotaro Shimonaka, Montasir Elahi, Shin-Ei Matsumoto, Koichi Ishiguro, Masato Hasegawa, Nobutaka Hattori, Yumiko Motoi
2. 発表標題 Asparagine residue 368 is involved in Alzheimer ' s disease tau strain-specific aggregation
3. 学会等名 第62回 日本神経病理学会総会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shotaro Shimonaka, Montasir Elahi, Shin-Ei Matsumoto, Koichi Ishiguro, Masato Hasegawa, Nobutaka Hattori, Yumiko Motoi
2. 発表標題 Asparagine residue 368 is involved in Alzheimer ' s disease tau strain-specific aggregation
3. 学会等名 Alzheimer ' s Association International Conference 2020 (国際学会)
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
---------	---------