

学位論文題名

Molecular analysis of mutant and wild-type tau deposited
in the brain affected by the FTDP-17 R406W mutation.

(R406W 変異をもつ前頭側頭型痴呆患者脳に蓄積する野生型、
変異型タウの分子解析)

学位論文内容の要旨

神経原線維変化 (neurofibrillary tangle: NFT) はアルツハイマー病など多くの神経変性疾患において、神経細胞内に形成される不溶性の構造物である。NFT の脳内分布が神経細胞脱落の部位と一致することから、NFT と神経細胞死の間に密接な関係があると考えられている。NFT は、超微形態的には2本のより合わさった線維 (paired helical filament: PHF) からなり、サルコシルなどに対し不溶性を示す。PHF の生化学的解析により、その主要な構成成分は、微小管結合蛋白の一つであるタウが異常にリン酸化されたものであることが明らかとなっている。これらのことから、タウの不溶化、PHF 形成を伴う異常が神経細胞死を引き起こす重要な経路であると考えられている。

Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17) は、常染色体優性遺伝を示す疾患であり、特徴的な病理学的変化として神経細胞の脱落と、神経細胞内、ときにグリア細胞内に NFT 形成が見られる。近年、これらの FTDP-17 家系でタウ遺伝子上に多くの種類のエクソン型、イントロン型変異が発見され、タウと神経細胞死の関係を解明する上で鍵を握る疾患として注目されている。エクソン型変異のほとんどは、タウの微小管結合領域およびその近傍に位置し、*in vitro* での解析からその一部は、タウの微小管重合能に影響を与えると考えられている。FTDP-17 の患者ではその変異型の違いにより様々な臨床症状、病理像を示すことが知られている。エクソン型変異の中でも R406W 変異は発症が50歳代後半と遅く、痴呆の進行も十数年かかることが知られており、遅延型変異と考えられている。また、R406W 変異脳では、アルツハイマー病脳と同様に、多数の NFT が存在する。これまでの研究から R406W 変異はタウの微小管重合能には影響は与えず、PHF 形成能も野生型と同等であると考えられている。また、培養細胞を用いた系では、R406W タウは野生型に比べ、リン酸化されにくいことが報告されている。しかし実際の患者脳における R406W タウの性質、動態については不明であり、この変異の細胞死への影響については明らかではない。そこでわれわれは R406W 脳より得られた可溶性画分、サルコシル不溶性画分中の野生型、変異型タウの存在比、およびそのリン酸化状態について、タンパク化学的、免疫化学的手法を用い解析した。

2例の R406W 脳 (症例1: 70歳、男性; 症例2: 71歳、女性) はオランダブレインバンクより供与された。死後時間はともに約5時間半であった。両症例とも、生前高度の痴呆を呈しており、タウ遺伝子上に R406W 変異があることが確認されている。はじめに、合成ペプチドを抗原として野生型タウ、R406W 変異タウを特異的に認識する抗体を作製した。これら抗野生型、抗 R406W 変異型抗体を用い、R406W 脳より調製したサルコシル不溶性画分を、ウェスタンブロット法により解析した。その結果、サルコシル

不溶性画分には野生型、変異型タウがほぼ等量比で存在していることが明らかになった。この結果をさらに確認するため、タンパク化学的手法を用いて解析をおこなった。これまでに、私は R406W 変異型タウと野生型タウは逆相クロマトグラフィー (RP-HPLC) で分離可能であることを見出ししていた。R406W 患者脳より PHF 中に含まれる不溶性タウ (PHF タウ) を精製し、脱リン酸化後 RP-HPLC で展開すると、野生型、変異型タウと思われるピークがほぼ等量得られた。さらにこれらのピークをリシルエンドペプチダーゼ (AP1) で消化し RP-HPLC で展開したところ、406 番目のアミノ酸を含む野生型、変異型タウ由来のペプチドがほぼ等量得られることが明らかになった。つぎに、R406W 患者脳における野生型、変異型タウの局在を、免疫組織学的手法により検討した。それぞれのタウを認識する抗体をアフィニティー精製し、二種類の蛍光色素で直接ラベルした。R406W のパラフィン包埋切片をこれらの抗体で二重染色し、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡下で観察したところ、野生型、変異型タウは同一の NFT に共存していることが明らかとなった。以上の結果より、R406W 脳では野生型、変異型タウはともに不溶性画分 (PHF 画分) に蓄積し、それらの比はほぼ 1 : 1 であることが明らかとなった。つづいて、可溶性画分のタウについて同様に検討したところ、野生型、変異型タウの量に明確な差は認められなかった。また、それぞれの mRNA の発現量を、定量的 RT-PCR 法を用いて検討したところ、明確な差は認められなかった。

次いで R406W 脳におけるタウのリン酸化について検討した。タウはリン酸化されると、電気泳動上の移動度が遅くなることが知られている。可溶性画分のタウについて、脱リン酸化後ウェスタンブロットをおこなったところ、野生型タウは脱リン酸化による明確なバンドのシフトが認められた。これに対し、変異型タウはこの様なバンドのシフトは認められなかった。このことから、可溶性画分中では変異型タウは野生型タウに比べ、リン酸化されにくいことが明らかとなった。つづいて、R406W 脳不溶性画分中に蓄積する野生型、変異型タウのリン酸化状態について検討した。PHF-tau を精製後、RP-HPLC を用いて野生型と変異型タウを分離し、数種の抗リン酸化タウ抗体を用いたウェスタンブロットをおこなった。その結果、R406W 脳に沈着する変異型タウは、野生型と同様に高度にリン酸化されていることが明らかとなった。

本研究により R406W 変異脳では野生型、変異型のタウがほぼ 1 : 1 の比で NFT に組み込まれていることが明らかになった。このことから、R406W 変異タウは野生型とほぼ同等の蓄積速度であるか、あるいは野生型、変異型タウが特異的な 1 : 1 の複合体を形成し、それが単位になり PHF が形成される可能性が考えられる。また、可溶性画分ではリン酸化されにくい R406W 変異タウが、不溶性画分中では高度にリン酸化されていることは、R406W 変異脳における神経細胞死の過程に、強いリン酸化の亢進状態が関与していることを示唆している。

ところで、FTDP-17 の中でこの R406W 変異と対比されるものとして P301L 変異が知られている。P301L 変異は临床上早期に発症し、進行も速いことから、促進型変異といえる。この P301L 変異脳をもちいて、同様に特異的抗体を用いた解析を行ない、P301L 脳では変異型タウのみが蓄積しているという結果を得ている。このような変異によるタウ蓄積様式の違いを明らかにすることは、各変異の細胞死に対する影響、および FTDP-17 家系間の多様性を理解する上で重要であると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 代 邦 雄

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

Molecular analysis of mutant and wild-type tau deposited in the brain affected by the FTDP-17 R406W mutation.

(R406W 変異をもつ前頭側頭型痴呆患者脳に蓄積する野生型、
変異型タウの分子解析)

Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17) は、常染色体優性遺伝形質を示す神経変性疾患であり、その脳には neurofibrillary tangle (NFT) などのタウ封入体が認められる。FTDP-17 の中から、タウ遺伝子上に多くの種類のエクソン型、イントロン型変異が発見されており、タウの機能異常と封入体形成、および神経細胞死の関係を解明する上で鍵を握る疾患として注目されている。中でも P301L、R406W 変異は臨床的特徴的な表現型を有するものとされている。本研究では FTDP-17 変異タウの不容化、蓄積への関与について解明する目的で、R406W、P301L 変異脳より得られた可溶性画分、サルコシル不溶性画分中の野生型、変異型タウの存在、およびそのリン酸化状態について、タンパク化学的、免疫化学的手法を用い解析した。

はじめに合成ペプチドを抗原として野生型タウ、変異型タウを特異的に認識する抗体を作製した。これらの抗体を用い、ウエスタンブロット法により解析した結果、R406W 脳より調製したサルコシル不溶性画分には野生型、変異型タウがほぼ等量で存在していた。さらに共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた蛍光二重染色法による解析の結果、野生型、変異型タウは同一の NFT に共存していた。以上より、R406W 脳では野生型、変異型タウはともに不溶性画分 (PHF 画分) に蓄積し、それらの比はほぼ 1 : 1 であるという結論を得た。次いで R406W 脳におけるタウのリン酸化について解析したところ、可溶性画分のタウでは変異型タウは野生型タウに比べ、リン酸化されにくいことを明らかとした。さらに、R406W 脳に沈着する変異型タウのリン酸化について検討したところ、野生型と同様、高度にリン酸化されていることを明らかとした。

また、P301L 変異脳についても同様に、特異的抗体を用いた検討を行った。その結果、P301L 脳より得られたサルコシル不溶性画分では、変異型タウのみが蓄積していた。また、免疫組織化学的解析の結果、変異タウのみがタウ封入体に存在していた。さらに、P301L 脳の可溶性画分について検討したところ、変異タウが選択的に減少していた。これに対し、野生型、変異型タウ

の mRNA 発現量に差は認められなかった。

以上の結果より、R406W 変異タウは野生型とほぼ同等の蓄積速度であるか、あるいは野生型、変異型タウが特異的な 1 : 1 の複合体を形成し、それが単位になり PHF が形成される可能性が考えられた。また、可溶性画分ではリン酸化されにくい R406W 変異タウが、不溶性画分中では高度にリン酸化されているという結果から、R406W 変異脳における神経細胞死の過程に、強いリン酸化の亢進状態が関与していることが示唆された。さらに P301L 脳では、変異型タウは野生型に比べ、積極的に蓄積することが示唆された。また、可溶性画分における P301L 変異タウの減少は何らかの原因による選択的分解であると考えられた。これらの結果をもとに、タウの変異型による蓄積過程の違い、および臨床症状との関係について論じた。

公開発表に際し、副査の石橋教授から R406W 変異タウのリン酸化低下の意義について、可溶性、および不溶性タウの量変動の相関について、他の FTDP-17 変異脳におけるタウ蓄積様式をもとにした分類について、逆相クロマトグラフィーによるタウの分離法について、FTDP-17 変異脳における野生型のみ蓄積の可能性について質問があった。副査の長嶋教授からは R406W 変異脳における野生型タウの蓄積機序について、各変異タウ *in vitro* での繊維形成能について、タウのノックアウトマウス、FTDP-17 変異タウのトランスジェニックマウスについてのこれまでの知見について質問があった。主査の田代教授からは日本での家系の報告例、および今後の新規家系の同定の可能性について、R406W、P301L 変異の臨床像の違いを規定する原因についての質問があった。これらの質問に対し、申請者は自身のこれまでの研究成果や文献情報をもとに概ね妥当な回答を行った。

この論文は、FTDP-17 患者脳における野生型、変異型タウの存在比を求めることにより、2つの変異型 (R406W、P301L) におけるタウ蓄積様式の違いを明確にしたことで高く評価され、今後、これらの解析を発展させ、アルツハイマー病をはじめとする、多くのタウオパチーの解明につながる知見を得ることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。