

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：24405

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2022

課題番号：22K20746

研究課題名（和文）中枢神経系の形成における α -synucleinとtauの制御機構の解明

研究課題名（英文）Functional cooperation of alpha-synuclein and Tau is essential for proper corticogenesis

研究代表者

王 晟明 (Wang, Shengming)

大阪公立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80967406

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,100,000円

研究成果の概要（和文）：私たちは機能的なリダンダンシーの問題を解決するためにアルファシヌクレインとタウのダブルノックアウトマウスを作成し、表現型を解析した。一連の研究で、アルファシヌクレインとタウは神経幹細胞の維持に重要な役割を果たしており、ダブルノックアウトマウスは神経幹細胞の早期の枯渇に伴う小脳症を示すことがわかった。特に発生後期に起こるグリア形成が顕著に障害されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちはアルファシヌクレインとタウのDKOマウスの解析を通して生理的な機能を明らかにしたが、DKOマウスに見られる神経形成の異常はこれまで報告されているものと全く異なったメカニズムで小脳症が発症している。したがってアルファシヌクレインとタウの関連研究は神経発生と神経変性の新たなフロンティアの開拓につながることを期待される。このことはアルファシヌクレインとタウの生理的な機能に迫る大きな手がかりを初めて提示するものである。

研究成果の概要（英文）：To reveal functional cooperation, we generated alpha-synuclein and tau double-knockout mice and characterized the functional cross talk between these proteins during brain development. As result, we find that deletion of alpha-synuclein and tau break the balance between the proliferative and neurogenic divisions of neuronal progenitor cells, resulting in an overproduction of early born neurons. On the other hand, precocious neurogenesis causes reduction of the number of neural progenitor cells in the middle stage of corticogenesis to diminish subsequent gliogenesis, and lead to reduction of brain size after born.

研究分野：医化学

キーワード：神経発生 微小管結合タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病やアルツハイマー病は代表的な神経変性疾患であり、アルファシヌクレインとタウはその原因遺伝子として同定された。一方で、その生理的な機能は長年の研究にもかかわらず不明であった。その大きな理由はシングルノックアウトマウスが軽微な表現型しか示さず、機能に迫る知見が限られていたからである。

2. 研究の目的

我々はアルファシヌクレインとタウのダブルノックアウトマウスを作って、胚と幼年期マウスの中枢神経系の構造を確認して、アルファシヌクレインとタウの中枢神経系形成における役割を解明する。

アルファシヌクレインとタウの欠損は発生早期に神経幹細胞の分化を促進して、幹細胞の枯渇が起こり、発生後期の神経膠細胞の形成が大きく障害されることを発見し、小脳症となることがわかった。アルファシヌクレインとタウの欠損が膠細胞形成に関わることを示したのは、我々の研究が初めてである。我々の研究から、アルファシヌクレインとタウの生理機能に迫る大きな手がかりとなることが期待される。さらに、今回明らかとなった神経形成の異常はこれまで報告されているものと異なり、神経発生の新たなフロンティアの開拓につながることを期待される。

3. 研究の方法

アルファシヌクレインとタウのダブルノックアウトはアルファシヌクレインシングルノックアウトマウスとタウシングルノックアウトマウスの交配で生成する。ジェノタイピングは標準 PCR でやる。

マウス脳標本は PLP 固定液で固定された、スクロース置換後凍結切片をする。BrdU の注射量が 50 μ g/g マウス重さ。

ライブセルイメージングで動力タンパクの細胞内運動解析と脳のスライス培養。

RT-qPCR と脳組織タンパク定量分析。

データ解析は全部 3 組以上の重複実験をやる。

4. 研究成果

アルファシヌクレインとタウのダブルノックアウトを使って、生後 6 週間の脳の構造を調べました。生後 6 週目のアルファシヌクレインとタウのダブルノックアウトマウスの脳サイズが明らかに減少していることがわかりました (図 1)。これらの結果は、アルファシヌクレインとタウが脳の発生中に重要な役割を果たしていることを強く示唆しています。

中中枢神経系の形成は主に神経前駆細胞の増殖と分化が制御している。生後 6 週目と異なって、Embryo day 14 (E14) のアルファシヌクレインとタウのダブルノックアウトマウスの脳サイズが明らかに増加した。脳室帯の放射状グリア細胞を注目するために、増殖と分化のマーカーを使って、神経前駆細胞を表示する。E14 のアルファシヌクレインとタウのダブルノックアウトマウスの脳室帯に放射状グリア細胞から分化された神経前駆細胞が明らかに増加しました (図 2)。E14 より早い時期の状況を確認するために、E12 のマウスに増殖と分化のマーカーを標示して、発生早期の幹細胞と前駆細胞をチェックした。この時期に、アルファシヌクレインとタウのダブルノックアウトマウスの神経細胞の形成は野生型とシングルノックアウトより早いとわかりました (図 3)。

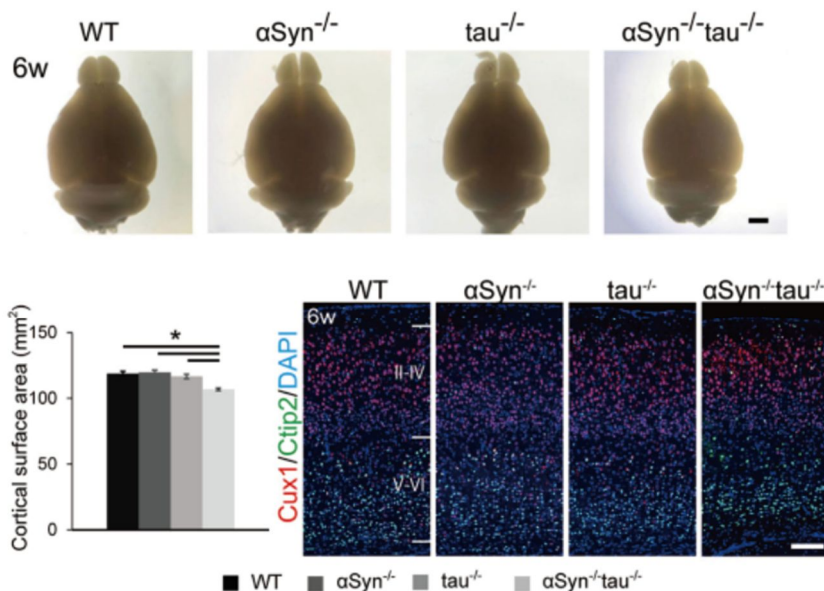


図 1. アルファシヌクレインとタウの欠損は成体マウスの脳サイズに影響がある

状態グリア細胞を注目するために、増殖と分化のマーカーを使って、神経前駆細胞を表示する。E14 のアルファシヌクレインとタウのダブルノックアウトマウスの脳室帯に放射状グリア細胞から分化された神経前駆細胞が明らかに増加しました (図 2)。E14 より早い時期の状況を確認するために、E12 のマウスに増殖と分化のマーカーを標示して、発生早期の幹細胞と前駆細胞をチェックした。この時期に、アルファシヌクレインとタウのダブルノックアウトマウスの神経細胞の形成は野生型とシングルノックアウトより早いとわかりました (図 3)。

アルファシヌクレインとタウのダブルノックアウトマウスは発生早期から radial glial cells と

intermediate

progenitor cells の増殖と分化が促進されただけ、メカニズムがまだ解明する必要がある。神経細胞分化関連因子 Ngn2 の標示結果はアルファシヌクレインとタウのダブルノックアウトマウスが幹細胞の分化に関連する Notch 通路に影響を与え、Notch 通路の

信号マーカーを使って、アルファシヌクレインとタウのダブルノックアウトマウス中枢神経の中に表現レベルを定量分析は野生型とシングルノックアウトマウスより低かった (図 4)。

アルファシヌクレインとタウはマイクロチューブル関連タンパクです、両方欠損の時にマイクロチューブルに影響を与える。マイクロチューブル末端の結合タンパク質 EB3 の移動が影響されている。

アルファシヌクレインとタウのダブルノックアウトマウスの脳室帯スライス培養をして神経幹細胞のエレベーター運動を解析する。DKO マウスのエレベーター運動が加速されることが分かりました。

この結果が DKO マウス神経発生の促進する機構を説明していた。

アルファシヌクレインとタウのダブルノックアウトマウスが発生早期に幹細胞の分化が加速されて、幹細胞の量が正常より早めに減少されると思う。その原因で出生後から DKO マウスの脳サイズが減少初めている。その同時に発生後期に神経膠細胞の中の星形膠細胞と希突起膠細胞発生と分化が抑制される (図 5)。

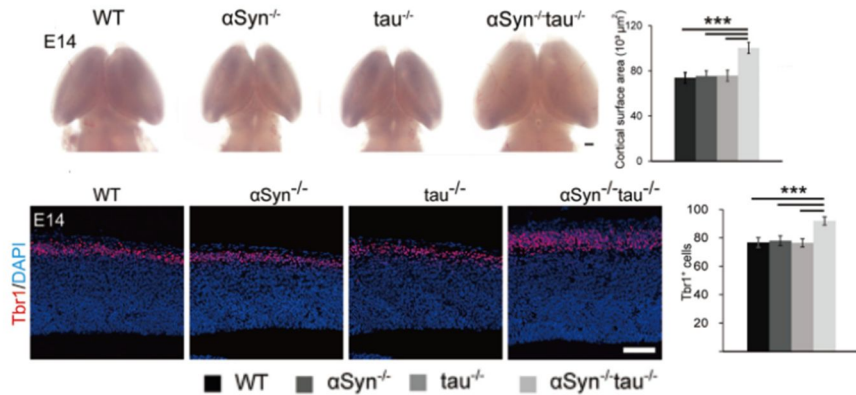


図 2. アルファシヌクレインとタウの欠損は E14 マウスの神経分化を促進する

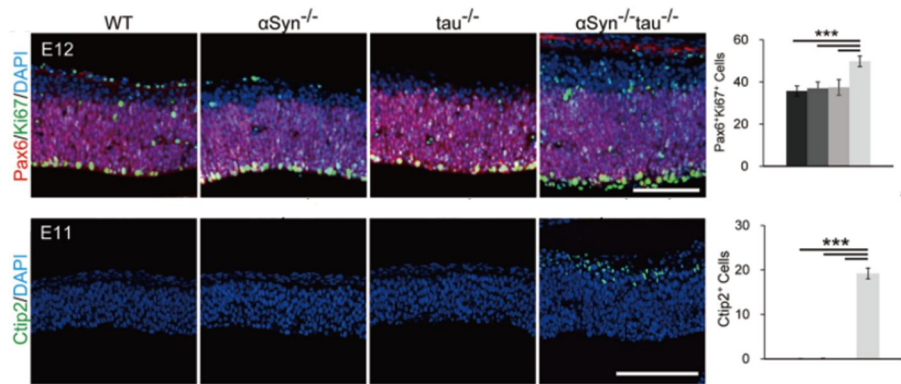


図 3. アルファシヌクレインとタウダブルノックアウトマウスの早期神経増殖と分化が促進される

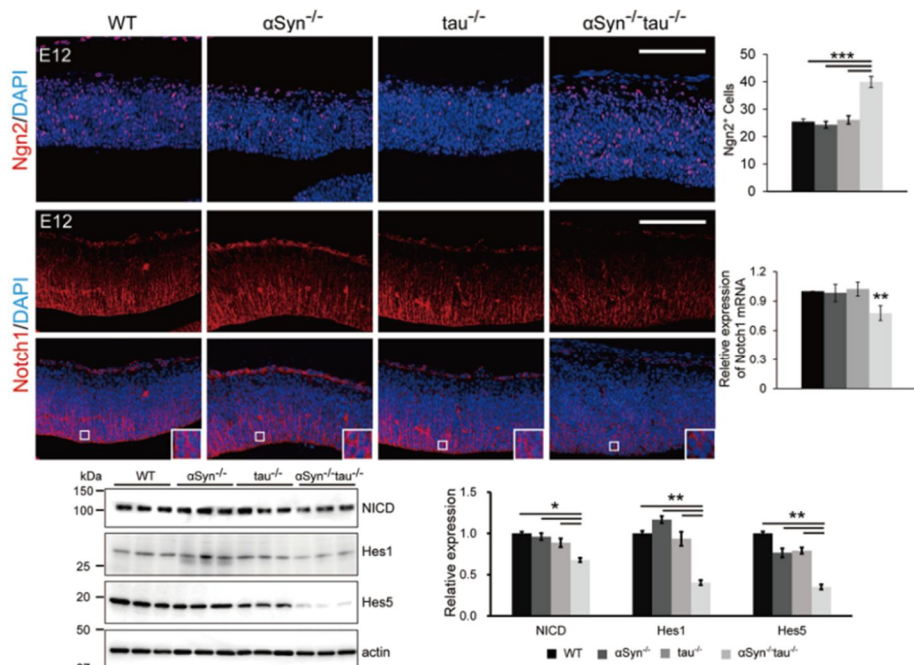


図 4. アルファシヌクレインとタウの喪失が Notch 通路信号を減らす

アルファシヌクレインとタウの欠損がマウス中枢神経発生早期の神経分化が促進され、神経幹細胞の早期枯渇を起こって、発生後期に神経膠細胞の星形膠細胞と希突起膠細胞発生と分化を抑制される。Notch 通路の抑制とエレベーター運動の促進がこの現象の分子機構にサポー

トする。今回明らかとなった神経形成の異常はこれまで報告されているものと異なり、神経発生の新たなフロンティアの開拓につながることを期待される。

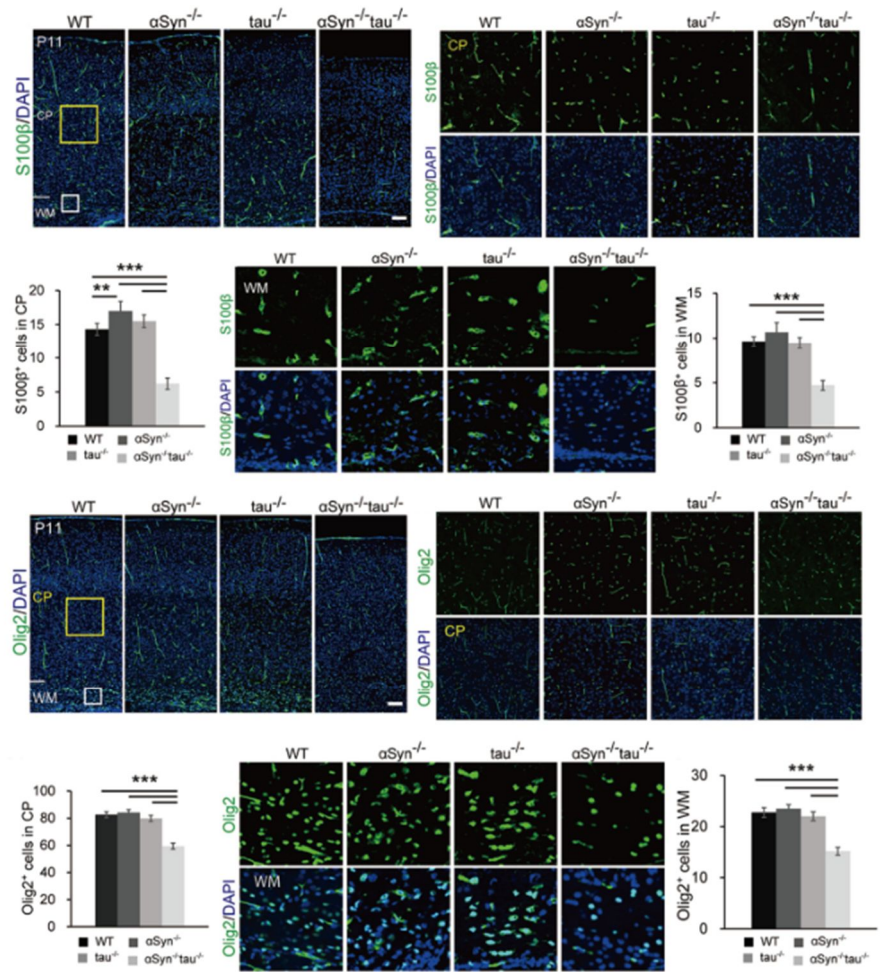


図 5. アルファシヌクレインとタウの喪失が神経膠細胞の発生と分化を抑制される

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wang Shengming, Fu Yu, Miyata Takaki, Matsumoto Sakiko, Shinoda Tomoyasu, Itoh Kyoko, Harada Akihiro, Hirotsune Shinji, Jin Mingyue	4. 巻 42
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 of 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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Wang Shengming
2. 発表標題 Functional cross-talk between α -Synuclein and tau in corticogenesis
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022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
---------	---------