

博士學位論文審査要旨

2020年2月4日

論文題目： Study of mechanisms for the axonal localization of the tau protein in neurons
神経細胞におけるタウ蛋白質軸索局在化メカニズムの研究

学位申請者： 岩田 実里

審査委員：

主査： 脳科学研究科 教授 元山 純

副査： 脳科学研究科 教授 貫名 信行

副査： 脳科学研究科 教授 高森 茂雄

要 旨：

この学位論文では、微小管結合蛋白質タウの神経細胞における軸索特異的局在に着目し、タウ蛋白質内における軸索局在に必須な部位の同定と機能について検討を行なっている。アルツハイマー型認知症を含む“タウオパシー”と呼ばれる疾患群において、タウ蛋白質は細胞体や樹状突起に異常局在し神経原線維変化を形成することが知られている。その異常局在が神経原線維変化の初期段階であり、その発症機構の解明が望まれるが未だ明らかになっていない。疾患での異常局在の解明にはタウ蛋白質の正常な神経細胞内での軸索局在機構を理解する必要があるが、その機構も未だ不明である。本学位研究はタウ蛋白質の神経細胞内における軸索局在機構の理解を目的としている。ラット胎児由来幼若神経細胞が、培養下で発達する過程を再現し、その過程でのタウ蛋白質の軸索局在機構を研究している。

申請者は、培養中の幼若神経細胞に対し外部から外来タウ遺伝子の発現を誘導し、誘導されたタウ蛋白質が軸索に局在する条件の検討から開始した。そして幼若神経細胞の軸索と樹状突起の成立時期以前に、一過的に外来タウ遺伝子の発現誘導を行うことで、タウ蛋白質の軸索特異的局在の再現に成功した。次にタウ蛋白質内部にある微小管結合領域やプロリンリッチ領域等、様々な部分的欠損を有する変異型蛋白質を作成し軸索局在への関与を解析した。その結果、プロリンリッチ領域2が軸索局在化に重要であることを発見した。さらにFRAP法(光褪色後蛍光回復法)を用いて、野生型と変異型タウ蛋白質との微小管との結合安定性および軸索方向あるいは細胞体方向への移動し易さの比較を行い、プロリンリッチ領域2がタウ蛋白質の細胞体から軸索への移動の制御に関わることを示した。

口頭試問では、英語による適切な研究発表を行った。質疑応答では論文についての問題点がいくつか指摘されたが、それに対して満足のできる回答・討論を行い、学位論文のdefenseを行うことができたと判断できる。

よって、本論文は、博士(理学)(同志社大学)の学位を授与するにふさわしいものであると認める。

総合試験結果の要旨

2020年2月4日

論文題目： Study of mechanisms for the axonal localization of the tau protein in neurons
神経細胞におけるタウ蛋白質軸索局在化メカニズムの研究

学位申請者： 岩田 実里

審査委員：

主査： 脳科学研究科 教授 元山 純

副査： 脳科学研究科 教授 貫名 信行

副査： 脳科学研究科 教授 高森 茂雄

要 旨：

博士学位候補者の岩田氏に対して、2020年1月29日午前11時30分より総合試験を行った。

岩田氏の学位研究は、発達過程にある神経細胞における微小管結合蛋白質タウの軸索への局在機構の細胞生物学的・分子生物学的解析である。そこで総合試験では主に細胞生物学、分子生物学、生化学の基礎および専門的な知識についての試問を行った。なお語学試験については、総合試験の前に行った公開口頭試問を英語で行なったため、総合試験では免除とした。

岩田氏は、審査委員の質問について適切に答え、不明な点に関しては十分に論理的な考察を行った。また関連分野の基礎知識は十分に備わっていると判断した。専門的な知識については、まだまだ不十分な点も認められるが、概して満足のできるレベルにあると判断した。

以上を踏まえて、審査委員一同の協議の結果、総合試験の結果は合格であると認める。

博士学位論文要旨

論文題目： Study of mechanisms for the axonal localization of the tau protein in neurons
神経細胞におけるタウ蛋白質軸索局在化メカニズムの研究

氏名： 岩田 実里

要旨：

タウは神経細胞の軸索に特異的に局在しているタンパク質である。微小管結合タンパク質の一つであり、微小管の構造を安定化する役割を持つ。一方、アルツハイマー型認知症を含む“タウオパシー”において、タウは細胞体や樹状突起に異常局在し、神経原線維変化を形成することが知られている。私は、タウの軸索局在の破綻、すなわち異常局在こそが神経原線維変化形成の初期段階であると考えた。これを検証するためには、まず、タウがどのように軸索へ局在しているかを知る必要があるが、その機構は未だ不明である。そこで私は、タウの軸索局在化分子機序解明を目的として学位研究を開始した。

海馬由来の初代神経細胞にタウを恒常的に発現させると、発現したタウは軸索だけでなく細胞体や樹状突起にも異常局在を示す。すなわち、この実験系では正常時のタウが軸索へ局在する機序を検討できない。そこでまず、外因性のタウを軸索特異的に局在させる実験系を確立することにした。内在性のタウは、神経細胞の発達期に高い発現を示し、大きく軸索に移動している。すなわち軸索への局在化は、神経細胞発達初期にすでにほぼ完了していることがわかった。このことから、神経細胞培養初期の時点で外因性タウを発現させる必要があるのではないかと考え、テトラサイクリン発現誘導系を利用したレンチウイルスベクターを使用し、一過的に外因性タウを発現させる系を構築した。この発現系を用いることにより、外因性タウを軸索特異的に局在させる方法を、世界で初めて構築した。

この新しい実験系を用いて、まず、軸索局在に必要なタウの領域の特定を行った。アミノ酸配列によりタウを9つの領域に分け、それぞれの領域を欠損させた変異体を神経細胞に発現させ局在を見ることで、タウの軸索局在に必用な領域を検討した。神経細胞培養2-3日目に各変異体タウの局在を観察したところ、proline rich region 2 (PRR2) を欠損させたタウが、野生型タウと異なり、細胞体や樹状突起に異常局在を示すことから、PRR2 がタウの軸索局在化に重要であることがはじめて明らかになった。さらに、Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)法を用いて、野生型タウの軸索への輸送を可視化することを試みた。先行研究では、「遅い軸索輸送」によってタウが輸送されることが報告されている。FRAP 実験により細胞体から軸索への優先的な移動が確認され、さらに PRR2 がその過程に必須であることを示唆する結果を得た。

先行研究では、タウは微小管依存性の輸送メカニズムによって軸索に輸送されることが示唆されている。そこで、タウの微小管結合に重要であるといわれている微小管結合部位 (microtubule-binding domain, MTBD) を欠損させた変異体を作成した。驚くべきことに、この変異体は正常な軸索局在を示した。FRAP においても、MTBD 欠損変異体が微小管に安定的に結合せず、主に拡散していることが確認された。PRR2 にはいくつかのリン酸化部位があるが、そのすべてをアラニンに置換した疑似脱リン酸化型変異体は、FRAP における移動性が極度に低下しており、微小管に強固に結合すると考えられた。この変異体は主に細胞体に分布し、軸索ではその入口部分にのみ分布した。これらの結果から、先行研究とは異なり、タウの微小管結合能は軸索局在に必須ではなく、むしろ抑制的に働くことが、独自の新規実験系において明らかとなった。一方、リン酸化部位をグルタミン酸に置換した疑似リン酸化変異体は、PRR2 欠損タウと似たような挙動を示した。すなわち、微小管への結合が低下し、細胞体と樹状突起に異常局在した。神経細胞発達

初期にタウがリン酸化されていることは明らかになっている。これらのことから、神経細胞発達初期のタウの軸索への移動に際して、タウの PRR2 でのリン酸化が関与し、特定の部位がリン酸化されることで微小管との結合力を変化させ別の因子と連携し軸索への移動を可能にしていると考えている。

この学位研究によって、神経細胞において外因性タウを軸索へ特異的に局在させる方法の構築により局在や細胞内動態などの検討を行うことを可能にした。この系により正常時のタウの研究に大きく貢献できると考えられる。また欠損変異体や PRR2 のリン酸化部位のアミノ酸置換により、タウの軸索局在に必要な領域の絞り込みとそれを含めたリン酸化状態の有無で細胞内の動態に変化が生じることが明らかになった。これらの結果は正常時のタウの局在化機構のほんの一部にすぎないが、正確な局在化機構の解明に必要な重要な結果を得られたと考えている。