

令和元年6月25日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07071

研究課題名(和文) 生理的条件下におけるタウ蛋白質の軸索局在の分子機序の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of axonal localization under physiological condition

研究代表者

渡辺 祥司 (WATANABE, Shoji)

同志社大学・研究開発推進機構・助教

研究者番号：80462745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経原線維変化の主成分であるタウは、生理的条件下では軸索にのみ局在している。一方、アルツハイマー病等の特定の疾患において、タウは異常な局在を呈し、様々な細胞毒性を惹起する。現在までに、タウの局在化機構の分子機序は不明のままであった。本研究では、培養神経細胞で生理的条件下と同様にタウが軸索にのみ局在する独自の発現系を利用し、タウが軸索に局在するためにプロリンリッチ領域(PRR2)が極めて重要であることを明らかにした。また、蛍光顕微鏡により分子動態を検討したところ、PRR2のリン酸化・脱リン酸化により微小管との親和性が変化することがタウの軸索局在に重要であるという新規の知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者人口の増加に伴い、アルツハイマー病を含む認知症の患者数も増加している。現在までに、アルツハイマー病関連タンパク質の一つであるタウに関して非常に多くの論文が報告されているが、局在化機構に着目した研究は未だ少ない。そこで、本研究ではタウの軸索局在に着目し、それを明らかにすることを目標に3年間の研究を進めた。

本研究で得られた結果は、学術的に新規な知見だけでなく、認知症の病態の一端を理解する新しい知見であると考えている。このことから、将来的に、病態の理解だけでなく創薬にも繋がる、学術的および社会的に意義のある研究であったといえる。

研究成果の概要(英文)：Tau is one of microtubule-associated proteins, and localizes to only the axon in healthy neuron. In contrast, Tau is mis-localized to the soma and dendrites in Alzheimer's disease and related disorders. Although the localization of Tau has been well known, the mechanisms for its localization have been poorly understood. The lack of an experimental system is taken as this reason.

Exogenously expressed Tau is readily mis-localized to the soma and dendrite in cultured rat hippocampal neurons. Then I constructed the original expression system. Using this system, I demonstrated that transient expression of Tau in immature neurons is important for the axonal localization. In addition, I found that the axonal localization of Tau did not require the interaction between Tau and microtubule by using this system and Tau deletion mutants. Moreover, I obtained results that proline-rich region 2 of Tau was extremely important for the molecular dynamics in neuron.

研究分野：生化学

キーワード：アルツハイマー病関連タンパク質 タウ 局在化機構 軸索 分子動態

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に伴い、アルツハイマー型認知症（AD）を含む認知症の患者は年々増加している。ADは、大脳皮質での神経細胞の脱落、およびアミロイドβ（Aβ）蛋白質を主成分とする老人斑とタウ蛋白質を主成分とする神経原線維変化の沈着を特徴としている。Aβの蓄積がAD発症の発端であるとする「アミロイド仮説⁽¹⁾」に基づき、Aβに関する研究が活発に行なわれている。しかしながら、現在までに、Aβを起点としたADの病態解明および創薬は期待通りの結果が得られているとは言えない。

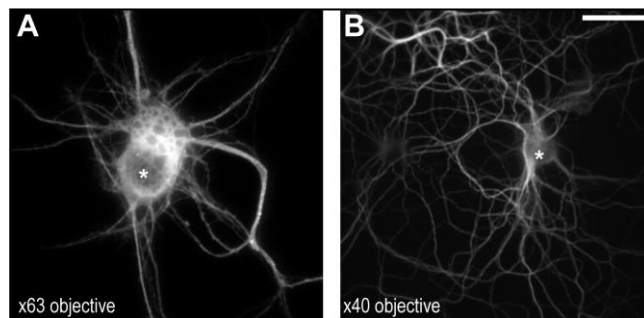
神経原線維変化は、過剰にリン酸化されたタウ蛋白質が細胞体で蓄積することにより形成し、ADだけでなく前頭側頭葉変性症など認知機能が消失する疾患で共通してみられる。このことから、神経原線維変化（タウの蓄積）の毒性が神経細胞の脱落や認知機能の低下・消失に大きく関与していることが予想される。タウは生理的条件（健康状態）では、神経細胞の軸索にしか局在していない。一方、病気の発症によりタウは異常局在し、最終的に細胞体で神経原線維変化を形成する。タウは生理的条件下において、何故、軸索のみに局在しているのだろうか。また、病気の発症に伴い、何故、異常局在を示すのであろうか。現在までに、AD患者における病理学的解析や*in vitro*における神経原線維変化の形成機構に関する研究は詳細に行われているにも関わらず、タウが軸索に局在する分子機序については不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

タウは微小管結合蛋白質の一つであり、生理的（健康）条件下においては神経細胞の軸索のみに局在しており、微小管と結合することで微小管を安定化させるといった重要な役割を担っている。タウの軸索局在は厳密に規定されており、細胞体や樹状突起にはほぼ局在しない。それにも関わらず、ADをはじめとする認知機能が消失する各種疾患において、細胞体で神経原線維変化を形成する。その原因として、老化もしくは病気の発症による「局在化機構の破綻」が考えられる。この破綻により、タウが異常な場所に局在し、神経原線維変化を形成する引き金となるのではないかと考えられた。しかし、現在までに、生理的条件下におけるタウの軸索局在の分子機序は不明な点が多く残されている。そこで、本研究課題では、それを明らかにすることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

タウは、ラット胎児由来の培養神経細胞で恒常的に過剰発現させると、軸索だけではなく、細胞体や樹状突起にも異常局在し（図1, A）、神経細胞死を誘導する。申請者は、これまでの実験で、ドキシサイクリン発現誘導系（Tet-on システム）を改良し、タウを一定時間過剰発現させ、内在性のものと同様に軸索のみに局在する独自の実験系を構築した（図1, B）。この実験系を有効に用いることにより、生理的条件下におけるタウの軸索局在の分子機序を明らかにすることを試みた。



（図1: タウ過剰発現系の構築）

神経細胞内でトリβ-アクトンプロモーターによりAcGFPを付加したタウを恒常的に発現させると、本来の局在とは異なり、細胞全体に局在する（A）。一方、独自に構築したTet-onシステムで一定時間のみ発現させ、約2週間培養すると、内在性タウと同様に軸索にのみ局在する（B）。網目状に見えるものが、軸索に局在するタウ蛋白質である。*は核を示す。

4. 研究成果

(1) タウの軸索局在には発現時期が極めて重要である

マウス脳および初代培養細胞から経時的にRNAを調製してリアルタイムPCRによりタウの発現を調べると、タウは出産直後または培養1日目で発現量が最も多かった。この結果を参考にし、独自に構築した発現システムを有するレンチウイルスベクターからレンチウイルスを調製し、ラット胎児由来の初代培養神経細胞にDIV=0（調製した日）で感染させた。感染1日後または6日後にドキシサイクリンにより1時間発現を誘導し、さらに13日または7日間培養してタウの局在を調べた（図2）。培養初期に発現を一過的に行うことにより、外因性のタウは内在性のタウと同様に軸索のみに局在した（図2-A）。一方、7日後に発現誘導したものは恒常的な過剰発現をさせた時と同様に軸索だけでなく、細胞体や樹状突起に異常局在した（図2-B）。以上の結果は、外因性のタウが軸索にのみ局在するためには発現時期が極めて重要な要因であることを示唆している。

(2) タウの軸索局在にはProline-rich region 2 (PRR2)が重要である

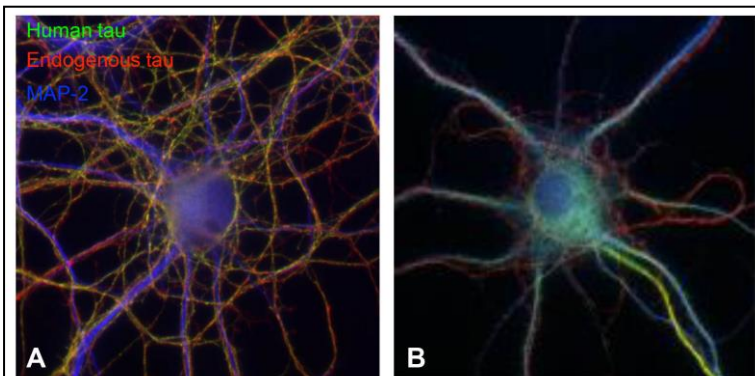
タウ蛋白質はアミノ酸配列により、9つのドメインに分けることができる(図3-A)。各ドメインを欠失した変異体を構築し、軸索局在に関わるドメインの探索を行った。その結果、Proline-rich region 2 (PRR2)を欠失した変異体において野生型と比べて明らかな異常局在が観察された(図3-B, C)。PRR2を欠失した変異体は、神経細胞が幼若な時も成熟した後でも、局在の異常が見られたことから、軸索局在に極めて重要な領域であることを示唆している。

驚いたことに、微小管との相互作用部位を欠失した変異体に関して、野生型と優位な局在の差を見出すことは出来なかった。この結果は、タウが軸索に局在するために、微小管との結合は必須ではないことを示唆している。

(3) PRR2 内のリン酸化・脱リン酸化は、軸索内の分子動態に影響を及ぼす

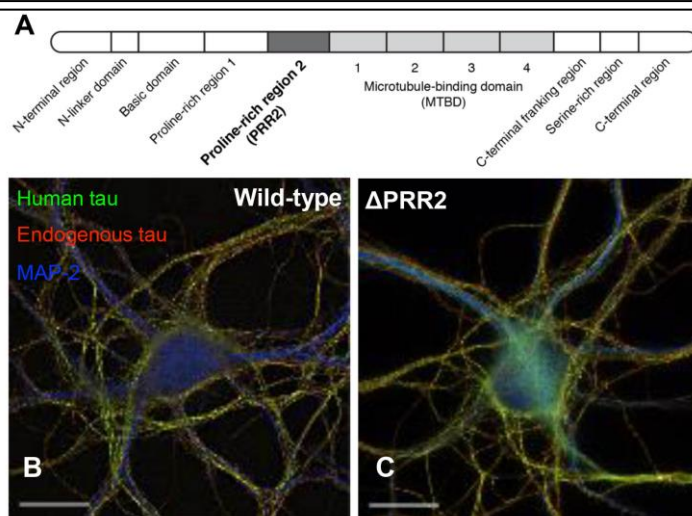
タウの PRR2 には、多数のリン酸化部位が集中している。このことに着目し、主要なリン酸化部位を全てグルタミン酸に置換した擬似リン酸化変異体 (PRR2-Glu) およびアラニンに置換した非リン酸化変異体 (PRR2-Ala) を構築して Fluorescence recovery after bleaching (FRAP) により分子動態を解析した(図4)。その結果、PRR2 欠失変異体および PRR2-Glu は微小管との結合力が弱く、比較的自由に動くことが出来た(図4-緑・グレー)。一方、PRR2-Ala は微小管との結合力が強く、微小管と結合すると殆ど動くことが出来なくなった(図4-赤)。これらの結果は、タウは PRR2 を介して微小管と結合していること、および PRR2 がリン酸化・脱リン酸化されることにより微小管との親和性を調節して可動性を変化させていることを示唆している。

以上の結果は、タウを正しく軸索に局在するための発現システムを有効に利用することで得られた成果であり、現在まで観察することが出来なかった新規性の高い結果である。したがって、一連の結果をまとめ、現在、論文投稿中である (Iwata, M.,



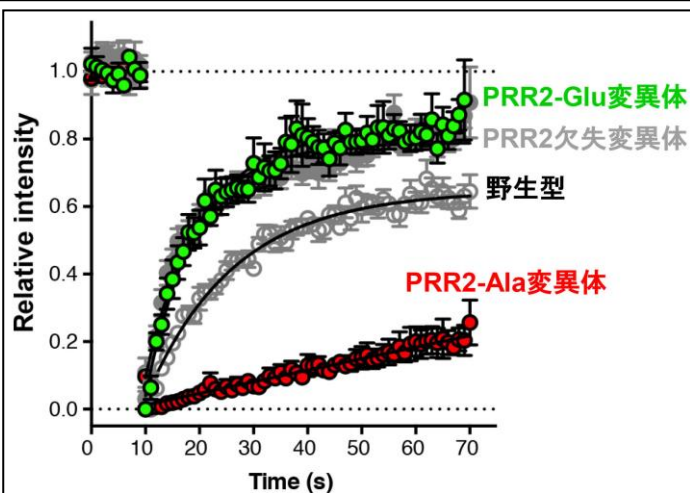
(図2: タウの軸索局在には発現のタイミングが重要である)

レンチウイルスをラット胎児由来の初代培養神経細胞にDIV=0で感染させ、感染1日後(A)または6日後にドキシサイクリンにより1時間発現を誘導し、さらに13日または7日間培養してタウの局在を調べた。緑=GFP-human Tau, 赤=内在性Tau, 青=MAP2(樹状突起マーカー)



(図3: タウの軸索局在にはPRR2が重要である)

A: タウのドメイン構造
B: 野生型タウの局在 (DIV 14)
C: PRR2を欠失した変異体の局在 (DIV14)
感染1日後にタウの発現を誘導し、その後13日間培養した。PRR2欠失変異体は野生型と比較して、細胞体や樹状突起に多く異常局在していた。



(図4: FRAPによるタウの分子動態解析)

軸索の特定の領域に局在するGFP-タウを光で一度褪色させ、その領域の蛍光の回復を観察した。縦軸が回復度で、横軸が時間である。回復度合いが高いことは動きやすいことを、低いことは動きにくいことを示している。

Watanabe, S. et al. (equally contribution), *Molecular Biology of the Cell*, 2019 年 6 月現在 revised)。

(参考文献)

(1) Hardy, J.A. and Higgins, G.A., *Science*, 1992 年, 256 巻, 184-185 ページ

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

① “The study of axonal localization mechanisms of tau in neuron”

Minori Iwata, Shoji Watanabe, Tomohiro Miyasaka, Hiroaki Misonou: Society for Neuroscience 2018 Annual meeting, San Diego (U.S.A), 2018 年 11 月

② “タウ蛋白質の神経細胞における軸索局在化機構と細胞内動態”

岩田実里、渡辺祥司、宮坂知宏、御園生裕明: 第 37 回 日本認知症学会学術集会、ロイトン札幌・札幌市教育文化会館 (北海道)、2018 年 10 月

③ “神経細胞におけるタウ蛋白質の分子動態”

岩田実里、渡辺祥司、宮坂知宏、御園生裕明: 第 91 回 日本生化学会大会、国立京都国際会館 (京都府)、2018 年 9 月

④ “神経細胞におけるタウ蛋白質の動態と軸索局在機構の解明”

岩田実里、渡辺祥司、宮坂知宏、御園生裕明: 第 90 回日本生化学会大会 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会)、神戸ポートアイランド (兵庫県)、2017 年 12 月

⑤ “神経細胞におけるアルツハイマー病原因蛋白質タウの軸索局在の分子機序”

岩田実里、渡辺祥司、宮坂知宏、朴洪宣、御園生裕明: 第 89 回日本生化学会大会、東北大学 (宮城)、2016 年 9 月

[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:

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:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

同志社大学脳科学研究科: <https://brainscience.doshisha.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※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、研究者個人に帰属されます。