

第24回麻布環境科学研究会 講演 B2

タウの構造変化の指標となる特異的抗体の性質

上野 瞳, 原田 千里, 村山 洋, 松田 基夫

麻布大学院・分子生物学

【序文】

タウは、exon2, 3および10の選択的スプライシングによって6つのアイソフォームとして主に中枢神経系の神経細胞で発現する微小管結合タンパク質であり、神経軸索において微小管の重合と安定化に重要な働きを持つと考えられている。3つのエクソンのうちexon10の有無によりタウの機能ドメインである微小管結合領域のくり返し配列の数が決まり、繰り返り配列の数の違いから6つのアイソフォームを3リピートタウおよび4リピートタウの2つのグループに分けられる。タウは分子間のジスルフィド結合により自己凝集する特徴があり、GSK3 β などのキナーゼにより過剰にリン酸化されると凝集が促進される。この凝集促進がアルツハイマー病などによる痴呆症発症と密接に関わっていると考えられている。過剰リン酸化したタウの神経細胞内蓄積を伴う病理所見が観察される神経変性疾患はタウオパチーと呼ばれ、アルツハイマー病を含めて約20の神経変性疾患が含まれる。細胞内に蓄積するタウアイソフォームが各疾患ごとに異なる事が知られているが、それぞれの疾患の発症メカニズムにおける各アイソフォームの関わりは解明されていない。我々は、タウの各アイソフォームと神経原線維変化形成との関係を明らかにすることが、各疾患の発症機序を解明する

上で重要であると考え、各アイソフォームを特異的に検出する特異抗体として、3および4リピートタウに対するポリクローナル抗体 (T3R, T4R) を作製した。これまでに、これら2つの抗体の性状解析から、タウ分子内の高次構造の変化 (β シート構造の有無) の指標になり得ることを明らかにし、抗原決定配列部分の構造がC末端領域の影響を受ける可能性がある事を報告してきた (第22および23回本研究会)。今回は、以上の結果がタウの自己凝集とどのように関連するのかをC末端領域欠失変異体の組換えタンパク質を用いて検討した。

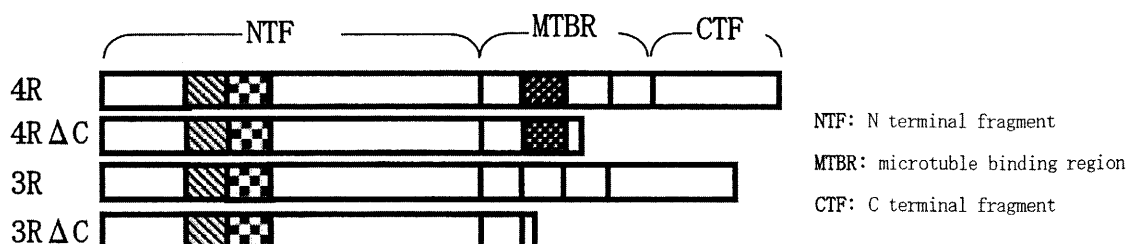
【方法】

1) 組換えタンパク質の精製

PCRで増幅した3および4リピートタウ (4R, 3R) とそれぞれのC末端欠失変異体 (4R Δ C, 3R Δ C) のDNA断片を大腸菌発現用ベクター pET21a (+) に挿入して組換え体分子を作成した (下図)。大腸菌 BL21 (DE3) 株で発現した組換えタンパク質を、加熱処理後、陽イオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーによって精製した。

2) 組換えタンパク質の凝集 (β シート形成) 実験

組換えタンパク質をヘパリン (終濃度 10 μ M) 存在下、37 $^{\circ}$ Cで静置した。 β シート構造の指標としてチオフラビン T (ThT) を加えておき、その蛍光強度



の変化を測定した。

3) タンパク質の検出

タウおよびその変異体はウエスタンブロットにより検出した。検出のための一次抗体には作製したアイソフォーム特異的抗体 T3R, T4R 及びタウのコントロールとしてタウ N 末端認識抗体 (tauN) を使用した。化学発光法及び、アルカリホスファターゼにより各タンパク質を検出し、各バンドの発光強度あるいは染色濃度を定量した。

【結果】

組換えタンパク質の凝集実験から、 β シート構造の形成の指標となる ThT 蛍光強度は $4R > 4R \Delta C$, $3R > 3R \Delta C$ の順に増加することが明らかになった。 $4R \Delta C$ および $3R$ の凝集による蛍光強度の増加の程度は同程度で、一方 $3R \Delta C$ では蛍光は殆ど認められなかった。このことは、タウの β シート構造形成

に対して2番目のくり返し配列 (exon10のコード領域) およびC末端領域が影響していることを示している。全長タウと比べて、C末端領域を欠失するとアイソフォーム特異抗体 (T3R, T4R) に対する親和性が上がることと合わせると、 β シート構造形成と2つのアイソフォーム特異抗体の結合配列の構造変化が関連していると考えられた。また、培養細胞で発現したタウおよび欠失変異体を用いたウエスタンブロットティングから得られた結果と同様な結果が組換えタンパク質を用いた実験からも得られたことは、T3R および T4R に対するタウの親和性の特徴が翻訳後修飾に依存せず、タウ自身の性質によるものと考えられた。今回の結果は、アイソフォームと神経原線維変化の発症機序を解明する上で、タウの状態を検討するためのプローブとして T3R, T4R が有効な抗体であることを示している。