

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15999

研究課題名（和文）KANSL1の新奇スプライスバリエントによるタウの樹状突起蓄積を阻害する核酸医薬

研究課題名（英文）Exploration of nucleic acid drugs inhibiting tau dendritic spine accumulation caused by the novel splice variant of KANSL1 mRNA

研究代表者

田中 融（TANAKA, Toru）

日本大学・薬学部・専任講師

研究者番号：30823702

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）：本研究では、アルツハイマー病の原因分子であるtauが神経細胞の樹状突起に蓄積・凝集していく過程を阻害する核酸医薬を発見することを目標に解析をおこなった。tau mRNAと相補的なKANSL1 mRNAの新奇スプライスバリエントが相互作用することによって、tau mRNAの翻訳活性化が引き起こされることが明らかとなり、さらにその相互作用を阻害する核酸医薬を見出すことができた。これらの成果は第43回、44回、45回、46回 日本分子生物学会年会および日本薬学 第143年会、144年会で報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、tau mRNAにKANSL1 mRNAの新奇スプライスバリエントが相互作用することによって、tau mRNAの翻訳が活性化されることが明らかとなった。このことからこれらmRNAの相互作用を阻害できれば、tauの樹状突起での蓄積・凝集を防ぐことにつながり、アルツハイマー病の治療が期待できる。また、tau遺伝子とKANSL1遺伝子の関係のように、互いに逆向きに転写され相補的な転写産物が生じる遺伝子のペアは数多く存在し、mRNA-mRNA相互作用が新たな遺伝子発現調節機構であることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to discover nucleic acid drugs that inhibit the process of accumulation and aggregation of tau, a causative molecule of Alzheimer's disease, in the dendritic spines of neurons. It was revealed that the novel splice variant of KANSL1 mRNA, which is complementary to tau mRNA, interacts with it, leading to the activation of tau mRNA translation. Furthermore, we were able to identify nucleic acid pharmaceuticals that inhibit this interaction. These findings were reported at the 43rd, 44th, 45th, and 46th Annual Meetings of the Molecular Biology Society of Japan and the 143rd and 144th Annual Meetings of the Pharmaceutical Society of Japan.

研究分野：分子生物学

キーワード：tau KANSL1 アルツハイマー病 翻訳調節 核酸医薬 アンチセンスオリゴヌクレオチド

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

認知症の約6割を占めるアルツハイマー病(AD)は、神経細胞の樹状突起内に形成される神経原線維変化の構成成分である tau と、神経細胞の外に沈着する老人斑の構成成分であるアミロイド (A)を責任分子とする進行性で不可逆な神経変性疾患である。研究開始当初、ドネペジルをはじめとするコリンエステラーゼ阻害薬や NMDA 受容体拮抗薬のメマンチンが使用されていたが、いずれも対症療法で病気の進行を遅らせるに留まっており、根本的な治療法の開発が切望されていた。AD 発症のきっかけとして A が重要であるとするアミロイド仮説のもと、A をターゲットとした根本的な治療薬の開発が進められていたが、治験において良好な成果は得られていなかった(後に A に対する抗体医薬であるレカネマブが上市された)。それに対し、tau の凝集によって形成される神経原線維変化の広がりや認知機能の低下とよく相関しており、進行してしまった認知症のターゲットとして、AD 発症のメカニズム解析や治療薬開発が盛んに行われ始めていた。

AD 脳の神経細胞内では、過剰にリン酸化された tau が樹状突起に蓄積し、凝集体として検出されていたが、そのメカニズムはほとんど明らかになっていなかった。研究代表者は、tau が樹状突起に蓄積するメカニズムとして、mRNA レベルでの樹状突起輸送および神経刺激に応じた局所翻訳と、それに続く tau タンパク質の過剰リン酸化が関与していることを明らかにし、またその解析の過程で tau mRNA と相補的な KANSL1 mRNA の新奇スプライスバリエーション(tKANSL1)が tau mRNA と同様に樹状突起に輸送されていることを見出した。したがって、tau mRNA の樹状突起輸送を制御できれば、樹状突起での過剰リン酸化 tau の蓄積・凝集を抑制することができると考えられた。

2. 研究の目的

(1)樹状突起内における tau のリン酸化機構の解析

これまでに、研究代表者は神経刺激に応じて樹状突起内で局所翻訳された tau はさらに過剰リン酸化を受けることを報告している。AD でみられる tau 凝集体は高度にリン酸化されていることから、AD 発症に至る道筋を理解する上で、樹状突起内での tau のリン酸化機構の解析が必要である。

(2)tau mRNA の翻訳に対する tKANSL1 mRNA の影響

tKANSL1 mRNA と tau mRNA は tau 3' UTR のほぼ全長において相互作用しており、たがいに遺伝子発現の制御に関わっていることが予想された。tKANSL1 mRNA が tau mRNA に対してどのような影響を及ぼしているのか明らかにできれば、AD 治療薬の開発に大きく貢献できる。また、翻訳調節について、mRNA に対して non-coding RNA が相互作用して翻訳を調節することはすでに知られていたが、mRNA-mRNA 相互作用が翻訳調節に関わっていることは知られていなかった。本研究によって tau mRNA と tKANSL1 mRNA の関係を明らかにできれば、新たな遺伝子発現制御機構の発見となる。

(3)tau mRNA と tKANSL1 mRNA の相互作用を阻害する ASO の探索

樹状突起内で局所的に翻訳される樹状突起タンパク質は、シナプスの可塑性に重要なものが多く、tau mRNA の翻訳を特異的に阻害する必要がある。tau mRNA と tKANSL1 mRNA の相互作用は相補的な領域における塩基対の形成によるものであるため、配列特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を用いれば、tau mRNA の翻訳を特異的に阻害することができる。

3. 研究の方法

(1)樹状突起 tau の GSK3 によるリン酸化

代表的な tau のリン酸化酵素である GSK3 についても tau と同様に mRNA レベルで樹状突起へ輸送され、神経刺激に応じて局所的に翻訳されることを in situ hybridization や免疫染色を用いて解析した。また、活性型 GSK3 の存在量の変化も解析した。

(2)樹状突起 tau の CDK5 によるリン酸化

代表的な tau のリン酸化酵素である CDK5 についても tau と同様に mRNA レベルで樹状突起へ輸送され、神経刺激に応じて局所的に翻訳されることを in situ hybridization や免疫染色を用いて解析した。また、CDK5 の活性化も解析した。

(3)tau mRNA の翻訳に対する tKANSL1 mRNA の影響

まず、tau mRNA の全長を発現し tau コード領域の 5' 上流に DsRed 遺伝子を挿入したプラスミドベクター(pDsRed-Tau)、tKANSL1 mRNA の全長を発現し tKANSL1 コード領域の 5' 上流に EGFP 遺伝子を挿入したプラスミドベクター(pEGFP-tKANSL1)および tau mRNA の 3' UTR に相補的な tKANSL1 mRNA の領域を発現するプラスミドベクター(pEGFP-AS)を構築した。神経系の株化細胞 NG108-15 に pDsRed-Tau および pEGFP-tKANSL1 あるいは pEGFP-AS をコトランスフェクションし、tau mRNA の翻訳活性に対する tKANSL1 mRNA の影響を解析した。タンパク質の発現量はウエスタンブロットで解析し、mRNA の発現量は RT-PCR を用いて解析を行った。mRNA の発現量に対するタンパク質の発現量の比をとり、翻訳活性と定義した。

(4) 神経細胞における神経刺激に応じた KANSL1 mRNA の翻訳活性化

tKANSL1 mRNA は tau mRNA と同様に樹状突起にまで分布している。樹状突起に輸送される mRNA は神経刺激に応じて局所的に翻訳が活性化されることが知られている。そこで、KANSL1 mRNA も神経刺激に応じて実際に翻訳が活性化されるのか解析を行った。分化 14 日目のマウス海馬由来初代培養神経細胞を 500 μ M のグルタミン酸で処理、KANSL1 タンパク質の発現量の変化を免疫染色で解析した。また、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを併用した場合についても解析を行った。

(5) tau mRNA と tKANSL1 mRNA の相互作用を阻害する ASO の解析

NG108-15 細胞に pDsRed-Tau および pEGFP-AS を遺伝子導入後、種々のアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) をトランスフェクションし、発現してくる DsRed-tau の量的変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 樹状突起 tau の GSK3 によるリン酸化

樹状突起へ tau mRNA が輸送され、神経刺激に応じて局所的に翻訳された tau が過剰にリン酸化された状態で検出されたことから、tau のリン酸化酵素である GSK3 も同様に mRNA レベルで樹状突起へ輸送され局所的に翻訳されることが考えられた。そこで、in situ hybridization を用いて GSK3 mRNA の細胞内分布を調べたところ、樹状突起にまで存在していることが確認できた (図 1A, B)。このとき、mRNA 輸送に重要な RNA 結合タンパク質である Staufen1 や FMRP との相互作用も免疫沈殿を用いた手法で確認できた。さらに神経刺激による変化を解析するためにグルタミン酸で処理したところ、GSK3 の樹状突起内発現量増加は tau の場合に比べてわずかであったが、PP1 を介した GSK3 の脱リン酸化による GSK3 の活性化が引き起こされることが分かった (図 1C-F)。この成果は Neurochem. Int. (2020)、第 43 回 日本分子生物学会年会 (2020) にて報告し、また、この成果を発展させて樹状突起内の過剰リン酸化 tau が凝集していくメカニズムに関する解析を行い、得られた成果は日本薬学会 第 143 年会 (2023)、第 144 年会 (2024) にて報告した。

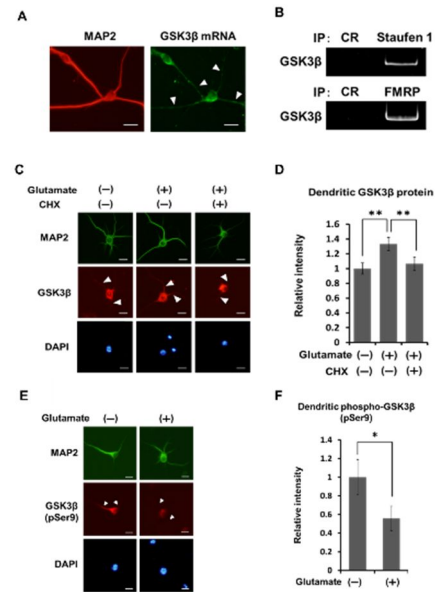


図1 GSK3 β mRNA の分布とグルタミン酸による活性化

(2) 樹状突起 tau の CDK5 によるリン酸化

GSK3 と同様、CDK5 も tau の代表的なリン酸化酵素であり、CDK5 mRNA の樹状突起輸送および局所翻訳について解析した。CDK5 mRNA もまた樹状突起に分布し神経刺激によって局所的に翻訳が活性化され、それに応じてリン酸化 tau の発現が増加することが分かった (図 2)。さらに NMDA 受容体を介した Ca^{2+} 流入によりカルパインが活性化され、CDK5 の活性化作用が強い p25 の生成が増加した。この成果は Biochimica et Biophysica Acta (2022)、第 4 5 回 日本分子生物学会年会 (2022) にて報告した。

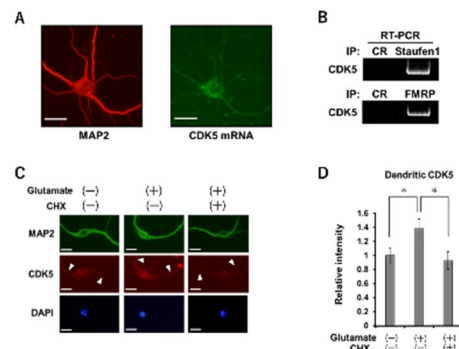


図2 CDK5 mRNA の分布とグルタミン酸による活性化

(3) tau mRNA の翻訳に対する tKANSL1 mRNA の影響

KANSL1 mRNA の新奇プライスバリエーション (tKANSL1) は既知の KANSL1 mRNA と比べて 3' -UTR が長く、全長で約 9700 塩基にもなる。この 3' UTR の長さの異なる mRNA が生じる理由として、利用されるポリ A シグナルの違いがある。既知の KANSL1 mRNA の場合は KANSL1 コード配列の下流約 1500 塩基にある一つ目のポリ A シグナルを利用しているのに対し、tKANSL1 mRNA の場合は tau 遺伝子領域にある二つ目のポリ A シグナルを利用している (図 3)。そのため、tKANSL1 mRNA は tau mRNA の 3' -UTR のほぼ全長約 3000 塩基と相補的である。興味深いことに、tau mRNA もま

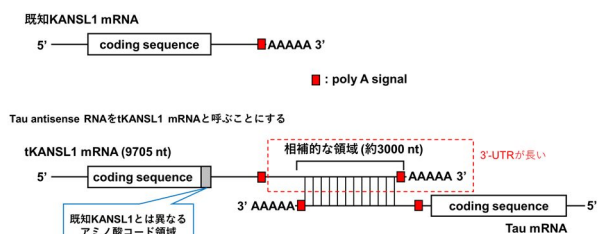


図3 tau mRNA と tKANSL1 mRNA の配列的關係性

たポリ A シグナルを二つ持っており、tKANSL1 mRNA と相補的なのは長い方の RNA である。

Tau mRNA の翻訳に与える tKANSL1 mRNA の影響を調べるために pDsRed-tau および pEGFP-tKANSL1 を神経系培養細胞 NG108-15 にトランスフェクションした。mRNA あたりのタンパク質量を翻訳活性と定義すると、EGFP-tKANSL1 mRNA の存在により DsRed-tau mRNA の翻訳活性は約 2 倍増加した(図 4)。さらに tKANSL1 mRNA の tau mRNA と相補的な領域だけでもこの活性化が起こるのか調べるために、pEGFP-tKANSL1 の代わりに pEGFP-AS をトランスフェクションしたところ、興味深いことにこの場合も DsRed-tau mRNA の翻訳活性が増加した。この成果は第 4 4 回 日本分子生物学会年会(2021)にて報告した。

(4)神経細胞における神経刺激に応じた KANSL1 mRNA の翻訳活性化

tKANSL1 mRNA は tau mRNA と同様に樹状突起にまで分布しており、神経刺激に応じて局所的に翻訳が行われていることが考えられた。マウス海馬由来神経細胞をグルタミン酸で処理したところ、興味深いことに tKANSL1 の樹状突起内発現量が増加し、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドによってこの増加は見られなくなった。このことから、tKANSL1 mRNA も神経刺激に応じて翻訳が活性化されることがわかった。

(5)tau mRNA と tKANSL1 mRNA の相互作用を阻害する ASO の解析

(3)の解析により tKANSL1 mRNA が tau mRNA の翻訳を促進することが分かったので、AD 治療薬開発のターゲットとして tKANSL1 mRNA と tau mRNA の相互作用の阻害が想定できる。本研究では RNA の配列特異的に作用することのできるアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)に着目して効果を検討した。

ASO として DNA を用いて解析を行った。tKANSL1 mRNA の tau mRNA と相補的な領域に作用する 40 塩基の ASO を複数種類用意した。いずれの ASO も tKANSL1 mRNA の異なる領域に作用する。NG108-15 細胞に pDsRed-tau および pEGFP-AS を遺伝子導入後、ASO を 1 種類ずつトランスフェクションし、発現してくる DsRed-tau の量を比較した。その結果 1 種類だけだと効果的に DsRed-tau の発現を抑えることは難しいことがわかった。そこで、15 種類の ASO を処理したところ、DsRed-tau の翻訳を効果的に抑制することができた(図 5)。この成果は第 4 6 回 日本分子生物学会年会(2023)にて報告した。

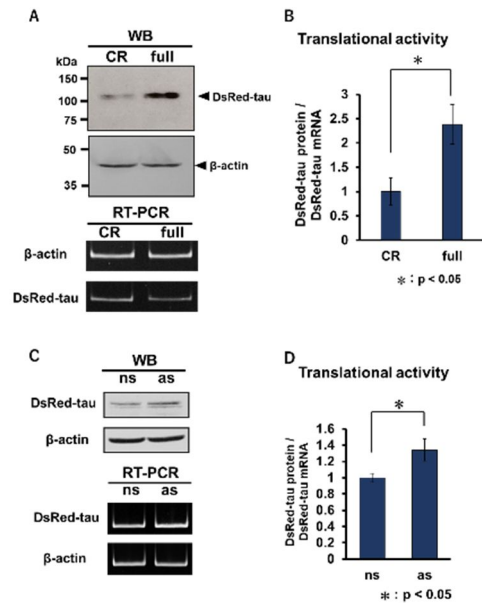


図4 tau mRNA の翻訳活性に対する tKANSL1 mRNA の影響

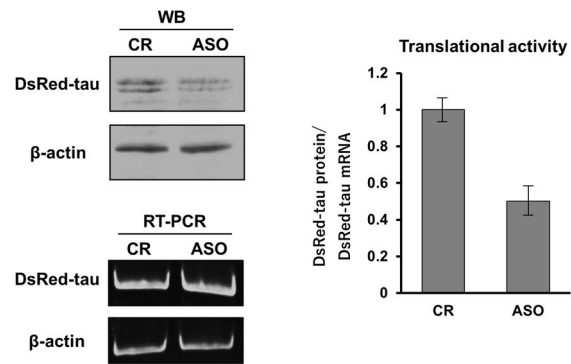


図5 tau mRNA と tKANSL1 mRNA の相互作用を阻害する ASO の解析

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 0件）

1. 著者名 Toru Tanaka, Sachiyo Ohashi, Akihiko Takashima, Shunsuke Kobayashi	4. 巻 1886
2. 論文標題 Dendritic distribution of CDK5 mRNA and p35 mRNA, and a glutamate-responsive increase of CDK5/p25 complex contribute to tau hyperphosphorylation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2022.130135	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 Toru Tanaka, Sachiyo Ohashi, Akihiko Takashima, Shunsuke Kobayashi	4. 巻 139
2. 論文標題 Glutamate-responsive translation of dendritic GSK3beta mRNA triggers a cycle for amplification of reactivated preexisting GSK3beta that is indispensable for tau hyperphosphorylation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104808
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2020.1048	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 融, 大橋 祥世, 小林 俊亮
2. 発表標題 Tauの過剰リン酸化に関わるCDK5の樹状突起発現機構と活性化機構
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 融, 大橋 祥世, 小林 俊亮
2. 発表標題 樹状突起におけるTauの局所翻訳と過剰リン酸化
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中 融, 大橋 祥世, 小林 俊亮
2. 発表標題 tau mRNAに相補的なKANSL1 mRNAの新奇スプライスパリアントの解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中融, 大橋祥世, 高島明彦, 小林俊亮
2. 発表標題 グルタミン酸刺激に応じた樹状突起GSK3 の活性化とタウの過剰リン酸化
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中融, 大橋祥世, 小林俊亮
2. 発表標題 KANSL1 mRNAの新奇3' -UTRパリアントはtau mRNAに相補的な領域を持ち翻訳を活性化する
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中融, 大橋祥世, 小林俊亮
2. 発表標題 高リン酸化Tauの凝集におけるカルシウムイオンの影響
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024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
---------	---------