

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年6月2日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2012～2014

課題番号：24700368

研究課題名（和文）凝集体非依存的なタウ神経毒性機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of aggregation-independent neurotoxicity induced by tau

研究代表者

謝 策 (Xie, Ce)

同志社大学・生命医科学部・特別研究員

研究者番号：10598981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）3,500,000円、（間接経費）1,050,000円

研究成果の概要（和文）：多くの加齢に伴い発症する認知症では、変性神経細胞の中に微小管結合タンパク質タウの凝集と蓄積が観察され、タウオパチーと総称される。その発症機構は不明であり、タウとの相互作用を有するタンパク質が深く関与すると考えられる。本研究は、凝集体形成を伴わずに、異常なタウを発現したタウオパチー線虫モデルを用い、タウ神経毒性に関与の可能性があるタンパク質を網羅的に解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Microtubule-associated protein tau aggregates and deposits in the degenerated neurons of many dementia developed with aging. These diseases are called tauopathies, which mechanism is still unclear. The proteins that associated with the abnormal tau are considered to be deeply related to the neurotoxic mechanism. In this study, we identified the proteins that may be involved in the toxic mechanism of tau, using a *C. elegans* model, in which abnormal tau was expressed without aggregation formation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経病理学

キーワード：タウ・タウオパチー・認知症・線虫

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 超高齢化社会が現実化した現在、認知症の有病率が増え続けている。多くの認知症の発症機構は不明であり、有効な予防法および治療法は確立されていない。

(2) アルツハイマー病をはじめとし、前頭側頭型認知症、皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺など多くの認知症では変性神経細胞内にタウというタンパク質の蓄積と凝集が観察される。このような神経変性疾患群を総称してタウオパチーと呼んでいる。

(3) タウオパチーの発症機構は不明であるが、生理的に発現するタンパク質であるタウの何らかの異常と深く関連すると考えられる。患者剖検脳から得られた情報をもとに、異常なタウの特徴として、凝集、過剰リン酸化および微小管からの解離などがあげられる。タウの凝集を巡る研究が進んでいる一方、多くの研究結果より、凝集体にかかわらないタウの毒性機構が存在することが示唆され（凝集体非依存的な機構）、詳細なメカニズムについては未解明である。

(4) 申請者らは、モデル生物としての線

虫の神経細胞にタウの全長配列を発現させた transgenic (Tg) 線虫を作成した。この Tg 線虫では神経機能の障害及び形態の異常が観察されるものの、凝集体形成は認められていない。したがって、凝集体非依存的なタウの神経毒性が純粋に再現されている動物モデルと考えている。

## 2. 研究の目的

申請者らにより樹立したタウオパチー線虫モデルを利用し、凝集体を形成していないタウと特異的に相互作用するタンパク質因子の網羅的解析を行い、同定する。これより、凝集体非依存的なタウの神経毒性の獲得メカニズムについて解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 線虫について

野生型線虫は N2 を使用した。タウオパチーモデル線虫について、PCR により、ヒトのタウ (ON4R) の全長 cDNA を増幅し、線虫神経細胞発現用ベクター pFXneo-punc-119 に組み込んだ。得られたプラスミド配列を DNA シークエンサーにより、確認した。マーカー pFXneo-Pges-1::EGFP と共に、野生型線虫の生殖巣にマイクロインジェクションした。腸管の緑色蛍光を指標とし、遺伝子導入個体を選別した。さらに、紫外線照射法により、安定発現株を獲得した。すべての線虫は 20° C、NGM 寒天培地を用い、飼育した。

### (2) 生化学解析

#### ① リン酸化解析

4 日齢の線虫を M9 緩衝液で回収し、TS 緩衝液 (50mM Tris、150mM NaCl、pH7.6) の中で、超音波により破壊した。120,000×g、15 分間、2° C で遠心させ、上清に最終濃度の 0.5M NaCl と 2% 2-mercaptoethanol を添加し、100° C、7 分間で加温した。再び、20,000×g、15 分間、2° C で遠心し、上清に最終濃度の

50%飽和硫酸アンモニウムを添加した。遠心後、沈殿を回収した後、Lambda protein phosphatase の処理を行った。

#### ② 微小管結合解析

4 日齢の線虫を M9 緩衝液で回収し、緩衝液 [0.1 M MES (pH 6.8)、1 mM EGTA、1 mM MgSO<sub>4</sub>、2 mM DTT、0.02mM Taxol、2mM GTP および 0.5% Triton X-100] の中で超音波破壊し、120,000 × g、20 分間、20° C で遠心後、上清と沈殿を分けた。

#### ③ Western blotting 解析

各サンプルを 10% SDS-PAGE により電気泳動し、PVDF 膜に転写した。抗体処理した後、chemiluminescence 法により、検出した。

### (3) 免疫共沈殿

4 日齢の Tau-Tg 線虫および Mock-Tg 線虫を回収し、各 120mg 回収した。MSB 緩衝液 [0.1M MES-K (pH6.8)、1mM MgSO<sub>4</sub>、1mM EGTA、0.05% TritonX-100、10% Glycerol、2mM GTP、0.1mM DTT、0.02mM Taxol、phosphatase inhibitor cocktail および protease inhibitors] 中でホモジナイズした。この破砕液を 120,000×g、20 分間、4° C で遠心し、得られた上清に 0.5ug 抗体を含有した磁石ビーズを添加し、4° C で 2 時間混合した。ビーズを MSB 緩衝液で 3 回洗浄した後、電気泳動解析を行った。

### (4) 質量分析

銀染色したバンドを切り出し、超純水の中に移動した。脱染色させた後、0.025mg/ml トリプシンでの処理を行い、4800 Plus MALDI TOF/TOF™ Analyzer (AB SCIEX) により、ペプチドの同定を行った。

## 4. 研究成果

タウオパチー病態脳の解析から、異常なタウはリン酸化され、微小管への結合能を失った状態を呈する。はじめに、線虫神経系に発現したヒトタウの存在状態について調べた。

Phosphatase を用い、タウを脱リン酸させ、脱リン酸化前のタウとの電気泳動上の距離変化を比較した結果、脱リン酸化後のタウの泳動距離が長かったことが示された (図 1 A)。したがって、線虫神経細胞に発現したタウはリン酸されたものであることがわかった。また、タウは神経細胞に常在する微小管結合タンパク質であり、タウオパチー発症時に、何らかの原因により、微小管から離れたことが知られている。Taxol と GTP を用い、微小管を安定化したうえで、超遠心で、微小管結合画分 (沈殿) と非結合画分 (上清) を分けた。タウは可溶性成分として、上清に残り、微小管から離れていたことが示され、不溶性凝集体を形成していないこともわかった (図 1 B)。以上より、線虫に発現したタウはリン酸化され、微小管から解離し、病態脳のタウと似た状態であるとした。

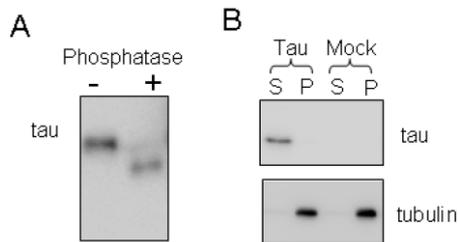


図 1 : 線虫の神経細胞に発現したタウについての生化学的解析 (A) タウはリン酸化された状態で存在した。(B) タウは微小管から離れていた状態で存在した。(S : 上清、P : 沈殿)

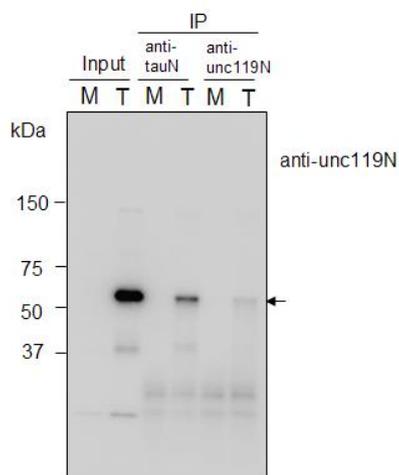
次いで、線虫の神経細胞に発現した異常なタウの毒性を解明するために、タウとの相互作用を有するタンパク質の同定を行った。本研究では、免疫沈降法により、タウと相互作用を有するタンパク質を網羅的に解析した。線虫神経系に発現したタウの N 末端側に、UNC119 の N 末端側にある 26 個アミノ酸残基

のペプチドを連結させ、タグとして機能させた。申請者らにより作製した抗タグ抗体の anti-unc119N および抗タウ N 末端側抗体の anti-tauN を磁気ビーズに固定させ、線虫からタウを免疫沈降し、アクリルアミド電気泳動をさせた後、western blotting により、タウが沈殿されたことを確認した (図 2 A)。さらにタウと相互作用するタンパク質複合体をアクリルアミド電気泳動させ、銀染色を行った。対照実験グループと比較し、タウ発現線虫に特異的に認められるバンドを切り出し、質量分析による同定を試みた。その結果、線虫の神経細胞に発現した異常なタウと相互作用を有するタンパク質を合計 20 種類を同定した。同定された結合因子の中に、アクチンが存在することを明らかにした (図 2 B の 8 番目のバンド)。アクチンは細胞中の細胞骨格タンパク質一種であり、細胞形態の変化と維持などの重要な働きを持つ。神経細胞においても軸索伸長、スパインの形態形成など神経機能における重要性が明らかである。タウオパチー発症メカニズムの現行研究の多くがタウと微小管との関連を標的としているが、タウとアクチン結合の生理学および病理学的意義については不明なところが多い。タウの機能異常がアクチン系に影響を与える可能性を示唆している。アクチン以外、アクトミオシン系のタンパク質、リン酸化を含めた修飾にかかわる酵素及びシナプス局在分子など、新規のタウと相互作用するタンパク質が含まれる。タウはこれらの分子との間にネットワークを作り、タウオパチーを発症させる可能性が考えられる。

タウオパチーの本質はタウによる神経機能の障害であり、正確な解析は in vivo の動物モデルを用いてのみ可能である。マウスに過剰発現したタウはリン酸化など異常な状態を呈したことが報告されたが、マウス自

身の正常な内在性のタウが存在するため、純粋に異常なタウと相互作用するタンパク質因子の同定が困難と考えている。本研究に用いたモデル生物としての線虫には、タウの同源タンパク質 (pt1-1) の発現量が少なく、および局在が限られており、異常なタウの毒性が純粋に再現される唯一のモデルと考えている。本研究により同定されたタウ結合候補タンパク質の中にタウの神経毒性発揮に関与する因子があると考えており、今後のタウオパチー機構の解明に重要な情報を提供できると考えている。

A



B

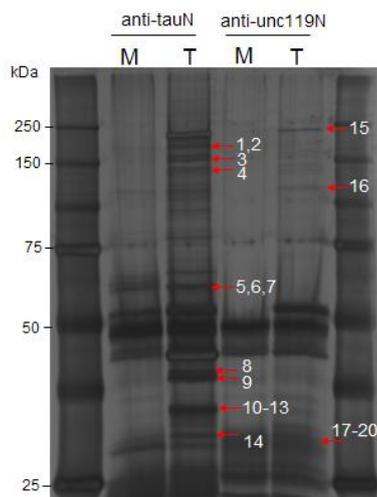


図2：免疫沈降解析 (A) 線虫から抗タウ抗体および抗タグ抗体より、タウを沈殿させ、

western blotting で確認した (矢印)。(B) 銀染色法と質量分析法の組み合わせにより、タウと相互作用するタンパク質バンドを確認し、同定した (赤い矢印、数字は同定されたタンパク質の番号である)。(IP:免疫沈降、M: Mock-Tg 線虫、T: Tau-Tg 線虫)

## 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)

Xie C, Miyasaka T, Yoshimura S, Hatsuta H, Yoshina S, Kage-Nakadai E, Mitani S, Murayama S, Ihara Y. (2014) The homologous carboxyl-terminal domains of microtubule-associated protein 2 and Tau induce neuronal dysfunction and have differential fates in the evolution of neurofibrillary tangles. PLoS One, 10. 1371. journal.pone.0089796.

[学会発表] (計 3 件)

① Xie Ce et al. "Phosphorylated tau and microtubule-associated protein 2 induce neuronal toxicity in *C. elegans*" The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry & The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry. 2012. 09. 29-10. 02. J Neurochem. 2012 Oct;123 Suppl 1:3-135. Kobe, Japan.

② Xie Ce et al. "Potential contribution of microtubule-associated protein 2 to the pathogenesis of Alzheimer's disease" The 42nd annual meeting of the Society for Neuroscience. 2012. 10. 13-17. New Orleans, LA, USA.

③Xie Ce et al.: "タウオパチー発症機構における MAP2 の関与"第 31 回日本認知症学会  
学術集会. 2012. 10. 26. Tsukuba, Japan.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

謝 策 (Xie, Ce)

同志社大学・生命医科学部・特別研究員

研究者番号：10598981