

氏名(本籍)	あお やぎ ひろ ふみ 青 柳 浩 史 (山形県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 4777 号		
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>Fibrillogenic Nuclei Composed of P301L Mutant Tau Induce Elogation of P301L Tau but Not Wild-type Tau</b> (P301L 変異タウからなる凝集核は P301L 変異タウの線維伸長を促進するが、野生型タウの線維伸長は促進しない)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	野 口 雅 之
副 査	筑波大学教授	理学博士	岡 村 直 道
副 査	筑波大学准教授	博士 (医学)	島 野 仁
副 査	筑波大学准教授	医学博士	水 上 勝 義

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

#### (目的)

FTDP-17 (frontotemporal dementia linked to chromosome 17) はタウ遺伝子に変異を持つ神経変性疾患であり、病理学的には前頭葉と側頭葉の萎縮、神経細胞の消失、神経細胞やグリア細胞内のタウ病変が特徴である。これまでの研究より、タウに P301L 変異を持つ FTDP-17 患者脳内では P301L 変異型タウのみ凝集しており野生型タウは凝集しないことが知られている。

本研究では、FTDP-17 患者脳内における変異タウの凝集体形成のメカニズムを明らかにすることを目的とし、生化学的解析、タンパク質化学的解析を行った。

#### (対象と方法)

大腸菌より精製した野生型タウ (以下, Tau-WT), P301L 変異型タウ (以下, Tau-P301L), R406W 変異型タウ (以下, Tau-R406W) にヘパリンを添加し, 37°C にてインキュベートし, 凝集したタウ線維を取得した。SDS-PAGE, CBB 染色によってその凝集体量を定量した。また, 電子顕微鏡によってタウ線維の形態を観察した。

Tau-WT, Tau-P301L, もしくは Tau-R406W の凝集体をソニケーションし, 野生型タウからなる凝集核 (以下, Seed-WT), P301L 変異型タウからなる凝集核 (以下, Seed-P301L), R406W 変異型タウからなる凝集核 (以下, Seed-R406W) を調製した。Tau-WT, Tau-P301L, Tau-R406W に各種凝集核を添加し, 37°C にてインキュベート凝集したタウ線維を取得した。SDS-PAGE, CBB 染色によってその凝集体量を定量した。

Seed-WT, Seed-P301L, Seed-R406W をプロナーゼによって消化し, プロナーゼ耐性を示す凝集核のコアドメインを SDS-PAGE, 質量分析, アミノ酸シーケンサーによって分析した。

#### (結果)

ヘパリン添加によって生じた Tau-WT, Tau-P301L もしくは Tau-R406W の凝集体量を定量した。96 時間のインキュベーションによって生じた Tau-P301L の凝集体量は Tau-WT や Tau-R406W よりも多量で, かつ

凝集体の増加が始まるタイミングは Tau-WT や Tau-R406W に比べて Tau-P301L の方が早かった。透過型電子顕微鏡にてこれらの凝集体を観察したところ、いずれの試料においても straight filaments (SFs) が観察され、変異による形態の違いはなかった。

Tau-WT, Tau-P301L 溶液に凝集核として Seed-WT を添加したところ、いずれにおいても同程度の凝集体が形成された。一方、凝集核として Seed-P301L を添加したところ、Tau-P301L において形成された凝集体のほうが Tau-WT よりも多量であった。Tau-WT, Tau-R406W に Seed-WT, もしくは Seed-R406W を添加したところ、いずれの場合においても同程度の不溶性タウが形成された。Seed によって形成された凝集体はいずれの試料においても、ヘパリンを添加した試料と同様の SFs の形成が観察され、その形態に差は認められなかった。

Seed-WT, Seed-P301L, Seed-R406W をプロナーゼ処理し、SDS-PAGE によってプロナーゼ耐性を示すコアドメインのバンドパターンを比較した。Seed-P301L のコアドメインのバンドパターンは Seed-WT と異なるバンドパターンを示したが Seed-R406W のそれは Seed-WT と同様であった。さらに、質量分析、アミノ酸シーケンスによってそれぞれのコアドメインのタンパク質化学的解析を行ったところ、Seed-P301L のコアドメインは Seed-WT と異なることが明らかとなった。一方、Seed-R406W のコアドメインは Seed-WT と同じであった。

(考察)

P301L 変異を持つ患者脳内では、P301L 変異型タウからなる凝集核が形成され、その凝集核を核として線維形成の伸長過程が進行するため、P301L 変異型タウからなる凝集体のみが形成され、野生型タウの凝集体は形成されないと考えられる。一方、R406W 変異を持つ患者脳内で R406W 変異型タウからなる凝集核と野生型タウからなる凝集核が同程度に形成される。どちらの凝集核を核とした場合においても R406W 変異型タウと野生型タウの線維伸長は同等に進行するために、R406W 変異型タウと野生型タウとが凝集体を形成すると予測される。

またタンパク質化学的解析の結果、Seed-P301L のコアドメインの構造は Seed-WT と異なること、Seed-R406W のコアドメインの構造は Seed-WT と同じであることが明らかとなった。すなわち、凝集核のコアドメインの構造が伸長過程に大きな影響を与えることが示唆された。また、同種の凝集核を添加した場合においても、伸長するタウ単量体の種類の違いによって生じる凝集体量に大きな差が認められた。このことから、凝集核のコアドメインの構造のみならずタウ単量体の構造も伸長過程に重要であると考えられた。さらに、凝集核とタウ単量体の相互作用の強さが伸長過程に大きな影響を与えることが示唆された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は FTDP-17 における P301L 変異型タウの異常凝集のメカニズムの一端を明らかにした大変優れた研究で今後の発展が期待される。

学位論文審査委員会において審査委員全員出席のもとに最終試験を行い、論文について説明をもとめ、関連事項について質疑応答を行った結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。