

平成22年 4月 9日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700324
 研究課題名 (和文) 微小管変性を中心としたタウオパチー神経変性機序の解明
 研究課題名 (英文) Imbalanced expression of tau and tubulin is an essential step for pathogenesis of tauopathy.
 研究代表者
 宮坂 知宏 (MIYASAKA TOMOHIRO)
 同志社大学・生命医科学部・助教
 研究者番号：90342857

研究成果の概要 (和文) : 高齢者に見られる認知症の大多数は、タウオパチーと呼ばれる特徴的な病理像を呈する。タウオパチーの発症機構については諸説有るものの、実際の病理変化を十分に説明できるものは無かった。本研究において、主要な細胞骨格である微小管を構成するタンパク質・チューブリンの消失を起点と考えることにより、タウオパチーの病理変化をよどみなく説明できることがわかった。これは認知症の解明、または新たな治療法開発につながるものである。

研究成果の概要 (英文) : Tauopathy is a major category of age-dependent neurodegenerative disease, which defined by numerous neuron-loss associated with filamentous phospho-tau inclusions and microtubule loss in affected neurons. In this study, we found that the both of over expression of tau and/or down regulation of tubulin can induce tauopathy-like neuronal dysfunction in *C. elegans*. Thus, we concluded that the imbalanced expression of tau and tubulin is an essential step for pathogenesis of tauopathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経病理学

キーワード：タウ、認知症、線虫、神経変性、微小管、チューブリン、アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

タウオパチーとは、変性神経細胞内にリン酸化タウからなる封入体を形成する疾患の総称である。高齢者にみられる認知症の大多数はタウオパチーであり、アルツハイマー病はその代表といえる。タウオパチー変性神経

細胞の重要な病理学的特徴のひとつに、微小管 (チューブリン) の消失がある。神経機能障害を説明する中心的異常所見であると考えられるものの、そのメカニズム、タウオパチーにおける重要性については不明であった。

2. 研究の目的

研究代表者によるこれまでの研究から、アルツハイマー病脳に見られるタウ陽性変性神経細胞では、ほぼ完全にチューブリン染色性の低下が認められることを見出している。さらにこのタウとチューブリンの逆相関はマウス、線虫などの実験動物を用いたタウオパチーモデル生物系においても再現されることを見出している。これら前駆的研究から、チューブリンの発現低下によるタウ/チューブリン比の上昇がタウオパチー発症の鍵であるとの仮説を導いた。本研究では、(1)チューブリンとタウの量的変化と神経機能障害の関係について解明すること(2)チューブリンとのバランスにかかわる、タウの分子種を決定すること(3)本仮説の検証とともに、新たなタウオパチー治療方針の提示をすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験には動物モデルとしてタウオパチーモデル線虫を作成し、用いた。線虫発現用プラスミド pFXneo をベースに神経細胞に特異的な *unc-119* プロモータの下流にタウ cDNA を組み込み、定法にしたがい安定発現型遺伝子導入株 (integrant) を構築した。これらのラインでは *unc-119* プロモータの影響により、全神経細胞でタウが発現することを確認している。(1)タウ/チューブリンバランスについては、遺伝子導入・発現系と feeding RNAi による knockdown システムを併用した。Mec-12 RNAi の神経機能への影響については touch assay により判定した。一方、K07H8.1 RNAi については協調運動障害の程度を判定した。(2)分子種の決定については、モデル動物を用いた生化学的手法により解析した。(3)タウ結合タンパクの構築については精製タンパク質を用いた *in vitro* 解析、および培養細胞を用いた強制発現系により解析した。また、チューブリンによるタウ重合阻害の可能性については、精製リコンビナントタウとブタ脳由来精製チューブリンをもちいた。タウの重合は heparin を用いた *in vitro* aggregation 法によりおこなった。

4. 研究成果

(1)はじめに神経系にヒト野生型タウを発現する線虫ラインを多数作成し、その発現量と神経機能異常の関係について、解析した。本研究で用いたラインはいずれも全神経細胞にタウを発現させたものであり、神経機能異常は協調運動障害 (*unc*) として容易に判定できる。解析の結果、タウの発現量に依存して、神経機能障害が強く現れることを見出した(図1)。一方、vector のみ、DsRed、EGFP 等を発現させた個体では高い発現量を維持

しているにもかかわらず、運動障害は認められなかった。これより、本研究で用いたタウ線虫の行動異常は特異的であり、タウの発現量に厳密に依存していた。次に、チューブリン発現低下の影響について RNAi 法による検討を試みた。線虫は相補的な mRNA を発現する大腸菌を餌とすることで、容易に RNAi による発現抑制が可能である (Feeding RNAi)。一方、線虫の接触応答を司る神経 (*mec neuron*) には特異的に発現する α -tubulin (*mec-12*) が知られている。*Mec-12* は接触応答には必須であるものの、個体発生に関与しないことがわかっており、本実験には極めて適した系と考えられる。*Mec-12* に対する RNAi system を構築し、タウ発現線虫への影響について検討した。その結果、Mock-Tg では *mec-12* の knockdown により中程度の神経機能障害が確認された。これに対し、タウ発現線虫ではこの機能障害がとくに強く表れた(図2)。これはタウの毒性がチューブリン発現抑制により惹起された事を意味している。チューブリンシヤペロンの1つである K07H8.1 gene に対する RNAi においても同様な結果が得られたことから (data not shown)、タウ/チューブリン発現比の異常な上昇が神経機能障害を引き起すと結論づけた。

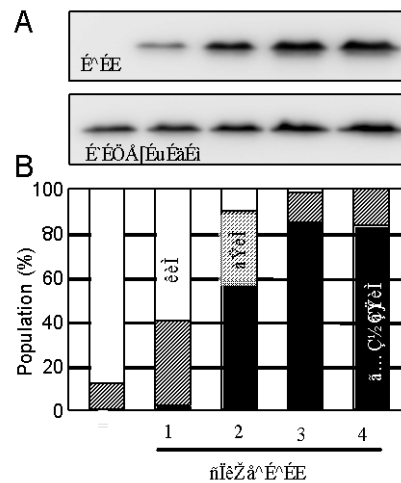


図1 タウの発現量 (A) と神経機能異常 (B) の比較

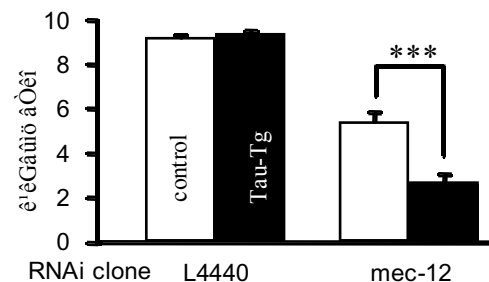
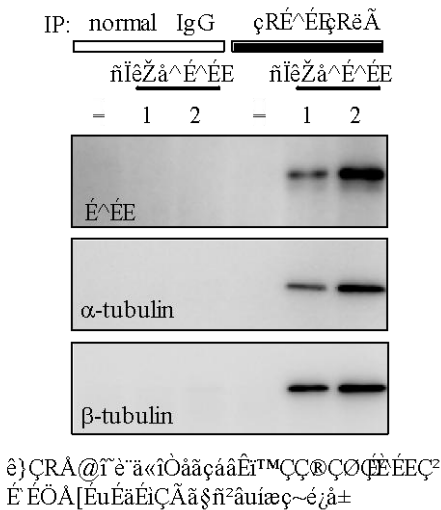


図2 タウ発現線虫と神経機能異常の比較

(2) 次に、タウオパチー線虫に発現するタウの性状について生化学的な検討をすすめた。はじめに、本研究で用いているモデルで発現するタウの存在様式について検討した。線虫を回収し、taxol, GTP を含んだ buffer でホモジナイズし、超遠心することにより、可溶性のチューブリンダイマーと微小管を分離回収することができる。このとき、発現させたタウはその微小管結合能に応じて沈殿の微小管画分に回収される (microtubule binding assay)。本検討の結果、タウ線虫に発現させたタウは全量、可溶性チューブリン画分に回収された。また、多種類の抗リン酸化タウ抗体を用いたウエスタンブロットの結果、これらのタウは高度にリン酸化されていることを見出した。したがって用いたモデル線虫ではタウが高度にリン酸化されているため、微小管に結合していない事が明らかとなった。次に、タウとチューブリンの接点について可溶性画分における複合体の形成を仮定し、免疫沈降法による解析をおこなった。上記可溶性チューブリン画分から抗タウ抗体により免疫沈降を行った結果、タウの回収量に応じてチューブリンの回収が確認された (図3)。マウス脳、精製タンパクを用いた解析においても同様に可溶性タウとチューブリンの結合が確認されており、神経細胞内において微小管非結合型タウはチューブリンダイマーと複合体を形成していると結論づけた。以上より、タウ/チューブリン比の上昇はこの複合体の崩壊を促し、タウを free にすることが予想され、この free のタウが神経毒性を有すると考えている。



(3) (2) の解析結果から free タウに結合するタンパク質を発現させることにより、毒性が中和できる可能性が考えられた。しかし、チューブリン自体はその厳密な発現調節

機構のため、過剰発現系の構築は困難であった。そこで、蛍光タンパク質 mCherry とチューブリンのタウ結合領域である C-末端領域を融合させたタンパク質の構築を試みた。In vitro、HEK293 細胞、およびリコンビナント精製タンパクを用いた解析により、タウと結合し、且つ十分な発現量を確保できるコンストラクトとして mCherry の C-末端側に α-tubulin の C 末端 51 アミノ酸のフラグメントを融合させた mCherry-C51 の構築に成功した。現在、線虫神経発現用のベクターを作成し、タウオパチー神経変性への影響について解析を進めている。

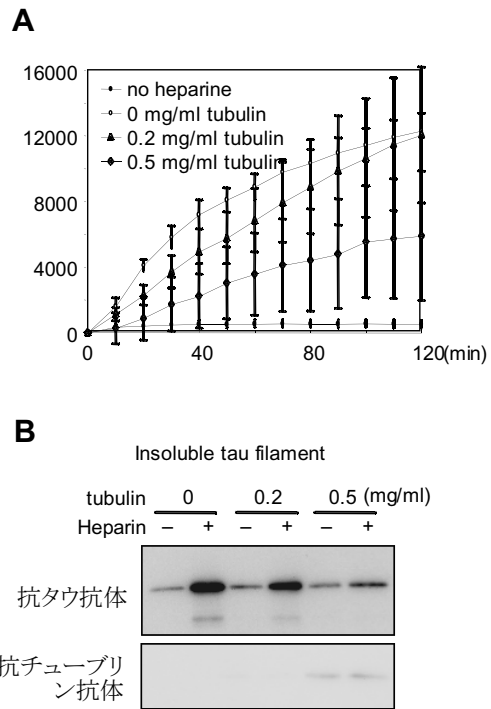


図4 in vitro tau aggregation. (A) heparin によるタウの重合は、チューブリンの共存によって抑制される。(B) 凝集したタウは Sarkosyl などの界面活性剤に対する不溶性を獲得する。

タウは C 末端側に特徴的なリピート構造を有し、ここで微小管と結合している。これは微小管結合領域と呼ばれており、可溶性チューブリンとタウの結合も恐らくこの領域を介していると考えられる。また、微小管結合領域は病理学的なタウ凝集のコアと考えられている。これらの知見から、通常チューブリンダイマーとの結合により隠されていた微小管結合領域がタウオパチーでは露出し、そこをコアとしてタウが重合すると考えられる。言い換えると、チューブリンの存在はタウの重合、恐らくそれに続く神経毒性を抑えている可能性がある。本研究では、このチューブリンによるタウ重合抑制効果についてリコンビナント精製タンパクを用いた in vitro 凝集系により解析した。タウはへ

パリリンなど陰性電荷に富む分子の存在下で容易に重合し、チオフラビンSなどの蛍光色素で認識されるようになる。本研究における実験条件下では、ヘパリンとの混合と同時にタウの重合が促進し、2時間にわたって不溶性凝集体の形成が観察された(図4)。また、この凝集はチューブリンの添加により濃度依存的に抑制された。以上より、チューブリンの存在はタウの凝集を阻害することが明らかとなった。

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1件)

Planel E, Krishnamurthy P, Miyasaka T, Liu L, Herman M, Kumar A, Bretteville A, Figueroa HY, Yu WH, Whittington RA, Davies P, Takashima A, Nixon RA, Duff KE. 、Anesthesia-induced hyperphosphorylation detaches 3-repeat tau from microtubules without affecting their stability in vivo: Tau hyperphosphorylation and microtubules stability in vivo.、J Neurosci、査読有、vol.28, 2008、12798-12807

[学会発表] (計1件)

Miyasaka T and Ihara Y. 、Imbalanced expression of tau and tubulin may be a key step to tauopathy. The 15th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience “Cell Death: what have we learned and what will we learn?”、2008年12月3日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮坂 知宏 (MIYASAKA TOMOHIRO)

同志社大学・生命医科学部・助教

研究者番号：90342857

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し