

氏名	そがわ こうしろう 曾川 甲子郎
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博第25号
学位授与の日付	平成26年6月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Tau タンパク質の自己重合反応における Tyr310 と Ile308 の役割とその構造化学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 土井 光暢 (副査) 教授 福永 理己郎 (副査) 准教授 友尾 幸司

## 論文内容の要旨

Tau タンパク質は、脳のニューロンに多数分布している微小管結合タンパク質(MAP: microtubule-associated protein)の一種であり、微小管に結合することで、その重合促進と安定化に寄与している。しかしながら、Tau タンパク質が異常にリン酸化されると微小管との結合能を失うと共に、異常自己重合を起こし、PHF(Paired Helical Filaments)と呼ばれる不溶性線維を形成し、神経細胞内に蓄積する。この PHF 形成は神経原線維変化と呼ばれ、 $\beta$ アミロイドからなる老人斑とともに、アルツハイマー型認知症(AD)患者の脳内に見られる代表的な病理学的所見の1つである。Tau 分子中の C 末端側には、相同性の高い約 30 アミノ酸残基が 3 回(3 リピート tau)あるいは 4 回(4 リピート tau)繰り返した特徴ある構造を有している微小管結合部位(MBD : microtubule binding domain)が存在している。このような、アイソフォームは、3つのエクソン(エクソン 2, エクソン 3, エクソン 10)における選択的スプライシングにより生じ、計 6 種の存在が確認されている。この MBD は、Tau タンパク質の機能発現に重要である一方で、自己重合体(PHF)形成にも密接に関与していることから、Tau タンパク質本体と共に、MBD を用いた自己重合メカニズムの解明は AD の発症機構ならびに治療薬の開発において極めて重要であると考えられる。これまでの 4 リピート型 MBD (4RMBD)及び種々の変異体を用いた研究から、第 3 番目のリピート(R3)の N 末端における  $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$  領域に存在する 310 番目の Tyrosine 残基が、PHF 形成に不可欠であり、更には他のリピ

ート領域(R1、R2、R4)が非常にフレキシブルな構造であるのに対して、R3 の<sup>306</sup>VQIVYK<sup>311</sup>領域は、rigid で extend な構造特性を有することが明らかとなっている。しかし、このような構造特性と Tyrosine 残基がどのように自己重合反応に関与しているかは、全く明らかになっていない。

このような背景より、本論文では、Tau タンパク質の自己重合における Tyrosine 残基の機能的、構造的役割と、<sup>306</sup>VQIVYK<sup>311</sup>領域の構造特性との相関を解明することを目的として、完全長 Tau や MBD についての様々な変異体をタンパク質工学的手法により作製し、分光学的手法、形態学的手法、更には NMR 法を用いて構造化学的研究をおこなった。

まず、3リピート型 MBD(3RMBD)を用いて<sup>306</sup>VQIVYK<sup>311</sup>領域についての Alanine 変異体を種々作製し、それらの PHF 形成について検討した結果、308 番目の Isoleucine 残基(Ile308)および310番目の Tyrosine 残基(Tyr310)をそれぞれ Alanine 残基に置換した両変異体は、いずれも PHF 形成能が消失した。このような結果から、MBD の PHF 形成には、この両残基が極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。次に、両残基の PHF 形成に対する構造的役割について R3 および VQIVYK ペプチド、更には両者の様々な変異体を作製し、それらの溶液構造について、NMR ならびに分子動力学計算を用い比較検討した。まず、TFE(2,2,2-Trifluoroethanol)中における R3 の構造解析では、Ile308 または Tyr310 の何れの残基を変異させても、VQIVYK 本来の rigid な構造特性が消失し、フレキシブルな構造に変化した。一方、重水素中での VQIVYK ペプチド変異体を用いた構造解析では、Tyr310 側鎖の芳香環と Ile308 側鎖の  $\gamma\text{CH}_3$  の間には芳香環の  $\pi$  電子密度に依存した何らかの相互作用が働いており、この相互作用が R3 の N 末端 VQIVYK 領域の rigid で extend な構造特性に大きく関与していることを明らかにした。この Tyr310 の芳香環と Ile308 の  $\gamma\text{CH}_3$  の相互作用は、 $\gamma\text{CH}_3$  に対する芳香環の配向が限定的であることより、両残基の側鎖間には CH- $\pi$  相互作用が働いているという結論に至った。そこで、この CH- $\pi$  相互作用が、完全長 Tau の PHF 形成においても必須であるかについて、種々変異体を用いて分光学的手法および形態学的手法により検討した。その結果、CH- $\pi$  相互作用を欠損させた変異体 Tau は、PHF 形成能も消失したことから、完全長 Tau においても、その PHF 形成には CH- $\pi$  相互作用が必要不可欠であることを明らかにした。

Tau タンパク質の自己重合反応において、Ile308 と Tyr310 の両側鎖間に形成される CH- $\pi$  相互作用の重要性は未だ報告されておらず、本研究において明らかにされた新たな PHF 形成機構は、認知症発症機構の解明と抗認知症薬の開発の上で、重要な指標になると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

Tau タンパク質は、脳のニューロンに多数分布している微小管結合タンパク質(MAP: microtubule-associated protein)の一種であり、微小管に結合することで、その重合促進と安定化に寄与している。しかしながら、Tau タンパク質が異常にリン酸化されると微小管との結合能を失うと共に、異常自己重合を起こし、PHF(Paired Helical Filaments)と呼ばれる不溶性線維を形成し、神経細胞内に蓄積する。この PHF 形成は神経原線維変化と呼ばれ、 $\beta$ アミロイドからなる老人斑とともに、アルツハイマー型認知症(AD)患者の脳内に見られる代表的な病理学的所見の1つである。Tau 分子中の C 末端側には、相同性の高い約 30 アミノ酸残基が 3 回(3 リピート tau)あるいは 4 回(4 リピート tau)繰り返した特徴ある構造を有している微小管結合部位(MBD : microtubule binding domain)が存在している。このような、アイソフォームは、3 つのエクソン(エクソン 2, エクソン 3, エクソン 10)における選択的スプライシングにより生じ、計 6 種の存在が確認されている。この MBD は、Tau タンパク質の機能発現に重要である一方で、自己重合体(PHF)形成にも密接に関与していることから、Tau タンパク質本体と共に、MBD を用いた自己重合メカニズムの解明は AD の発症機構ならびに治療薬の開発において極めて重要であると考えられる。これまでの 4 リピート型 MBD (4RMBD)及び種々の変異体を用いた研究から、第 3 番目のリピート(R3)の N 末端における  $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$  領域に存在する 310 番目の Tyrosine 残基が、PHF 形成に不可欠であり、更には他のリピート領域(R1、R2、R4)が非常にフレキシブルな構造であるのに対して、R3 の  $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$  領域は、rigid で extend な構造特性を有することが明らかとなっている。しかし、このような構造特性と Tyrosine 残基がどのように自己重合反応に関与しているかは、全く明らかになっていない。

このような背景より、曾川甲子郎君は、Tau タンパク質の自己重合における Tyrosine 残基の機能的、構造的役割と、 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$  領域の構造特性との相関を解明することを目的として、完全長 Tau や MBD についての様々な変異体をタンパク質工学的手法により作製し、分光学的手法、形態学的手法、更には NMR 法を用いて構造化学的研究をおこなった。

まず、3 リピート型 MBD(3RMBD)を用いて  $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$  領域についての Alanine 変異体を種々作製し、それらの PHF 形成について検討した結果、308 番目の Isoleucine 残基(Ile308)および 310 番目の Tyrosine 残基(Tyr310)をそれぞれ Alanine 残基に置換した両変異体は、いずれも PHF 形成能が消失した。このような結果から、MBD の PHF 形成には、この両残基が極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。次に、両残基の PHF 形成に対する構造的役割について R3 および VQIVYK ペプチド、更には両者の様々な変異体を作製し、それらの溶液構造について、NMR ならびに分子動力

学計算を用い比較検討した。先ず、TFE(2,2,2-Trifluoroethanol)中における R3 の構造解析では、Ile308 または Tyr310 の何れの残基を変異させても、VQIVYK 本来の rigid な構造特性が消失し、フレキシブルな構造に変化した。一方、重水素中での VQIVYK ペプチド変異体を用いた構造解析では、Tyr310 側鎖の芳香環と Ile308 側鎖の  $\gamma\text{CH}_3$  の間には芳香環の  $\pi$  電子密度に依存した何らかの相互作用が働いており、この相互作用が R3 の N 末端 VQIVYK 領域の rigid で extend な構造特性に大きく関与していることを明らかにした。この Tyr310 の芳香環と Ile308 の  $\gamma\text{CH}_3$  の相互作用は、 $\gamma\text{CH}_3$  に対する芳香環の配向が限定的であることより、両残基の側鎖間には CH- $\pi$  相互作用が働いているという結論に至った。そこで、この CH- $\pi$  相互作用が、完全長 Tau の PHF 形成においても必須であるかについて、種々変異体を用いて分光学的手法および形態学的手法により検討した。その結果、CH- $\pi$  相互作用を欠損させた変異体 Tau は、PHF 形成能も消失したことから、完全長 Tau においても、その PHF 形成には CH- $\pi$  相互作用が必要不可欠であることを明らかにした。

Tau タンパク質の自己重合反応において、Ile308 と Tyr310 の両側鎖間に形成される CH- $\pi$  相互作用の重要性は未だ報告されておらず、本研究において明らかにされた新たな PHF 形成機構は、認知症発症機構の解明と抗認知症薬の開発の上で、重要な指標になると考えられる。以上の事より、

上記の論文は、博士（薬学）論文として適当と判断する。