

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18366

研究課題名(和文) 異常リン酸化認知症Tauの新規定量解析による発病機構の解明

研究課題名(英文) Novel quantitative analysis of abnormal phosphorylated tau

研究代表者

木村 妙子 (KIMURA, TAEKO)

首都大学東京・理工学研究科・特任研究員

研究者番号：60748820

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)：アルツハイマー病を含むタウオパチーの病理的特徴は異常リン酸化タウを含む凝集体である。本研究では定量的リン酸化かつ組み合わせ解析可能なPhos-tag法を用い解析を行なった。培養細胞強制発現タウを解析したところ、12の異なるリン酸化アイソタイプが存在し、主な部位はThr181, Ser202, Thr231, Ser235, Ser404であった。これはマウス脳タウと同様であった。ヒト脳を用いた解析では予想外に非リン酸化タウの存在率が高いこと、病理進行程度でリン酸化の更新がみられたが可溶性タウでは異常リン酸化は見られなかった。このことより凝集タウが積極的にリン酸化を受けることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Tau is hyperphosphorylated in the brains of patients with tauopathies, such as Alzheimer's disease. However, neither the mechanism of hyperphosphorylation nor its contribution to pathogenesis is known. I applied the Phos-tag SDS-PAGE. Here, I found ~12 phosphorylation isotypes of tau in culture cells with different combinations of phosphorylation at Thr181, Ser202, Thr231, Ser235 and Ser404. These phosphorylation sites were similar to tau phosphorylated in mouse brains. In normal elderly human brains, nonphosphorylated ON3R and ON4R tau were most abundant. A slightly higher phosphorylation of tau, which may represent the early step of hyperphosphorylation, was increased in Alzheimer disease patients at Braak stage V. Tau was pelleted by centrifugation, and sarkosyl-soluble tau in either Alzheimer disease or corticobasal degeneration brains showed phosphorylation profiles similar to tau in normal human brain, suggesting that hyperphosphorylation occurs in aggregated tau.

研究分野：神経化学

キーワード：タウ リン酸化 Phos-Tag SDS-PAGE法 Cdk5 ヒト患者脳 タウオパチー

## 1. 研究開始当初の背景

日本では高齢化社会が急速に進んでおり、高齢者の認知症予防や治療が急務な問題となっている。認知症の50%以上を占めるアルツハイマー病(AD)の特徴は神経原線維変化と呼ばれる神経細胞内沈着物であり、その主要成分は異常にリン酸化された Tau である。異常リン酸化 Tau の蓄積が見られる疾患は他にも数多く知られており、それらは総称してタウオパチーと呼ばれている。AD の他に皮質基底核変性症(CBD)、進行性核上性麻痺(PSP)、ピック病(PiD)などがある。異なるタウオパチーでは発病時期、病態に違いがあるが、これらは Tau の蓄積箇所やリン酸化の違いによるものと考えられる。家族性の前頭側頭葉型認知症(FTDP-17)では Tau の変異が原因となり、異常リン酸化、蓄積、そして神経変性が引き起こされることが明らかになっている。即ち Tau の変異が疾患を引き起こす理由を明らかにするためには Tau の異常リン酸化が起きる仕組みを解析することが重要と考えた。

Tau のリン酸化はリン酸化酵素(Cdk5、GSK3-、PKA など)と脱リン酸化酵素(PP2A など)によって制御されている。疾患脳ではこれらのバランスが崩れることにより、Tau が異常にリン酸化されると考えられている。バランスの崩れる原因と崩れ方を明らかにする必要がある。AD 患者脳内で見られる Tau のリン酸化部位は約 30 ヶ所と報告されている(Hanger et al., 2009)。これほど多くのリン酸化部位が亢進している理由として、脱リン酸化酵素のダウンレギュレーションが提唱されている(Vogelsberg-Ragaglia et al., 2001)。申請者も脱リン酸化酵素についての研究を行い、脱リン酸化制御因子 Pin1 について報告をした(Kimura et al., 2013)。その過程でリン酸化抗体では Tau 分子全体のごく一部がリン酸化されるだけでも検出されてしまい、Tau の全体のリン酸化量を評価出来ないことに気が付いた(Kimura et al., 2014)。つまりリン酸化抗体による解析ではタウオパチーで特定のリン酸化部位のリン酸化が亢進していることは明らかとされているが、Tau の全体のリン酸化状態を評価することは出来ていなかった。近年、タンパク質のリン酸化状態を解析する手法として、リ

ン酸基を特異的に捕捉する Phos-Tag を用いたリン酸親和性電気泳動法が開発された(Kinoshita et al., 2006)。通常の SDS-PAGE ではタンパク質は単一バンドで検出されるが、Phos-Tag SDS-PAGE 法を用いることで、リン酸化部位やリン酸基の数によって移動度が異なるバンドが検出される。また、Phos-Tag SDS-PAGE 法で得られた全バンド量から目的のバンドを比較することにより、リン酸化量を定量することも可能である。本研究では Phos-tag SDS PAGE 法を用い、Tau のリン酸化量とリン酸化の組み合わせを定量的に解析する方法を確立し、タウオパチーにおける Tau のリン酸化の実態を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

タウオパチーは Tau の凝集体を病理とする一群の神経変性疾患である。Tau の毒性が疾患の原因となっていると考えられるが、その実体は不明である。凝集 Tau は異常リン酸化されており、異常リン酸化を解明することはその毒性及び病理の解明につながると考えられる。これまでの Tau のリン酸化研究は主としてリン酸化抗体により行われてきた。しかし、リン酸化抗体による解析では特定のリン酸化部位の相対的なリン酸化量の比較しか出来ず、全体のリン酸化量は評価出来なかった。本研究では Tau の異常リン酸化の実体を明らかにするため、リン酸化の組合せとリン酸化の総量を定量可能な Phos-Tag 法を用いて、タウオパチーにおける Tau のリン酸化解析を行うことで Tau の異常リン酸化の実態を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

各タウオパチー(AD, CBD, PSP, PiD, FTDP-17)の異なるリン酸化を Phos-tag 法を用いて解析し、発病に關与するリン酸化酵素を同定する。それらリン酸化酵素の阻害剤が各タウオパチーの治療予防となりえるかを検討した。

まずは培養細胞にて主な Tau キナーゼによる Tau のリン酸化を Phos-tag で解析し、プロファイリング(リン酸化酵素によるバンドシフトデータベース化)を作製する。次にマウスモデルにてプロファイリングを基に解析。

#### 4. 研究成果

##### (1) 培養細胞でのリン酸化タウアイソタイプ の同定

培養細胞に発現させたタウのリン酸化を Phos-tag 法により解析した。タウは 12 のバンドに分

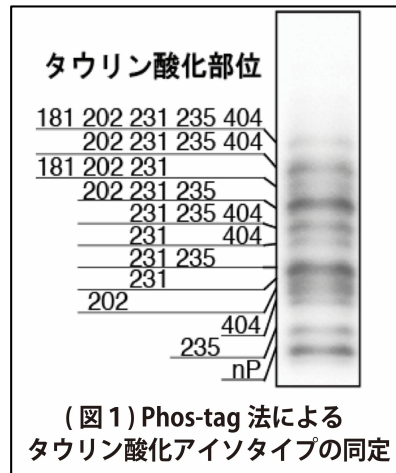
離され、異なる部位で

リン酸化された多くのアイソタイプとして存在することが示された (図 1)。

リン酸化されない各種 Ala 変異体を作成し、リン酸化部位を同定したところ、主なリン酸化部位は Thr181、Ser202、Thr231、Ser235、Ser404 であった。いずれも Ser/Thr-Pro 配列であり、プロリン指向性キナーゼによってリン酸化されていることが示された (Kimura et al., Scientific Reports)。

##### (2) AD モデルマウス脳を用いたタウのリン酸化解析

(1)のリン酸化プロファイリング(図 2)を基にして AD モデルマウス脳におけるタウのリン酸化解析を行った。AD モデルマウスとして、P301L トランスジェニック(Tg)マウス(FTDP-17 の変異 Tau の Tg)と 5x FAD マウス(変異 APP と変異プレセニリンの Tg で AD モデル)の 2 種類を用いた。P301L Tg マウスはおよそ 50 週齢で高リン酸化 Tau の凝集が見られることが知られていた。50 週齢では野生型に比べ P301L Tg マウスでは Tau の高リン酸化が確認され、主なリン酸化部位は Thr181、Ser202、Thr231、Ser235、Ser404



であった (Kimura et al., Scientific Reports リバース中)。また、5x FAD マウス(A の高い産生がみられる)ではタウの高リン酸化は確認されず、A 量の増加によるマウス内在性タウのリン酸化への影響を確認するにはいたらなかった (Kimura et al., AJP 2016)。

##### (3) ヒト脳におけるタウのリン酸化定量解析

AD 脳では 30 ヶ所以上の異常リン酸化が報告されている。その通りであれば、リン酸化タウアイソタイプは膨大な数になり、Phos-tau 法によっても解析は困難である。そこで初めに正常ヒト脳内での非リン酸化タウとリン酸化タウの比率を解析した。成体ヒト脳においては 3 リピード型(ON3R)と 4 リピード型(ON4R)のアイソフォームタウが存在する。それぞれのアイソフォームのリン酸化状態を Phos-tag 法で解析したところ、それぞれのアイソフォームのうち 17.9%、14.1%は全くリン酸化されていない非リン酸化型であり、予想以上に多く非リン酸化型タウが成体脳に存在することが明らかになった。また Phos-tag 法で分離したタウをリン酸化抗体で検出することで、特定のリン酸化部位の定量化を行った。この解析により、ヒト成体脳において Ser404 がタウ全体の 57%でリン酸化されていることが明らかとなった (Kimura et al., AJP 2016)。

##### (4) タウオパチー患者脳におけるタウのリン酸化定量解析

AD の進行に伴うタウのリン酸化解析

AD の進行に伴う、タウのリン酸化の総量を明らかにするため、健常者脳、中程度 AD 患者脳(ブランクステージ V)、重度 AD 患者脳(ブランクステージ VI)を Phos-Tag 法で解析した。AD 脳では健常者に比べてタウのリン酸化の上昇が見られ、また重度の患者では中程度に比べさらなるリン酸化の亢進が確認された。しかし、この増加は既に健常者脳にも存在するリン酸化アイソタイプの増加であった。つまり、AD の進行に伴いリン酸化アイソタイプの組み合わせは健常者脳と変わらないが、リン酸化状態が高いリン酸化アイソタイプの割合が増加することが分かった (Kimura et al., AJP 2016)。

皮質基底核変性症(CBD)脳でのタウのリン酸化解析

タウオパチーの一つである CBD 患者脳でのリン酸化解析を行った。(4-a)と同様にCBD患者脳、健常者脳、AD 患者脳でタウのリン酸化状態を Phos-Tag 法で比較したところ、CBD 患者脳では健常者脳や AD 患者脳とは異なるリン酸化アイソタイプを示した(Kimura et al., AJP 2016)。

申請者は、Phos-tag SDS-PAGE 法を用いることで生体内でのタウのリン酸化部位や組み合わせを定量的に解析する手法を独自に開発し、この手法をヒト疾患に適用することで、異なるタウオパチーではタウのリン酸化アイソタイプが異なることを明らかにした。これはタウのリン酸化アイソタイプの違いがタウオパチーにより異なる病理を示す原因である可能性を示唆している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

Kimura T, Hatsuta H, Masuda-Suzukake M, Hosokawa M, Ishiguro K, Akiyama H, Murayama S, Hasegawa M, Hisanaga S. The Abundance of Nonphosphorylated Tau in Mouse and Human Tauopathy Brains Revealed by the Use of Phos-Tag Method. Am J Pathol. 186:398-409,2016

Kimura T, Hosokawa T, Taoka M, Tsutsumi K, Ando K, Ishiguro K, Hosokawa M, Hasegawa M, Hisanaga S. Quantitative and combinatory determination of in situ phosphorylation of tau and its FTDP-17 mutants. Sci Rep. 6:33479,2016

[学会発表](計 5件)

招待講演

Kimura, T., Hatsuta, H., Masuda-Suzukake, M., Hosokawa, M., Ishiguro, K., Akiyama, H., Murayama, S., Hasegawa, M., Hisanaga, S. The abundance of nonphosphorylated tau among heterogeneously phosphorylated tau species in vivo in mouse and human tauopathy brains 第 58 回日本神経化学会大会(9・2015 埼玉)

木村妙子、久永眞市. Phos-tag SDS-PAGE 法による神経変性疾患タウのリン酸化解析. 第 66 回電気泳動学会(9・2015 東京)

国際学会発表 (ポスター)

Taeko Kimura, Hiroyuki Hatsuta, Masami Masuda-Suzukake, Masato Hosokawa, Koichi Ishiguro, Haruhiko Akiyama, Shigeo Murayama, Masato Hasegawa, Shin-ichi Hisanaga. New insights in quantitative analysis of phosphorylation of Tau in AD model mouse and Tauopathy brains by Phos-tag SDS-PAGE. 25th meeting of the International society for neurochemistry (8, 2015 Cairns, Australia)

国内学会発表 (ポスター)

Taeko Kimura, Koichi Ishiguro, Masato Hasegawa, Shi-ichi Hasegawa. Tau は細胞内で様々なリン酸化状態として存在する。第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学会大会 合同年会 (10. 2016 福岡)

Taeko Kimura, Tomohisa Hosokawa, Koji Tsutsumi, Masami Masuda-Suzukake, Masato Hosokawa, Koichi Ishiguro, Haruhiko Akiyama, Shigeo Murayama, Masato Hasegawa, and Shin-ichi Hisanaga. New insights in tau phosphorylation obtained by Phos-tag SDS-PAGE analysis. Phos-tag 法を用いた FTDP-17 変異タウのリン酸化解析. 第 57 回 日本神経化学会(9・2015 奈良)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者

木村 妙子 (KIMURA, Taeko)  
首都大学東京, 理工学研究科, 特別研究員  
研究者番号: 60748820

(2)研究分担者  
( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
( )

研究者番号:

(4)研究協力者  
( )