

# タウ蛋白を介したアルツハイマー病発症機構

高島明彦 柳下聡介 添田義行

**Clinical Neuroscience** 別冊

Vol. 28 No. 9 2010 年 9 月 1 日発行

中 外 医 学 社

# タウ蛋白を介したアルツハイマー病発症機構

高島 明彦 柳下 聡介 添田 義行

## はじめに

タウ蛋白は微小管結合蛋白質の一つで、微小管形成を促進する因子として最初に発見された<sup>1)</sup>。タウは17番染色体長腕17q21に存在する16個のエクソンから選択的スプライシングによってアミノ酸352~441個からなる6種類のアイソフォームを持つ<sup>2,3)</sup>。PC12細胞では神経成長因子(NGF; Nerve Growth Factor)によって神経細胞様に分化するが、この時タウ蛋白発現量が増大し微小管重合を促進し、神経突起を形成する<sup>4)</sup>。試験管内でチューブリンとタウを共存させると微小管重合促進が観察される<sup>1)</sup>。これらのことから、タウ蛋白は微小管重合に重要な蛋白質であると考えられている。

一方、このようなタウの正常な機能に対してFTDP-17にみられる変異タウは、神経原線維変化と神経細胞死を特徴とする認知症を引き起こす<sup>5~7)</sup>。神経原線維変化(neurofibrillary tangle: NFT)は過剰にリン酸化したタウ蛋白が線維状となったもので構成され、NFTが生じている脳の部位では数倍の神経脱落がおきている。これらのことは、タウが過剰リン酸化され凝集してNFTを引き起こす過程の中で、神経機能低下や神経脱落が生じていると考えられる。

## タウの翻訳後修飾

タウは蛋白質として合成された後、リン酸化、糖鎖修飾、ユビキチン化、ニトロ化など様々な修飾を受ける。その中でも、特にリン酸化はタウの機能に大きな影響を及ぼす。

### 1. リン酸化

タウには、最も長い441アミノ酸残基のタウ(2N4R)において、リン酸化され得る部位が85カ所(45個のSer, 35

個のThr, 5個のTyr)存在する。各々のリン酸化部位特異的な抗体が数多く作られており、それらによって少なくとも30カ所のリン酸化部位が同定されている。Ser 262などいくつかの部位を除いて、全て微小管結合ドメインの外側に存在しており、大半はProに隣接している。通常、脳に存在するタウは1分子につき2~3カ所がリン酸化されているが、アルツハイマー病(AD)などでみられる過剰リン酸化タウ(PHF-tau)は1分子につき少なくとも8カ所程度がリン酸化を受けている<sup>8)</sup>。過剰にリン酸化を受けたタウは微小管と結合することができなくなって凝集し、最終的にはNFTを形成する。また、そのような凝集化反応が進行する際、タウは他の微小管結合蛋白質であるmicrotubule-associated protein (MAP)1やMAP2を巻き込むため、それらの機能を阻害する<sup>9)</sup>。その結果、微小管の安定性が失われることになる。また、FTDP-17で見つかった変異型タウでは、野生型タウほどにリン酸化を受けずに凝集し得ることが分かっている<sup>10)</sup>。

一方、発生初期のタウも1分子につき7カ所程度がリン酸化されているものの、凝集はしない。しかも、PHF-tauとは異なり、微小管結合能を保持している。発生段階の進行に伴って脱リン酸化酵素が活性化すると、胎児型のリン酸化タウが減少する<sup>11)</sup>。

タウをリン酸化する酵素としては、Pro指向性のものとして、mitogen activated protein (MAP), glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK 3 $\beta$ ), cyclin-dependent kinases (CDK)として知られるcdc2やcdk5など、Pro指向性ではないものとしては、microtubule-affinity regulating kinase (MAPK), Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II)などが知られている。その他、FynなどのSrcキナーゼによるTyrのリン酸化も報告されている。

一方、タウの脱リン酸化に関わる酵素として、protein phosphatase (PP)1, PP2A, PP2Bなどの可能性が考えられているが、脳内では主にPP2Aがその役割を担っている

0289-0585/10/¥500/論文/JCOPY

たかしま あきこ 理化学研究所脳科学総合研究センター/アルツハイマー病研究チームチームリーダー  
やぎした そうすけ 理化学研究所脳科学総合研究センター/アルツハイマー病研究チーム  
そえだ よしゆき 同

と考えられており、実際に AD 脳でその活性低下も報告されている<sup>12)</sup>。

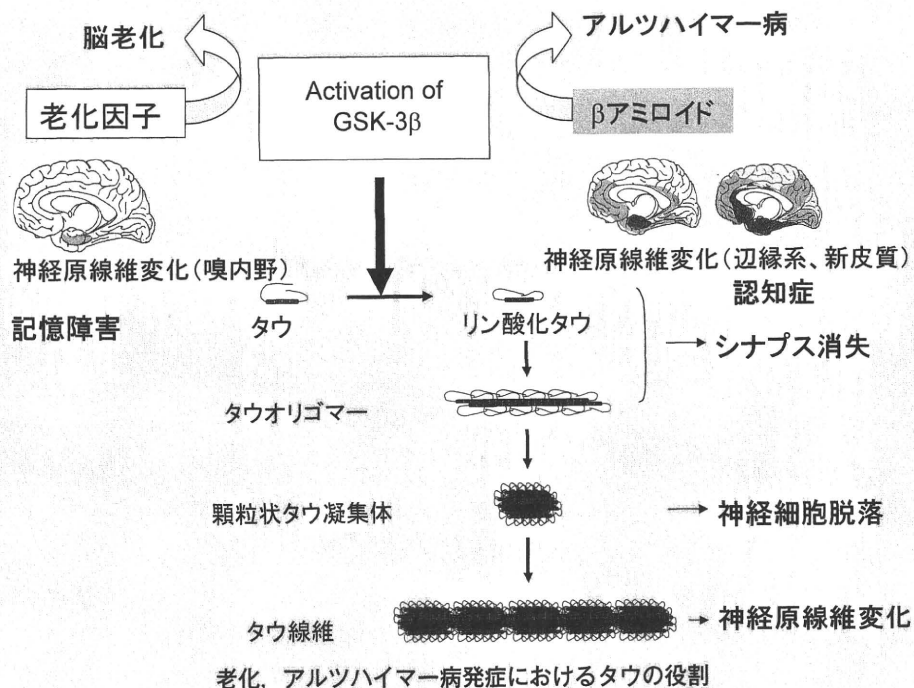
PHF-tau に特異的なリン酸化部位としては、抗体 AT 100 の認識部位 (Thr 212, Ser 214) や、Ser 422 が知られている。特に、AT 100 認識部位は GSK 3 $\beta$  でリン酸化され得ることから GSK 3 $\beta$  と AD との関連が強く示唆されている。一方、Ser 422 については GSK 3 $\beta$  はリン酸化を行えない。ここをリン酸化する酵素の一つとして、c-Jun NH 2-terminal kinase (JNK) の可能性が考えられている。JNK は細胞ストレスや炎症因子、A $\beta$  の添加などによって活性化する。また、ホスファターゼの阻害で Ser 422 のリン酸化されたタウが増加することから、キナーゼのみならずホスファターゼの関与も示唆されている。

## 2. 糖鎖修飾

O 結合型糖鎖付加はよくみられる糖鎖修飾であり、Pro に隣接した Ser や Thr に O-GlcNAc が付加されるというもの。タウもこの修飾を受け、糖鎖が付加される箇所はリン酸化部位より少ない。また、タウはこの修飾によりリン酸化されにくくなることが分かっている<sup>13)</sup>。一方で、AD 脳においては異常にリン酸化されたタウが N-glycosylation されており、paired herical filament (PHF) 構造の維持に寄与していることがわかっている<sup>14)</sup>。

## 3. ユビキチン化

ユビキチンは、標的となる蛋白質の Lys 残基に共有結合で付加され、26 S プロテアソームによる分解シグナルとしての役割を担うことでよく知られている。NFT がユビキチンの抗体によっても免疫染色されることから、PHF-tau がユビキチン化を受けていることが明らかにされた<sup>15)</sup>。微小管結合領域に存在する Lys 254, 257, 311, 317 がその標的的部位である。AD 脳由来のタウを用いた解析により、ユビキチン化を受けたタウの多くはモノユビキチン化されており、一部はポリユビキチン化されていることが明らかに



された。また、ここでみられたタウは N 末端側が削られたものであることが明らかにされた<sup>11)</sup>。過剰にリン酸化を受けたタウは PHF-tau として凝集し、その後 N 末端側が削られ、それらがユビキチン化を受けているものと考えられている。

タウのユビキチン化に関与する E3 ligase としては、the carboxyl terminus of heat-shock cognate 70-interacting protein (CHIP) が同定されている。われわれのグループは、AD 患者由来の脳で CHIP の量が上昇していること、また CHIP を欠くマウスでは不溶性タウが上昇することを確認した<sup>16)</sup>。

## 4. ニトロ化

ニトロ化とは、チロシン残基の芳香環にニトロ基が共有結合的に付加されることである。NFT 中にニトロ化されたタウが存在することが明らかにされており<sup>17)</sup>、ニトロ化によってタウの微小管との結合能が失われると考えられている<sup>18)</sup>。特に、Tyr 29 がニトロ化されたタウは深刻な AD 脳に特異的に見つかった<sup>18)</sup>。

## 神経原線維変化形成と認知機能

アルツハイマー病では細胞外に  $\beta$  アミロイドの蓄積である老人斑と、神経細胞の細胞体または樹状突起に NFT

と呼ばれる病理像を示す。この NFT は過剰にリン酸化および凝集化したタウ蛋白より構成されている。タウは本来微小管に結合しているが、タウが過剰リン酸化され、微小管との結合能が減少し、細胞質内のタウの濃度が増加する。その結果、タウ同士が自己結合し、ダイマーやトリマーを形成する。その後、これらのオリゴマー同士が結合することで、40 個程度のタウで構成される球状の凝集体 (granular tau oligomer) を形成する<sup>19)</sup>。この球状の granular tau oligomer 同士が結合し、伸張することで線維状の PHF または straight filament を形成し、これらが NFT の構成成分となる (図)。

Braak らは NFT の出現する脳部位によってアルツハイマー病の病期を 6 つに分けている。Stage I および II では海馬 CA 1 領域および嗅内野に NFT が出現し、認知機能障害はほぼ観察できないものの軽度の記憶障害が生じる。Stage III および IV では海馬 CA 1 領域や嗅内野において多数の NFT の出現、および他の辺縁系での NFT の出現が観察され、記憶障害と軽度の認知障害がみられる。Stage V および VI では海馬全域および新皮質において多数の NFT が出現し、失語および失認などの見当識障害が観察される。このように、NFT の出現は認知機能障害と非常によく相関することから、タウの凝集化はアルツハイマー病の認知機能障害に重要な役割を有すると考えられている<sup>20)</sup>。一方、FTDP-17 の原因となる変異体タウ (P 301 L) を発現するマウスは記憶障害と脳内における NFT の形成を示し、このマウスの P 301 L タウの発現を抑制すると記憶障害は改善されるが、脳内の NFT の形成は持続することが報告されている<sup>21)</sup>。このことは NFT が神経脱落や記憶障害の原因ではなく、NFT を形成する過程で神経脱落や機能障害が生じることを示している。

### タウとシナプス消失

われわれはタウが神経細胞に与える影響について考察するため、野生型のヒト型タウを発現するマウスを作製した。このマウスでは 20 ヶ月を超えた「老齢」マウスにおいて記憶学習障害がみられた。しかし、NFT の形成や神経細胞の脱落は観察されなかった。一方、特に嗅内皮質と呼ばれる場所において、PHF 1 陽性のリン酸化タウ増加およびシナプス消失を認めた。嗅内皮質は、ヒトにおいて NFT が

最初に出現する場所として知られている。また、Mn-MRI を用いて神経細胞の活動を観察したところ、この部位での神経活動の低下を認めた<sup>22)</sup>。以上の結果は、タウが NFT 形成よりも前に、リン酸化タウがシナプス消失に関わっていることを示している。

### タウと神経脱落

FTDP-17 患者では AD に比べて 10 倍の神経脱落が観察されるが、リン酸化タウ蓄積は非常に少ない。このことは FTDP-17 では NFT 形成よりも神経細胞死がおきていることを示唆している。確かにショウジョウバエを用いた実験では FTDP 型変異ヒトタウ (R 406 W) の過剰発現は NFT を形成せずに、細胞障害を誘発する<sup>23)</sup>。この細胞障害の原因としていくつかの要因が考えられる。

タウは本来、微小管に結合することで細胞骨格の安定化を行っている。しかし、リン酸化などの modification によりタウと微小管との結合が切れ、微小管の安定性が低下することで細胞障害を示す。また、過剰にリン酸化したタウは微小管に結合している正常なタウや、MAP 2 などの他の微小管結合蛋白を微小管から引き離し巻き込んで NFT を形成するため、微小管の安定性に異常を誘発し、細胞障害を引き起こす可能性が考えられている<sup>9)</sup>。

FTDP-17 のタウ変異である P 301 L はタウ凝集しやすい変異である。この変異を持つヒトタウ蛋白を前項で紹介した野生型タウ Tg マウスと同様のプロモーターを用いて Tg マウスを作成し調べた。このマウスでは不溶性タウの蓄積が観察される。しかしながら、ガリアス銀染色で特異的にみられる NFT は非常にまれな出現を示した。神経細胞数をカウントすると P 301 L マウスで神経細胞の脱落が観察された。このことは不溶性タウ凝集体の形成は神経脱落に関与することを示唆している。ヒト患者と同様 P 301 L タウのリン酸化程度は野生型タウと比べて低く、P 301 L タウの凝集体形成はリン酸化程度に依存しないと考えられる。不溶性タウ凝集体には顆粒状タウ凝集体、線維が含まれる。Santacruz らの結果では NFT と神経脱落は直接関係せず、NFT 形成過程に神経毒性を示す凝集体があることが示唆されている。このことからタウ線維になる前の凝集体である顆粒状タウ凝集体が神経細胞脱落の要因であることが示唆される。



## むすび

これまで、家族性アルツハイマー病の遺伝子研究から $\beta$ アミロイドが主要なアルツハイマー病の原因であるとするアミロイド仮説を基に、 $\beta$ アミロイドを標的とする治療薬開発がなされてきたが、いずれも認知低下を阻止することが出来ていない。タウは確かに $\beta$ アミロイドの下流で修飾を受け、オリゴマーから顆粒状タウ凝集体を形成することでシナプス消失、神経脱落を生じている。孤発性アルツハイマー病の場合、家族性と異なり加齢に伴う多因子に

よって引き起こされるが、恐らくいずれもタウによるシナプス消失、神経脱落が認知症を引き起こす共通の機構であると考えられる(図)。このことからタウを標的とした治療薬はシナプス消失や神経脱落を抑制し、認知症進行を阻止することが期待される。現在、タウ凝集阻害剤の一つであるメチレンブルーがアルツハイマー病患者の認知機能低下を阻害するという結果が報告されており<sup>24)</sup>、この考えを支持している。

## 文 献

- 1) Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, et al. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975 ; 72 : 1858-62.
- 2) Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, et al. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats : differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J*. 1989 ; 8 : 393-9.
- 3) Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, et al. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease : identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988 ; 85 : 4051-5.
- 4) Drubin DG, Feinstein SC, Shooter EM, et al. Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC 12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J Cell Biol*. 1985 ; 101 : 1799-807.
- 5) Goedert M, Spillantini MG. Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2000 ; 1502 : 110-21.
- 6) Hutton M. Missense and splice site mutations in tau associated with FTDP-17 : multiple pathogenic mechanisms. *Neurology*. 2001 ; 56 : S 21-5.
- 7) Ingram EM, Spillantini MG. Tau gene mutations : dissecting the pathogenesis of FTDP-17. *Trends Mol Med*. 2002 ; 8 : 555-62.
- 8) Kopke E, Tung YC, Shaikh S, et al. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 1993 ; 268 : 24374-84.
- 9) Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med*. 1996 ; 2 : 783-7.
- 10) Alonso Adel C, Mederlyova A, Novak M, et al. Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *J Biol Chem*. 2004 ; 279 : 34873-81.
- 11) Morishima M, Ihara Y. Posttranslational modifications of tau in paired helical filaments. *Dementia*. 1994 ; 5 : 282-8.
- 12) Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, et al. Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron*. 1994 ; 13 : 989-1002.
- 13) Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, et al. Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5 : impairment in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 2005 ; 280 : 1790-6.
- 14) Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Glycosylation of microtubule-associated protein tau : an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nat Med*. 1996 ; 2 : 871-5.
- 15) Mori H, Kondo J, Ihara Y. Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science*. 1987 ; 235 : 1641-4.
- 16) Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, et al. In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J Neurochem*. 2005 ; 94 : 1254-63.
- 17) Horiguchi T, Uryu K, Giasson BI, et al. Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies. *Am J Pathol*. 2003 ; 163 : 1021-31.
- 18) Reynolds MR, Reyes JF, Fu Y, et al. Tau nitration occurs at tyrosine 29 in the fibrillar lesions of Alzheimer's disease and other tauopathies. *J Neurosci*. 2006 ; 26 : 10636-45.
- 19) Maeda S, Sahara N, Saito Y, et al. Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. *Biochemistry*. 2007 ; 46 : 3856-61.
- 20) Braak H, Braak E. Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl*. 1996 ; 165 : 3-12.
- 21) Santacruz K, Lewis J, Spire T, et al. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*. 2005 ; 309 : 476-81.
- 22) Kimura T, Yamashita S, Fukuda T, et al. Hyperphosphorylated tau in parahippocampal cortex impairs place learning in aged mice expressing wild-type human tau. *EMBO J*. 2007 ; 26 : 5143-52.
- 23) Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, et al. Tauopathy in *Drosophila* : neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science*. 2001 ; 293 : 711-4.
- 24) Whisick C, Bentham P, Wischick D, et al. Tau aggregation inhibitor (TAI) therapy with RENBER arrests disease progression in mild and moderate Alzheimer's disease over 50 weeks. *Alzheimers Dement*. 2008 ; 4 : T 167.

### 3. 認知症性疾患の遺伝子と病態

#### 6) アミロイド(A $\beta$ )とタウをつなぐもの\*

● 高島明彦\*\*

**Key Words:**  $\beta$ -amyloid, tau, GSK-3 $\beta$

#### キーセンテンス

- ・ Alzheimer病の病態はアミロイド蓄積量より神経原線維変化(タウ蓄積)と相関がある.
- ・ GSK-3 $\beta$ は老化,  $\beta$ アミロイドによって活性化し, タウを過剰にリン酸化することで神経原線維変化形成に寄与する.
- ・ 過剰にリン酸化されたタウが線維化する過程でシナプス消失や神経脱落が生じる.

#### $\beta$ アミロイド仮説

Alzheimer病(AD)は記憶障害から始まり高度の認知症となることが臨床的な定義であり, 脳内で $\beta$ アミロイドの蓄積である老人斑, 過剰にリン酸化したタウが線維状となって蓄積した神経原線維変化, 脳の萎縮の3点が観察されることが病理における定義である.  $\beta$ アミロイドの蓄積はADに特有であるが, 神経原線維変化および脳萎縮はほかの神経変性疾患においても共通にみられる. ADの緩徐に進行する臨床症状がどのような機構で引き起こされるのかというのがAD研究の主要な研究テーマである. 分子生物学的アプローチから遺伝的にADを発症する家族性ADの病因遺伝子の解明が行われた. これまでに三つの遺伝子に突然変異が見出されている. 一つは

$\beta$ アミロイド前駆体(APP)である. 突然変異は主に $\beta$ アミロイドを産生する $\beta$ セクレターズの切断部位と $\gamma$ セクレターズの切断部位に存在し,  $\beta$ アミロイドの産生量の増大または凝集しやすいA $\beta$ 42と呼ばれる $\beta$ アミロイド産生を増大することが示された. さらに近年, プレセニリン1, 2という染色体14番と1番に存在する遺伝子に変異が見出された. プレセニリン遺伝子産物は $\gamma$ セクレターズの構成因子で突然変異があるとA $\beta$ 42/A $\beta$ 40の比率を増大させることが見出されている. これらの遺伝子に突然変異があると必ずADをひき起こすこと. これは単一因子(遺伝子変異)に起因する家族性ADの発症を説明する. さらに,  $\beta$ アミロイドの凝集増大が三つの異なる遺伝子変異によって共通に引き起こされることであることが示された. このことは, 多因子によって引き起こされる孤発性ADにおいても共通に引き起こされていると考えられた.

1991年, HardyはHigginsとともに $\beta$ アミロイド仮説を発表したのである. この仮説はAPPに突然変異が見出されたことと, 変異APPを発現するマウスがADと同様の老人斑と神経原線維変化を引き起こすことを(後に撤回された)基に考えられた. Yanknerらが報告した $\beta$ アミロイドによる海馬初代培養細胞系を用いた神経毒性は当初多くの議論があったが,  $\beta$ シート構造をもつ凝集 $\beta$ アミロイドによって引き起こされるこ

\* 3. Gene and pathogenesis of dementing disorders. 6) Connector  $\beta$ -amyloid with tau.

\*\* Akihiko TAKASHIMA, Ph.D.: 独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センターアルツハイマー病研究チーム(☎351-0198 埼玉県和光市広沢2-1); Lab. for Alzheimer's Disease, Brain Science Institute, RIKEN, Wako, Saitama 351-0198, Japan.

とが明らかにされ、さらに $\beta$ アミロイド仮説を支持した。この実験系にタウ遺伝子ノックアウトマウス由来の初代培養神経細胞系を用いて $\beta$ アミロイド添加すると神経細胞死が抑制されることから、 $\beta$ アミロイドの下流にタウおよび神経細胞死が引き起こされることが示唆されている<sup>1)</sup>。家族性ADの変異APPを発現するマウスPDAPPがヒトと同じ老人斑を形成すること、さらにTg2576が老人斑を形成し記憶障害を起こすこと、また、 $\beta$ アミロイド抗体療法によって $\beta$ アミロイド蓄積を消失させると記憶障害が改善することから、このマウスモデルがADモデル動物のゴールドスタンダードとしてAD治療薬開発に使われている。しかし、このマウスモデルの問題点の一つは神経原線維変化も神経脱落も示さないことである。すなわち、変異APPを発現して老人斑を形成するマウスは神経原線維変化、神経脱落をひき起こすことなく記憶障害を示しており、ADにおける病態と異なるというのが問題点として残っている。しかしながら、 $\beta$ アミロイドが引き起こす記憶障害に関して、タウ遺伝子をもたないマウスでは老人斑を形成しても記憶障害の改善がみられていることから、モデル動物における $\beta$ アミロイドが引き起こす記憶障害にはタウが関与していることが示唆されている<sup>2)</sup>。

### $\beta$ アミロイド蓄積と 神経原線維変化形成

Braakらは、病理学的検討から $\beta$ アミロイドは前頭葉基底部から蓄積が始まり新皮質へA, B, Cという段階で拡大することを示している。しかしながら、この $\beta$ アミロイドの分布の拡大と認知機能障害は必ずしも一致していない。神経原線維変化は出現する部位によって病期を6段階に分けている。神経原線維変化は最初嗅内野に出現し、次に大脳辺縁系、新皮質へと拡大するのである。この神経原線維変化の拡大は認知機能低下とよく相関している<sup>3)</sup>。

Braakらは、2,000以上の年齢の異なる剖検例を用いて $\beta$ アミロイド、タウ沈着について調べた。その結果、 $\beta$ アミロイド蓄積と神経原線維変化の間に相関はなかったが、各年齢における $\beta$ アミ

ロイド蓄積とそれぞれの部位の神経原線維変化の保有率を調べると興味深い点が明らかになった(図1)。嗅内野における神経原線維変化の保有率は20歳代で10~20%で、保有率は加齢とともに増大し、50歳で半数のヒトに観察され、75歳ぐらいでピークとなる。その後、減少するが、これは嗅内野に神経原線維変化をもっているヒトが減るのではなく嗅内野から辺縁系、新皮質へ神経原線維変化が拡大したことを意味している。嗅内野だけ、および辺縁系から新皮質まで拡大した神経原線維変化をもつヒトは75歳までに90%を超えることになる。 $\beta$ アミロイド蓄積は50から60歳くらいから始まり加齢とともにその割合は増大しほぼ75歳では半分のヒトに $\beta$ アミロイド蓄積がみられるようになる。すなわち、嗅内野の神経原線維変化は $\beta$ アミロイド蓄積と独立に引き起こされるのである。むしろ、嗅内野の神経原線維変化は $\beta$ アミロイド蓄積に先んじて起きているようである。一方、辺縁系や新皮質の神経原線維変化は $\beta$ アミロイド蓄積の後に起きており、この神経原線維変化は $\beta$ アミロイド蓄積に依存して引き起こされているのかもしれない。すなわち、辺縁系、新皮質では $\beta$ アミロイド蓄積に依存して神経原線維変化が形成するという $\beta$ アミロイド仮説が成立するであろう。嗅内野における神経原線維変化形成は加齢因子によって脳老化をひき起こす。この老化による変化は非常にゆっくりと進行するが、 $\beta$ アミロイドが存在すると脳老化が加速され、神経原線維変化が辺縁系、新皮質へと拡大し認知症をひき起こすと考えられる(図2)。

### 神経原線維変化形成機構と神経機能

老化因子によっても $\beta$ アミロイドによっても神経原線維変化が生じることが神経機能低下を介して記憶障害から認知機能障害をひき起こす直接の原因となっている。これは、 $\beta$ アミロイド蓄積なしで神経原線維変化と神経脱落を伴う認知症を示す家族性前頭側頭葉認知症FTDP-17においてタウ遺伝子に変異がみられたことから支持される。試験管内のタウ凝集実験からタウが線維化する前に顆粒状のタウ凝集体が形成されることが見出されている。すなわち、微小管に

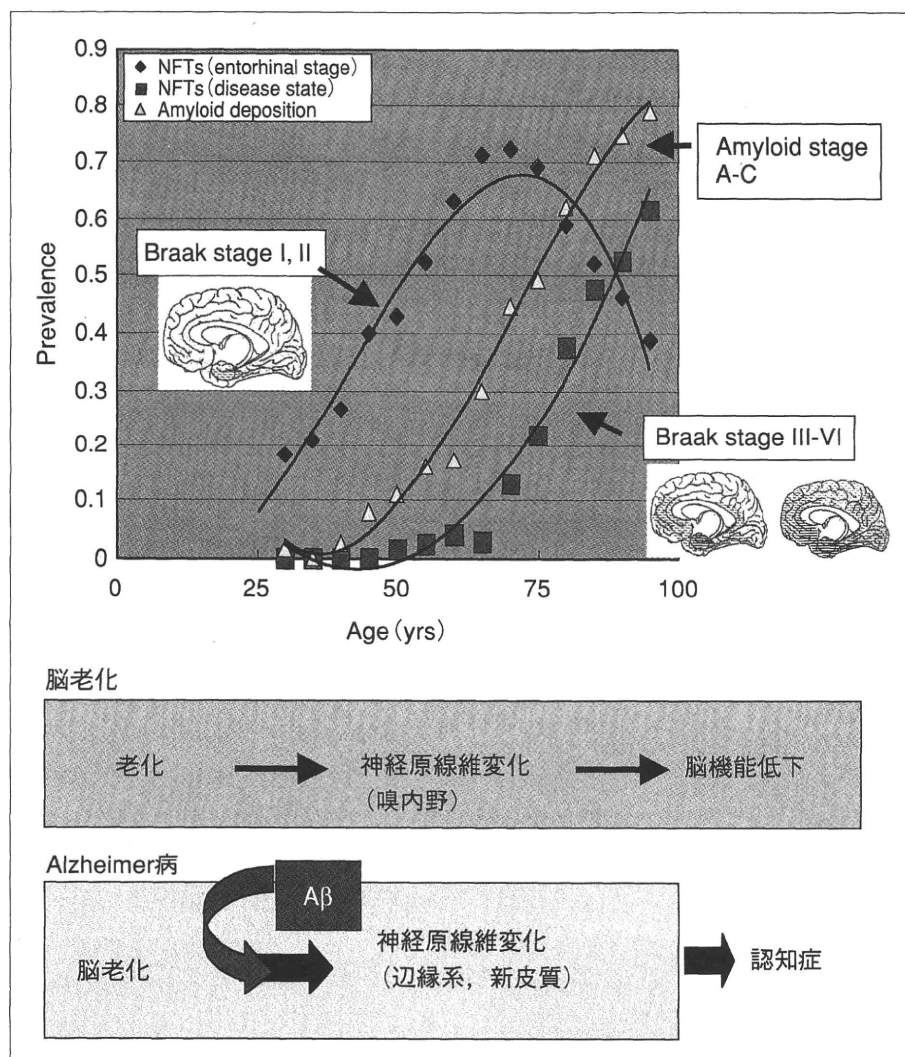


図1 βアミロイドと神経原線維変化の関係

Braakらの観察を基に各年齢のBraak stage I, II (神経原線維変化が嗅内野に出現), βアミロイド蓄積, Braak stage III-VI (神経原線維変化が辺縁系, 新皮質に出現)の割合を示している。このことから, 嗅内野の神経原線維変化形成はβアミロイドに依存せず, むしろ, 加齢に依存し脳老化をひき起こす要因ではないかと考えられた。一方, 辺縁系, 新皮質における神経原線維変化形成はβアミロイド蓄積後に起こっており, この神経原線維変化形成はβアミロイド蓄積に依存するものと考えられる。

結合したタウは過剰なリン酸化により微小管からはずれたタウ同士で結合するようになる。可溶性のタウオリゴマーから不溶性の顆粒状タウ凝集体が形成され, その後, 線維化し神経原線維変化となる<sup>4)</sup>。

テトラサイクリンによって変異タウ蛋白質 (P301L) の発現を調節することのできるマウスでは, 神経原線維変化が形成される時期にタウ蛋白質の発現を減少すると神経細胞死と記憶障害の改善がみられた。しかし, タウ蛋白質の発現が減少した後も神経原線維変化は形成される

ことから神経原線維変化そのものには神経毒性はないことが示唆された<sup>5)</sup>。野生型ヒトタウ蛋白質を発現するマウスでは加齢に伴って神経原線維変化も神経細胞死も観察されなかったが, 記憶障害を示した。このマウス脳を調べてみると, 嗅内野に過剰にリン酸化したタウ蛋白質の蓄積とシナプスの消失が観察され, functional MRIで記憶障害の程度と相関して嗅内野神経活動の低下が観察されている。このことから, 過剰にリン酸化したタウ蛋白質はシナプス脱落に関係することが考えられる<sup>6)</sup>。さらに, タウ蛋

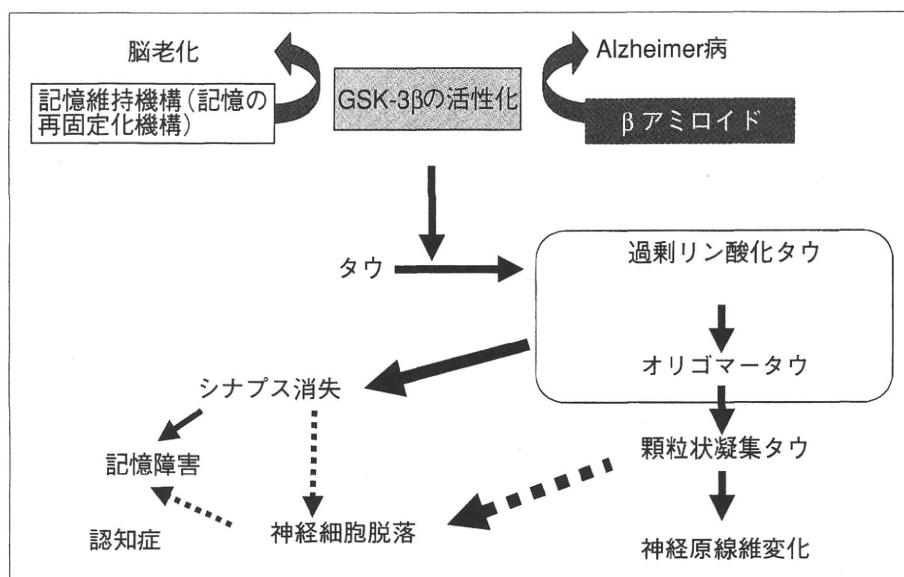


図2 脳老化,  $\beta$  アミロイドはGSK-3 $\beta$ を活性化する  
その結果, リン酸化されたタウによってシナプス消失, 顆粒状凝集タウによって神経細胞脱落が引き起こされる。

白質の顆粒状凝集体は神経細胞死に関与することが見出されている。すなわち, タウ蛋白質が線維化する過程で過剰にリン酸化されたタウ蛋白質はシナプス消失によって神経機能に障害をひき起こす。この段階では, おそらくリン酸化タウ蛋白質ができないようにすることでシナプスの再生は可能であろう。さらに, タウ蛋白質の顆粒状凝集体ができると神経細胞死をひき起こし脳機能は不可逆的な障害を受けることになる(図2)。

### GSK-3 $\beta$ の活性化とタウリン酸化

老化であれ  $\beta$  アミロイドであれ, 過剰にリン酸化されたタウが蓄積すると一連のタウ凝集によって神経機能低下が引き起こされる。したがって, タウの過剰リン酸化をひき起こす酵素を見出すことは老化やAD発症を理解する上で重要なことである。タウを過剰にリン酸化する酵素は多く報告されているが, その中でGSK-3 $\beta$ はその阻害剤がタウTgマウスにおける神経原線維変化形成を抑制することからAD発症に関連する酵素としてコンセンサスを得つつある。この酵素は最初tau protein kinase I(TPKI)として牛脳微小管画分からタウ蛋白を過剰にリン酸化し, PHF-タウと同様のエピトープを形成しうる酵素として同定された<sup>7)</sup>。一方Woodgettらは, グルコー

ス代謝に関与する酵素グリコーゲンシンターゼ(GS)のリン酸化酵素としてGSK-3 $\alpha$ と $\beta$ をクローニングした<sup>8)</sup>。TPK1のクローニングの結果, この酵素はGSK-3 $\beta$ と同一のものであることが判明した。海馬初代培養神経細胞に $\beta$ アミロイドを添加すると, GSK-3 $\beta$ の活性化が観察されタウの過剰リン酸化が起こる。ホモログであるGSK-3 $\alpha$ やCDK5, MAPキナーゼの活性化は起こっていなかった。GSK-3 $\beta$ の活性調節はTyr216とSer9のリン酸化によって行われている。Tyr216のリン酸化されたGSK-3 $\beta$ は活性型であり, Ser9のリン酸化はGSK-3 $\beta$ を不活性化する。このSer9のリン酸化はPKA, PKC, AKT, MAPキナーゼ, PP1によって行われGSK-3 $\beta$ の活性が調節されている<sup>9)</sup>。 $\beta$ アミロイド添加ではPI3キナーゼ活性の低下に伴ってAKT活性が低下し, Ser9がリン酸化されたGSK-3 $\beta$ 量が減少しGSK-3 $\beta$ が結果的に活性化されタウの過剰リン酸化と神経細胞死をひき起こす。 $\beta$ アミロイドがどのような機構でAKTシグナル低下をひき起こすのかは明らかではない。アミロイドの受容体としてAPP, RAGE, PrPが報告されている<sup>10)~12)</sup>。この下流シグナルに着いては明らかではない。一方, 凝集 $\beta$ アミロイドには特定の受容体はないのではないかと報告もある。 $\beta$ アミロイドのアミノ酸をD型アミノ酸で作製すると $\beta$ アミロイドに特異的



な受容体があればD型アミノ酸で作製した $\beta$ アミロイドは認識されないはずである。しかし、D型アミノ酸で作製した $\beta$ アミロイドを重合させて神経細胞に添加すると神経細胞死が観察されたのである<sup>13)</sup>。 $\beta$ アミロイドは重合して負の電荷が表面に存在し細胞膜と静電的に結合しやすくなる<sup>14)</sup>。GSK-3 $\beta$ はムスカリン受容体、ドーパミン(D<sub>2</sub>)受容体、NMDA受容体の下流に存在しSer9がリン酸化されているが、 $\beta$ アミロイドが非特異的に細胞表面に結合し、これらのシグナルを妨害すると結果としてGSK-3 $\beta$ の活性化が起こるのかもしれない。確かに記憶獲得の基本的な可塑性機構としての長期増強(LTP)を起こすとGSK-3 $\beta$ の抑制が起こることが示されている。GSK-3 $\beta$ の活性化は長期抑制(LTD)には必須で、NMDA受容体下流でPP1が活性化されGSK-3 $\beta$ のSer9を脱リン酸化することで活性化する<sup>15)</sup>。この機構は記憶の再固定化と呼ばれる記憶を維持する時に作用している。GSK-3 $\beta$ を不活性化すると記憶の再固定化ができない<sup>16)</sup>。われわれはこのことから、加齢に伴う知識の増大は記憶の呼び出し再固定化を頻繁に起こすことになり、加齢とともにGSK-3 $\beta$ が活性化が頻繁に起こり嗅内野に神経原線維変化を形成するのではないかと考えている。

## おわりに

$\beta$ アミロイドが直接神経細胞に作用すると上述したカスケードで神経原線維変化が形成される可能性は考えられる。ただこの場合、 $\beta$ アミロイドが作用するとすぐにGSK-3 $\beta$ の活性化によって神経機能低下や神経原線維変化形成が引き起こされるのであろうが、ヒトの新皮質の場合、 $\beta$ アミロイドが蓄積して数十年後に神経原線維変化が生じるようになっている。この時間的な違いをどのように説明するのかは一つの問題である。また、今のところAPPマウスとタウマウスを掛け合わせると神経原線維変化形成が加速されたとするHuttonらの結果は他のグループでは再現されていない。アミロイド抗体療法の結果は、実質中の $\beta$ アミロイドは減少したが認知機能低下を抑制できなかった。こう考えると、これまで考えてきたような脳実質に蓄積する $\beta$

アミロイドが直接神経細胞に作用するのかどうかという点についても再考する必要があるかもしれない。

## 文 献

- 1) Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, et al. Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 6364-9.
- 2) Roberson ED, Searce-Levie K, Palop JJ, et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 2007 ; 316 : 750-4.
- 3) Braak H, Braak E. Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997 ; 18 : S85-8.
- 4) Takashima A. Hyperphosphorylated tau is a cause of neuronal dysfunction in tauopathy. *J Alzheimers Dis* 2008 ; 14 : 371-5.
- 5) Santacruz K, Lewis J, Spires T, et al. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 2005 ; 309 : 476-81.
- 6) Kimura N, Tanemura K, Nakamura S, et al. Age-related changes of Alzheimer's disease-associated proteins in cynomolgus monkey brains. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 ; 310 : 303-11.
- 7) Ishiguro K, Takamatsu M, Tomizawa K, et al. Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like component of paired helical filaments. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 10897-901.
- 8) Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J* 1990 ; 9 : 2431-8.
- 9) Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 2001 ; 65 : 391-426.
- 10) Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z, et al. Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein : a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 2000 ; 3 : 460-4.
- 11) Yan SD, Chen X, Fu J, et al. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1996 ; 382 : 685-91.
- 12) Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, et al. Cellular

- prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 2009 ; 457 : 1128-32.
- 13) Cribbs DH, Pike CJ, Weinstein SL, et al. All-D-enantiomers of beta-amyloid exhibit similar biological properties to all-L-beta-amyloids. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 7431-6.
- 14) Yoshiike Y, Akagi T, Takashima A. Surface structure of amyloid-beta fibrils contributes to cytotoxicity. *Biochemistry* 2007 ; 46 : 9805-12.
- 15) Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, et al. LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. *Neuron* 2007 ; 53 : 703-17.
- 16) Kimura T, Yamashita S, Nakao S, et al. GSK-3beta is required for memory reconsolidation in adult brain. *PLoS ONE* 2008 ; 3 : e3540.

\*

\*

\*



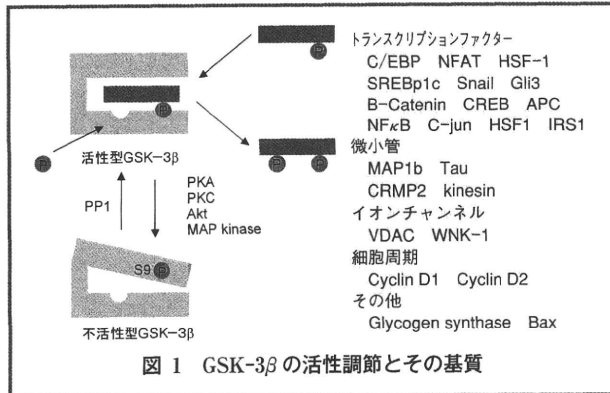
# GSK-3 $\beta$ と記憶・認知症

高 島 明 彦

Clinical Neuroscience 別冊

Vol. 28 No. 6 2010 年 6 月 1 日発行

中 外 医 学 社

GSK-3 $\beta$  と記憶・認知症高島 明彦  
たか しま あき ひこ理化学研究所脳科学総合研究センター  
アルツハイマー病研究チームチームリーダー図1 GSK-3 $\beta$ の活性調節とその基質

はじめに GSK-3 $\beta$ は、解糖系におけるグリコーゲンシンターゼをリン酸化する酵素として、そのホモログであるGSK-3 $\alpha$ と共にWoodgettらによってクローニングされた<sup>1)</sup>。三菱化学生命科学研究所のグループは、アルツハイマー病で見られる神経原線維変化が過剰にリン酸化された微小管結合タンパクタウによって構成されていることに注目し、タウを過剰にリン酸化する酵素をウシ脳の微小管画分から精製し、タウプロテインキナーゼ1 (Tau protein kinase; TPK I)、および2 (TPK II)と命名した<sup>2,3)</sup>。この部分ペプチド配列からcDNAクローニングが行われ、TPK IはGSK-3 $\beta$ と同一であり<sup>4)</sup>、TPK IIはCDK5とその活性化因子P25の複合体であることが明らかにされた<sup>5,6)</sup>。その後の検討からGSK-3 $\beta$ は認知症発症に深く関わっていることが明らかになってきた。

GSK-3 $\beta$ の生化学的性質

GSK-3 $\beta$ は分子量47 kDaであり、どの組織にも発現は見られ、特に脳では神経細胞で発現が高い<sup>7,8)</sup>。この酵素の特徴は恒常的に活性化状態であるということ、および自己または他の酵素によってリン酸化されたアミノ酸残基を認識して、その周りのSer/Thrをリン酸化することである(図1)。例えば、グリコーゲンシンターゼやCREBなどはGSK-3 $\beta$ の基質であるが、GSK-3 $\beta$ だけではリン酸化ができず、必ず前もって近傍のSer/Thrにリン酸が入っている必要がある。この性質を決めているのは96番目に存在するアルギニン残基である。これをアラニンに置換すると、予めリン酸化された部位を認識して近傍をリン酸化するGSK-3 $\beta$ の性質は失われるのである。GSK-3 $\beta$ の活性調節はTyr216とSer9のリン酸化によって行われている。Tyr216のリン酸化されたGSK-3 $\beta$ は活性型である。このリン酸化シグナルとして当初SrcファミリーのFynなどによって細胞外のシグナルに応答することが報告された。一方、GSK-3 $\beta$ が自己リン酸化によってTyr216のリン酸化を引き起こすという報告が出されている。Ser9のリン酸化はGSK-3 $\beta$ を不活性化化する。GSK-3 $\beta$ はムスカリン受容体、ドーパミン(D2)受容体、NMDA受容体、インスリン受容体、神経成長因子受容体の下流に存在し、PKA, PKC, AKT, MAP kinase, PP1によって活性調節が行われている<sup>9)</sup>。

GSK-3 $\beta$ の細胞内での役割

GSK-3 $\beta$ は細胞内で細胞質に主に存在しており、更に核、ミトコンドリアにも存在してアポトーシス、細胞周期、細胞極性、細胞移動、遺伝子発現の調節など、神経発生から神経変性まで多くの細胞

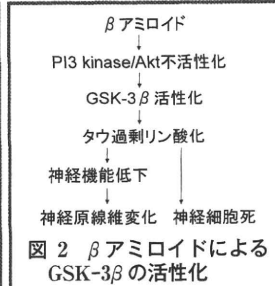
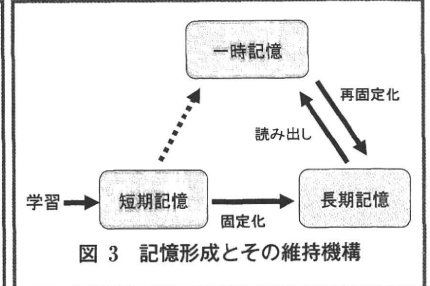
図2 βアミロイドによるGSK-3 $\beta$ の活性化

図3 記憶形成とその維持機構

内シグナル伝達機構に関与している。例えば神経突起の退縮と伸張にGSK-3 $\beta$ は関与している神経突起の成長円錐の伸張にはGSK-3 $\beta$ の抑制が関与している<sup>10-12)</sup>。例えば、小脳顆粒神経でGSK-3 $\beta$ を抑制すると成長円錐の拡大と枝分かれの増大が確認される。また、セマフォリン3AはGSK-3 $\beta$ を活性化することでCRMP2をリン酸化し、神経突起の退縮を引き起こしている<sup>13)</sup>。細胞骨格の形成と安定化には微小管結合タンパク質であるMAPs(microtubule binding proteins)が寄与している。GSK-3 $\beta$ はタウやMAP1bをリン酸化し、微小管を不安定化する。更に、微小管に沿ってタンパクやミトコンドリアを運搬するキネシンモータータンパクもGSK-3 $\beta$ の基質であり、GSK-3 $\beta$ によってリン酸化されると運搬物(cargo protein)と結合できなくなる<sup>14)</sup>。GSK-3 $\beta$ の基質としてβカテニン、HSF-1(heat shock factor 1)<sup>15,16)</sup>、CREB、C-junが存在する。βカテニンはリン酸化されることで細胞質において分解され、核内でのβカテニン量を減少させることでCyclinD1, myc, C-junなどの細胞増殖に関係する遺伝子発現の調節を行っている。HSF-1、C-junおよびCREBは核内に存在するトランスクリプションファクターである。いずれもGSK-3 $\beta$ によってリン酸化されることでDNAとの結合能が低下し、熱ショックタンパク発現や特にCREBの場合、記憶に関連する遺伝子発現が抑制され記憶障害を引き起こす可能性が示唆される。GSK-3 $\beta$ はミトコンドリア膜に孔を開け、アポトーシスを引き起こすBaxをリン酸化することでBaxの2量体化を促進し、アポトーシスを引き起こす<sup>17)</sup>。このように、GSK-3 $\beta$ は多くの基質をリン酸化することによって細胞内のシグナル伝達に関与している。恐らく、GSK-3 $\beta$ は細胞内シグナルのネガティブレギュレーターとして役割を果たしていると考えられる(図1)。

GSK-3 $\beta$ と認知症

老人性認知症の大半を占めるアルツハイマー病では、βアミロイドの蓄積である老人斑と過剰リン酸化タウの凝集体である神経原線維変化とそれに伴う神経脱落が主要な病理像である。神経脱落と神経原線維変化には相関があるので、リン酸化タウの凝集と神経細胞死に関連があることが想像される。βアミロイド仮説が正しいとすると、βアミロイドがリン酸化タウ形成を引き起こし、神経原線維変化と神経細胞死を引き起こすと考えられる(図2)。GSK-3 $\beta$ は試験管内でタウを過剰にリン酸化し神経原線維変化を形成するリン酸化タウと同じ部位のリン酸化をする酵素と単離されてきたので、GSK-3 $\beta$ がβアミロイドによって活性化するタウリン酸化酵素の一つの候補として浮上したのである。実際、海馬初代培養神経細胞にβアミロイドを添加すると神経細胞死とタウの過剰リン酸化が引き起こされる。この時GSK-3 $\beta$ 活性の増大が起こる。GSK-3 $\beta$ のアンチセンスオリゴヌクレオチドによってGSK-3 $\beta$ を抑

0289-0585/10/¥500/論文/JCOPY

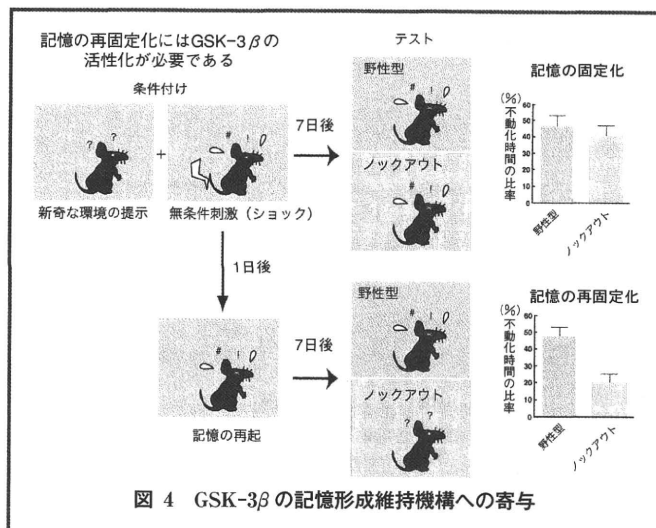


図 4 GSK-3 $\beta$  の記憶形成維持機構への寄与

制するとタウリン酸化の抑制と神経細胞死の阻害が引き起こされた<sup>18-21</sup>。タウノックアウトマウス由来の初代神経培養細胞に $\beta$ アミロイドを添加すると神経細胞死が阻害されることから、 $\beta$ アミロイドはGSK-3 $\beta$ を活性化することでタウを過剰リン酸化し神経細胞死を引き起こすと考えられた<sup>22</sup>。 $\beta$ アミロイドによるGSK-3 $\beta$ の活性化はPI3 kinase/Aktシグナルが $\beta$ アミロイドによって抑制されることによることも明らかになった。このことは、タウを強制発現するマウス脳に $\beta$ アミロイドを海馬CA1領域にインジェクションすることでCA3に神経原線維変化を形成するモデルにLiClを腹腔内投与しておくでGSK-3 $\beta$ 活性が抑制され、神経原線維変化形成が阻止されることで、動物脳でも同様の機構が存在することが確認された。近頃、APP/タウダブルトランスジェニックマウスにGSK-3阻害剤を投与することで神経原線維変化形成と老人斑形成、更にモリス水迷路における記憶障害の改善が起こることが報告されている。実際、LiClを投与すると $\beta$ アミロイド放出の低下が観察され<sup>23</sup>、それがGSK-3 $\alpha$ の阻害によることが確認されている<sup>24</sup>。これらのことは、GSK-3( $\alpha$ および $\beta$ )はアルツハイマー病発症に大きく関与することが考えられる。

#### GSK-3 $\beta$ の記憶機構への寄与

モリス水迷路や恐怖条件付けテストにおける学習記憶は、主に神経回路の長期増強(LTP)や長期抑制(LTD)と呼ばれるシナプス可塑性によって引き起こされていると考えられる。海馬スライス標本を用いた研究ではLTPを起こすとSer9のリン酸化が増大し、GSK-3 $\beta$ の抑制が起こる<sup>25,26</sup>。一方、NMDA依存性のLTDを引き起こすためにはGSK-3 $\beta$ の活性化が必要であることが報告されている<sup>27,28</sup>。すなわち、GSK-3 $\beta$ は正常な神経ネットワークの活動の中でその活性が調節されているのである。GSK-3 $\beta$ の脳機能への関与を調べるためGSK-3 $\beta$ 遺伝子欠失したマウスが作成された。ホモザイゴートでは胎生致死であるため、ヘテロザイゴートのGSK-3 $\beta$ マウスを用いて行動解析が行われた。モリス水迷路では最初の3日間はトレーニングによって学習することができたが、トレーニングを続けると9日目では場所記憶が失われた。このことはGSK-3 $\beta$ は学習機能より記憶機能に関与することが考えられた。これを明確にするため恐怖条件付け記憶試験が行われた。マウスは箱の中に入れられ一定時間後に足に電気刺激を与える。こうすると海馬では“この箱は電気刺激がくる”という文脈を学習し短期記憶が形成される。この短期記憶は数時間で消去されるが、記憶の固定化によって長期記憶となる。学習後にタンパク合成阻害剤を海馬に投与するとこの記憶の固定化ができないので、何らかのタンパク合成を伴う機構であると考えられる。この長期記憶も想起(recall)されると不安定になる。マウスを電気刺激した後もう一度同じ箱に入れ文脈を

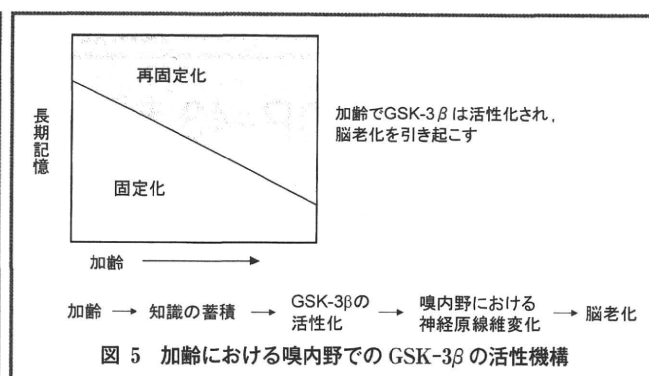


図 5 加齢における嗅内野での GSK-3 $\beta$  の活性機構

想起させ、その後タンパク合成阻害剤を投与すると固定化した長期記憶が失われるのである。この時に更に長期記憶を形成する機構を再固定化(reconsolidation)と呼ぶ(図3)。このGSK-3 $\beta$ ヘテロノックアウトマウスは記憶を固定化できるが、固定化した記憶を呼び出し再固定化することができないことが明らかになった(図4)。野生型マウスでは海馬領域のGSK-3 $\beta$ 活性が記憶の再固定化を起こす時期に増大し、この活性をGSK-3 $\beta$ 阻害剤で抑制すると野生型マウスでも記憶の再固定化ができなかった。これらの結果はGSK-3 $\beta$ の活性化が記憶の再固定化に必要であることを示している<sup>29</sup>。Collingridgeらの結果と合わせて考えると記憶の再固定化にはLTDが必要であることが示唆される。

#### 老化とアルツハイマー病

Braakらの研究から、神経原線維変化は嗅内野に最初に出現し嗅内野の神経活動を低下させることで記憶障害が生じると考えられる。この神経原線維変化形成は $\beta$ アミロイドに依存しない。 $\beta$ アミロイドが蓄積を始めると神経原線維変化は嗅内野から大脳辺縁系、新皮質へと広がり認知症を引き起こす。加齢によって記憶障害が引き起こされる機構をこれまでに記述した現象から考えると、以下のような機構が考えられる(図5)。

若齢期においては多くのことを経験しそれを学習記憶する。これはLTPによって引き起こされると考えられる。加齢に伴って新奇の事象に遭遇することは少なくなる。そうすると多くの生活する場面では記憶の想起と再固定化が頻繁に行われるようになる。記憶の再固定化にはLTDによってGSK-3 $\beta$ の活性化が起こりタウは過剰にリン酸化されシナプス消失が起こる。シナプス消失は神経機能低下を引き起こし記憶障害となる。過剰にリン酸化されたタウは凝集して神経原線維変化を形成すると考えられる。

#### 文 献

- Woodgett JR. *Embo J.* 1990; 9: 2431-8.
- Ishiguro K, et al. *J Biol Chem.* 1992; 267: 10897-901.
- Ishiguro K, et al. *J Biochem(Tokyo).* 1988; 104: 319-21.
- Ishiguro K, et al. *FEBS Lett.* 1993; 325: 167-72.
- Kobayashi S, et al. *FEBS Lett.* 1993; 335: 171-5.
- Uchida T, et al. *FEBS Lett.* 1994; 355: 35-40.
- Takahashi M, et al. *Brain Res.* 2000; 857: 193-206.
- Takahashi M, et al. *J Neurochem.* 1994; 63: 245-55.
- Grimes CA, et al. *Prog Neurobiol.* 2001; 65: 391-426.
- Eickholt BJ, et al. *J Cell Biol.* 2002; 157: 211-7.
- Lucas FR, et al. *J Cell Sci.* 1998; 111(Pt 10): 1351-61.
- Hall AC, et al. *Mol Cell Neurosci.* 2002; 20: 257-70.
- Chadborn NH, et al. *J Cell Sci.* 2006; 119: 951-7.
- Morfini G, et al. *Embo J.* 2002; 21: 281-93.
- Chu B, et al. *J Biol Chem.* 1998; 273: 18640-6.
- Xavier JJ, et al. *J Biol Chem.* 2000; 275: 29147-52.
- Arokium H, et al. *J Biol Chem.* 2007; 282: 35104-12.
- Takashima A. *J Alzheimers Dis.* 2008; 14: 371-5.
- Takashima A, et al. *Neurosci Res.* 1998; 31: 317-23.
- Takashima A, et al. *Neurosci Lett.* 1996; 203: 33-6.
- Takashima A, et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 7789-93.
- Rapoport M, et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 6364-9.
- Sun X, et al. *Neurosci Lett.* 2002; 321: 61-4.
- Phiel CJ, et al. *Nature.* 2003; 423: 435-9.
- Hooper C, et al. *Eur J Neurosci.* 2007; 25: 81-6.
- Zhu LQ, et al. *J Neurosci.* 2007; 27: 12211-20.
- Peineau S, et al. *Br J Pharmacol.* 2008; 153 suppl 1: S 428-37.
- Peineau S, et al. *Neuron.* 2007; 53: 703-17.
- Kimura T, et al. *PLoS ONE.* 2008; 3: e 3540.

特集：アルツハイマー病 ― 研究と診療の進歩

## アルツハイマー病発症におけるタウの意義

高 島 明 彦

**BRAIN and NERVE**

第 62 卷 第 7 号 別刷  
2010 年 7 月 1 日 発行

医学書院



## アルツハイマー病発症におけるタウの意義

## Significance of Tau in the Development of Alzheimer Disease

高 島 明 彦\*

Akihiko Takashima\*

## Abstract

Based on the amyloid hypothesis, studies on for Alzheimer disease (AD) therapy mostly focus on elimination of  $\beta$ -amyloid. However, results of recent studies on amyloid immunotherapy suggest that it may not be sufficient to target only  $\beta$ -amyloid for AD therapy. Neurofibrillary tangles (NFTs), which contain hyperphosphorylated tau are the other pathological hallmark of AD; clinical progression of NFTs is from the entorhinal cortex to the limbic cortex, and neocortex. In a brain region showing NFTs, synapse loss and neuronal loss were observed; this suggests the possibility that NFT formation is involved in brain dysfunction because of synapse loss and neuronal loss. In the process of NFT formation, tau formed different aggregation species—tau oligomers, granules, and fibrils. From the analysis of different human tau-expressing mouse lines, soluble hyperphosphorylated tau, including the tau oligomer, was found to be involved in synapse loss; and granular tau formation was also found to be involved in neuronal loss. Therefore, inhibition of tau aggregation and tau phosphorylation is expected to prevent synapse loss and neuron loss, which may halt progressive dementia in AD.

Key words : tau, phosphorylation, oligomer, granular aggregate, synapse loss, neuronal loss

## はじめに

アルツハイマー病 (Alzheimer disease: AD) では病理学的特徴として、アミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) の凝集物である老人斑が神経細胞外にみられ、神経細胞内では微小管結合蛋白の1つであるタウが過剰にリン酸化した状態で線維化し沈着している。老人斑はADに特異的に観察されるが、神経原線維変化は前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia: FTD) などほかの神経変性疾患でも観察されており、神経変性の共通の機構によって生じると考えられている。ADにおいて神経原線維変化は、neuropil threadとして樹上突起内に、neuritic plaque内では軸索末端、さらに細胞体に形成されている。一方、FTDの場合は多くが神経細胞体、またはグリア細胞内にタウ凝集体が観察される。Shiarliらは家族性FTDパーキンソンニズム (FTDP-17)、孤発性FTD、早発型ADの剖検脳を

調べ、それぞれ神経原線維変化について比較した<sup>1)</sup>。その結果、神経脱落はFTDでADより多く観察されたが、不溶性タウの量、およびリン酸化タウはAD脳で10倍多いことが示されている。すなわち、ADの場合、タウの過剰リン酸化に起因する神経原線維変化形成が引き起こされていると考えられる。

## I. 神経原線維変化と病態

Braakらは、神経原線維変化の出現する部位によって病期を6段階に分けている<sup>2,3)</sup> (Fig. 1)。最初期に神経原線維変化は嗅内野に出現する。Braak stage Iではまばらに存在するが、stage IIになるとその数は増大する。Braak stage IIIになると、嗅内野II層では多数の神経原線維変化が観察されるようになる。この部分には神経原線維変化の終末像であるゴーストタングルが出現するようになる。この段階では海馬CA1領域にはそれほど多

\* 理化学研究所アルツハイマー病研究チーム [〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1] Laboratory for Alzheimer's Disease, RIKEN, Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan

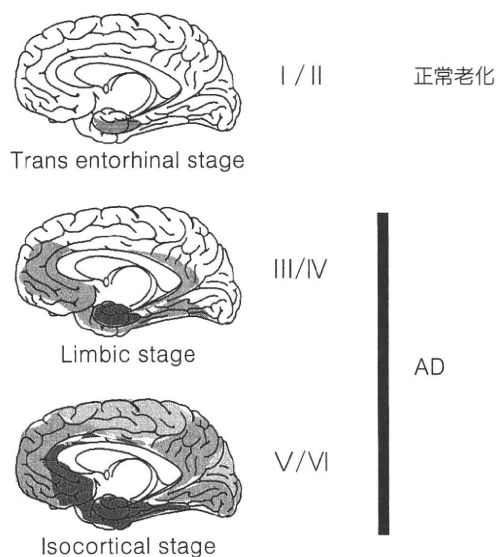


Fig. 1 Braak の神経原線維変化ステージ

くの神経原線維変化は生じていない。Stage IV では、嗅内野に多数のゴースタンブルが観察されるようになる。さらに、海馬 CA1 では多数の神経原線維変化が出現し、CA4、鉤状回でも神経原線維変化が出現するようになる。この時期には扁桃体を含む辺縁系で多数の神経原線維変化が出現するようになる。このことから、stage III および IV を limbic (辺縁系) stage と呼んでいる。Stage V および VI では、海馬全領域で多数の神経原線維変化が観察されるようになり、辺縁系での神経原線維変化は進行し数の増大とゴースタンブルが出現するようになる。この時期の最も大きな特徴は、新皮質にも多数の神経原線維変化が生じることである。この時期を isocortical (新皮質) stage と呼ぶ。このように神経原線維変化は嗅内野/海馬から始まり、大脳辺縁系、新皮質へと拡大する。一方、AD の病態は学習記憶障害から始まる。この学習記憶、特にエピソード記憶の形成には嗅内野/海馬が関与しており、嗅内野/海馬の機能障害から始まると考えられる。さらに大脳辺縁系機能の低下から、易怒性など人格の崩壊を伴う末期の認知症を呈するようになる。神経原線維変化の数と罹病期間は正の相関があり、またそれは認知程度とも相関することから、神経原線維変化形成が神経機能低下と相関し、神経原線維変化が出現する場所によってその部位の機能低下が起り、それに対応する脳機能の障害が病態として現れると考えることができる。

## II. AD における $A\beta$ とタウの関係

Braak らはまた、年齢の異なる剖検脳について  $A\beta$  蓄積と神経原線維変化の分布を調査している<sup>2)</sup>。その結果、 $A\beta$  蓄積と神経原線維変化の間に相関はなかったが、各年齢における  $A\beta$  蓄積とそれぞれの部位の神経原線維変化の保有率を調べると、興味深いことが明らかになった (Fig. 2)。嗅内野における神経原線維変化の保有率は 20 歳代で 10~20% であり、加齢とともに増大し、50 歳では半数のヒトに観察され、75 歳頃にピークを迎える。その後、減少するが、これは嗅内野に神経原線維変化を持っているヒトが減るのではなく、嗅内野から辺縁系、新皮質へ神経原線維変化が拡大したことを意味している。嗅内野だけ、および辺縁系から新皮質まで拡大した神経原線維変化を持つヒトの割合は、75 歳までに 90% を超えることになる。 $A\beta$  蓄積は 50~60 歳頃より始まり、加齢とともにその割合は増大し、ほぼ 75 歳では半分のヒトに  $A\beta$  蓄積がみられるようになる。すなわち、嗅内野の神経原線維変化は  $A\beta$  蓄積と独立に引き起こされるのである。むしろ、嗅内野の神経原線維変化は  $A\beta$  蓄積に先んじて起こっているようだ。これに対し、辺縁系や新皮質の神経原線維変化は  $A\beta$  蓄積の後に起きており、この神経原線維変化は  $A\beta$  蓄積に依存して引き起こされているのかもしれない。

一方、 $A\beta$  免疫療法によって老人斑や毒性を持った  $A\beta$  を取り除く方法が AD の治療法として期待されたが、臨床治験では老人斑は除かれたものの、認知症の進行を有意には抑制しなかった<sup>4)</sup>。神経原線維変化は神経変性の執行役として働き、 $A\beta$  はそのスイッチの役割を果たしているのかもしれない。すなわち、神経原線維変化は老化に伴って嗅内野/海馬に起り、 $A\beta$  によって大脳辺縁系から新皮質で神経原線維変化を形成する。神経原線維変化が出現する部位と AD における臨床症状には大まかに相関することから、神経原線維変化形成が神経細胞の機能低下に関与することが病理学的な検討から示唆されている。

## III. タウ

タウは微小管結合蛋白であり、その主要な機能は微小管に結合しそれを安定化することである。微小管は動的な構造を持ち、細胞の分裂、移動、神経突起の成長というような細胞内シグナルに対応して動的にその構造を変化させている。タウは、染色体 17 番にある 16 個のエク



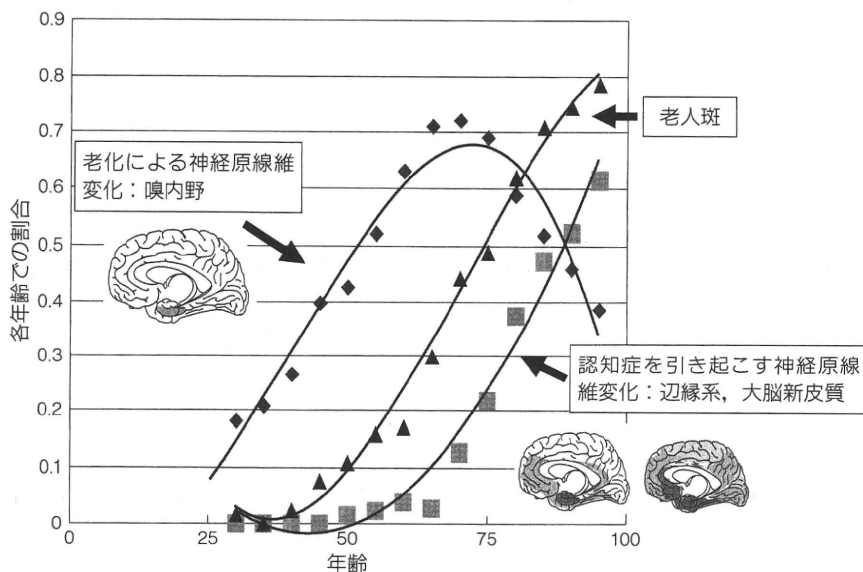


Fig. 2 神経原線維変化と A $\beta$  蓄積の関係

ソンを持つ単一の遺伝子から alternative splicing により 352~441 アミノ酸で構成される 6 種類の isoform を持つ蛋白質である (Fig. 3)。N-末領域ではエクソン 2, エクソン 3 が挿入されるか否かの isoform が存在し<sup>5,6)</sup>, この領域は src ファミリーの fyn のような非受容器チロシン・キナーゼを介して細胞膜との相互作用に必要な領域と考えられている<sup>7-9)</sup>。C-末領域ではエクソン 10 の挿入の有無で 3 リピート, または 4 リピートと呼ばれる微小管結合領域を形成する。タウ遺伝子の突然変異は FTDP-17 で, 150 家系から 35 以上の突然変異が見出されている<sup>10-16)</sup>。このタウ遺伝子変異があると神経原線維変化と神経脱落が起こり, 前頭側頭葉に認知症状を引き起こす。この突然変異は 2 つに大別される。1 つはエクソンに突然変異を生じ, 変異タウ蛋白を生じるタウ変異である。もう 1 つは, エクソン 10 のスプライシングを引き起こすイントロンのスプライス受容近傍に突然変異を持ち, 3 リピート, 4 リピートの比率を変えるものである。後者については, どのように神経機能低下を引き起こし神経原線維変化を生じるのかは明らかになっていない。しかし前者については, 変異タウ蛋白について調べることで, これらの変異蛋白では微小管結合能が低く, 自己凝集能が高いため微小管形成が阻害されるうえに, 軸索輸送も抑制され, 神経機能低下を生じると考えられている<sup>10)</sup>。

#### IV. 神経原線維変化と神経機能

少なくとも神経原線維変化が生じている脳部位におけ

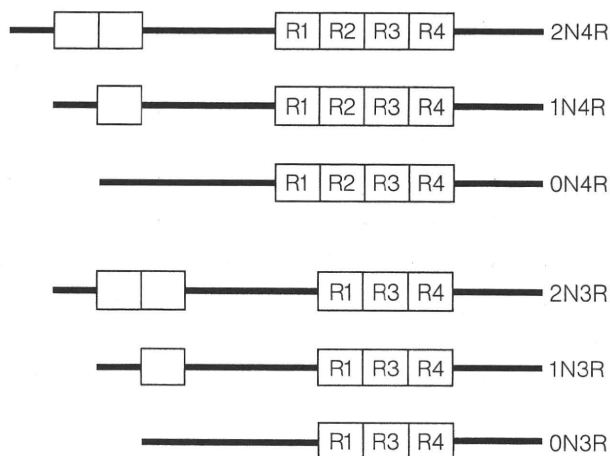


Fig. 3 タウのアイソフォーム

る神経活動が低下することによって, 病理の進行とともに緩徐に病態も進行することが考えられる。確かに神経原線維変化が生じている領域ではその何倍もの神経脱落が起こり, 神経脱落, または神経原線維変化と認知症の程度はよく相関している<sup>17)</sup>。タウノックアウトマウス由来の神経細胞は A $\beta$  による細胞死は起こりにくい<sup>18)</sup>。つまり, 神経細胞死を引き起こすうえでタウが重要な役割を担っているらしい。タウが凝集して線維化することが神経細胞死を引き起こし, さらに脳機能の低下を引き起こしているのかもしれない。SantaCruz らは Tet システムでタウ発現を調節することのできるマウスモデルを作製した<sup>19)</sup>。このシステムでは, テトラサクリンを投与していない場合は内在性タウの約 30 倍程度の P301L 変異タウを発現し, 海馬で典型的な神経原線維変化と細胞脱

落を引き起こす。一方、テトラサクリンをマウスに投与すると、タウ発現が抑制され、細胞死の阻止と記憶障害の改善が観察された。しかし、タウ発現抑制後も神経原線維変化は形成されたのである。この結果は次のように解釈することができる。タウの神経細胞における過剰な蓄積は神経細胞死と神経活動抑制を引き起こす。これはつまり神経原線維変化の形成と神経細胞死は異なる機構で引き起こされる、ということである。このことから、神経原線維変化そのものが毒性を持つのではなく、むしろ、記憶障害の改善から考えると、蓄積したタウが線維化することで神経機能低下が改善される可能性も考えられる。つまり、神経原線維変化形成以前のタウの蓄積が神経機能に異常をもたらす可能性を、この結果は示しているのである。

Mandelkow らはタウの過剰発現によって軸索輸送が障害されることを示した<sup>20-22)</sup>。これはタウが微小管に結合することでモーター蛋白であるキネシンの移動を妨害するため、軸索輸送に障害が起こるとしている。しかしながら、タウトランスジェニックマウスが機能障害を引き起こすのは加齢に伴ってタウが蓄積してからである。若齢と老齢のタウトランスジェニックマウスにおける微小管画分のタウレベルに差はみられないことから、タウの過剰発現による軸索輸送障害というのは考えにくいかもしれない<sup>23)</sup>。神経原線維変化を形成するタウはリン酸化されており、微小管では結合能を失っている。このことから考えると、むしろ微小管に結合しているタウより細胞質に蓄積しているタウに毒性機構が備わっていると考えるほうが考えやすい。

## V. タウの神経毒性

Brandt らは、タウのセリン残基をグルタミン酸に置換して AD でみられるような過剰リン酸化タウと類似した性質を持つタウ cDNA を作製し神経細胞に発現させたところ、PHF (paired helical filaments)-タウの構造変化を認識する MC1 抗原性を示した<sup>24)</sup>。さらに PHF1 のエピトープ (リン酸化セリン 396, 404) を示すタウの発現は、樹上突起のシナプスに影響を与えることなく神経変性を起こすことを報告している。また、Iqbal のグループの Alonso らは AD-P タウ (可溶性画分にあるリン酸化タウ) が存在することを明らかにしている<sup>25-27)</sup>。この AD-P タウは自己凝集して線維化する性質を持っており、正常タウと結合することを見出した。さらに AD-P タウ存在下では微小管再重合を阻害することを明らかにした。このことから、Alonso らは AD-P タウが正

常タウを結合することにより微小管の不安定化が引き起こされ、そのため軸索輸送が阻害され、その結果、細胞死が起こるのではないかと推測している。すなわち、タウのリン酸化とそれに続く凝集がタウによる神経毒性に関与することが示唆される。

## VI. タウ蛋白質のリン酸化

タウ蛋白質の特徴の 1 つは、その配列の中に多くのリン酸化可能部位が存在していることである。441 アミノ酸で構成される最長のタウ蛋白質では、45 個の Ser, 35 個の Thr, 5 個の Tyr が存在している。そのためタウ蛋白質は細胞内のリン酸化酵素のよい標的となる。これらリン酸化可能部位のうち 17 部位は Ser, Pro あるいは Thr, Pro の配列を持ち、プロリン指向性セリン、スレオニン、リン酸化酵素の標的となっている。例えば、MAP kinase, glycogen synthase kinase-3 (GSK-3 $\beta$ ), cyclin-dependent kinase (cdc) 5, cdc2 などである。そのほかの部位は protein kinase A (PKA), protein kinase C, calcium-calmodulin-dependent kinase II, (CaMKII), serum and glucocorticoid-dependent kinase (SGK), protein kinase B (PKB), MAP-microtubule-dependent kinase (MARK), SAD kinases によってリン酸化される<sup>28)</sup>。Y18 や Y394 のようなチロシン残基は、Fyn などのチロシンリン酸化酵素によってリン酸化を受ける<sup>8)</sup>。リピート部位にある lysine-isoleucine-glycineserine motif (KIGS), または lysine-cysteineglycine-serine motif (KCGS) motifs に存在する S262, S293, S324, S356 は、MARK, PKA, SAD kinases, CaMKII, p70S6K によってリン酸化され微小管結合能を消失する<sup>29-31)</sup>。また、タウ蛋白質 N-末、C-末のリン酸化はタウの立体構造に関与すると考えられている。

## VII. 溶液中におけるタウ蛋白質の構造とリン酸化による構造変化

タウ蛋白質は溶液中で折り畳み構造をとらない蛋白質であるため、熱による変性が起こらない。また特定の折りたたみ構造をとらないことから、X線解析などによる構造解析が非常に難しい蛋白質である。Mandelkow らは近接した色素分子の間で励起エネルギーが電子の共鳴によって直接移動する蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) を用いて、溶液中にあるタウ蛋白質の N-末、C-末、リピート間の距離を決定した<sup>32)</sup>。Fig. 4 に示すように、溶液中ではタウ蛋

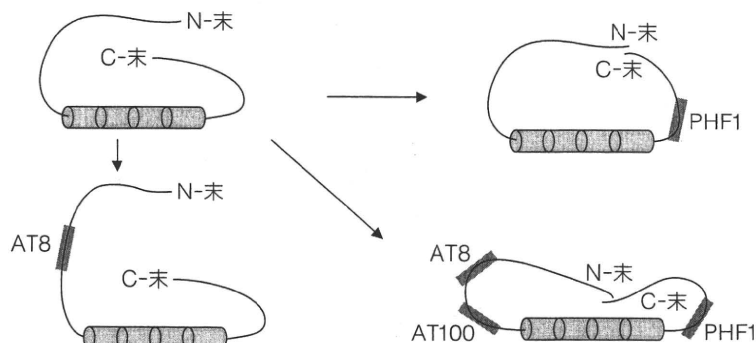


Fig. 4 リン酸化による溶液中でのタウの構造変化

白質はN-末とC-末がリピート方向に折れ曲がったペーパークリップのような構造をしていることが、FRETを用いた研究から明らかにされた。リン酸化されたタウ蛋白質の構造解析は、同様のFRETを用いて行われた。しかし、特定のリン酸化部位が均一にリン酸化されたタウ蛋白質を得るのは困難である。このため、目的のリン酸化部位にあるセリン、スレオニンの電化を持ったアミノ酸ではグルタミン酸に置換することでリン酸化したタウ蛋白に似た性質を持つ擬似リン酸化タウ蛋白質を作製し、構造解析を行った。タウ蛋白質N-末に存在し神経原線維変化形成の初期にリン酸化されるAT8というリン酸化タウ抗体が認識する、Ser199, Ser202, Thr205の擬似リン酸化タウ蛋白質では、タウ蛋白質のN-末部位がC-末から離れ、ペーパークリップ構造が広がった構造となる。タウ蛋白質C-末に存在し、神経原線維変化形成では中期～後期にリン酸化されるSer396, Ser404 (PHF1抗体が認識する部位)の擬似リン酸化では、タウ蛋白質のC-末がリピート部位から外側へ広がり、N-, C-末部位の距離は短くなる。興味深いことにAT8部位とPHF1部位を同時に擬似リン酸化したタウ蛋白質ではN-, C-末部位の距離は短くなり、さらにN-, C-末部位からリピートまでの距離も短くコンパクトなペーパークリップ構造となった。線維化したタウ蛋白質で観察されるAT100の認識部位であるThr212, Ser214をさらに擬似リン酸化すると、タウ蛋白質のペーパークリップ構造はAT8, PHF1のみの場合よりもN-, C-末部位がリピートに近づきさらにコンパクトなペーパークリップ構造となり、線維化したタウ蛋白質に特徴的な構造変化を認識するMC1抗体のエピトープを形成した<sup>33)</sup>。リピート部位がリン酸化されたタウ蛋白質は、微小管から離れた細胞質に存在する。微小管から離れたタウ蛋白質は多くのリン酸化酵素の基質となり、過剰なリン酸化が起こる。過剰にリン酸化されたタウ蛋白質はコンパクトなペー

パークリップ構造をとり、リピート部位を介したタウ同士の親和性が増大し、タウ蛋白質凝集、線維化を引き起こすと考えられる。

## VIII. タウ蛋白質線維形成過程

タウ線維形成過程を *in vitro* で詳細に検討するため、Maeda らはリコンビナントタウをヘパリンとインキュベーションして経時的にタウ線維の形成過程を $\beta$ シート構造を認識するチオフラビン蛍光強度の測定溶液中での原子間力顕微鏡観察を行った<sup>34)</sup>。4時間インキュベーションでは、原子間力顕微鏡下で凝集体の形成は観察されないが、SDS-PAGE上ではジスルフィド結合を介したタウ多量体の形成が観察された。その後、チオフラビン蛍光強度の増大とともに、直径20 nmを中心に分布する顆粒状凝集体 (granular tau oligomer) が観察され、次に顆粒状凝集体と線維が観察される。この顆粒状凝集体を蔗糖密度勾配遠心法によって分離精製し静的レーザー散乱光を用いて調べてみると、タウ蛋白40分子によって顆粒状凝集体が形成されていることが示された。精製した顆粒状構造物を濃縮していくと、タウ蛋白質の線維が形成された。タウ蛋白質は互いに結合して可溶性の多量体を形成する。その後、 $\beta$ シート構造を持つ顆粒状凝集体を形成する。顆粒状凝集体の濃度が増大してくると、顆粒状凝集体同士が結合しタウ蛋白質の線維状構造物を形成するようになる (Fig. 5)。タウ蛋白質の顆粒状凝集体と線維状構造物は、神経原線維変化でみられるタウ蛋白質の構造変化を認識する抗体MC1に陽性反応を示す。このことにより、タウ蛋白質は顆粒状凝集体を形成する前に過剰にリン酸化された状態となり、コンパクトなペーパークリップ構造をとっていると考えられる。ヒト脳では、認知症を発症する以前にタウ蛋白質顆粒状構造物の有意な増大が観察されている<sup>34)</sup>。また、ヒト脳か