

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651215

研究課題名（和文） タウタンパク質によるアミロイド繊維形成を支配するアミノ酸リン酸化コードの探求

研究課題名（英文） Possible phosphorylation code for the fibril formation of tau protein

研究代表者

森井 孝 (MORII TAKASHI)

京都大学・エネルギー理工学研究所・教授

研究者番号：90222348

研究成果の概要（和文）：

アルツハイマー病患者の神経細胞内で観察される繊維状凝集物の主成分は、過剰なリン酸化を受けたタウタンパク質である。タウ凝集体形成の核となるアミノ酸配列の特定位置をリン酸化したペプチドを系統的に合成し、それらの凝集特性を解析した結果、特定位置のアミノ酸リン酸化が繊維状凝集体形成を促進もしくは阻害することが明らかになった。この結果は、タウのリン酸化の組み合わせによって凝集体形成が促進もしくは阻害される『タウ・リン酸化コード』が存在することを支持する。

研究成果の概要（英文）：

Hyperphosphorylated forms of tau protein are the main component of paired helical filaments (PHFs) of neurofibrillary tangles in the brain of Alzheimer's disease patient. However, the detailed mechanisms of how the individual phosphorylation event induces the formation of PHFs remain to be established. Tau derived phosphorylated peptides have been utilized to understand the effect of phosphorylation on fibrillation of tau and showed the first example that the position of charged residue plays a critical role for the amyloid fibrillation of tau.

We have focused on the fibril-forming sequence of tau, VQIVYK (PHF6), that possesses serine or lysine at its N-terminal in the native isoform of tau, and synthesized the PHF6 derived phosphorylated serine and/or tyrosine containing peptide. Interestingly, the peptide phosphorylated at the N-terminal serine residue showed remarkably low fibrillation propensity as compared to the peptide phosphorylated at tyrosine that possessed the same net-charge. Our results indicate that the role of hyperphosphorylation for the fibril formation of tau should not be considered only from the point of view of altering the net charge of protein. The phosphorylation would afford many variation of tau that could define a "tau-phosphorylation code" for the amyloid-type fibril formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：活性発現の分子機構、ペプチド、アミロイド、タウタンパク質、リン酸化、凝集体、繊維状凝集体、アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病患者の神経細胞内では神経原繊維変化と呼ばれる繊維状凝集物が観察される。この繊維状凝集物の主成分は最大 45 箇所がリン酸化を受けたタウタンパク質であることから、過剰なリン酸化はタウの繊維形成において重要な因子であることが予想される。特定位置のアミノ酸リン酸化は、そのアミノ酸の化学的性質を変化させるため、タウ本来の機能を制御するだけでなく、アミロイド形成においても凝集特性に大きく影響する可能性が高い。しかし、過剰リン酸化を受けたタウが均一な組成ではないこと、凝集体形成は単一箇所のリン酸化により支配されるものではないことから、リン酸化タウの繊維形成に関する分子機構は明らかではない。

タウが形成する凝集体の核となるのは4つの繰り返し配列からなる Microtubule binding domain (MBD)である。タウ MBDには数多くのリン酸化部位が報告されているが、どの箇所がリン酸化されるとタウの凝集体形成が促進もしくは抑制されるかについての知見はない。特定アミノ酸のリン酸化がタウの凝集特性を支配するのではなく、ある位置のリン酸化は凝集体形成を促進するが、別の箇所と同時にリン酸化した場合には凝集体形成を強く阻害するといった、凝集体形成においてリン酸化の組み合わせ効果が存在する可能性が高い。

2. 研究の目的

リン酸化タウタンパク質の繊維状凝集体形成におけるアミノ酸リン酸化の役割を明らかにする。タウ MBD 繰り返しアミノ酸配列に存在する凝集体形成を担う「凝集性コアペプチド」に注目して、特定位置のアミノ酸をリン酸化したペプチドおよび立体的な配置を制御したペプチドオリゴマーを系統的に合成する。ペプチドの凝集特性と凝集体の形状を解析することにより、

(1)特定位置のアミノ酸リン酸化が繊維状凝集体形成に及ぼす影響

(2)異なるリン酸化アミノ酸配列間の相互作用による繊維状凝集体形成

を明らかにし、リン酸化の組み合わせによる凝集体形成則『タウ・リン酸化コード』を探求する。

3. 研究の方法

タウタンパク質の凝集コアであると考えられている繰り返しアミノ酸配列に由来する SPHF ペプチド(SVQIVYK)および CORE ペプチド(VQIINKKLDLSNVQS)を合成する。脳内でリン酸化を受ける可能性が示唆されるセリンとチロシンをリン酸化した SPHF および CORE ペプチド誘導体を系統的に作

製し、リン酸化の位置と数の違いによるペプチドの凝集特性および繊維形状を評価するさらに、リン酸化した SPHF および CORE ペプチド誘導体を特定の配置で同種または異種二量化したペプチドをタウ凝集体コアモデルとして合成し、それらの凝集特性と繊維形状を評価する。

(1)位置特異的にリン酸化したタウ凝集性コアペプチドによるアミロイド凝集体形成の解析

(2)位置特異的にリン酸化したタウ凝集性コアペプチドによるアミロイド凝集体形成の解析

(3)二量体形成による凝集性ペプチドの配向制御：タウ繰り返し配列中の凝集コア配列がどのように配向してアミロイド繊維を形成するかを探る。

4. 研究成果

【平成 23 年度】

タウ凝集体を形成する MBD 中のコア配列のひとつと予測される VQIVYK 配列の N 末端には生体内でリン酸化を受ける可能性が示唆される 305 位セリンが存在する。

セリンを付加した SPHF ペプチド、305 位セリンと 310 位のチロシンをそれぞれリン酸化した SPHF 誘導体ペプチド (pSPHF, SPHFpY)、そしてタウのスプライシング・バリエーションに対応した 305 位にリシンが存在する KPHF および KPHFpY を合成した。また、繰り返しアミノ酸配列に存在するコア配列 VQIINKKLDLSNVQS (CORE ペプチド) をもとにして、生体内でリン酸化を受けることが示されているセリン残基 (下線部) をリン酸化したペプチドを合成した。これらを用いて、各ペプチドのアミロイド繊維形成特性を超遠心による凝集体形成臨界濃度測定、構造を蛍光・赤外分光法、円二色性スペクトルにより解析した。各ペプチドによって形成された繊維の形状・サイズを電子顕微鏡 (TEM) ・原子間力顕微鏡 (AFM) により観察する条件を決定した。

【平成 24 年度】

アルツハイマー病患者の神経細胞内に蓄積するアミロイド凝集体の主成分は、過剰にリン酸化されたタウタンパク質である。しかし、リン酸化タウの『どのアミノ酸がリン酸化されることによってアミロイド凝集体形成が引き起こされるのか』は謎に包まれている。

タウの凝集体形成に関与するアミノ酸配列の特定位置をリン酸化したペプチドおよび立体的な配置を制御したリン酸化ペプチドオリゴマーを系統的に合成し、それらの凝集特性を解析した。

タウ凝集体を形成するうえで重要な

SVQIVYK 配列の N 末端 (305 位) セリンは生体内でリン酸化を受ける可能性が示唆される。305 位セリンを含むペプチド、305 位セリンと 310 位のチロシンをそれぞれリン酸化した SPHF 誘導体ペプチド (pSPHF, SPHFpY)、そしてタウのスプライシング・バリエーションに対応した 305 位にリシンが存在する KPHF およびそのリン酸化体 KPHFpY を合成した。また、同じく凝集体形成に重要な VQIINKKLDLSNVQS の生体内でリン酸化を受けることが示されているセリン残基をリン酸化したペプチド (CORE1S, CORE 1pS) を合成した。

各ペプチドのアミロイド繊維形成特性を凝集体形成臨界濃度測定、構造を蛍光・赤外分光法、円二色性スペクトル、繊維の形状・サイズを電子顕微鏡 (TEM)・原子間力顕微鏡 (AFM) により観察した。これらの結果をもとにして、pSPHF、SPHFpY、KPHF および KPHFpY の凝集特性と凝集体の形状を明らかにして、その結果を *Biochemistry* 誌に発表した。

また、リン酸化された SPHF および CORE 誘導体ペプチドを組み合わせたペプチド二量体は、必ずしも高い凝集体形成能は示さなかった。これらの結果から、「凝集特性を決定する複数位置のリン酸化の組み合わせ「タウ・リン酸化コード」の存在が示唆された。

【今後の展開・波及効果】

今後は、タウ繰り返し配列中の凝集コア配列がどのように配向してアミロイド繊維を形成するかについて興味が集まる。本研究で試みた、リン酸化された SPHF および CORE 誘導体ペプチドを組み合わせたペプチド二量体を展開することにより、タウがさまざまな組み合わせでリン酸化された状態での、同一タウ分子内もしくはタウ分子間でのタウ MBD 内の凝集コア配列間相互作用をモデル化することが可能になる。

本研究で明らかになった「凝集性が高いもしくは低いコードを持つリン酸化タウペプチド」により、タウのアミロイド凝集体形成が促進または阻害されるかを検証することにより、「タウ・リン酸化コード」に関する研究がさらに展開されると期待出来る。

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 1 件)

1. Inoue, M.; Konno, T.; Tainaka, K.; Nakata, E.; Yoshida, H.; Morii, T. "Positional effects of phosphorylation on the stability and the morphology of tau-related amyloid fibrils."

Biochemistry, 査読有, 2012, 51, 1396-1406. (DOI: 10.1021/bi201451Z)

〔学会発表〕 (計 1 件)

1. 馬場 あゆみ、森井 孝

「2 種類のタウタンパク質凝集性ペプチドによるアミロイド繊維形成の評価」

日本化学会第 93 春季年会、2013 年 03 月 22 日～2013 年 03 月 25 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス

〔図書〕 (計 1 件)

1. 中田栄司、森井 孝

「タンパク質ベースの蛍光バイオセンサー」、第 8 章、pp92-100、「ここまですすんだバイオセンシング・イメージング」日本化学会編、2012 年、化学同人

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

研究室ホームページ :

http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/material/a-12_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森井 孝 (MORII TAKASHI)

京都大学・エネルギー理工学研究所・教授

研究者番号 : 90222348

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号：