

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06821

研究課題名（和文）脳の発生過程における α -synuclein と tau の機能的な相互作用の解明

研究課題名（英文）Cooperative function of alpha-synuclein and tau during brain development

研究代表者

金 明月（Jin, Mingyue）

大阪公立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：60740404

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）：Syn と tau が脳に異常蓄積すると神経変性疾患を発症させるが、その発症機構は未だに不明な点が多い。本研究では二つの遺伝子を同時に欠損させた Syn^{-/-}tau^{-/-} マウスを作成し、中枢神経系の構築における Syn と tau の協同的相互作用を解析した。その結果、Syn と tau が胎生初期においては Notch シグナルを介して神経幹細胞の分裂と分化を制御し、胎生後期においては神経機能発揮に支持的に働くグリア細胞の形成に関与することを発見した。本研究により、神経発生とグリア形成における Syn と tau の機能的なクロストークが解明され、PD や AD 含む神経変性疾患の発症機構の解明に新しい知見を提供する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Syn と tau が脳への異常蓄積は神経変性疾患の発症原因となるが、その生理的な機能は十分解明されていない。臨床では、PD は主に運動障害を示すのに対し、AD 患者は主に認知機能の低下を示している。しかし、神経変性疾患患者の死後解剖では、Syn と tau が一緒に病変部に異常蓄積することが多数報告され、Syn と tau 両者が認知機能と運動の制御に密接に関わっていることを示唆した。本研究は、これまで独立して研究されていた Syn と tau が機能的クロストークを持つことを初めて明らかにし、異なる神経変性疾患にまたがる共通病態、特に PD と AD 間に存在する共通関連性を特定するのに重要な証拠を提示することになる。

研究成果の概要（英文）：Abnormal intracellular aggregation of Syn and/or tau in the human brains define multiple forms of neurodegenerative diseases including AD and PD. In addition, coexistence of

Syn and tau aggregates in tauopathies and synucleinopathies indicates a strong cross-talk between two proteins during pathogenesis. Despite their disease relevance, the normal physiological functions and roles of these two proteins have remained elusive, as mice with knockout of either of these proteins do not present overt phenotypes. To address this issue, we simultaneously removed Snca and Mapt genes and generated Syn^{-/-}tau^{-/-} mice. Through this research project we revealed that Syn and tau participate in proper neurogenesis and gliogenesis via controlling of Notch signaling and microtubule reorganization. Functional cross-talk between Syn and tau during corticogenesis will provide new mechanistic insights for the pathogenesis of neurodegenerative diseases caused by aberrant Syn and/or tau.

研究分野：神経生物学

キーワード：脳の発生

1. 研究開始当初の背景

α -synuclein (α Syn)と tau は脳に高発現する微小管結合たんぱく質(Microtubule associated proteins, MAPs)で、これらの遺伝子に変異が生じた場合にはパーキンソン病(Parkinson's disease, PD)や認知症(Alzheimer's disease, AD)などの神経変性疾患を発症させる原因となる。しかし、これらのタンパク質の生理機能には不明な点が多く、脳に異常蓄積することによる神経細胞の変性・脱落の分子機構も十分解明されていない。その理由の一つが、 α Syn 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。そこで、我々は微小管を場とした α Syn と tau の機能的相互作用を解明するため、二つの遺伝子を同時に欠損させたダブルノックアウト α Syn^{-/-}tau^{-/-}マウスを作成し、中枢神経系の構築における α Syn と tau の協同的機能解明を目指した。

神経細胞の微小管は細胞骨格として細胞の形態維持、分裂と分化、細胞遊走、極性維持、また細胞質ダイニンやキネシンのようなモータータンパク質のレールとして軸索内物質輸送に重要な役割を果たす。微小管のダイナミクスは厳密に制御されていて、その制御因子の変異はさまざまな中枢神経系の形成不全や神経変性疾患の原因となっている。発生過程で神経幹細胞の分裂異常は小脳症を引き起こし、神経細胞の遊走異常は滑脳症を発症させる。我々のグループはこれまで、滑脳症の原因遺伝子・LIS1 と小脳滑脳症(microlissencephaly)の原因遺伝子・KATNB1 の機能解析を行い、両者とも細胞質ダイニンを介して微小管ネットワーク再編を制御することを報告した(Toba *et al.*, *EMBO J.* 2008; Jin *et al.*, *Sci. Rep.* 2017)。また、 α Syn が細胞質ダイニンの順行性運搬に必要な可動性微小管(荷台となる微小管)の形成に必須であることを突き止めた(Jin *et al.*, *Sci. Rep.* 2017)。我々が発見した可動性微小管は、14本のプロットフィラメント(14-pfs)で形成された unconventional 微小管で、 α Syn によって安定化されていた。先行研究では、神経軸索に高発現している MAP である tau も 14-pfs で形成された微小管に結合することが報告されている。そこで、マウス後根神経節(DRG)に α Syn と tau を共発現させ live cell imaging で観察したところ、両タンパク質が神経軸索内を一緒に移動していることが明らかとなり、機能的な共役が示唆された。興味深いことに、 α Syn と tau の遺伝子に変異が生じた場合には PD や AD などの重い神経変性疾患を発症させるにも関わらず、それぞれの単独ノックアウトマウスはほとんど表現型を示さなかった。そのため、これらのタンパク質の生理機能や脳に異常蓄積することで発生する神経細胞の変性・脱落の分子機構も十分解明されていない。一般的に、細胞内 MAPs は機能的にリダナントで生理的な機能を解析するのが困難であることが多い。そこで本研究課題では、 α Syn と tau のダブルノックアウトマウス α Syn^{-/-}tau^{-/-}を作成することでお互いの機能的な重複性を解消し、 α Syn と tau の生理機能を解明できることが期待できると思い、本研究の構想に至った。

2. 研究の目的

我々の予備実験から、6周齢の WT、 α Syn^{-/-}、tau^{-/-}に比べて α Syn^{-/-}tau^{-/-}マウスの脳が著しく小さくなっていることを発見した。それに反して、 α Syn^{-/-}tau^{-/-}マウスの胎児脳は WT、 α Syn^{-/-}、tau^{-/-}より大きくなっていた。これらの結果により、 α Syn と tau が中枢神経系の構築に関わっていることが分かって。脳の発生における α Syn と tau の協同的生理機能を探るため、WT、 α Syn^{-/-}、tau^{-/-}と α Syn^{-/-}tau^{-/-}マウスを詳細に解析し、中枢神経システムの構築と神経細胞の機能維持における α Syn と tau

の生理機能を解明することを目指す。

3. 研究の方法

発生過程における α Syn と tau の生理機能を解明するため、WT、 α Syn^{-/-}、tau^{-/-} と α Syn^{-/-}tau^{-/-}マウスの胎生期 E11 から生後6週齢マウス脳解析に合わせて、細胞実験を行った。

(1) 免疫組織化学、細胞分裂解析、qPCR、Western blot などの方法を合わせて、 α Syn と tau が E12-E15 胎児脳において Notch シグナルを介して神経幹細胞の分裂と分化を制御することを明らかにした。

(2) WT、 α Syn^{-/-}、tau^{-/-} と α Syn^{-/-}tau^{-/-}マウス胎児から胎児線維芽細胞(MEF)を分離し、微小管の再重合様子を免疫染色と live cell imaging で解析した。WT、 α Syn^{-/-}、tau^{-/-} と DKO マウス胎児から分離した MEF 細胞に異なる濃度のノコダゾールを添加し、室温で1時間処理後、免疫染色を行い、四種類の細胞における微小管の維持状況と再重合を調べた。また、四種類の MEF 細胞に蛍光標識 EB 3 (微小管先端結合たんぱく質) を発現させ、ライブセルイメージングで微小管の重合状況を追跡した。

(3) WT と α Syn^{-/-}tau^{-/-}マウス胎児 E12-E14 の脳組織のスライス培養(200-300 μ m 厚さ)を行い、Lyn-EGFP と H₂B-RFP で神経幹細胞の膜と細胞核をそれぞれ可視化し、神経幹細胞の分裂と新しく生まれた神経細胞が皮質層に遊走して行く様子を live imaging で観察した。その結果を解析し、 α Syn と tau の欠損が神経幹細胞の未分化性の維持、細胞周期の長さ、細胞核の移動スピードに与える影響を確認した。

4. 研究成果

我々は、脳の発生期における WT、 α Syn^{-/-}、tau^{-/-} と α Syn^{-/-}tau^{-/-}マウスの解析を行い、 α Syn と tau がステージ依存的に神経発生とグリア形成に重要な役割を果たすことを発見した。

(1) 胎児 E12-E14 の解析により、 α Syn と tau の欠損が神経幹細胞の分裂と神経細胞への分化を促進させた。また、E11 胎児脳解析から、 α Syn と tau の欠損が神経発生の時期を早めることを発見した。 α Syn と tau の機能欠損による神経発生時期の前倒しと神経分化の促進が α Syn^{-/-}tau^{-/-}マウスの胎児脳を著しく大きくさせたことが分かった。さらなる解析により、 α Syn と tau の欠損が Notch シグナルを介して神経幹細胞の分化を促進させたことを判明した。

(2) WT と α Syn^{-/-}tau^{-/-}マウス胎児 E12-E14 脳の神経幹細胞を Lyn-EGFP と H₂B-RFP で標識し、脳組織のスライス培養と live imaging を行い、 α Syn と tau の欠損が神経幹細胞の分裂期 G2 フェーズにおける神経幹細胞細胞核の移動を加速させた。また、蛍光標識したほとんどの細胞が 48 時間後、 α Syn^{-/-}tau^{-/-}の新皮質に移動して行った。これらの結果により、 α Syn と tau の欠損が神経幹細胞の分化を促進することが確認できた。

(3) E15 の胎児脳解析により、発生後期のグリア形成が著しく抑制された。この結果は、 α Syn^{-/-}tau^{-/-}マウスの脳発生初期における神経細胞への分化が促進されたことで、発生後期の神経幹細胞の数が著しく減少したのが原因である。

(4) 生後 α Syn^{-/-}tau^{-/-}マウスのアストロサイトとオリゴデンドロサイトの増殖と成熟が抑制され、P11 からマウス脳サイズも小さくなっていった。これらの結果により、 α Syn と tau がグリア形成、増殖と成熟に重要な役割を果たしていることを解明した。

以上の研究により、 α Syn と tau が協同で神経発生とグリア形成を制御してい

ることを明らかにした。

(5) 発表論文、参加した学会

Jin M.,* Wang S., Gao X., Zou Z., Hirotsune S. and Sun L. Pathological and physiological functional cross-talks of α -synuclein and tau in the central nervous system. *Neural Regeneration Research* 19(4):855-862.

Jin M., Matsumoto S., Ayaki T., Yamakado H., Taguchi T., Togawa N., Konno A., Hirai H., Nakajima H., Komai S., Ishida R., Chiba S., Takahashi R., Takao T. and Hirotsune S. (2022.11.12). DOPAnization of tyrosine in α -synuclein by tyrosine hydroxylase leads to the formation of oligomers. *Nature Communications* 13(1):6880

Wang S., Fu Y., Miyata T., Matsumoto S., Shinoda T., Itoh K., Harada A., Hirotsune S. and **Jin M.*** Functional cooperation of α -synuclein and tau is essential for proper corticogenesis. *The Journal of Neuroscience* 42(37):7031-7046.

Penisson M., **Jin M.,** Wang S., Hirotsune S., Francis F., Belvindrah R. (2022.3.21). Lis1 mutation prevents basal radial glia-like cell production in the mouse. *Human Molecular Genetics* 31:942-957.

Jin M., Matsumoto S., Ayaki T., Yamakado H., Taguchi T., Togawa N., Konno A., Hirai H., Nakajima H., Komai S., Takahashi R., Takao T. & Hirotsune S. New posttranslational modification of α -synuclein by tyrosine hydroxylase leads to the formation of cytotoxic oligomers. *The 16th Annual Meeting of Chinese Neuroscience Society & The 2nd CJK International Meeting* (Zhuhai, China, July 27-30, 2023).

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 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Jin M., Wang S., Gao X., Zou Z., Hirotsune S. and Sun L.	4. 巻 19(4)
2. 論文標題 Pathological and physiological functional cross-talks of α -synuclein and tau in the central nervous system.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Neural Regeneration Research	6. 最初と最後の頁 855-862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/1673-5374.382231.	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 Jin M., Matsumoto S., Ayaki T., Yamakado H., Taguchi T., Togawa N., Konno A., Hirai H., Nakajima H., Komai S., Ishida R., Chiba S., Takahashi R., Takao T. and Hirotsune S.	4. 巻 13(1):6880
2. 論文標題 DOPAnization of tyrosine in α -synuclein by tyrosine hydroxylase leads to the formation of oligomers.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-34555-4.	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 Wang S., Fu Y., Miyata T., Matsumoto S., Shinoda T., Itoh K., Harada A., Hirotsune S. and Jin M.	4. 巻 42(37)
2. 論文標題 Functional cooperation of α -synuclein and tau is essential for proper corticogenesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal Neuroscience	6. 最初と最後の頁 7031-7046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0396-22.2022.	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 Penisson Maxime, Jin Mingyue, Wang Shengming, Hirotsune Shinji, Francis Fiona, Belvindrah Richard	4. 巻 31(6)
2. 論文標題 Lis1 mutation prevents basal radial glia-like cell production in the mouse	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 942 ~ 957
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddab295	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0件

〔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1件

国際研究集会 The 16th Annual Meeting of Chinese Neuroscience Society & The 2nd CJK International Meeting	開催年 2023年～2023年
--	--------------------

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