

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 25 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C) 一般

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590050

研究課題名（和文）認知症治療薬の開発を目指したタウ蛋白質の構造機能解析と自己凝集機構の解明

研究課題名（英文）Studies of structure-function relationship and self-aggregation mechanism of tau protein for development of the therapeutic drug of Alzheimer's disease.

研究代表者

箕浦 克彦 (MINOURA KATSUHIKO)

大阪薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10278591

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病の発症に関与しているタウタンパク質の異常自己重合機構について、物理化学的手法を用い解析を行った。その結果、イソロイシン残基とチロシン残基の側鎖間に形成される相互作用が、自己重合の引き金になることを明らかにした。また、自己重合を阻害する抗体 (Fab2r) の開発に成功し、その相互作用様式を X 線結晶構造解析より明らかにした。これらの研究成果は、認知症の治療薬或は予防薬を開発する上で重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：Information on the structural scaffold for tau aggregation is important in developing a method of preventing Alzheimer's disease. Therefore, we studied the elucidation of a common structural element necessary for the self-assembly of full-length tau using various physico-chemical methods. As the result, it was revealed that the C-H \cdots π interaction between the Ile308 and Tyr310 side chains in the third repeat of MBD is indispensable for the self-assembly of full-length tau. Moreover, we have determined the crystal structure of the Fab2r coexisted with its partial antigen peptide VQIINK and clarified the recognition mode of antigen peptide by the antigen. The detailed structural information will help to understand tau polymerization and the affinity maturation for inhibition of AD progress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：生物物理化学

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は初老期から老年期にかけて発症する進行性の認知症状を主徴とする神経変性疾患のひとつであり、高齢化が進む現代においてその病態の解明と治

療法の確立は大きな課題となっている。

微小管結合タンパク質の一種であるタウタンパク質は、神経細胞の骨組みを作り細胞内の物質輸送を担う微小管に結合し、その重合促進と安定化に働いている。しかしながら、

AD患者の脳内では、タウタンパク質が異常自己重合を起こし、PHF(paired helical filament)と呼ばれる不溶性線維を形成して神経細胞内に蓄積している。これは神経原線維変化と呼ばれ、認知症の重症度と相関を示し、アルツハイマー型認知症の病理学的所見の一つとされている。

PHFの形成は、タウタンパク質の異常なリン酸化やタウ遺伝子の点突然変異により引き起こされると考えられており、主に病理学的、形態学的、遺伝学的、生化学的立場から研究が進められ、タウタンパク質の異常性と病態、特に脳神経病理との関連についてはかなり解明されている。しかし対照的に、その病変の本体であるタウタンパク質のPHF形成機構については、世界中で活発な研究が展開されているにもかかわらず、統一的な結論が得られていないのが現状である。PHF形成機構の解明には、タウタンパク質の分子・原子レベルの物性についての知見を得ることが必要不可欠であることから、タウタンパク質本来の機能発現ドメインである反面、PHF形成にも大きく関与する微小管結合ドメイン(MBD)に着目し(Fig. 1)、それらを構成する各繰り返し配列の物性と自己重合能について検討し、いくつかの重要な知見を得た。

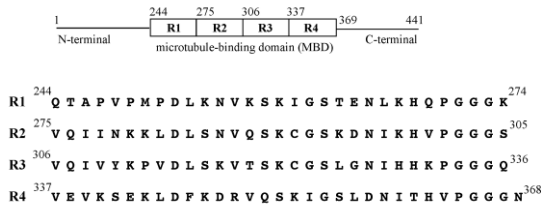


Fig. 1. タウタンパク質とアミノ酸配列

2. 研究の目的

現在までに得られた知見を基に、種々のMBD及び完全長タウタンパク質の変換体を遺伝子操作により作成し、蛍光、CDを始めたとする分光学的解析、X-線やNMRによる立体構造解析、分子動力学計算、結合実験などを駆使して、タウタンパク質が自己重合して不溶性のPHF構造に変化する機構を分子・原子レベルで解明し、重合開始の引き金となる構造部分を選択的に認識・結合してPHF形成を阻止する化合物を設計し、認知症治療薬の開発へ繋げることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) タウMBDの自己重合に重要なアミノ酸残基の同定

遺伝子操作を駆使することにより、MBDのさまざまな部位変換体を作成し、それらのフィラメント形成能と構造特性について、NMR溶液実験、蛍光強度測定、電子顕微鏡撮影

等により明らかにし、フィラメント形成に対する各リピートの働き、自己重合に重要なアミノ酸残基を明らかにする。

(2) 完全長タウタンパク質間の自己重合に重要なアミノ酸残基の同定

完全長タウタンパク質やその変換体を作成し、それらについて(1)と同様に、フィラメント形成能と構造特性について研究を行い、自己重合に重要なアミノ酸残基や構造特性を明らかにする。

(3) ポリフェノール化合物によるMBDの自己重合阻害作用と新規重合阻害物質の探索

我々は、赤ワインに多く含有されているポリフェノールであるシアニジン(Cy)、チアゾリン化合物であるメチレンブルー(MB)は、MBDのフィラメント形成を阻害するが、相互作用様式が異なることを蛍光やCD等の分光学的解析より明らかにしている。そこで、CyやMB以外の幾種類かのポリフェノール類とフェノチアジン系化合物を用いて、阻害効果と構造特性について解析を行い、相互作用している特定のアミノ酸配列あるいはアミノ酸を明確にする。

(4) MBDのリピート構造を特異的に認識する抗体とリピート構造複合体のX線結晶構造解析

タウタンパク質のPHF形成に重要に関わると考えられるMBD中のR2リピートが有する特定のアミノ酸領域を認識するモノクローナル抗体のFabフラグメントとR2リピートペプチド(VQIINK配列)との複合体X線結晶構造解析を行い、抗体のMBD認識部位を構造化学的に解析し、MBDを特異的に認識し結合することにより重合阻止能を有するペプチドや低分子有機化合物の開発に繋げる。

4. 研究成果

(1) タウMBDの自己重合に重要なアミノ酸残基の同定

MBD領域のR3に存在するVQIVYK配列は、MBDの自己重合に極めて重要であることをこれまでの研究で明らかにしている。そこで、VQIVYK配列のどのアミノ酸が重要であるかを明らかにする目的で、各アミノ酸をアラニン残基(Ala残基)に変換した変異体を作成し、それらの自己重合能をThioflavin S (ThS)を用いた蛍光強度測定、電子顕微鏡撮影などにより解析した結果、チロシン残基(Tyr残基)をAla残基に置換した4R-A変換体において、自己重合能が消失するという興味深い知見が得られた。そこで、自己重合能の解明と重合阻害機構の開発を目指し、Tyr残基の役割について詳細に検討した。Fig. 2に示す

4R-A を用いて、R1、R2 および R4 の同様部位に Tyr 残基を置換してそのフィラメント形成能を検討した結果、有意なフィラメント形成能を有するには及ばなかった。したがって、フィラメント形成には R3 の N 末端側の Tyr 残基の存在とその位置が重要であることが明らかとなった。

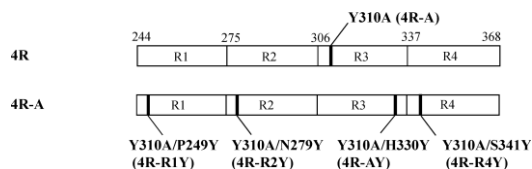


Fig. 2. 各種 Tyr 残基変換体

Tyr 残基が存在する R3 の N 末端領域である ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ は、両親媒性を保った extend 構造をとっているとされ、PHF 形成への高い寄与が示唆されている。そこで、この配列内において Tyr 残基の位置を変化させた変換体を作成し (Fig. 3)、Tyr 残基の位置的重要性ならびに ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ 配列の構造特性と自己重合機構の解明を目指した。

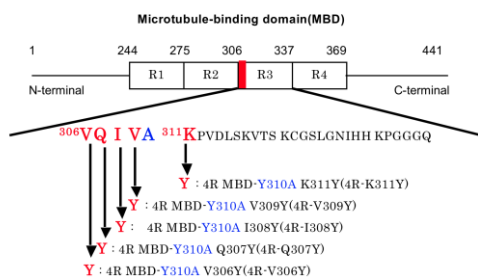


Fig. 3. Tyrosine 残基変換体のアミノ酸配列

Fig. 3 に示した Tyr 残基変換体について、ThS 蛍光強度測定を行い、フィラメント形成能を 4R と比較した結果 (Fig. 4)、4R に対し 4R V306Y、4R I308Y、4R V309Y 及び 4R K311Y は蛍光強度の上昇はあまり認められないことから、フィラメント形成能が著しく低下することがわかった。一方、4R Q307Y においては、蛍光強度が上昇し、フィラメント形成能を有していることがわかった。更に、電子顕微鏡によるフィラメントの形態観察においても、各変異体において蛍光強度測定と同様の差違が確認できた。十分成熟した線維状のフィラメントが観察できる 4R に対して、蛍光強度の上昇があまり認められなかった 4R V306Y、4R I308Y、4R V309Y 及び 4R K311Y は、伸びた線維状のフィラメントは観察されず、粒状でとどまっており、フィラメント形成能が低下していることがわかった。一方、蛍光強度の上昇が観察できた 4R Q307Y は 4R と比較し短い、短く伸びた線維状のフィラ

メントが多く観察でき、Tyr 残基は 310 番目以外に 307 番目に存在してもフィラメント形成能を有することがわかった (Fig. 5)。

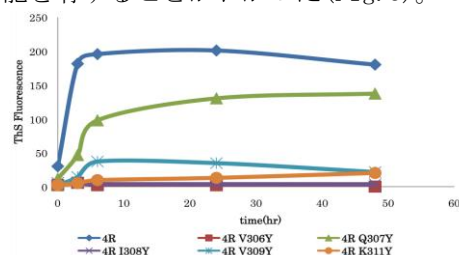


Fig. 4. 4R の Tyr 残基変換体のフィラメント形成能

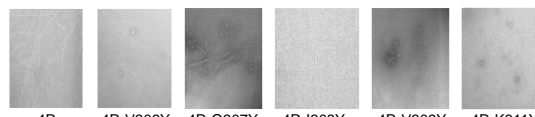


Fig. 5. Tyr 残基変換体のフィラメント形態

さらに、Tyr 残基の周辺残基の影響を調べる目的で、VQIVYK 配列の Tyr 残基以外を Ala 残基に置換した変換体の蛍光強度測定と電子顕微鏡によるフィラメント形成の確認を行った結果、Ile 残基を Ala 残基に置換した変換体において、蛍光強度は上昇せず、フィラメント形成も確認されなかった (Table 1)。これらのことより、Ile-308 と Tyr-310 の両アミノ酸残基の側鎖間で CH- π 相互作用が形成され、その結果 VQIVYK 領域の構造が安定化されることがフィラメント形成促進に寄与していると推測された。

Table 1. Comparison of ThS fluorescences and EM morphologies of 4RMBD and their mutants (25 nM)^{a,b}

Wild/Mutant	Relative fluorescence intensity (%)	EM morphology
4R	100	filament
Y310A	0	no granule and no filament
I308A	0	no granule and no filament
I308V	90	filament
I308Y/Y310I	0	no granule and no filament
Q307Y	300	filament+granule(+2)
Q307Y/Y310A	100	filament
Q307Y/V309A/Y310A	0	no granule and no filament

^aThe fluorescence intensities of mutants correspond to values relative to those of wild 4RMBD at 1 hr after initiating aggregation by addition of heparin. ^bEM morphology at 48 hr after initiating aggregation by addition of heparin

(2) 完全長タウタンパク質間の自己重合に重要なアミノ酸残基の同定

MBD において確認された結果が、完全長のタウタンパク質 (Full tau) においても確認されるかどうかを検証した。(1) で作製した変換体を Full tau においても作製し、それらのフィラメント形成能について、ThS 蛍光強度測定や電子顕微鏡測定などの分光学的解析により検討を行った。その結果、R3 の N 末端に存在するイソロイシンやチロシンという 1 つのアミノ酸残基をアラニンに変換するだけで、Full tau のフィラメント形成能が消失したことから (Table 2)、フィラメント形

成には Ile308 と Tyr310 が必要不可欠であり、それは Ile308 と Tyr310 の側鎖間において C-H... π 相互作用を形成することにより、³⁰⁶VQIVYK³¹¹ 配列の構造が安定化されることに起因していることを明らかにした (Fig. 6)。この結果から、認知症治療薬・予防薬の開発には、C-H... π 相互作用を阻害する分子の設計が有用であると考えられる。

Table 2. Comparison of ThS fluorescences and EM morphologies of 4Rtau and their mutants (25 μ M)^a

Wild/Mutant	Relative fluorescence intensity (%)	EM morphology
4Rtau	100	filament
I308A	0	no granule and no filament
I308V	40	short filament
Y310A	0	no granule and no filament
Y310W	100	filament
I308Y/Y310I	0	no granule and no filament
Q307Y	300	granule(+2)
Q307Y/Y310A	0	no granule and no filament
Q307Y/V309A/Y310A	10	no granule and no filament

^aThe fluorescence intensities of mutants correspond to the values relative to those of wild 4Rtau at 1 hr after initiating aggregation by addition of heparin. ^bEM morphology at 48 hr after initiating aggregation by addition of heparin.

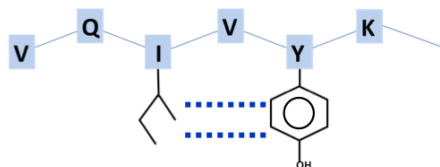


Fig. 6. フィラメント形成能における C-H... π 相互作用の重要性

(3) ポリフェノール化合物による MBD の自己重合阻害作用と新規重合阻害物質の探索

これまでの研究において、赤ワインに多く含有される cyanidin が著しい阻害作用を有することが確認された。また、類似構造を有するフェノチアジン系の化合物であるメチレンブルー (MB) も、cyanidin 同様に強い重合阻害効果が確認された。そこで、我々が日常摂取する食物に含まれる物質のうち、これらと類似の骨格を有する化合物に着目し、阻害効果と構造特性について解析を行った (Fig. 7)。その結果、ポリフェノール類では、cyanidin のみに重合阻害効果が確認され、catechin と epicatechin では阻害効果が確認されなかった。これらの構造を比較すると、完全な平面構造をとる cyanidin に対して、catechin と epicatechin は立体構造を有していることから、この構造の違いが阻害効果の有無と関係することが明らかとなった。同様な平面構造であるフェノチアジン骨格を有する化合物についても、検討を行った。既に強い阻害効果を確認している MB に対して、thionin は MB と同様の強い効果を有していたが、同じ平面構造を有しているが 10 位の N に置換基が導入された chlorpromazine は、全く阻害効果を示さなかった。これらの結果から、化合物の平面構造や置換基の種類など

の構造特性が、重合阻害効果と大きく関係することが明らかとなった。さらに、thionin より強い重合阻害活性を有する物質としてシコニンの発見に成功した。現在、タウタンパク質の自己重合に対するこれら化合物の阻害機構について、NMR 溶液実験および分光化学的手法を用い解析を行うとともに、医薬品への応用を目指して、分子改良を検討している。

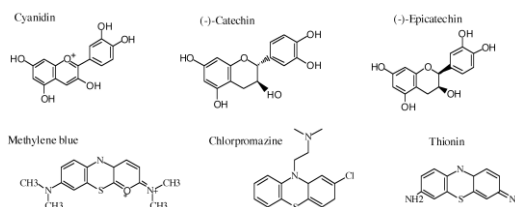


Fig. 7. ポリフェノール、フェノチアジン系化合物

(4) MBD のリピート構造を特異的に認識する抗体とリピート構造複合体の X 線結晶構造解析

タウタンパク質の自己重合に重要に関与している MBD 中に存在する R2 配列の特定アミノ酸配列 (VQIINK) を特異的に認識して作用する抗体を作成し、重合阻害効果の評価、及び Fab 抗体の X 線結晶構造解析を行った。R2 認識抗体は、それを産生するマウスハイブリドーマ細胞の上清を大量培養し、ProteinG カラムを用いることで高純度に精製することができた。タウタンパク質に対する抗体の重合阻害評価は ThS 蛍光強度測定により行い、特異的結合については表面プラズモン解析を用いることで、作成した抗体は R2 を特異的に認識し、タウタンパク質の自己重合を強く抑制していることを明らかにした。

次に、R2 抗体とタウタンパク質との相互作用様式を解明するため、複合体の結晶化を行った。抗体はパパインで Fab フラグメントに切断し、抗体認識部位の一部 6 残基 (VQIINK) ペプチドを作製した。これらをハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った結果、Fab-VQIINK 複合体の結晶化に成功し (Fig. 8)、X 線回折において 2.0 Å 分解能のデータが得られた。それらのデータを用いた構造解析により Fab と VQIINK 複合体の立体構造が得られた (Fig. 9)。



PEG3350 : 18%
Glycerol : 10%
NH4I : 0.1M
Fab2r3 濃度 : 11mg/ml
Buffer : 10mM Tris-HCl pH8.0

Fig. 8. Fab2r3-VQIINK 複合体結晶

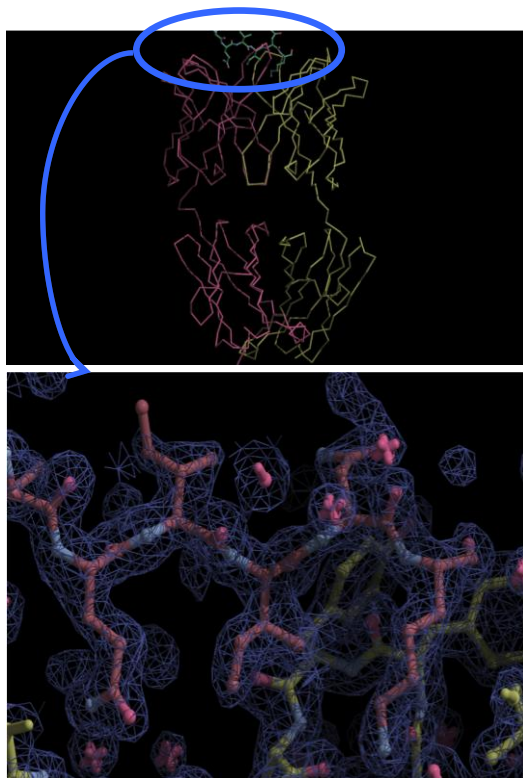


Fig. 9. Fab2r3-VQIINK 複合体構造

現在、詳細な相互作用解析を行っているが、抗体との特異的な認識機構を原子レベルで明らかにすることが出来れば、この情報を基に、新規タウタンパク質の自己重合阻害剤の開発に役立てることが期待出来る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- ① Sogawa K, Okuda R, In Y, Ishida T, Taniguchi T, Minoura K, Tomoo K. (2012) C-H... π interplay between Ile308 and Tyr310 residues in the third repeat of microtubule binding domain is indispensable for self-assembly of three- and four repeat tau. *J Biochem* in press. 査読有
 - ② Sogawa K, Okuda R, Minoura K, In Y, Ishida T, Taniguchi T, Tomoo K. (2012) C-H- π interaction between I308 and Y310 residues is required for self assembly of full length tau. *Peptide Science* 2011. **48**, 165-168. 査読有
 - ③ Naruto K, Minoura K, Okuda R, Taniguchi T, In Y, Ishida T, Tomoo K. (2010) Interplay between I308 and Y310 residues in the third repeat of microtubule-binding domain is essential for tau filament formation. *FEBS Lett.* **584**, 4233-6. 査読有 DOI:10.1016/j.febslet.2010.09.012
 - ④ Nishiura C, Takeuchi K, Minoura K, Sumida M, Taniguchi T, Tomoo K, Ishida T. (2010) Importance of Tyr310 residue in the third repeat of microtubule binding domain for filament formation of tau protein. *J. Biochem.* **147**, 405-14. 査読有 DOI:10.1093/jb/mvp181
 - ⑤ Minoura K, Takeuchi K, Nishiura C, Naruto K, Sumida M, Taniguchi T, Tomoo K, Ishida T. (2010) Structural role of tyrosine residue in the third repeat of microtubule binding domain for filament formation of tau protein. *Peptide Science* 2009. **46**, 227-230. 査読有
- 〔学会発表〕(計 14 件)
- ① 曾川甲子郎、奥田良平、箕浦克彦、尹康子、友尾幸司、石田寿昌、Tau タンパク質の自己重合における Ile308 と Tyr310 が形成する CH- π 相互作用の重要性、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日、札幌
 - ② 須佐匡樹、土屋孝弘、箕浦克彦、尹康子、友尾幸司、谷口泰造、辻坊裕、石田寿昌、Tau タンパク質の自己凝集抑制能を有する特異的認識抗体の作成とその複合体結晶化による構造機能解析、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日、札幌
 - ③ 曾川甲子郎、奥田良平、箕浦克彦、尹康子、石田寿昌、谷口泰造、友尾幸司、CH- π interaction between I308 and Y310 residues is required for self assembly of full length tau、第 48 回ペプチド討論会、2011 年 9 月 28 日、札幌
 - ④ Katsuhiko Minoura, Keiko Naruto, Ryouhei Okuda, Taizo Taniguchi, Yasuko In, Toshimasa Ishida, and Koji Tomoo, Importance of CH- π interaction between I308 and Y310 residues in the third repeat of microtubule binding domain for tau filament formation, 5th International Peptide Symposium, 2010.12.5, Osaka.
 - ⑤ 奥田良平、鳴戸佳子、箕浦克彦、尹康子、谷口泰造、友尾幸司、石田寿昌、Full length tau の自己重合における C-H... π 相互作用の重要性について、第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2010 年 10 月 30 日、大阪
 - ⑥ 木挽友博、土屋孝弘、箕浦克彦、尹康子、友尾幸司、谷口泰造、辻坊裕、石田寿昌、Tau タンパク質の自己凝集抑制能を有する特異的認識抗体の作成とその構造機能解析、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 30 日、岡山
 - ⑦ 鳴戸佳子、箕浦克彦、尹康子、谷口泰造、

友尾幸司、石田寿昌、Tau タンパク質微小管結合ドメイン(MBD)の自己重合における Tyrosine 残基と周囲のアミノ酸残基の重要性について、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 30 日、岡山

- ⑧ 箕浦克彦、竹内健悟、西浦千里、鳴戸佳子、澄田美保、谷口泰造、友尾幸司、石田寿昌、Structural role of tyrosine residue in the third repeat of microtubule binding domain for filament formation of tau protein、第 46 回ペプチド討論会、2009 年 11 月 5 日、北九州

6. 研究組織

(1) 研究代表者

箕浦 克彦 (MINOURA KATSUHIKO)

大阪薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10278591

(3) 連携研究者

友尾 幸司 (TOMOO KOJI)

大阪薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70257898