

神経細胞変性における微小管結合蛋白質 タウのリン酸化および代謝に関する研究

*Analysis of metabolism and phosphorylation of tau, a microtubule
associated protein, in neuronal degeneration*

村山 洋, 岩橋和彦, 松田基夫

麻布大学大学院環境保健学研究科

Ohoshi Murayama, Kazuhiko Iwahashi, Motoo Matsuda

Graduate School of Environmental Health Sciences, Azabu University

Abstract: Neurofibrillary tangle is one of major pathological hallmarks of Alzheimer's disease. In this pathological change, abnormal intracellular aggregates composed of hyperphosphorylated tau proteins are observed. Recently, familial missense mutations in tau gene were identified by reverse genetic analysis of FTDP-17 families. 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 tubulins into the microtubules, role (s) of tau in pathological events remains unclear.

To elucidate role (s) of tau in the neurodegeneration, we made antibodies (T3R and T4R) recognizing specifically tau isoforms, three and four repeat tau, respectively. By enzyme linked immunosorbent assay and western blot analysis, it was revealed that the affinities of these antibodies were depend on conformations of their epitopes. In addition, a C-terminal portion of tau contributed to forming tertiary structure of these epitopes. T3R and T4R might be the biochemical markers for monitoring the change in local conformation of the repeat domain. T3R and T4R generated in this study may be powerful probe for the biochemical and pathological diagnostics of dementia.

目 的

少子高齢化社会において老人性痴呆症の予防法及び治療法の確立は急務である。アルツハイマー病は老人性痴呆症の半数を占めており、その発症機序に関する研究は特に重要である。アルツハイマー病型痴呆の発症機序に関しては、 β アミロイド蛋白質($A\beta$)の増加と蓄積が最も重要な原因であるとする『アミロイド仮説』(1, 2)が多くの研究者によって

指示されており、現在『アミロイド仮説』に基づいた治療薬開発が精力的に進められている。一方、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、 $A\beta$ の置苦戦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(3)、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。神経原線維変化では、変性神経細胞

内における微小管結合蛋白質タウの蓄積が特徴であり、このタウ蛋白質の神経細胞の変性における役割を解明することは発症機序解明において極めて重要であると考えられる。また、1998年にタウ遺伝子変異が原因で発症する痴呆症の報告によってタウが痴呆症発症に直接関わる可能性が示唆され(4, 5), タウと発症との関係を明らかにするための研究が注目されている(6, 7, 8, 9, 10, 11, 12)。

神経原線維変化において蓄積しているタウ蛋白質は高度にリン酸化されており、タウ蛋白質のリン酸化が神経細胞変性と密接に関係していると考えられる。しかし、20ヶ所以上報告されているリン酸化部位のうち、どの部位のリン酸化がどのように発症と関係しているかは必ずしも明らかではない。また、タウ蛋白質はリン酸化を受けると微小管から遊離し、正常な状態では細胞内で代謝されるが、アルツハイマー病においてはこのタウ蛋白質の代謝のバランスが崩れたために細胞内に蓄積している可能性が考えられる。本研究は、リン酸化特異的抗体、タウ蛋白質アイソフォーム特異抗体を用いて神経細胞変性に関連したタウ蛋白質のリン酸化および細胞内代謝について詳細に検討することを目的とした。本年度は、タウ蛋白質アイソフォーム特異抗体の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た。

方 法

3リピートタウおよび4リピートタウに対する特異抗体(抗血清)は、合成ペプチドCPGGGKVQIVYK (PR3), CVQIINKKLDL (4RP) およびCPGGGSVQIVYK (PR4) を、KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) にMBA法で作製したコンジュゲイトを2週間おきに、ウサギ(日本白色種)を6回免疫することによって作製した。上記合成ペプチドを個相化したELISA法により、作製した抗体の抗体価及びエピトープを確認した。組換えタウタンパク質は、大腸菌で発現させ熱安定分画として回収したのちにフォスフォセルロースカラムを使って精製した。培養細胞で発現させたタウは、熱安定分画として回収してSDS-PAGE及びウェスタンブロッティング法にて解析した。なお、培養細胞を用いる場合は、LipofectAMINE2000Reagent (LIFE

TECHNOLOGIES, Tokyo, Japan) を使った遺伝子導入法を利用してヒトタウcDNAを細胞に導入してタウタンパク質を発現させた。

結果と考察

タウアイソフォーム特異抗体の性状: 3リピートタウと4リピートタウの2つのアイソフォームを識別する抗体(ポリクローナル抗体)の作成に成功し、これら抗体の抗原認識配列に対する親和性などの性状を組換えタンパク質、合成ペプチドおよび培養細胞を用いて検討した結果、各抗体の抗原認識配列に対する親和性が隣接する配列に影響を受けることを明らかにした。各抗体の抗原決定配列には、すでに β シート形成に関わるコア配列が含まれていること、あるいはT4RがT3Rの抗原(合成ペプチド)に対して交差反応することから、2つの抗体のタウタンパク質に対する親和性が抗原決定配列のコンフォメーション、特に β シート構造に影響される可能性が考えられた。従って、これら抗体のタウに対する親和性とタウ病変との間の関係を明らかにすることが重要であり興味深い。さらに、タウタンパク質発現COS7細胞をT3RあるいはT4Rで免疫染色した結果から、2つの抗体が免疫組織化学的にもアイソフォームを認識する抗体として応用できることが示された。

タウ微小管結合領域の構造に関する知見: タウタンパク質の欠失変異体やアミノ酸置換体を用いた解析から、2つの抗体が認識する抗原決定配列(エピトープ)が抗原に用いた合成ペプチドの配列と同じであることが確認された。また、吸収実験では、各抗体のタウタンパク質に対する結合が合成ペプチド(抗原)によって阻害された。これらの結果から、T3RとT4Rがタウタンパク質の微小管結合領域内の限定された配列を認識する抗体であることが強く示唆された。一方、各抗体の抗原決定配列には、すでに β シート形成に関わるコア配列が含まれていること、あるいはT4RがT3Rの抗原(合成ペプチド)に対して交差反応することから、2つの抗体のタウタンパク質に対する親和性が抗原決定配列のコンフォメーション、特に β シート構造に影響される可能性が考えられた。ヘパリンで β シート構造を誘導したタウに対する反応性を検討したところ、T3Rおよび

T4R のタウに対する親和性が β シート構造の形成によって低下することが明らかとなり、上記の可能性を強く示唆する結果が得られた。従って、抗原決定配列の解析の結果から T3R および T4R が微小管結合領域の局所的構造変化の生化学的マーカーとして応用可能であることが示唆された。

プリオン病など近年脳神経細胞にタンパク質の異常な蓄積が深く関わる疾患が注目されている。これら疾患においてはタンパク質の構造とその蓄積あるいは脳内の代謝の間に密接な関係があり、本研究で作製した抗体はタウ病変の形成メカニズムを解明する上で有効なマーカーとなると考えている。

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リピートタウと4リピートタウ）の識別を可能にする抗体 T3R および T4R を得た。今回作製した抗体は、他のグループが作成したものと比較して特異性が高いことに加え、タウの微小管結合領域の高次構造の変化を検出するのに利用可能であることが明らかとなった。微小管結合領域はタウの機能に重要な部分であり、抗体 T3R および T4R は痴呆症発症におけるタウの関わりを詳細に解析する上で利用価値の高い抗体だと考えられる。

文 献

- 1) Hardy, J.A. and Higgins, G.A., Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science*; 256: 184-5, 1992.
- 2) Selkoe, D.J., The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends cell Biol*; 8: 447-453, 1998.
- 3) Braak, H. and Braak, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*; 82: 239-259, 1991.
- 4) 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., Fahn, 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.
- 5) Spillantini, M.G., Goedert, M., Crowther, R.A., Murrell, J.R., Farlow, M.R., and Ghetti, B., Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: a disease with abundant neuronal and glial tau filaments. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94: 4113-4118, 1997.
- 6) Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Paul, M. M., Baker, M., Yu, X., Duff, K., Hardy, J., Corral, A., Lin, W.L., Yen, S.H., Dickson, D.W. and Hutton, M., Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet*; 25: 402-405, 2000.
- 7) Gotz, J., Chen, F., Barmettler, R. and Nitsch, R. M., Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem*; 276: Barmettler, R., Chen, F., Probst, A. and Nitsch, R. M., Oligodendroglial tau filament formation in transgenic mouse expressing G272V tau. *Eur J Neurosci*; 13: 2131-2140, 2001.
- 9) Ishihara, T., Zhang, B., Higuchi, M., Yoshiyama, Y., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M., Age-dependent induction of congophilic neurofibrillary tau inclusions in tau transgenic mice. *Am J Pathol*; 158: 555-562, 2001.
- 10) Tanemura, K., Akagi, T., Murayama, M., Kikuchi, N., Murayama, O., Hashikawa, T., Yoshiike, Y., Park, J.M., Matsuda, K., Nakao, S., Sun, X., Sato, S., Yamaguchi, H. and Takashima, A., Formation of filamentous tau aggregations in transgenic mice expressing V337M human tau. *Neurobiol Dis*; 8: 1036-1045, 2001.
- 11) Higuchi, M., Ishihara, T., Zhang, B., Hong, M., Andreadis, A., Trojanowski, J. and Lee, V.M. Transgenic mouse model of tauopathies with glial pathology and nervous system degeneration. *Neuron*; 35: 433-446, 2002.
- 12) Tatebayashi, Y., Miyasaka, T., Chi, D.H., Akagi, T., Misgima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Tanemura, M., Ishiguro, K., Planel, E., Sato, S., Hashikawa, T. and Takashima, A., Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99: 13896-13901, 2002.