

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 11 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870846

研究課題名(和文)分子コシャペロンFKBP5による神経細胞内凝集機構の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of neuronal intracellular aggregation by FKBP5

研究代表者

佐藤 亘(Sato, Ko)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：90610395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は分子コシャペロンFK506 binding protein 5 (FKBP5)が神経変性疾患における「細胞内凝集促進因子」である可能性について検討した。アルツハイマー病モデルマウス脳内においてFKBP5を過剰発現した結果、微小管結合タンパク質タウについて(1)タンパク質量の増加、(2)リン酸化の亢進、(3)神経細胞内での異所性局在を引き起こすことが明らかとなった。一方、タウの細胞内凝集形成については観察されなかった。したがって、FKBP5はアルツハイマー病においてタウの細胞内凝集形成の促進には寄与しないが、その病理メカニズムを修飾する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate whether a molecular co-chaperone protein FK506 binding protein 5 (FKBP5) could be an 'accelerator of intracellular aggregation' in neurodegenerative diseases. In this study, I found that over expression of FKBP5 in Alzheimer's disease model mouse show increase expression levels, highly phosphorylation and miss-localization of tau, a microtubule associated protein. On the other hand, I could not detect intracellular aggregation of tau. These results suggest that FKBP5 would not accelerate intracellular aggregation but modify Alzheimer's disease pathology.

研究分野：機能生物化学

キーワード：細胞内凝集 分子シャペロン

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は生体の構造から機能までを担う重要な因子であり、タンパク質の合成系および分解系の機能不全は様々な疾患の原因になると考えられている。タンパク質合成系において不完全な立体構造を形成した異常フォールディングタンパク質、いわゆる「不良タンパク質」は、細胞内における品質管理機構(タンパク質品質管理機構)を介して積極的に排除される。特に、非増殖性細胞である神経細胞ではタンパク質品質管理を含めた細胞内環境の維持がきわめて重要であり、その破たんはアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患にみられる細胞内異常凝集物の蓄積を引き起こすと考えられる。

このようなタンパク質品質管理機構において中心的な役割を果たすのは、分子シャペロンである。多くの分子シャペロンは熱ストレス応答性の Heat Shock Protein (HSP) であり、細胞へのストレスなどによりタンパク質が熱変性を受けた際にそのタンパク質の折り畳みを制御することが知られている。特に HSP70 や HSP90 は細胞内におけるタンパク質恒常性の維持に重要であり、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として知られるアミロイドベータ前駆体タンパク質 (APP) の過剰発現マウスと HSP70 過剰発現マウスの交配マウスでは、APP 単独の過剰発現マウスに比べてアミロイドベータ量の減少することがすでにわかっている (Hoshino et al.: J Neurosci., 2011)。

FK506 binding protein 5 (FKBP5) は HSP90 の基質タンパク質のフォールディングやトラフィッキングを制御する、HSP90 の分子シャペロンである。最近の報告から FKBP5 が HSP90 の基質を異性化することにより基質の安定性を高める可能性が示された (Jinwal et al.: J Neurosci., 2011)。また、微小管結合タンパク質・タウ (アルツハイマー病にみられる細胞内凝集の主要構成成分) の安定化に関与すること、変異型タウ過剰発現マウス脳内での FKBP5 過剰

発現がタウの線維化 (オリゴマー化) を加速させて神経細胞毒性を増大させることが明らかとなっている (Blair et al.: J. Clin. Invest., 2013)。これらの報告は、神経変性疾患において FKBP5 のような分子シャペロンの機能不全が細胞内タンパク質の凝集に關与する可能性を示唆するものである。

2. 研究の目的

これまでの報告から考えると、脳内における FKBP5 の過剰発現は HSP90 との相互作用を介してタウを安定化させ、そのオリゴマー化を促進する可能性が高い。そこで本研究は、分子シャペロン FKBP5 が神経変性疾患にみられる細胞内凝集体の形成を促進する「凝集促進因子」である可能性について調べることを目的とした。そのモデルとして神経変性疾患の一つであるアルツハイマー病に着目し、FKBP5 がその二大病理であるアミロイドベータ ($A\beta$) 病理およびタウ病理を繋ぐ「ミッシングリンク」であると仮定した。

以上のことから本研究では、マウス Fkbp5 を前脳特異的に過剰発現する Fkbp5 過剰発現マウス (Fkbp5-Tg マウス、申請者ら未発表) およびアルツハイマー病モデルマウスであるヒト APP ノックインマウス (APP-KI マウス、Saito et al.; Nat. Neurosci., 2014) を交配することで、個体レベルでの FKBP5 過剰発現によるタウ凝集と神経変性への影響について明らかにするべく研究を行った。

3. 研究の方法

脳内で $A\beta$ 凝集が顕著となる 9 か月齢、12 か月齢、15 か月齢、18 か月齢、24 か月齢における APP-KI マウス、および Fkbp5-Tg マウスと APP-KI マウスの交配マウス (以下、Fkbp5 x APP マウス) について、麻酔下において PBS 還流を行ったのち脳組織を摘出した。半脳を 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定して組織学的解析に用い、残りの半脳は大脳および海馬を分離し生化学的解析に用いた。切前者についてはパラフィン脳

へを
染色したが、
し染したな
とンしな
析ジ認され
解才確認さ
基礎工を観
、シンの状態は
製シ組織像は
作キ組な
片をト行
顕著な

その後、タウ凝集加快速が脳内の
のいれ部のために、抗タウ抗体
かを検討するた、抗リン酸化タウ抗体
(Tau5)や抗リン酸化タウ抗体
(AT8、AT180、pS262、pS396、
pS404など)による免疫組織染色
色を行った。さらに、神経原線
維変化形成の有無に、ついで確認
するた、ガリアス銀染色を行
った。また、TUNEL染色によ
り神経細胞死の有無を確認し

生化学的解析においては、大
脳および海馬について Tris バ
ッファーを用いて脳抽出液を作
製し(Tris 可溶性、Triton X-100
可溶性、サルコシル可溶性およ
び不溶性の 4 分画)、解析を行
った。FKBP5 の過剰発現がタウ
のタンパク質安定性に影響する
可能性を考え、抗タウ抗体を用
いてウェスタンブロットを行
い定量した。リン酸化状態の変
化については、抗リン酸化抗体
を用いるとともに Phos-tag
SDS-PAGE(タンパク質バンドの
移動度によりリン酸化タンパク
質を容易に判別できる手法)を
用いてタウのリン酸化状態を
検討した。

なお、解析を開始するにあ
り APP-KI マウスと Fkbp5-Tg x
APP-KI マウスの間で Aβ の蓄積
に差がないことを抗 Aβ 抗体
(82E1、N1D) による免疫組織
染色ならびに ELISA 法によ
って確認した。

4. 研究成果

脳組織切片および抗タウ抗体
(Tau5)を用いてタウの脳内局
在を観察した。通常、タウは神
経細胞軸索に局在することが知
られており、APP-KI マウスでは
いずれの月齢においてもタウが
軸索に局在した。一方、24 か月
齢の Fkbp5-Tg x APP-KI マウス
の海馬では CA1 および CA3 領域
において細胞体へのタウの異
所性局在が観察された。ただし、神
経原線維変化の形成や神経細胞
死については確認すること

きなかつた。

一方、ウェスタンブロットに
よりタウの定量を行ったところ、
9 か月齢および 12 か月齢では
APP-KI マウスと Fkbp5-Tg x
APP-KI マウスの間でタウ量に
変化はみられなかったが、15 か
月齢以降では APP-KI マウスに
比べて Fkbp5-Tg x APP-KI マ
ウスの大脳および海馬において
タウ量の増加が認められた。特
に、24 か月齢 APP-KI マウス
に比べて Fkbp5-Tg x APP-KI マ
ウスの大脳では Tris 可溶性タ
ウ量が 1.2 倍ほど増加した。こ
のとき、Phos-tag SDS-PAGE
を用いてタウのリン酸化状態を
調べたところ、APP-KI マウス
に比べて Fkbp5-Tg x APP-KI マ
ウスの大脳では Tris 可溶性タ
ウの著しいリン酸化が観察され

以上の結果から、アルツハイ
マー病モデルマウス脳内にお
ける Fkbp5 の過剰発現は (1) タウ
のタンパク質量を増加させる、
(2) タウのリン酸化を亢進する、
(3) タウの異所性局在を引き
起こす、ことが明らかとな
った。一方、Fkbp5 の過剰
発現によるタウの細胞内凝
集形成を確認することは
できない。また、当初予
定していたタウリン酸化酵
素の同定や細胞レベルにお
けるメカニズム解析には
至らなかった。今後、今
後の課題とする。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

佐藤 巨 (Sato Ko)
国立研究開発法人理化学研究所
脳科学総合研究センター
研究員
研究者番号：90610395

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし