様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ５ 月 １６ 日現在

機関番号：１４１０１
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2020
課題番号：１９Ｋ１７００２

研究課題名（和文）多能性幹細胞とヒト凍結脳のタウ蛋白における網羅的リン酸化比較解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of tau protein phosphorylation in pluripotent stem cells and human brain

研究代表者
森本　悟（Morimoto, Satoru）

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：００８１６９５２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト凍結脳組織から、質量分析（MS）解析に使用するためのタウタンパク質の精製手法を確立した。さらに特殊なMS解析を用いて、健常者およびアルツハイマー病患者脳におけるタウタンパク質のリン酸化状態を解析した。予測解析の結果から、181個のリン酸化アミノ酸配列を同定した。さらに同定されたペプチド（アミノ酸を構成するより小さい単位）のリストについて、健常者とアルツハイマー病患者脳との間で、各ペプチド毎にリン酸化状態の明確な差異を検出するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究課題において、ヒト凍結脳からの効率的なタウタンパク質の抽出・純化方法、ならびにリン酸化部位解析法を確立した。その方法を用いて、健常者とアルツハイマー病患者脳におけるタウタンパク質のリン酸化の違いを、詳細にプロファイリングすることに成功した。
アルツハイマー病を代表としたタウタンパク質に異常を来す疾患は、患者数が非常に多く社会的に重要度の高い疾患にも関わらず、根本的な治療法が存在しない。本研究結果は、タウ関連疾患の重要な病態産物であるリン酸化タウタンパク質の疾患毎の形成機序や、リン酸化という現象をターゲットとした治療法への全く新しい側面のアプローチを提供できる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：We have established a method for purifying tau protein from human frozen brain tissue for use in mass spectrometry (MS) analysis. In addition, a specific MS analysis was used to analyze the phosphorylation status of tau protein in the brains of healthy subjects and Alzheimer's disease patients. From the results of predictive analysis, 181 phosphorylated amino acid sequences were identified. For a list of further identified peptides (smaller units that make up amino acids), a clear difference in phosphorylation status was detected for each peptide between healthy subjects and the brains of Alzheimer's disease patients.

研究分野：神経科学

キーワード：Kii ALS/PDC　tau　phosphorylation　mass spectrometry　pluripotent stem cells

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

アルツハイマー病（AD）、筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン・認知症複合（Kii ALS/PDC）、第 17 番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う家族性前頭側頭型認知症（frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: FTDP-17）といったタウオパチーでは、側頭葉内側面を中心としたリン酸化タウタンパク質の蓄積を認めるが、タウのリン酸化の違いと疾患特異性の関係は不明である。過去の報告では、AD におけるタウタンパク質のリン酸化状態には、健常者との有意な違いが示されている[1)]。さらに、 AD および進行性核上性麻痺患者由来タウの網羅的リン酸化解析によって、健常者に比べ疾患由来のタウはそれぞれ特異的に高度なリン酸化を受けていることが報告された[2)3)]。しかし、本邦でのみ発症の確認される Kii ALS/PDC において、タウタンパク質のリン酸化についての詳細な解析の報告はない。

２．研究の目的

アルツハイマー病や Kii ALS/PDC に特異的なタウタンパク質のリン酸化状態を調べるために、健常者・患者凍結脳および iPS 細胞由来神経細胞からタウタンパク質を精製し、質量分析法によってリン酸化レベルやリン酸化部位の網羅的解析を行う。また、「同一疾患でもタウタンパク質のリン酸化状態が異なる」、「脳部位や細胞種特異的に促進されるタウタンパク質のリン酸化状態が存在する」という仮説を立て、脳内の複数部位・複数細胞のリン酸化状態の検討も目指す。

３．研究の方法

ヒト脳組織から質量分析（MS）解析を行うためのタウタンパク質の精製手法を確立し、健常者及び患者脳からタウタンパク質を精製しリン酸化状態を網羅的に解析する。ヒト凍結脳は、当施設ならびに各試料提供施設の倫理委員会による承認を得た上で、三重大学大学院地域イノベーション学研究科紀伊難病研究センターより Kii ALS/PDC 患者剖検脳を、公益財団法人脳血管研究所美原記念病院より健常者および孤発性 AD 患者剖検脳を入手し、先行論文を参考にタンパク質の可溶性及び不溶性画分を調製する[4)5)]。これらの調製画分から、抗タウ抗体を用いた免疫沈降でタウタンパク質を精製した後、免疫沈降産物を UltrafleXtreme MALDITOF/TOF-MS（Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA）を用いて MS 解析を行う[6)7)8)]。タンパク質における 85 箇所のセリン・スレオニン・チロシンのアミノ酸部位のリン酸化状態を、個々のサンプルで比較検討し、健常人に比べ AD や Kii ALS/PDC でリン酸化の亢進が起きているエピトープを決定していく。
慶應義塾大学医学部生理学教室では、健常者及び各疾患由来の全てのヒト iPS 細胞を揃えており、ヒト脳組織でのリン酸化パターンと対比する意味で、AD、Kii ALS/PDC、FTDP-17、健常人由来 iPS 細胞を用いる。iPS 細胞から大脳皮質ニューロンを分化誘導し、患者病態における早期ステージの神経細胞サンプルを調製し、ヒト凍結脳のサンプルと同様に、精製したタウタンパク質のリン酸化状態について MS を用いて解析する。その後、リン酸化部位の違いに起因する細胞レベルでの分子病態機序を探索する。
将来的には、配列特異的なキナーゼやリン酸化パスウェイを標的とした創薬に発展させていく。

４．研究成果

（１）ヒト凍結脳組織から MS 解析に使用するためのタウタンパク質の精製手法を確立した。具体的には、健常者３例および AD 患者３例の前頭葉と側頭葉、さらに Kii ALS/PDC 患者 21 例の前頭葉あるいは側頭葉の凍結サンプルから超遠心法およびグアニジン塩酸含有緩衝液等を利用し、可溶性画分および不溶性画分タンパク質を抽出した。その後、カラムアフィニティークロマトグラフィーの原理を用いた免疫沈降（IP）の系において、複数の抗ヒトタウ抗体から最適な抗体選定を行い（Anti-Tau Mouse monoclonal Ab (TAU-5) (Merck Millipore 社, abcam 社)、Anti-Tau Rabbit polyclonal Ab (H-150) (Santa Cruz Biotechnology 社)）、健常者、アルツハイマー病患者、および Kii ALS/PDC 患者凍結脳の可溶性および不溶性画分からタウタンパク質を特異的に抽出することに成功した（図１）。

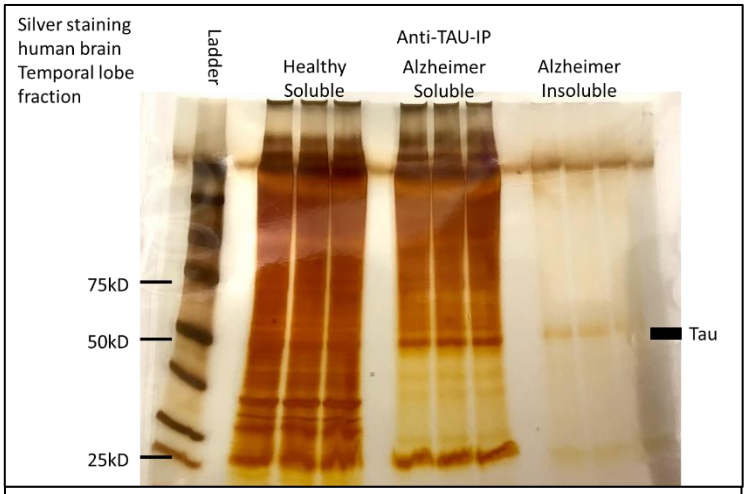

図１　ヒト凍結脳におけるタウタンパク質精製（銀染色像）

（２）本研究期間において、健常者および AD 患者脳由来免疫沈降産物に対して、Nano-scale liquid chromatographic tandem mass spectrometry (nLC-MS/MS) 分析（Q-Exactive HFX)を実施、MS データを Proteome Discoverer（PD）2.4（Thermo Fisher Scientific 社）と MASCOT2.6（MATRIX SCIENCE 社）で同定定量した。PhosphoRS（Protein Chemistry Facility）を用いて予測された結果から、181 個のリン酸化アミノ酸配列を同定した。さらに同定されたペプチドのリスト（4 種類：NCBI の GI number; 530412235/ 530412233/ 8400715/ 42495386）について、Abundance Ratio: (AD 患者脳可溶性画分) / (健常者脳可溶性画分)＝3.887/ 100/ 0.095/ 0.487、Abundance Ratio: (AD 患者脳不溶性画分) / (健常者脳可溶性画分)＝0.01/ NA/ 0.052/ 1.871 と、健常者と AD 患者脳の間で、各ペプチド毎にリン酸化の明確な差異を検出するに至った。このことは、取りも直さずアルツハイマー病特異的なリン酸化状態の存在を示唆し、今後の展望として、今回の研究課題にて確立した手法を用いて、Kii ALS/PDC 患者脳内でリン酸化の亢進が起きているタウタンパク質中のエピトープを決定していく予定である。

（３）MS 解析の結果から、不溶性画分試料中の IgG の混入が想定以上に多かったため、透析による不溶性画分のグアニジン濃度低減を試みた。もともと 0.4%グアニジン溶液であったが、Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassette（Thermo Fisher Scientific 社）によりグアニジンを可能な限り（タンパク質は析出しない範囲で）除去し、IP 時のグアニジンの影響が逓減される様子が観察された（図２）。これによりタウタンパク質の純度が向上し、MS 解析の精度が上昇することが期待される。

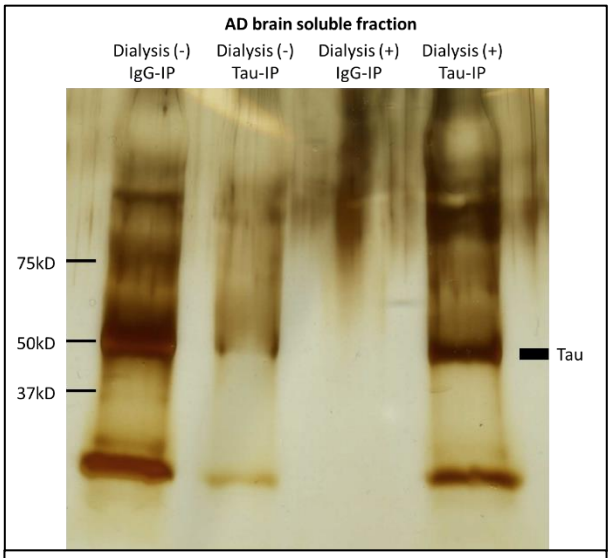

図２ 透析による免疫沈降効率の比較

（４）疾患特異的 iPS 細胞モデルについては、当研究室で保有する健常者ならびに AD 患者（家族性および孤発性）由来 iPS 細胞のほか、Kii ALS/PDC 患者由来 iPS 細胞を 6 名の患者より樹立した（これらの細胞株は、理化学研究所バイオリソース研究センター (RIKEN BRC)に寄託済みである。）。また、当研究室で確立された大脳皮質ニューロンの分化誘導方法を用いて [9]、安定的に患者由来大脳皮質ニューロンを供給できる体制まで整った。

（５）Kii ALS/PDC 患者脳におけるトランスクリプトーム解析（Gene Ontology 解析）により、mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade の亢進状態が示唆され [10]、Kii ALS/PDC 脳におけるリン酸化状態の亢進が後成遺伝学的観点からも改めて示唆されることとなった。

＜引用文献＞

① Understanding Alzheimer's Disease, Prof. Inga Zerr (Ed.), InTech 2013
② Hanger DP, et al. Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. J Biol Chem 2007;282(32):23645-54.
③ Wray S, et al. Direct analysis of tau from PSP brain identifies new phosphorylation sites and a major fragment of N-terminally cleaved tau containing four microtubule-binding repeats. J Neurochem 2008;105(6):2343-52.
④ Mulot SF, et al. PHF-tau from Alzheimer's brain comprises four species on SDS-PAGE which can be mimicked by in vitro phosphorylation of human brain tau by glycogen synthase kinase-3 beta. FEBS Lett 1994;349(3):359-64.
⑤ Hanger DP, et al. New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry. J Neurochem 1998;71(6):2465-76.
⑥ Hirosawa M, et al. Novel O-GlcNAcylation on Ser(40) of canonical H2A isoforms specific to viviparity. Sci Rep 2016;6:31785.
⑦ Shihoya W, et al. Activation mechanism of endothelin ETB receptor by endothelin-1. Nature 20165;537(7620):363-8.
⑧ Kwak HG, et al. Proteomic characterization of histone variants in the mouse testis by mass spectrometry-based top-down analysis. Biosci Trends 2016;10(5):357-64.

⑨ Sato T, et al. Generation of region-specific and high-purity neurons from human feeder-free iPSCs. Neurosci Lett 2021;746:135676.
⑩ Morimoto S, et al. Brain Transcriptome Analysis Links Deficiencies of Stress-Responsive Proteins to the Pathomechanism of Kii ALS/PDC. Antioxidants (Basel). 2020;9(5):423.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2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 Morimoto Satoru、Ishikawa Mitsuru、Watanabe Hirotaka、Isoda Miho、Takao Masaki、Nakamura Shiho、Ozawa Fumiko、Hirokawa Yoshifumi、Kuzuhara Shigeki、Okano Hideyuki、Kokubo Yasumasa	４．巻 9
２．論文標題 Brain Transcriptome Analysis Links Deficiencies of Stress-Responsive Proteins to the Pathomechanism of Kii ALS/PDC	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Antioxidants	６．最初と最後の頁 423～423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox9050423	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 Leventoux Nicolas、Morimoto Satoru、Hara Kenju、Nakamura Shiho、Ozawa Fumiko、Mitsuzawa Shio、Akiyama Tetsuya、Nishiyama Ayumi、Suzuki Naoki、Warita Hitoshi、Aoki Masashi、Okano Hideyuki	４．巻 47
２．論文標題 Generation of an ALS human iPSC line KEIOi001-A from peripheral blood of a Charcot disease-affected patient carrying TARDBP p.N345K heterozygous SNP mutation	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Stem Cell Research	６．最初と最後の頁 101896～101896
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2020.101896	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　3件／うち国際学会　2件）

１．発表者名 Kokubo Y, Morimoto S, Sasaki R, Kuzuhara S, Ishigami A
２．発表標題 Abnormal accumulation of citrullinated proteins in ALS/PDC of the Kii peninsula of Japan
３．学会等名 The 30th International Symposium on ALS/MND（国際学会）
４．発表年 2019年

１．発表者名 Morimoto S
２．発表標題 Elucidation of Pathomechanism and Development of Therapy for Kii ALS/PDC
３．学会等名 SLDDDRS WEBINAR SERIES 2021-2023. 1st Keio-Stanford Webinar.（招待講演）（国際学会）
４．発表年 2021年

１．発表者名
森本悟

２．発表標題
歯科補綴学研究者によるiPS細胞研究が拓く病態解析と創薬の未来

３．学会等名
第128回日本補綴歯科学会学術大会（招待講演）

４．発表年
2019年

１．発表者名
森本悟

２．発表標題
The development of iPSC-derived astrocytes in disease modeling of Kii ALS/PDC

３．学会等名
第24回グリア研究会

４．発表年
2019年

１．発表者名
森本悟

２．発表標題
筋萎縮性側索硬化症（ALS）におけるiPS細胞創薬から医師主導治験へのシームレスな展開

３．学会等名
第19回日本再生医療学会総会（招待講演）

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
研究協力者	堂前　直 (Domae Naoshi) (00321787)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・ユニットリーダー (82401)	

６．研究組織（つづき）

	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
研究協力者	渡部　博貴 (Watanabe Hirotaka) (30422413)	学校法人慶應義塾・慶應義塾大学医学部・特任講師 (32612)	

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