

論文の内容の要旨

論文題目 タウオパチーにおける tau 依存性 BRCA1 凝集の検討

氏名 栗原 正典

<背景> タウオパチーは脳内に tau タンパクの凝集体を認めることを特徴とする神経変性疾患の一群である。tau にはリピートドメインのリピート数により 3 リピート (3R) と 4 リピート (4R) があり、疾患ごとに凝集体に含まれる tau のリピート数が異なる。代表的な疾患としてアルツハイマー病 (AD) では凝集体に 3R, 4R ともに含まれ、ピック病では 3R のみ、進行性核上性麻痺 (PSP)・大脳皮質基底核変性症 (CBD) では 4R のみが含まれる。また凝集体の構造も疾患ごとに異なることが知られる。AD では tau の他にアミロイド β ($A\beta$) の沈着を認め、ピック病・PSP・CBD では認めない。正常の tau は可溶性で微小管の安定化などに関わり、tau が不溶化・凝集することで細胞の機能障害が起きると考えられているが、その機序は確定していない。

所属する研究室の間野 助教らは AD 脳の神経細胞において、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の原因遺伝子がコードするタンパクであり DNA 修復など DNA 恒常性維持に関わることが知られる BRCA1 タンパクが、細胞質で tau 依存性に凝集していることを報告した [Mano T et al. Proc Natl Acad Sci USA 2017]。 $A\beta$ 刺激下の神経細胞において BRCA1 をノックダウンすると DNA 断片化の増加とともに神経突起の減少が見られ、また他のグループからモデルマウス海馬で BRCA1 をノックダウンするとシナプス機能障害・認知機能低下が生じることも報告され [Suberbielle et al. Nat Commun 2015]、AD 脳において tau 依存性に BRCA1 が凝集し機能が低下することで神経細胞の機能障害が生じている可能性が示唆された。

以上から tau 依存性 BRCA1 凝集を阻害することで病態を改善できる可能性があるが、その機序はこれまで明らかでなかった。また AD 以外のタウオパチー脳でも同様に tau 依存性に BRCA1 凝集が生じているか明らかでなかった。

<目的> そこで今回 tau 依存性 BRCA1 凝集の機序の一端を明らかにすることを目的として本研究を行なった。tau・BRCA1・他の因子それぞれの要因を検討するため 1. AD 以外のタウオパチーでも tau 凝集に伴う BRCA1 の細胞質での凝集が生じているか明らかにし BRCA1 凝集誘導に重要な tau の性質を検討する、2. tau 依存性 BRCA1 凝集に関わる他の因子を探索するためのスクリーニング系の構築可能性を検討する、3. tau 依存性 BRCA1 凝集に関わる BRCA1 のドメインを明らかにする、ことを考え検討を行なった。

<研究の概要>

1. タウオパチー剖検脳における検討

AD 4 例, ピック病 2 例, PSP 3 例, CBD 3 例の剖検脳においてリン酸化 tau・BRCA1 抗

体を用いて免疫染色を行った。既報告の通り AD の神経原線維変化・ニューロピルスレットでリン酸化 tau と BRCA1 の共局在を認め、今回新たにピック病のピック球、PSP の渦巻き型神経原線維変化・コイル小体・一部の房状アストロサイトでもリン酸化 tau と BRCA1 の共局在を認めることが明らかとなった。検討した CBD 3 例の前頭葉・中脳ではリン酸化 tau と BRCA1 の共局在を認めなかった。また界面活性剤サルコシルを用いて PSP 凍結脳を可溶性・不溶性に分画しウェスタンブロットを行い、PSP 脳でサルコシル不溶性 BRCA1 が正常コントロール脳に比べて増加していることを確認した。

2. スクリーニング系構築可能性の検討

N 末端に蛍光タンパク Venus をタグ付けした全長 BRCA1 を発現するプラスミドを作成し一過性過剰発現を行なった。既報の通り、凝集しやすい P301L 変異の入った 4R tau を HEK 細胞で一過性過剰発現し、試験管内で作成した tau 凝集シードを導入し、細胞内 tau 凝集誘導を行なった。

HEK 細胞における一過性過剰発現系で Venus-全長 BRCA1 が tau 凝集依存的に凝集することを蛍光顕微鏡観察、サルコシル不溶性分画ウェスタンブロットで確認した。スクリーニング実験を行なうためばらつきの少ない系を目指し Venus-BRCA1 を安定発現する細胞クローンを作成した。作成中に細胞死が目立つクローンや細胞増殖が遅いクローンを認め、得られた単一細胞クローンは 4 つのみであった。今回の検討で最終的に得た 4 つの細胞クローンではクローンごとに蛍光の特徴が異なり、一過性過剰発現系で認めたような tau 依存性 BRCA1 凝集を確認できなかった。

また tau の C 末端に Venus の N 末端側断片 VN を、BRCA1 の N 末端に Venus の C 末端側断片 VC をタグ付けしたプラスミドを作成し二分子蛍光補完法 (BiFC) を用いた系の検討を行なった。一過性過剰発現では tau 凝集シードを加え tau 凝集を誘導した際に蛍光細胞の増加、細胞質に点状の凝集様の蛍光を認め BiFC により tau 依存性 BRCA1 凝集を検出できることが示唆された。安定同時発現細胞株作成を試みたが、今回の検討では得られたクローンのうち半数で tau-VN を発現したものの VC-BRCA1 を発現したクローンは得られなかった。

3. tau 依存性凝集に関わる BRCA1 ドメインの検討

Venus-BRCA1 の BRCA1 配列内に欠失変異を加えたプラスミドを作成した。これらを HEK 細胞にトランスフェクションし一過性過剰発現し、tau の凝集を誘導して tau 依存性凝集に関わる BRCA1 のドメインを検討した。

全長 BRCA1, BRCA1_del_1-70, BRCA1_del_305-770, BRCA1_del_775-1292 では tau 凝集シードを加え tau 凝集シードを誘導した際に凝集・不溶化を認めたが、BRCT ドメインを含む C 末端を欠失した BRCA1_del_1508-1863 のみ tau 依存性凝集を認めなかった。BRCA1 C 末端側アミノ酸配列のみの BRCA1_1293-1863 及び BRCA1_1508-1863 で tau 依存性凝集を

認め、BRCTドメインの全てを欠失したBRCA1_1293-1645ではtau依存性凝集を認めなかった。

<考察> タウオパチー剖検脳を用いた検討から、A β の沈着を認め3R tau, 4R tauともに凝集体に認めるADのみならず、3R タウオパチーであるピック病、4R タウオパチーであるPSPでもtau依存性BRCA1凝集が生じることが明らかとなった。またtau凝集体の疾患特異的凝集体構造にも依存しないことが示唆された。

今回の検討ではtau依存性BRCA1凝集に影響を与える他の因子を探索するためのスクリーニング系を構築することができなかった。安定発現細胞株が作成できなかった原因としてVenus-BRCA1プラスミドが11 kbと大きくゲノム組込み効率が悪く十分な発現量が得られない可能性や、全長BRCA1の過剰発現による細胞毒性から発現量の多い細胞が選択的に除かれた可能性や細胞の性質が変化してしまった可能性を考えた。いずれの可能性もtau依存性BRCA1凝集に関わるBRCA1のドメインを明らかにし、プラスミドを小さく細胞毒性がないアミノ酸配列まで絞込み、その情報をもとに系を改善できないかと考え、次の凝集に関わるBRCA1のドメインの検討を進めた。

欠失変異体を用いた検討からtau依存性BRCA1凝集に関わるBRCA1のドメインはC末端にあるBRCTドメインであることが明らかとなった。BRCTドメインは家族性乳癌卵巣癌症候群の病原性変異の報告が多い部位であり、正常では立体構造をとり他のリン酸化タンパクとの結合を介してタンパク複合体を形成し様々な機能に関わることが報告されている。今後BRCA1 BRCTドメインのこうした既報告の機能がtau依存性凝集に関わるかBRCTドメイン内変異体などを用いてさらに検討が進み、また絞り込んだ情報を用いてスクリーニング系を改善し、tau依存性BRCA1凝集に関わる他の因子の探索・同定が行なわれることが期待される。