

平成 20 年 8 月 18 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890274

研究課題名（和文） タウ凝集阻害剤の検索と評価

研究課題名（英文） The screening and assessment of tau aggregation inhibitors

研究代表者

前田 純宏（MAEDA SUMIHIRO）

独立行政法人 理化学研究所 アルツハイマー病研究チーム 研究員

研究者番号 70443025

研究成果の概要：タウ線維の形成は、アルツハイマー病をはじめとする様々な神経変性疾患で観察される病理像である事などから、神経変性と深い関連性が考えられている。そこで我々は、タウ線維形成阻害薬の検索を行った。タウ線維形成阻害薬をいくつか新たに同定したが、既報の物も含めて、タウ線維中間体の形成は阻害しない事が判明した。故に、タウ線維中間体の毒性、化合物存在下で形成された中間体の毒性を試験する事が重要であると考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,320,000	0	1,320,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学 研究分野コード 6906

キーワード：アルツハイマー病、タウ線維、中間体、天然物、原子間力顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

タウ線維の蓄積はアルツハイマー病をはじめとする様々な神経変性疾患において観察される病理像である。そして、その蓄積部位が神経細胞の脱落部位とよく一致する事、認知症の程度とよく相関する事などから、タウ線維形成は、神経変性と深い関連性がある物と考えられた。また、タウ遺伝子の変異によって引き起こされる家族性の神経変性疾患も報告され、その患者脳内において、タウ線維形成が観察された事などから、タウタンパク質による機能障

害が起こる事、それらにタウ線維形成が何らかの関わりがある事などが考えられていた。しかし、近年遺伝子改変マウスを用いた解析から、タウ線維形成が進んでいるにも関わらず、神経変性が減じられるという現象が報告された。

これらの事から、タウ線維形成は、神経変性と深い関連性があるが、それ自身ではなく、その前段階において、神経変性に寄与する物と考えられた。

そこで我々は、試験管内での実験から、タウ凝集体形成における中間体を検索した。

すると、顆粒状の凝集体がタウ線維の中間体として振る舞う事が判明した。そして、それらの存在をヒト脳内においても確認する事に成功した。

2. 研究の目的

タウ線維形成阻害薬の検索が世界的に行われているが、それらはあくまでも線維形成の阻害薬に過ぎず、中間体である顆粒状凝集体の形成も阻害するかどうかは不明である。

そこで我々は、顆粒状凝集体など、タウ線維形成の各段階における凝集体阻害活性を指標として、化合物の検索を行う事にした。

3. 研究の方法

様々な微生物や植物等から得られる天然有機化合物は、複雑な構造を有する物が多く、多様な生物活性を示す。それ故に、薬剤のリード化合物として非常に有用である。そこで、当研究においても、天然物由来の有機化合物を用いて、スクリーニングを行った。

まずはガラス基板上に光親和法により2000種類以上の天然物由来化合物を結合させたガラス基板(図1)の上にタウタンパク質を展開した(図2)。

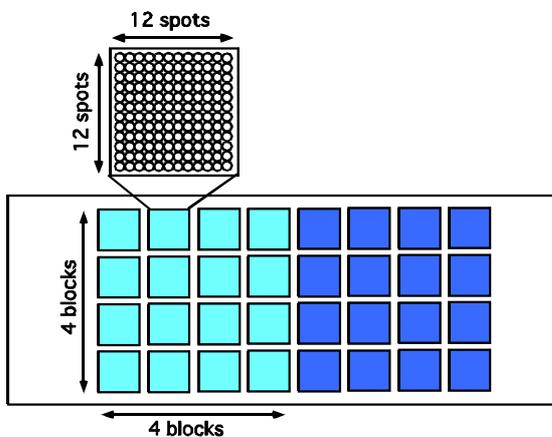


図1 ガラス基板上における化合物の配置

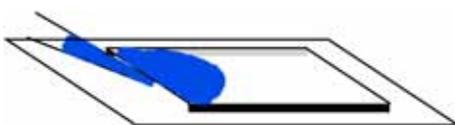


図2 基板上へのタウタンパク質の展開

その後、洗浄過程を経て、基板上の化合物に結合したタウタンパク質を、抗体を用いて検出した(図3)。

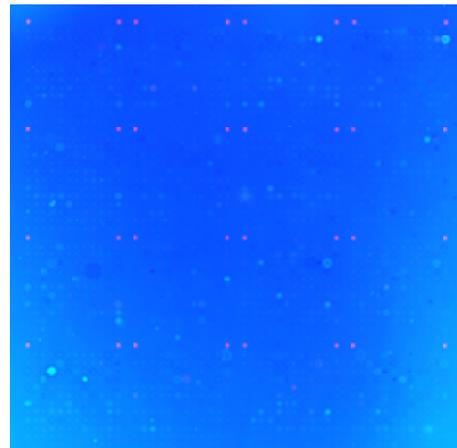


図3 検出された、タウと化合物の結合(赤い斑点状の物がシグナル。緑色の斑点はマーカー)

その後、これらの化合物存在下において、タウタンパク質の凝集実験を試みた。タウ凝集体の検出には、Thioflavin T(ThT)という、シート構造を持った線維を検出する試薬による蛍光観察と、原子間力顕微鏡観察を用いた。

4. 研究成果

上記の方法を用いて、天然物由来の化合物2000種類の中から、各種タウタンパク質に結合しうる化合物を検索した。用いたタウタンパク質は、タウ単量体、顆粒状凝集体、線維状凝集体である。すると、数多くのポリフェノール類が、タウ単量体と結合する事が分かった。また、全てのタウタンパク質と結合する化合物なども観察された。

2000化合物の内、タウと結合する事が確認された202化合物を用いて、タウ線維形成阻害活性を試みた。これらの化合物存在下において、タウタンパク質の凝集促進剤を添加し、ThTの蛍光強度の時間変化を観察した所、図4のような変化が観察された。

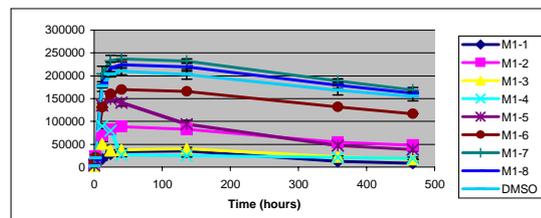


図4 化合物存在下における ThT assay

このようにして、タウ線維形成が阻害される化合物、されない化合物を検索した所、タウ単量体と結合する化合物においては、

タウ線維形成阻害活性があるが、単量体とは結合せず、タウ線維、顆粒状凝集体と結合する化合物は、タウ線維形成阻害活性を持たないという事が判明した。このようにして検索された化合物の中には、エピカテキン類のように、既報の、ポリフェノール系天然物由来化合物も含まれていた(図5)。

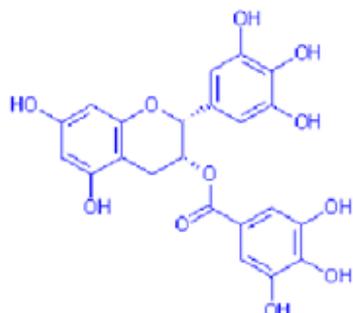


図5 エピガロカテキンモノガレイト

そこで、このようにしてタウ線維形成阻害活性が観察された各種化合物が、顆粒状凝集体形成阻害活性も持つのかを、原子間力顕微鏡観察により確認した。

まずは、化合物非存在下におけるタウ凝集体形成を確認する為に、化合物を溶解させる溶媒のみを加えた状態での原子間力顕微鏡観察を行った(図6)。

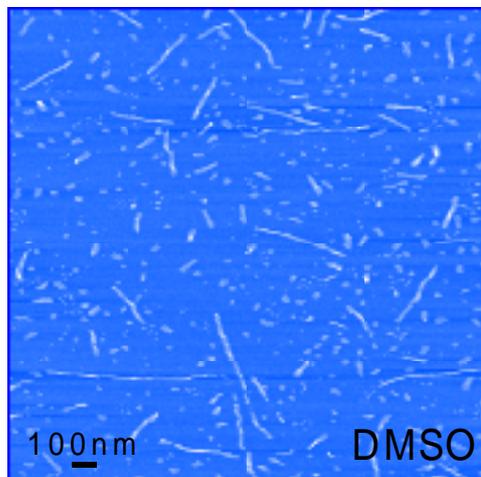


図6 化合物非存在下におけるタウ凝集体形成の原子間力顕微鏡観察。Scale barは100nm。線維状凝集体と共に、顆粒状凝集体が観察されている。

次に、化合物存在下において、タウ凝集実験を行い、原子間力顕微鏡によって、生成物を観察した。すると、図7のように、タウ線維形成は阻害するが、顆粒状凝集体形成は阻害しない、もしくは、顆粒状凝集体形成を促進する化合物も存在する事が判明した。

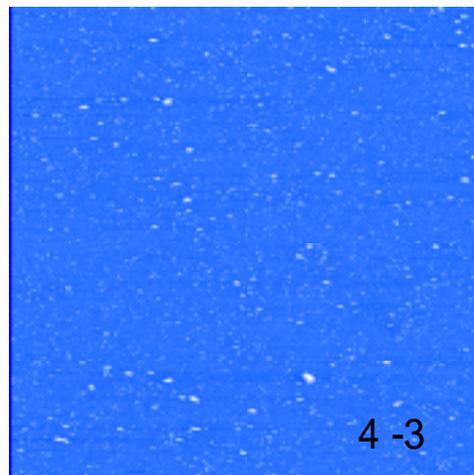
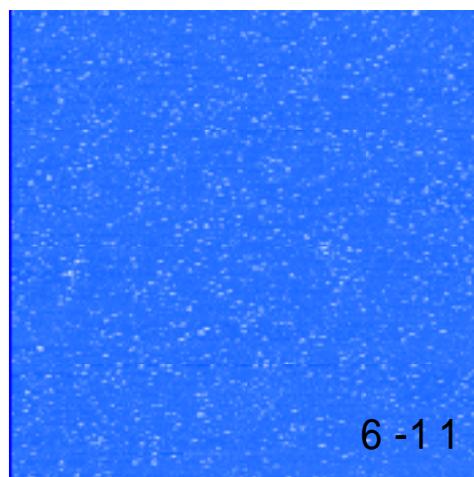
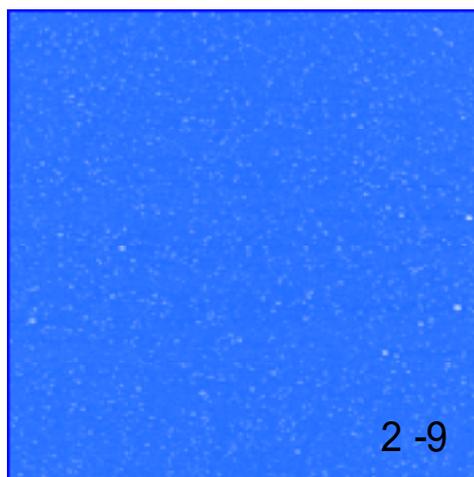


図7 ポリフェノール系化合物存在下における、原子間力顕微鏡像。線維状凝集体は観察されないが、顆粒状凝集体が観察される。

現行のタウ凝集体形成阻害剤の開発では、焦点は主にタウ線維形成の阻害におかれているわけだが、我々の研究から、単にタ

ウ線維の形成阻害剤がタウ凝集阻害剤としては捉えがたい事が判明した。今後は、顆粒状凝集体の神経毒性、また化合物存在下で形成された顆粒状凝集体の神経毒性を鑑みた上での薬剤開発、または顆粒状凝集体形成も阻害する活性をもつ化合物の探索が課題となるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4件)

1. Mizoroki T, Meshitsuka S, Maeda S, Murayama M, Sahara N, Takashima A. Aluminum induces tau aggregation in vitro but not in vivo. J Alzheimers Dis. 2007 Jul;11(4):419-27. 査読有り

2. Sahara N, Maeda S, Yoshiike Y, Mizoroki T, Yamashita S, Murayama M, Park JM, Saito Y, Murayama S, Takashima A. Molecular chaperone-mediated tau protein metabolism counteracts the formation of granular tau oligomers in human brain. J Neurosci Res. 2007 Nov 1;85(14):3098-108. 査読有り

3. Sahara N, Maeda S, Murayama M, Suzuki T, Dohmae N, Yen SH, Takashima A. Assembly of two distinct dimers and higher-order oligomers from full-length tau. Eur J Neurosci. 2007 May;25(10):3020-9. 査読有り

4. Ueno H, Murayama O, Maeda S, Sahara N, Park JM, Murayama M, Sanda A, Iwahashi K, Matsuda M, Takashima A. Novel conformation-sensitive antibodies specific to three- and four-repeat tau. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jun 29;358(2):602-7. 査読有り

[学会発表](計 1件)

前田純宏、伊藤原蔵、佐原成彦、高島明彦
FTDP-17 mutation modify the intermediate formation of tau filament
第26回日本認知症学会学術集会
平成19年10月17、18日大阪国際会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 純宏 (MAEDA SUMIHIRO)

独立行政法人 理化学研究所 アルツハ

イマー病研究チーム 研究員

研究者番号 70443025