

博士学位論文審査要旨

2020年2月7日

論文題目： チューブリン恒常性の破綻がタウタンパク質に与える影響

学位申請者： 藤原 ひとみ

審査委員：

主査：	生命医科学研究科	准教授	舟本 聡
副査：	生命医科学研究科	特別客員教授	石浦 章一
副査：	脳科学研究科	教授	貫名 信行

要 旨：

アルツハイマー病をはじめとした神経変性疾患では、微小管結合タンパク質として知られるタウタンパク質が線維化した神経原線維変化 (Neurofibrillary tangle, NFT) が認められる。このような病理像を呈す神経変性疾患をタウオパチーと称し、脳内の NFT 形成部位や出現頻度には神経細胞の脱落と強い相関がある。タウタンパク質は、神経細胞の軸索に存在し微小管の重合や安定性に寄与し、この機能はリン酸化によって負に制御されていると考えられている。NFT は高度にリン酸化したタウタンパク質で構成されていることから、タウタンパク質の異常なリン酸化が微小管の崩壊を招くことで、タウオパチーを引き起こすと考えられてきた。しかし、実験的な条件で、タウタンパク質のリン酸化によって、微小管の崩壊が再現されることはない。一方で、人為的な微小管の崩壊がタウタンパク質のリン酸化を亢進することや、微小管を構成するチューブリンの減少がタウタンパク質の毒性を増大させることが知られている。このような経緯から、申請者は本学位論文で、微小管やチューブリンの恒常性の破綻がタウオパチーを引き起こすと仮説を立て、その検証を試みた。

申請者は、微小管やチューブリンの恒常性を破綻させるために、チューブリンの分子シャペロンとして機能する tubulin specific-chaperon E (Tbce) の発現を抑えることを着想した。実際にマウス海馬初代培養神経細胞に Tbce に対する miRNA を発現するレンチウイルスを感染させると、Tbce 発現が低下し、14 DIV の神経細胞の細胞体において、不活性型の非アセチル化チューブリンの増加が認められた。さらに、この神経細胞では、タウタンパク質の複数のリン酸化部位のリン酸化が亢進し、細胞体においてリン酸化タウタンパク質の増大も認められた。以上の結果から、チューブリンの恒常性の破綻がリン酸化タウタンパク質の異常局在や蓄積を引き起こすことが示され、タウオパチー発症機序の解明に貢献することができた。

よって、本論文は、博士 (理学) (同志社大学) の学位論文として十分な価値を有すると認められる。

総合試験結果の要旨

2020年2月7日

論文題目： チューブリン恒常性の破綻がタウタンパク質に与える影響

学位申請者： 藤原 ひとみ

審査委員：

主査：	生命医科学研究科	准教授	舟本 聡
副査：	生命医科学研究科	特別客員教授	石浦 章一
副査：	脳科学研究科	教授	貫名 信行

要 旨：

2020年1月16日（木）16時から17時15分にかけて、申請者の学位審査論文に関する公聴会を実施した。口頭発表は45分、質疑応答は30分であった。その後、主査と副査のみによる申請者に対する非公開の口頭試問を約15分行った。

質疑応答や口頭試問では、実験手法や実験結果の解釈等について質問がなされた。申請者はこれらに適切に対応し、研究内容や研究手法等について十分な理解と考察を示すとともに、研究背景についても十分な専門知識を有することを示すことができた。学位論文の骨子となるこの研究成果は、米国学術雑誌Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC) に筆頭著者として投稿され、査読時に改訂指示を受けることなく、約3週間で受理された。このことは、申請者が示した研究結果が重要かつ適正であったことを示唆している。

申請者のこれまでの研究成果の発表件数は、筆頭著者としてのポスター発表が5件、筆頭著者としての共著学術論文が1件（上記BBRC）、筆頭著者以外の共著学術論文発表が3件（Journal of Biological Chemistry、Acta Neuropathologica Communications、cells）である。この中で、アミロイドβ産生に関するなど学位論文の以外の認知症関連分野のものがあることは特筆すべきで、申請者が認知症研究分野において広い見識と技術を有することを示している。

申請者は、本研究科修了に必要な所定の単位を修得しており、語学（英語）については入学時に語学試験結果とTOEICスコアにおいて資格認定を受けている。

よって、総合試験の結果が合格であると認める。

博士學位論文要旨

論文題目： チューブリン恒常性の破綻がタウタンパク質に与える影響

氏名： 藤原 ひとみ

要旨：

認知症とは、後天的且つ不可逆的な脳の障害により、いったん正常に発達した認知機能が慢性的に低下し、日常生活や社会生活に支障をきたす状態をいう。認知症を発症頻度により分類した場合、最も大きな割合を占めるのが、アルツハイマー型認知症 (Alzheimer's disease, AD)である。その罹患者数は増加の一途をたどっており、認知症の問題は患者や介護に関わる家族への負担のみならず、社会経済的にも大きな負担となってきた。今後超高齢化社会に突入していく日本において、認知症発症機序の解明及びそれに基づく根本的治療法の確立は喫緊の課題となっている。

AD は初老期以後に発症する認知症で、記憶力障害から始まり、しだいに失認、失行、見当識障害をともなう。AD では、神経細胞脱落による脳の萎縮に加え、老人斑及び神経原線維変化 (Neurofibrillary tangle, NFT) とよばれる病理変化が認められる。これらのうち、NFT は、微小管結合タンパク質であるタウタンパク質 (タウ) が凝集・線維化し異常に蓄積したものである。変性神経細胞にタウの蓄積をともなう疾患は AD 以外にも前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺など複数の認知症が含まれ、このような病理像を呈す神経変性疾患は総称して、タウオパチーと呼ばれる。これまでに、NFT の形成部位および頻度が臨床症状の進行や神経細胞脱落に強い相関があることが知られている。また家族性のタウオパチーの遺伝学的解析から、タウの遺伝子変異が同定されている。これらの知見は、タウオパチーがタウの生理機能の変化及び機能不全により引き起こされることを強く示唆している。

タウは、通常成熟した神経細胞の軸索に特異的に局在、微小管に結合し、その重合促進や安定化に寄与すると考えられている。その機能はリン酸化により負に制御されていると考えられている。NFT の構成成分が異常にリン酸化されたタウであること、および病理学的に蓄積したタウは微小管への機能が消失されていたことなどから、タウオパチーはタウのリン酸化が起因となり、細胞体への異常局在・凝集体形成とともに微小管が消失し、最終的に神経細胞死に至ると信じられてきた。しかし、これまでにタウのリン酸化がタウオパチーを引き起こす直接的な証拠は無い。これに対し、昨今の *in vivo* 解析から、タウのリン酸化では微小管の崩壊や凝集体形成が誘導されず、またリン酸化依存的な細胞体への異常局在も示さないことが報告されている。したがって、タウオパチー発症におけるタウのリン酸化の役割およびその発症機構については抜本的な改訂が必要である。

本研究ではタウオパチーのもう一つの病理学的特徴である微小管消失に着目した。タウオパチー変性神経細胞内では、タウの蓄積に伴い微小管 (チューブリン) の消失が認められる。タウは微小管の重合促進や安定化に関与すると考えられてきたことから、微小管の消失はタウのリン酸化によるタウの機能損失の結果として生じる事象だと考えられてきた。しかし、病理学的解析ではタウの蓄積よりも先に微小管の消失が起きている可能性が示唆されている。また本研究の先行研究から、人為的な微小管の崩壊はタウのリン酸化を亢進することや、チューブリンの減少がタウの神経毒性を増大させることが確認されている。これらの結果は、これまでの仮説とは異なり、微小管維持機構の破綻がリン酸化をはじめとするタウの異常化を引き起こす可能性を示している。本研究では、神経細胞における微小管 (チューブリン) の恒常性の破綻とそれに伴うタウ

異常化への影響について検討した。

チューブリンの恒常性破綻を誘発するには直接チューブリンをノックダウンする方策が考えられる。しかし、チューブリンには多数の *isotype* が存在することから、特定のチューブリン mRNA のノックダウンでは期待される効果が得られない可能性が高い。したがって本研究では、チューブリンそのものではなく α チューブリンの folding や α/β チューブリンの会合に関与するシャペロン分子、*tubulin specific-chaperon E* (Tbce) に着目した。これまでに Tbce の機能損失は、軸索の微小管の減少やチューブリンのタンパク質発現量の減少をもたらすことが報告されている。はじめにマウス神経細胞に対する Tbce ノックダウンシステムを構築し、タウの細胞内局在およびリン酸化への影響について検討した。

はじめに miRNA による Mouse Tbce ノックダウンを試みた。Mouse Tbce に対する 4 つの miRNA 候補配列 (miR-Tbce1~miR-Tbce4) を選定し、ノックダウン効果について N2a 細胞および Mouse TBCE を過剰発現させた HEK293 細胞を用いて検討した。その結果、Mouse Tbce の発現抑制効果が認められる配列として miR-Tbce1 及び miR-Tbce3 を同定した。

次に、マウス神経細胞に対する応用を目指し、神経特異的プロモータおよびレンチウイルス発現系を組み合わせた Mouse Tbce ノックダウンシステムを構築した。胎生 17 日齢のマウス海馬より初代培養神経細胞を作製し、0 days *in vitro* (DIV) の時点で control または miR-Tbce1 を発現するレンチウイルスを感染させ、細胞の経時変化を観察した。miR の配列は EmGFP mRNA の 3'-UTR 領域に組み込むことで、miR の発現を緑色蛍光でトレースできるようにした。はじめに、独自に作製した Anti-Mouse TBCE 抗体を用い、miR-Tbce1 及び miR-Tbce3 の Mouse TBCE 発現量に対する影響を検討した。その結果、miR-Tbce1 で良好な Mouse TBCE 発現抑制効果が得られ、7 DIV から 14 DIV にかけて control 細胞と比較して半分程度まで減少していた。レンチウイルスを介して miR-Tbce1 を発現させることで、14 DIV まで神経細胞の形態や生存率に影響を及ぼさない程度に Mouse Tbce をノックダウンできるシステムの構築に成功した。

次に、Mouse Tbce ノックダウンによる α チューブリンへの影響について検討した。免疫細胞染色法により α チューブリンの局在解析を行った結果、14 DIV の Mouse Tbce ノックダウン細胞の細胞体において α チューブリンの蓄積が認められた。一方、安定化微小管の指標となるアセチル化 α チューブリンは減少していた。細胞体に蓄積した α チューブリンの性状についてさらに生化学的な解析をおこなった。可溶性のチューブリンと微小管を分画する手法を用いて各細胞の α チューブリンを回収し、Western blot 法で解析した。その結果、可溶性チューブリン画分において、14 DIV で非アセチル化 α チューブリンの増大が認められた。その一方で、微小管画分における全 α チューブリン及びアセチル化 α チューブリン量に関しては、control 細胞と比較しても変動が見られなかった。上記のとおり、Tbce は α チューブリンの正確な folding に必須なシャペロンである。以上より、Mouse Tbce ノックダウンにより微小管に組み込まれない不活性型の可溶性 α チューブリンが細胞体で蓄積したものと判断した。チューブリンの *de-novo* 合成が抑制され、正常なターンオーバーが不能に陥った状態であり、本来のチューブリン恒常性が破綻した状態であると考えた。

さらに、この α チューブリンの恒常性の破綻が内在性タウに与える影響について検討した。その結果、Mouse Tbce ノックダウン神経細胞の細胞体において、不活性型の α チューブリンの異常蓄積とともにトータルタウ及び Ser202/Thr205 リン酸化タウの異常局在が確認された。Western blot 法を用いた解析の結果、トータルタウ、Ser202/Thr205 リン酸化タウ、及び Ser396/404 リン酸化タウの増大が確認された。以上の結果から、 α チューブリンの恒常性の破綻は、リン酸化タウの細胞体での異常局在及び蓄積を引き起こすことが示された。

マウス脳において、生理的条件下ではタウは軸索に局在している。これに対し、タウオパチーモデルであるタウトランスジェニックマウス脳に発現する外来性タウは細胞体に異常局在し、このようなタウがタウ病変の形成につながることを示されている。したがって、リン酸化タウの神

経細胞体への異局在、蓄積はタウオパチー形成における極めて重要なステップであると言える。本研究では、 α チューブリンの恒常性の破綻により、内在性タウの細胞体への局在やリン酸化の増大などの異常性が誘導されることを見出した。現在までに、何らかの刺激によりマウス脳の内在性タウの異常局在を再現した報告は僅かしか無い。本研究で得られた知見は、剖検脳の病理所見で観察された微小管の消失とタウの蓄積をつなげる重要な所見と考えている。

本研究で認められたタウの細胞体への蓄積に関する詳細なメカニズムについてはさらなる検証が求められるが、異所性発現の増強または分解の低下が考えられる。qRT-PCR 解析を行なった結果、7 DIV・14 DIV の Mouse *Tbce* ノックダウン細胞において、タウの遺伝子発現量に変動は見られなかった。したがって、タウ mRNA の転写は関わっていないと考えている。ただし、タウについては翻訳レベルでの発現調節の例も知られており、タウの発現量調節機構の解明が必要と考えている。その一方で、分解系の機能破綻がタウのタンパク質量の増大を引き起こす要因であることも考えられる。タウは、ユビキチンプロテアソーム系やオートファジーによる分解を受けることや、 Ca^{2+} 依存的なシステインプロテアーゼであるカルパインにより切断されることが報告されている。また一般的な培養細胞に過剰発現したタウは速やかに分解されることが知られていることから、チューブリンの恒常性が破綻した神経細胞ではタウ分解経路の選択的な機能不全が起きている可能性も考えられる。今後、本研究で構築された Mouse *Tbce* ノックダウンシステムを *in vivo* 解析に応用し、慢性の α チューブリンの恒常性の破綻とタウの凝集体形成、さらには神経原線維変化形成への関連性を解析する必要がある。