

論文全文要約

4',6-Diamidino-2-Phenylindole Distinctly Labels Tau Deposits

(4',6-Diamidino-2-Phenylindole はタウ病変の検出に有用である)

李 成玉

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

タウオパチーとは微小管関連タンパクのタウタンパクが不溶化し線維性の細胞内蓄積として病理学的に観察される疾患群の総称である。異常蛋白質の細胞内蓄積は封入体と呼ばれ、このような封入体は一次構造を認識する銀染色剤あるいは抗体、二次構造を認識するタウリガンドあるいはチオフラビン、高次構造を明らかにしうる電子顕微鏡などを用いて検出可能で、これらの方法は疾患診断の重要な糸口となります。本来 DAPI は核酸の染色剤であるが、抗体を用いてアルツハイマー病患者の海馬を調べる過程で、このような核染色剤は、核のみならず神経原線維変化と呼ばれるタウタンパク質の封入体も染色することに気づいた。そこで DAPI が不溶化したタウタンパク質を認識することに関して検討した。

本研究では、アルツハイマー病患者 5 例、進行性核上性麻痺 (Progressive supranuclear palsy, PSP) 患者 2 例、筋緊張性ジストロフィー、「脳内鉄沈着を伴う神経変性症」(Neurodegeneration with brain iron accumulation)、「17 染色体に連鎖する前頭側頭型認知症およびパーキンソンニズム」(Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17) および大脳皮質基底核変性症 (Corticobasal degeneration, CBD) 患者各 1 例、計 11 例のタウオパチー患者ホルマリン固定剖検脳組織を検討対象として DAPI 染色後に蛍光顕微鏡にて観察した。

タウオパチーでは疾患毎に関与するタウ蛋白のアイソフォームすなわち 3 リピータウ、4 リピータウもしくはその両者が異なり、それに伴ってタウタンパク質の封入体の形態も様々である。一般に 3 リピータウあるいは 4 リピータウ単独の封入体は球状の形態を呈し、3 と 4 リピータウの両者で構成される封入体は火炎状である。タウ蛋白はそのアイソフォームや集積する細胞の相違を反映して種々の病理学的形態の異なる細胞内凝集体いわゆる封入体を形成することを根拠とし、抗体を用いて神経細胞の 2 つのアイソフォームを染色したところ、3 と 4 リピータウの両者で構成される封入体が DAPI で染色されるが、リピータウ単独のタウオパチーでは一部のみに留まる。

次に銀染色で神経細胞とグリア細胞での様々なタウ病変を確認し、連続切片の同じ領域の DAPI 染色性を検討した。結果、DAPI は大部分の神経細胞内のタウ病変で陽性であるが、グリア細胞のそれは陰性である。

DAPI は通常核染色剤として用いられるが、それ以外にも DAPI は poly リン酸官能基、tubulin などを標識しうるということが報告されている。したがって、タウ病変における DAPI 染色性のメカニズムについてこれらの物質が関与していることが考えられ、タウ病変に未知の核酸が存在する可能性、タウ蛋白

そのもののリン酸基が DAPI のターゲットである可能性について検証した。それに加えて変性したタウ蛋白の高次構造が関与している可能性についても検討した。タウ蛋白凝集体内の未知の核酸成分の DAPI 染色性に対する影響を検討するため、ヌクレアーゼの DNase I ならびに RNase A 処理にて組織内の核酸成分を除去した後も DAPI の染色性が保たれることを確認した。すなわち DAPI のタウ蛋白凝集体染色性は核酸に依存したものではないことが明らかになった。また DAPI は核酸のみならずポリリン酸にも親和性があることから、タウオパチーにおける DAPI 染色性にリン酸基が関与している可能性を検討する目的で Phos-tag を実験に供した。Phos-tag はリン酸基に高親和性の試薬であり、予め Phos-tag で組織を処理することにより組織内のリン酸基をマスクすることが可能である。このような処理の後も DAPI の染色性に変化は見られず DAPI がリン酸基を標的としていないことが明らかになった。変性したタウ蛋白の高次構造の DAPI 染色性に対する影響を検討するため、 β -シート二次構造の病理学検討によく使用されるギ酸の処理前後、DAPI と類似る化学構造を持つチオフラビンにより染色されるタウ病変と DAPI そのものの比較を通じて DAPI 染色と β -シートの関係が明らかになった。

小括すると、DAPI は全ての 3R/4R アイソフォームタウ病変で陽性になり、4R アイソフォームタウ病変で部分的に陽性になる。また、全てのグリア細胞由来のタウ病変で陰性になる。更に、タウ病変における DAPI 陽性は核酸とリン酸官能基と関係なく、 β -シートと関係する。

結論は DAPI はタウ病変の検出に有用な染色試薬であることである。