

タウオパチーにおける形態特異的タウ重合モデルの開発

田中稔久

三重大学医学部 神経・筋病態学

共同研究者： 福森亮雄（大阪医科薬科大学 薬学部 薬物治療学 II 研究室）

【研究の背景】

高齢化社会を迎えた現在、認知症の病態メカニズムの解明とそれにもとづく早期診断・治療法の開発は緊急の課題である。この中でタウが異常蓄積するものはタウオパチーと総称されている。アルツハイマー病 (Alzheimer Disease: AD) に加え、Primary Age-Related Tauopathy (PART)、慢性外傷性脳炎 (Chronic Traumatic Encephalopathy: CTE)、ピック病 (Pick Disease: PiD)、大脳皮質基底核変性症 (CorticoBasal Degeneration: CBD)、嗜銀顆粒性認知症 (Argyrophilic Grain disease: AGD)、Ageing-Related Tau AstroGliopathy (ARTAG)、進行性核上性麻痺 (Progressive Supranuclear Palsy: PSP)、Globular Glial Tauopathy (GGT) などが含まれている。タウ蛋白の超微形態は AD 脳に見いだされる Paired Helical Filaments (PHF) (直径約 10~20 nM、約 80 nM 周期の規則的な凹凸があるフィラメント構造体) と特に PSP 脳等に見いだされる Straight Filaments (SF) の 2 種類が知られていたが、近年のクライオ電子顕微鏡法の開発と進歩により、病態ごとのタウの超微形態の分子モデルが明らかにされた。それによると、それぞれのタウオパチー性疾患において特徴的なタウ分子のフォールディング構造があり、従来は PHF と SF の 2 種類に見えていたものは、少なくとも 8 種類のパターンの分子重合体に類型化されている¹⁾。そしてこの構造の基本構造は、まず 2 つのタウ分子が 2 量体を形成し、その 2 量体が形成する平面とは垂直方向に重層的にこれらが重なっていくことによりタウ線維が形成されているということである。そこで、各タウオパチー性疾患に見いだされるタウ 2 量体を個別に作成することができれば、これをもとに重合シードを形成させ、さらにこれを鋳型として複製して十分量の疾患別タウ線維 (神経原線維変化) を保有することができると想定できる。そして、これをもとに特異抗体を作成するなどの方法で各タウオパチーに特異的な診断薬・治療薬の開発に貢献することができると考えられる。そこで、こういった問題に対応するために、我々はフォトクロスリンク法を用いて人工的に単一の重合タウ分子モデルを作成することを発案した。このフォトクロスリンク法とは紫外線照射により蛋白間で架橋させる方法であり、ある蛋白と結合親和性のある蛋白を同定する、あるいは複合体を形成することが既知の蛋白間において結合の接合部位を同定して複合体の立体構造を明らかにする際などに用いられている。例えば、アミロイド前駆体蛋白は γ セクレターゼの複合体により切断されてアミロイド β が産生されるのであるが、蛋白切断という酵素反応の際に両者の結合した複合体が形成されることが想定されるが、このフォトクロスリンク法により両者の接合部位が明らかとなりアミロイド前駆体蛋白と γ セクレターゼの複合体の構造が明らかにされている²⁾。

【目 的】

本研究では、様々な超微形態を有するタウ重合体モデルの作成のために、前述のフォトクロスリンク法を用いてタウ蛋白同士の接合面の異なるタウ 2 量体を作成することにした。

【方 法】

1) 変異挿入型タウ遺伝子の作成

リコンビナントタウ蛋白を作成するにあたって、ヒト由来のタウ遺伝子を大腸菌における産生量を増やすためにコドン最適

化法を使用した。ほとんどのアミノ酸は複数のコドンから翻訳されるが、コドンバイアスは種によって異なっている。このため、ヒト遺伝子を大腸菌で翻訳させる場合、翻訳量が減少することが指摘されている。そこで、翻訳効率を改善するために 441 アミノ酸に翻訳される全長型ヒトタウ遺伝子が大腸発現に適した配列に改変し、さらにその 3' 末端側に His タグ配列を接合したものをベクター pPAL7 (Bio-Rad) のマルチクローニングサイトに挿入した。結果として、発現するタウ蛋白の N 末端には pPAL7 にある eXact タグ、C 末端には His タグを付加したものになるが、これらはアフィニティクロマトグラフィにより蛋白精製を効率化するために行ったものである。

そして、病態機序に関与するタウ 2 量体を作成するために光反応性アミノ酸である para-Benzoyl-L-phenylalanine (pBpa) をリコンビナントタウ蛋白への導入を試みた。このアミノ酸は数オングストロームの距離で近接したアミノ酸に対して、紫外線 (UV) 照射下では分子間でクロスリンク(架橋)する性質を有している。アンバーコドン (UAG) は通常は終始コドンであるが、このコドンに対応して pBpa を翻訳時に組み込むことのできる特殊トランスファー RNA (pBpa-specific aminoacyl-tRNA synthetase and the corresponding amber suppressor (Peter G. Schultz 博士 (The Scripps Research Institute) より供与) を蛋白産生用の大腸菌 (E. coli Rosetta (Novagen)) に導入したもの (Orip-Sup) を用いた。そしてタウ遺伝子コンストラクトの特定部位にアンバーコドンを置換するにあたっては、部位特異的変異導入法 (Site Directed Mutagenesis) を用いた。前述の pPAL7 にタウ遺伝子を組み込んだものをテンプレートとし、テンプレート 0.5 μ l、フォワードプライマー 0.5 μ l、リバープライマー 0.5 μ l、PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (タカラバイオ) 12.5 μ l を混和し、超純水を加え最終 25 μ l にしたうえで PCR で増幅した。PCR プロトコルとしては、98°C 10 秒、55°C 15 秒 sec、72°C 50 秒で 30 サイクル行い、最終的に 4°C で保存した。どの部位にアンバーコドンを導入するかに関して、つまり蛋白に翻訳したレベルではどの部位に pBpa を挿入するかに関して、今までクライオ電顕で明らかにされたタウ 2 量体形成における接合面部位の配列から選定した³⁾。今回は AD 脳に見いだされる PHF の構造からタウの 332-336 番目の各アミノ酸部位と、PiD 脳に見いだされる wide filaments の構造から 332-336 番目の各アミノ酸部位に対して変異を導入することにし、プライマーを設計した。PCR で増幅したあとは、PCR 産物に混じっているメチル化された鑄型プラスミドを消化するために、Dpn1 処理 (PCR 産物に Dpn1 (タカラ) 1 μ l を加え、37°C にて 1 時間反応) を行った。そして、これを大腸菌 DH5 α 株に形質転換して、抗生物質の入ったアガロースプレートに塗布し、37°C でインキュベート (overnight) した。翌日コロニーの出現を確認し、これらを少量培養したうえで、キットを用いて miniprep 作業をおこない (Plasmid Miniprep Kit (QIAGEN))、得られたプラスミドの中のタウ遺伝子の配列をシーケンズによって確認した。

2) 変異挿入型リコンビナントタウ蛋白の作成

出来上がった変異タウ遺伝子コンストラクトについては、通常は終始コドンとして認識されるアンバーコドンに特殊アミノ酸である pBpa が導入されて翻訳されるために、特殊トランスファー RNA を組み込まれた大腸菌 orip-Sup に作成した遺伝子コンストラクトを形質転換した。また、変異導入を行っていない野生型タウ遺伝子コンストラクトについては通常の大腸菌 DH5 α 株に形質転換した。そして、同様に抗生物質の入ったアガロースプレートに塗布し、37°C でインキュベート (overnight) した翌日にコロニーの出現を確認し、これらを 5ml の培地に移して培養したうえで、0.4mM の IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) および 0.5mM pBpa の投与により発現を誘導し、添加 3 時間後の菌体を遠心により回収し、これに直接 SDS サンプルバッファーを添加したものをサンプルとして電気泳動 (SDS-PAGE) を行って、一次抗体として抗タウ抗体 (H-150) (Santa Cruz Biotechnology) および抗 His タグ抗体を用いたウエスタンブロットにより発現確認を行った。

少量培養による発現確認を行った後、菌体を 1L の培地にて大量培養を行い、IPTG を添加して 3 時間培養の菌体を遠心によって回収し、これを -80°C に凍結保存した。後日、凍結した菌体にバッファー (50mM HEPES-NaOH pH7.4、500mM NaCl、20mM Imidazole、および 1mM DTT (Dithiothreitol)) を加えて溶解し、氷上にて超音波破碎を行った。そして、サンプルを 0.22 μ m シリンジフィルター (大阪ケミカル PES030022) に通して不溶性成分を除去したうえで、以下の 3 種類のカラムを組み合わせて精製を行った。

① HisTrap™ HP (Cytiva) (His タグを利用したアフィニティカラム)

カラムを結合バッファー (50mM HEPES-NaOH pH7.4、500mM NaCl、20mM Imidazole) で平衡化しておき、これにサンプルをアプライし、同バッファーを流した後に、溶出バッファー (50mM HEPES-NaOH pH7.4、500mM NaCl、500mM Imidazole) を流してリコンビナントタウ蛋白質を溶出した。

② HiTrap™ SP HP (Cytiva) (陽イオン交換カラム)

カラムを初期バッファー (50mM HEPES-NaOH pH7.4、170mM NaCl) で平衡化しておき、これにサンプルをアプライし、同

バッファーを流した後に、溶出バッファー (50mM HEPES-NaOH pH7.4、300mM NaCl) を流してリコンビナントタウ蛋白質を溶出した。

③ Profinity eXact™ Purification Resin (Bio-Rad) (eXact タグを利用したアフィニティカラム)

カラムに Profinity eXact™ Purification Resin を充填し、初期バッファー (100mM Sodium phosphate pH7.2) で平衡化しておき、これにサンプルをアプライし、同バッファーを流した後に、溶出バッファー (100mM Sodium phosphate pH7.2、100mM NaF) を流してリコンビナントタウ蛋白質を溶出した。

3) 変異挿入型リコンビナントタウ蛋白質を用いた 2 量体タウ蛋白質の作成

作成した変異タウ蛋白および野生型タウ蛋白を希釈し 1mg/ml にそろえ、タウ蛋白 50 μ l とバッファー (100mM Tris-HCl pH7.4) 50 μ l を PCR チューブに入れ混和し、37°C にて加温振とう (overnight) してタウ線維形成の基礎となるコンフォーメーションを誘導した。そして、サンプルを氷上に配置し、そこに UV 照射機 (8 W, 230 V, 50 Hz; UVP, Upland, CA, USA) を設置して波長 365nm の UV を 30 分間照射した。そのサンプルを SDS-PAGE にて電気泳動し、抗タウ抗体を用いてウエスタンブロットを行って 2 量体形成を確認した。

【結 果】

1) 変異挿入型タウ遺伝子の作成

得られたプラスミドの中のタウ遺伝子の配列をシークエンスによって確認し、目的とした部位へのアンバーコドンの変異導入を確認した。

2) 変異挿入型リコンビナントタウ蛋白質の作成

前述の①HisTrap™ HP、②HiTrap™ SP HP、③Profinity eXact™ Purification Resin を組み合わせることで、純度の高いタウ蛋白を精製・抽出できた。①②の組み合わせでカラムから溶出したサンプルをチューブに 500 μ l ずつ回収し、その一部を SDS-PAGE で泳動し、CBB (Coomassie Brilliant Blue) にて染色したものである。他の蛋白成分がおおむね除去されていることが示唆された。

3) 変異挿入型リコンビナントタウ蛋白質を用いた 2 量体タウ蛋白質の作成

抗タウ抗体を用いたウエスタンブロットを行って 2 量体形成を確認した。野生型タウ、変異型タウ (C322→Amber)、変異型タウ (S324→Amber) を 37°C にて加温振とうものと、それぞれに UV 照射したものを比較したところ、加温振とうのみでは 2 量体形成は明瞭ではないが、これに UV 照射を行うと変異型タウ (S324→Amber) においては 2 量体形成したバンドが視認できた。

【考 察】

タウ蛋白凝集体が脳内に異常値蓄積する疾患はタウパチーと呼ばれているが、AD、PiD、CTE、CBD、AGD、PSP、AGD、PART、等がタウオパチーに含まれている。タウ遺伝子異常から認知症を発症する FTDP-17 の発見からタウは神経変性を引き起こす重要なキーファクターであるものと理解されているが⁴⁾、単一ではなくさまざまな種類のタウオパチー性疾患が存在する理由は不明である。近年、プリオン性疾患に並んでタウオパチー性疾患におけるタウ蛋白の伝播仮説が提唱されてきた⁵⁾。この仮説において、凝集したタウ蛋白は神経細胞から他の神経細胞へ伝播し、長い期間を経て脳全体に拡散していくことが唱えられている。Sanders らは、*in vitro* で重合したリコンビナントタウ蛋白を超音波破碎後に限界希釈を行って重合の基礎となる重合シードを作成したところ、生化学的特性の異なる複数のタウ蛋白重合シードを作成することに成功した⁶⁾。このタウ蛋白重合シードはタウ発現培養細胞に導入した場合は同じ生化学的特性を有するタウ重合体が複製され、これをタウ発現マウス脳内に摂取した場合も同じ生化学的特性を有するタウ重合体が複製された。また、さまざまなタウオパチー性疾患から抽出したタウ凝集体をタウ発現細胞に導入すると、細胞内におけるタウ凝集体の分布パターンが異なることから、疾患ごとに異なるタウ凝集体の生化学的特性があることが考えられた。そして、この実験結果からは、さまざまなタウオパチー性疾患におけるタウ凝集体の構造は疾患ごとに異なっており、そのためその生化学的特性が異なるのではないかという考え方が示唆された。実際、以前より AD 脳内で観察される神経原線維変化は微小形態としては PHF であり、PSP 脳内で観察されるタウ線維は SF という形態をとっていることが知られていた。但し通常の電子顕微鏡ではタウ凝集体の線維構造の概観は観察

できても、1 つ 1 つのタウ蛋白分子の配合の仕方は観察することはできないため、構造の詳細な理解は困難であった。近年クライオ電子顕微鏡法が開発されたが、これは生体試料をその溶液ごと急速凍結して非晶質の水の中に埋め込む氷包埋法を用いて生体資料を高真空の電子線から守って撮像し、また同種のタンパク質の多数の投影像から立体構造を再構築する単粒子解析法を組み合わせることで、生体蛋白の構造を詳細に解析する方法である。この方法を用いてタウ凝集体の解析が進み、まず Fitzpatrick らにより PHF と SF の構造が明らかにされた⁷⁾。そして、PiD、CTE、CBD におけるタウ凝集体の構造が明らかにされ⁸⁻¹⁰⁾、現在ではタウ凝集体は少なくとも 8 種類のパターンに類型化されている¹⁾。よって、さまざまなタウオパチー性疾患には、それぞれに特徴的なタウ凝集体の構造があることが明確になりつつある¹¹⁾。本研究では、このような流れで明らかにされたタウ凝集体の構造をもとに、リコンビナントタウ蛋白を用いて同型のモデルを作成することを計画した。タウ凝集体の個別の構造モデルを作成すれば、疾患別にタウ蛋白重合のプロセスをより詳細に解析することができ、診断法・治療法の開発に貢献できると考えられるからである。そこで、まず凝集体の最小単位である 2 量体を作成することにした。2 つの蛋白を架橋する方法に関してはフォトクロスリンク法を使用した。光反応性の特殊アミノ酸である pBpa をタウ蛋白の特定の部位に挿入するために、通常では終止コドンになっているアンバーコドンに対応して特殊アミノ酸を翻訳中の蛋白に取り入れる技法を使用した¹²⁾。そのため、アンバーコドンに pBpa を挿入する特殊トランスファー RNA を発現するベクターを組み込んだ大腸菌 orip-Sup を使用した²⁾。このような特殊アミノ酸を組み込むとリコンビナント蛋白の収量は通常のリコンビナント蛋白の収量に比べて 1/3 から 1/5 に減ってしまう。そこで、大腸菌の収量を上げるためにコドン最適化法を使用した。これによって、今回変異タウ蛋白は数 mg レベルで抽出することができ、さらに複数のカラムで抽出したことにより純度の高いタウ蛋白が抽出できた。そして、UV によるクロスリンクの結果としては C322 部位の変異では 2 量体が確認できなかったが、S324 部位の変異では 2 量体が確認できた。クロスリンクにより単量体から 2 量体に変化したわけだが、この方法では 2 量体を形成できるのはせいぜい 10%程度とされているので、全てが 2 量体に移行するわけではない。また、このクロスリンク法においては、光反応性のアミノ酸と反応してクロスリンクするためには対応するアミノ酸が数オングストロームまで近接している必要があることから、偶発的な結合ではなく複合体の形成が無いと起こりにくいものと想定される。よって、S324 部位の変異で確認できた 2 量体は PiD 脳に見いだされる wide filaments の構造に由来するものではないかと推認できる。しかし、これを検証するためには、この 2 量体をシーズとしてさらに線維重合を誘導し、この形態を確認する必要がある。C322 部位の変異では UV 照射しても 2 量体形成が今回確認できなかったが、明確な理由は不明であるが、この方法論では光反応性アミノ酸である pBpa の反応基が相手の蛋白側に配向している必要があり、配向性が悪い場合は位置的に近接していても共有結合を引き起こせない可能性が考えられる。今回の研究では、タウ蛋白重合体の基礎となる 2 量体を純度の高いリコンビナント蛋白を用いて人工的に作成することを試みたが、接合面に位置するアミノ酸を光反応性アミノ酸に置換しても、おそらく配向性の問題から 2 量体形成ができる場合とできない場合があることが理解できた。前述のようにタウオパチーには様々な疾患が含まれており、それぞれの構造解明が進んでいることから、本研究の方法を用いて疾患別の 2 量体を作成し、それを重合・線維形成させることによって病態脳に由来しない単一の微小形態のタウ重合体を作成すれば、今後の診断法・治療法の開発に大きく貢献するものと考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究は、タウオパチーと称される様々な神経変性疾患におけるタウ蛋白の超微形態が異なっているということを前提に、タウ分子間の接合面に考慮したうえでその基本構造となる 2 量体を作成した。ここからさらに重合プロセスを進めることにより、オリゴマー、プロトフィブリル、フィブリルへと進めることが可能と考えられるが、単一の超微形態のタウオリゴマーあるいはタウプロトフィブリルを疾患ごとにそろえれば、これに対する特異抗体を作成してこれを診断法および治療法へ応用する、あるいは線維延長を阻害する重合阻害剤を検討して疾患特異的治療薬を開発する、などの臨床への貢献が期待できる。

【参考・引用文献】

- 1) Shi Y, Zhang W, Yang Y, Murzin AG, Falcon B, Kotecha A, van Beers M, Tarutani A, Kametani F, Garringer HJ, Vidal R, Hallinan GI, Lashley T, Saito Y, Murayama S, Yoshida M, Tanaka H, Kakita A, Ikeuchi T, Robinson AC, Mann DMA, Kovacs GG, Revesz T, Ghetti B, Hasegawa M, Goedert M, Scheres SHW. Structure-based classification of tauopathies.

- Nature. 598(7880):359-363,2021.
- 2) Fukumori A, Steiner H. Substrate recruitment of γ -secretase and mechanism of clinical presenilin mutations revealed by photoaffinity mapping. EMBO J. 35(15):1628-1643,2016.
 - 3) Scheres SH, Zhang W, Falcon B, Goedert M. Cryo-EM structures of tau filaments. Curr Opin Struct Biol. 64:17-25,2020.
 - 4) Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed LA, Trojanowski J, Basun H, Lannfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd PR, Hayward N, Kwok JB, Schofield PR, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. Nature. 393(6686):702-705,1998.
 - 5) Goedert M, Eisenberg DS, Crowther RA. Propagation of Tau Aggregates and Neurodegeneration. Annu Rev Neurosci. 40:189-210,2017.
 - 6) Sanders DW, Kaufman SK, DeVos SL, Sharma AM, Mirbaha H, Li A, Barker SJ, Foley AC, Thorpe JR, Serpell LC, Miller TM, Grinberg LT, Seeley WW, Diamond MI. Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. Neuron. 82(6):1271-88,2014.
 - 7) Fitzpatrick AWP, Falcon B, He S, Murzin AG, Murshudov G, Garringer HJ, Crowther RA, Ghetti B, Goedert M, Scheres SHW. Cryo-EM structures of Tau filaments from Alzheimer's disease brain. Nature. 2017 547(7662):185-190,2017.
 - 8) Falcon B, Zhang W, Murzin AG, Murshudov G, Garringer HJ, Vidal R, Crowther RA, Ghetti B, Scheres SHW, Goedert M. Structures of filaments from Pick's disease reveal a novel tau protein fold. Nature. 561(7721):137-140,2018.
 - 9) Falcon B, Zivanov J, Zhang W, Murzin AG, Garringer HJ, Vidal R, Crowther RA, Newell KL, Ghetti B, Goedert M, Scheres SHW. Novel tau filament fold in chronic traumatic encephalopathy encloses hydrophobic molecules. Nature. 568(7752): 420-423,2019.
 - 10) Zhang W, Tarutani A, Newell KL, Murzin AG, Matsubara T, Falcon B, Vidal R, Garringer HJ, Shi Y, Ikeuchi T, Murayama S, Ghetti B, Hasegawa M, Goedert M, Scheres SHW. Novel tau filament fold in corticobasal degeneration. Nature. 580(7802):283-287,2020.
 - 11) Vaquer-Alicea J, Diamond MI, Joachimiak LA. Tau strains shape disease. Acta Neuropathol. 142(1):57-71,2021.
 - 12) Ryu Y, Schultz PG. Efficient incorporation of unnatural amino acids into proteins in Escherichia coli. Nat Methods. 3(4):263-265,2006.