

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700429

研究課題名(和文)アルツハイマー病モデルマウスにおける記憶学習障害の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of memory impairment in Alzheimer's disease mice model

研究代表者

柳下 聡介 (YAGISHITA, Sosuke)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：30585592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病を始めとする神経変性疾患に關与するタウに着目した研究を実施した。タウのリン酸化は、疾患の発症と密接な關連があると考えられているため、内在性タウのリン酸化が亢進した新規モデルマウスの開発を実施した。

また、近年、タウはシナプスにも存在し、神経細胞の情報伝達に対して何かしらの役割を持っていることが分かっているため、情報伝達制御に關与するタンパク質についての解析を実施し、新たな知見を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, I focused on tau protein, which is related to tauopathy including Alzheimer's disease. Especially, tau phosphorylation is thought to relate to onset of neurodegenerative disease, I established a new mice model with accelerated phosphorylation of tau. Moreover, recent studies suggest the presence of tau in synaptic region. I focused on a receptor-related synaptic protein and suggested a new mechanism on the regulation of receptor trafficking.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：アルツハイマー病 タウ 長期抑制 新規モデル

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病では、脳内にアミロイドβタンパク質および過剰にリン酸化されたタウの蓄積が認められる。両者がアルツハイマー病の発症や進行に関与していることが示唆されているが、その詳細なメカニズムは不明である。

アミロイドβタンパク質の蓄積は、マウスにおいて記憶障害を引き起こす。しかし、その記憶障害には、タウの存在が必要であることが明らかにされている。よって、タウは、アミロイドβタンパク質の下流において、記憶障害を直接的に引き起こすと考えられる。

しかし、タウに関して、その詳細なメカニズムは不明であり、生理機能解明が求められている。

ところで、神経細胞は、シナプスという構造を介し、神経伝達物質の授受により、情報伝達を行っている。神経伝達物質を放出する側を前シナプスと呼び、神経伝達物質受容体によりそれを受容する側を後シナプスと呼ぶ。最近、後シナプスにもタウが存在し、何かしらの役割を果たしていることが示唆されている。繰り返し情報入力があったシナプスでは、受容体の量の増減により、情報伝達強度の調整を行っている。受容体の量が増える現象を長期増強、減る現象を長期抑制という。近年、タウは、長期抑制に必要であることが分かった。よって長期抑制機構の解明もタウの機能を明らかにする上で重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究は、タウに関する上記の背景を踏まえ、タウの生理機能解明を目指したものである。

(1) 従来、タウ研究のためのモデル動物と言えば、タウの過剰発現マウスが主流であった。これまでに、それらを用いた研究により有用な知見が多く得られている。しかし、一方で、過剰発現による影響を無視することができないのも事実である。ある程度、知見が蓄積してきた今だからこそ、内在性タウに着目した解析が必要であり、それに相応しいモデルの作製が望まれている。そこで、本研究では新しいタウ研究用ツールの作製、そしてその提供を目指した研究を実施することにした。

(2) 先行研究でタウがシナプスに存在すること、そこで神経細胞間の情報伝達を調節していることが明らかにされている。しかし、その詳細なメカニズムは不明である。タウが関与するのは、特に、神経伝達物質受容体が減少する「長期抑制」という現象であり、タウは長期抑制に必要であることが分かっている。

よって、タウの生理機能解明のためには、

まず長期抑制のメカニズムの詳細を明らかにすることが必要である。そこで、本研究では、受容体に結合するタンパク質に着目し、受容体の動態制御機構の解明、またそれに対するタウの影響について考察することとした。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスに軽度な刺激を施し、内在性タウのリン酸化状態を生化学的手法により検討した。また、認知機能への影響を観察するため、行動解析を実施した。また、刺激によってどのようなカスケードが影響を受けているのかを解析する目的で、遺伝子発現解析を実施した。

(2) グルタミン酸受容体のサブユニットの一つGluA2とそれに結合するタンパク質に着目した。両者の結合・乖離に関して、検討を実施した。結合・乖離の評価は、COS7細胞を主に用い、共免疫沈降法およびウェスタンブロットティング法に依った。適宜、変異体を作製して実験を行った。また、GFP融合タンパク質を作製し、リアルタイムイメージング法により、細胞内でのタンパク質の挙動を観察した。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスに軽度な刺激を継続的に施した結果、脳組織(海馬・大脳皮質)において、内在性タウのリン酸化が顕著に亢進することを見出した。タウにはリン酸化部位が多数存在し、それぞれの部位に特異的な抗体が作製されているため、それらを用いてリン酸化部位の同定が可能である。生化学的解析によって、各部位のリン酸化レベルを検討したが、調べたうちのほとんどの部位でリン酸化が亢進していることが分かり、刺激によるリン酸化の増加は、タウ分子全体に渡ることが分かった。

刺激に関しては、短期間(5日程度)実施したものと長期間(1ヶ月程度)実施したものとを比較した。多少、タウのリン酸化を受ける部位に差異は認められたが、概ね同等であることを確認した。

結果の一部を図1に示す。これは1ヶ月間刺激を実施したものであり、いくつかのリン酸化部位について、そのリン酸化の程度を検討した結果である。

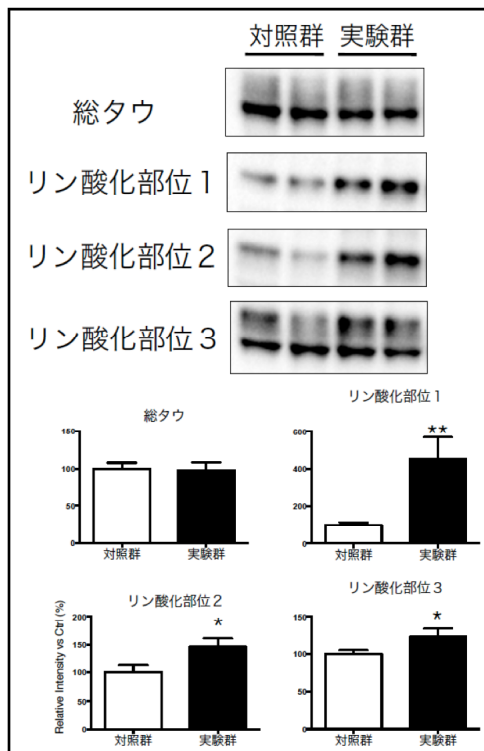


図1 タウのリン酸化の検出例

よって、実験の種類にも依るが、タウのリン酸化を観察するためには、5日間の刺激で十分であろうとの結論を得た。より短い期間についても検討したが、顕著な差を得る上で、5日間という実験条件が比較的安定していると考えられた。

また、5日間刺激を続けた後、しばらく通常環境で飼育したところ、内在位タウのリン酸化程度が、対照群レベルまで低下していた。よって、このリン酸化は刺激依存性であることが確かめられるとともに、脱リン酸化酵素の関与が考えられた。

従来、タウ研究モデルと言え、遺伝子改変動物が主流であった。その中でも、前頭側頭型認知症において見つかった変異型タウを導入したマウスが広く用いられている。表現型が顕著であるため、これまでに様々な有用な知見が得られてきており、タウ研究の進捗に多大な貢献をしてきた。

しかし、その一方で、タウの過剰発現に依る影響を無視することはできず、例えば、それによって軸索輸送障害が起きていることなども報告されている。よって、タウの生理機能解明のためには、内在性のタウを解析することが可能な新規のモデルマウスが必要とされてきた。

現在までに、その条件を満たすモデルとして、麻酔モデルなどが知られている。しかし、行動実験ができないという点において、改良の余地があった。

本研究で新たに作製したモデルは、内在性タウのリン酸化を容易に検出できること、一週間程度で作製可能であること、作製にかか

る費用が安価であること、刺激が非侵襲的、軽微で、比較的生理的条件に近い行動解析や長期にわたった観察が可能であること、など様々な利点がある画期的なモデルである。特に、行動解析が可能であることや作製費用が安価であることは、産業的な有用性も高いと考えられる。

このモデルを利用して薬効評価を行うことや、タウのリン酸化に至るカスケードの解析を行うことは、アルツハイマー病を始めとするタウオパチーのメカニズム解明の一助となることが期待される。

実際に、行動解析が可能であるかを確認するため、Y-maze試験および高架式十字迷路を実施した。双方の試験とも、対照群と同様の結果を得ており、顕著な記憶障害等は観察されていない。刺激期間の延長等を今後検討する必要がある。一方で、体重や活動量に対する顕著な影響もなく、ここで実施した行動解析が、きちんと実験として成立したことは意義深い。本モデルが他のモデルとの差別化を図る上で重要な要素である。

最後に、タウのリン酸化に至る経路の検討を実施した。現在までに、ERKというリン酸化酵素の活性において、多少の変動を同定している。しかし、JNK, GSK3 β , CDK5等については顕著な変化は認められない。また、neuroinflammationのマーカーとして、GFAPやIba-1の発現量をリアルタイムPCR法で検討したが、こちらについても有意な変化は認められなかった。また、最初期遺伝子の発現状態についても、解析を実施した。今後は、網羅的解析なども視野に、タウのリン酸化に至る経路の同定を行っていきたいと考えている。

(2) 長期抑制の主体とも考えられているGluA2に結合するタンパク質Xに着目した解析を実施した。特に、両者の結合・乖離を決める要因について検討した。その結果、タンパク質Xにおいて、GluA2との結合に重要な役割を果たしている部位を同定した。これは、今までの報告にない新たな部位であった。

この部位に変異を導入すると、GluA2との結合強度が著しく減少することを見出した。しかし、この部位を欠損させても結合部位には変化が認められなかった。このメカニズムを明らかにするため、蛍光タンパク質GFPと融合させたタンパク質Xを作製し、培養細胞に導入、その際の細胞内局在をリアルタイムイメージング法により観察した。

タンパク質Xは、Xどうしで結合する性質を持ち、可視化によって結合の度合いを評価することができる。検討の結果、本研究で同定した部位は、タンパク質Xどうしが結合するのに必須の部位であることが分かった。

本研究の成果は、GluA2とタンパク質Xとの結合に関して新しいメカニズムを提供するものであり、今後の記憶の分子メカニズム解明の基盤の一つとなることが期待される。

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4件)

[1] Haruhiko Watahiki, Sosuke Yagishita, Eugene Futai, Shoichi Ishiura, CTF1-51, a truncated carboxyl-terminal fragment of amyloid precursor protein, suppresses the effects of A β 42-lowering γ -secretase modulators, *Neurosci. Lett.* 526(2), 96-9, Sep. 2012, 査読有り, 10.1016/j.neulet.2012.08.029.

[2] Kimihiko Sato, Chiaki Tanabe, Yoji Yonemura, Haruhiko Watahiki, Yimeng Zhao, Sosuke Yagishita, Maiko Ebina, Satoshi Suo, Eugene Futai, Masayuki Murata, Shoichi Ishiura, Localization of mature neprilysin in lipid rafts, *J. Neurosci. Res.* 90(4), 870-7, Apr. 2012, 査読有り, 10.1002/jnr.22796

[3] Yoji Yonemura, Eugene Futai, Sosuke Yagishita, Satoshi Suo, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo, Shoichi Ishiura, Comparison of Presenilin 1 and Presenilin 2 γ -Secretase Activities Using a Yeast Reconstitution System, *Journal of Biological Chemistry* 286(52), 44569-75, Dec. 2011, 査読有り, 10.1074/jbc.M111.270108

[4] Masashi Asai †, Sosuke Yagishita †, Nobuhisa Iwata, Takaomi C. Saido, Shoichi Ishiura, Kei Maruyama, An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal fragments via cathepsin B in a human neuroglioma model, *FASEB J.* 25(10), 3720-30, Oct 2011 († equal contribution), 査読有り, 10.1096/fj.11-182154

[学会発表] (計6件)

[1] Seiya Suzuki, Sosuke Yagishita, Ayaka Sorimachi, Maya Moriizumi, Takeo Awaji, Masahiko Suzuki, Kei Maruyama, Establishment of a new mouse model with accelerated phosphorylation of endogenous tau, 日本薬理学会, 仙台, 2014年3月19日

[2] 鈴木星也, 柳下聡介, 淡路健雄, 鈴木正彦, 丸山敬, 「野生型マウスを用いた内在性タウのリン酸化亢進モデルの作製」, 日本認知症学会, 松本, 2013年11月8日-9日

[3] 鈴木星也, 柳下聡介, 淡路健雄, 鈴木正彦, 丸山敬, 「内在性タウのリン酸化亢進マウスモデルの作製」, 日本生化学会, 横浜,

2013年9月11日-13日

[4] 柳下聡介, 浅井将, 岩田修永, 西道隆臣, 石浦章一, 丸山敬, 「カテプシンBを介したアミロイド前駆体タンパク質の代謝経路」, 日本薬理学会関東部会, 2012年10月20日, 東京

[5] 添田義行, 吉池裕二, 前田純宏, 木村哲也, 村山美由紀, 溝呂木達也, 山下俊治, 柳下聡介, 斎藤臣雄, 長田裕之, 高島明彦, 「in vitro および in vivo における低分子化合物による tau 凝集抑制作用の検討」, 日本認知症学会, 2011年11月11日-13日, 東京,

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: タウタンパク質のリン酸化が亢進された非ヒトモデル動物の製造方法

発明者: 柳下聡介, 鈴木正彦, 淡路健雄, 吉川圭介, 丸山敬, 鈴木星也

権利者: 学校法人埼玉医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-130358

出願年月日: 2013年6月21日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳下 聡介 (YAGISHITA Sosuke)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30585592