

微小管結合タンパク質タウの神経細胞死における役割に関する研究

Role of microtubule associated protein tau in neuronal cell death

村山 洋, 岩橋和彦, 秋山孝洋, 松田基夫

麻布大学大学院環境保健学研究科

Ohoshi Murayama, Kazuhiko Iwahashi, Akiyama Takahiro and Motoo Matsuda

The Graduate School of Environmental Health Sciences, Azabu University

Abstract. Neurofibrillary tangle composed of hyperphosphorylated tau aggregation in neuron is one of major pathological hallmarks of Alzheimer's disease or other neurodegenerative disease. Recently, familial mutations in tau gene were identified by reverse genetic analysis of FTDP-17 families. Some of these mutation lead amino acid substitution and the other affect alternative splicing of the exon10. This suggests that tau is possibly involved in developing "tauopathy". Although tau is known as an axonal microtubule associated protein that stabilized the structure solubility of microtubules and promotes polymerization of tubulines into the microtubules, role(s) of tau in pathological events remains unclear. To elucidate how tau protein and its isoforms are involved in the neurodegeneration, we developed quantitative method for tau isoforms, three and four repeat tau, respectively. Real Time PCR using Taq Man probe (ABI) three and four repeat tau mRNA could be quantified with high sensitivity ($> 10\text{pg}$ of total RNA). In addition, a little cross reactivity between three and four repeat tau mRNA was observed. These results suggested that tau mRNA in small number of neuronal cells (~ 10 cells) of mouse or human brain could be quantified by our method. Combining with isoform specific antibodies T3R and T4R previously generated, the measurement may be useful for studying the molecular mechanism in developing dementia.

目 的

痴呆症原因の約半分を占めるアルツハイマー病の主要な病理像である老人斑を形成する β アミロイド($A\beta$)の増加と蓄積が、重要な発症機序と考えられている一方で、もう一つの病理学的変化である神経原線維変化は、アルツハイマー病に限らずPick病など器質性病変を伴う痴呆症の発症との関連が注目されている。臨床的な重症度(痴呆の程度)と病理所見との相関をみると、 $A\beta$ の蓄積によって生じる老人斑の出現頻度よりはむしろ神経原線維変化の頻度の方が痴呆の重症度とよく相関していることから(1),

アルツハイマー病の発症について解析する上で神経原線維変化の形成機序の解明が重要だという考え方が広がっている。神経原線維変化においては、微小管結合たんぱく質タウの神経細胞内における異常蓄積が特徴であり、1998年にタウ遺伝子の変異が原因で発症する家族性痴呆症が報告されてから、タウの異常が痴呆症発症に直接関係するものと考えられるようになってきたが、その詳細は明らかではない(2)。タウタンパク質は、選択的スプライシングにより6つのアイソフォームとして神経細胞で発現する。痴呆症の原因に依存して細胞内に蓄積するタウアイソフォームが異なることが知られている(3)。従って、

各アイソフォームと疾患発症との関わりを明らかにすることが重要であると考えられる。これまでに、タウ蛋白質アイソフォーム特異抗体を作成し、抗原認識特異性の詳細な解析を行うとともにタウタンパク質の高次構造に関する解析を行ってきた。本研究では、タウと神経細胞死の関係を明らかにする目的でタウ遺伝子から選択的スプライシングにより産生される6つのアイソフォームがそれぞれどのような役割を果たすのかを明らかにすることを目標として、脳内で神経細胞が変性していく過程における各アイソフォームの動態を追跡検討するための各アイソフォーム mRNA を判別定量する条件の検討を試みた。

方 法

培養細胞に、LipofectAMINE 2000 Reagent (LIFE TECHNOLOGIES, Tokyo, Japan) を使ってヒトタウ cDNA (3 リピータウ, 4 リピータウ) を導入してそれぞれの mRNA を合成した。RNA は、キアゲン RNA 抽出キットにより totalRNA として調整し、定量用資料とした。また、マウス脳の totalRNA も同様に調整した。各アイソフォームの定量には、TaqMan プローブ (ABI) を利用したリアルタイム PCR 法を採用し、条件を詳細に検討した。

結果と考察

6つのタウアイソフォームはN末端領域にある反復配列の数によって3リピータウと4リピータウの2つのグループに分けられる。今年度は、2つのグループを mRNA レベルで判別する条件の検討を試みた。判別法の原理には、TaqMan プローブ (ABI) を利用したリアルタイム PCR 法を採用し、基礎的な条件の検討を終えた。2つのグループ間の塩基配列の違いが僅なため、通常のリアルタイム PCR 法の条件では、3リピータウと4リピータウを完全に判別することは困難であるが、詳細な条件検討の結果、特異性の高い結果が得られた。感度については、totalRNA 量でみると約 1 ng 以下程度まで検出可能であり、脳における mRNA の動態を細胞レベルで定量的にトレースすることが可能であると考えている。これまでに、ヒトおよびマウスのタウアイソフォー

ムについて、条件を確立した。本法により、ヒト脳組織あるいはヒト型タウ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスにおけるタウアイソフォームの動態に関して詳細が明らかにされることが期待できる。今後は、以前に作成したアイソフォーム特異抗体 (3 リピータウと 4 リピータウを判別) と併用し、神経細胞を障害する刺激によって引き起こされる脳内タウの動態 (in vivo) を追跡検討する予定である。

要 約

神経原線維変化の形成に重要な関わりを持つタウタンパク質の2つの型のアイソフォーム (3 リピータウと 4 リピータウ) の mRNA レベルを識別定量する条件を検討した。本法は、神経細胞変性過程におけるタウ遺伝子発現およびアイソフォーム発現パターンの動態を追跡する上で有効な手段であると考えられる。

文 献

- 1) Braak, H. and Braak, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*; 82: 239-259, 1991
- 2) Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R.C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Reed, L. A., Trojanowski, J., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahan, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P.R., Hayward, N., Kwok, J. B. J., Schofield, P. R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B. A., Hardy, J., Goate, A., vanSwieten, J., Mann, D., Lynch, T. and Heutink, P., Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*; 393: 702-705, 1998
- 3) A., Delacourte, N., Sergeant, A., Wattez, D., Gauvreau and Y., Robitaille, Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation. *Ann Neurol*; 43: 193-204, 1998