

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24241076

研究課題名(和文) タウ蛋白不安定化剤による新しいタウオパチー治療戦略の構築

研究課題名(英文) Identification of a small molecule that induces autophagy-mediated degradation of TAU

研究代表者

萩原 正敏 (Hagiwara, Masatoshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10208423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,500,000円

研究成果の概要(和文)：タウオパチーは、微小管結合蛋白質タウが神経細胞内に多量に貯留する神経変性疾患の総称であり、アルツハイマー病も含まれている。本研究では、タウオパチーに対する治療薬の創製を目的として、タウ蛋白量を定量する細胞評価系を構築し、タウ蛋白質の不安定化を誘導する低分子化合物の探索を行った。その結果、タウ蛋白質のオートファジー依存的分解を誘導する新規化合物FIT-068の同定に成功した。FIT-068は、野生型タウのみならず、遺伝子疾患として報告されている変異を有するタウに対しても不安定化を誘導したことから、タウ遺伝子変異に起因する家族性認知症に対しても有効性を示す可能性があると期待される。

研究成果の概要(英文)：Aberrant accumulation of TAU has been recognized as one of characteristic features in neurodegenerative diseases known as tauopathies, which include Alzheimer's disease. Deletion of Tau-encoding Mapt in mice prevented Amyloid-beta-mediated deficits, suggesting that reducing Tau protein confers resistance to Amyloid-beta-mediated neurodegeneration. In this study, we developed a cell-based assay system based on doxycycline-driven bicistronic expression of mCherry and TAU fused with EGFP, in order to evaluate effects of molecules on TAU protein. We identified a small molecule that induces degradation of TAU. This compound, FIT-068, decreased not only endogenous, but also mutant TAU proteins harboring genetic mutations of hereditary tauopathies. FIT-068-mediated decrease of TAU was prevented by pre-treatment with an inhibitor of lysosomal degradation, suggesting that FIT-068 induces autophagy-mediated degradation of TAU. FIT-068 is thus a promising drug candidate for treating tauopathies.

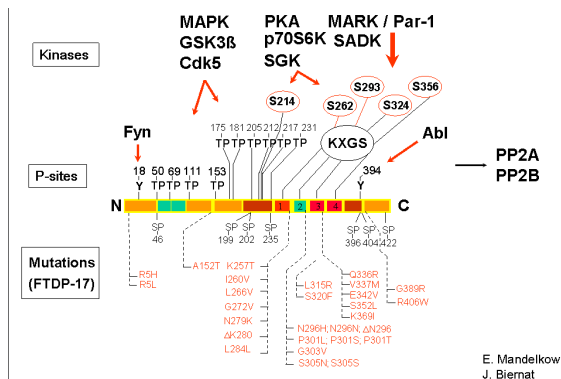
研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：タウオパチー アルツハイマー病 化合物 スクリーニング タウ リン酸化酵素 リン酸化酵素 急性ストレス

1. 研究開始当初の背景

タウオパチーは、難溶性化したタウ蛋白質が螺旋状の線維を形成し、神経細胞内で「神経原線維のもつれ」として多量に貯留する神経変性疾患の総称である。タウは微小管付随蛋白質であり、微小管の重合促進と安定化に働く。アルツハイマー病をはじめとした様々な病態がタウオパチーに含まれる。

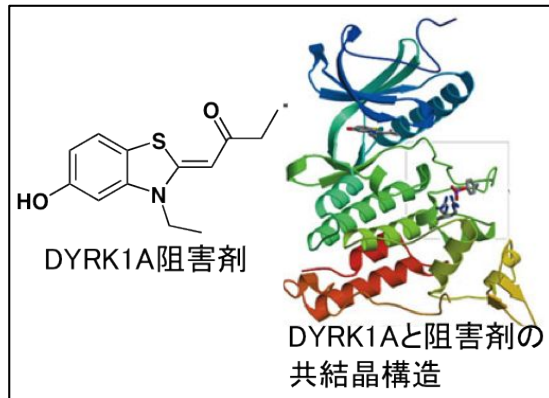
タウ蛋白質の難溶化・凝集線維形成の原因は、タウの過剰リン酸化と考えられている。これまでにタウ蛋白質をリン酸化する酵素が同定・報告されている (Stoothoff WH et al. Biochim Biophys Acta. 2005: 下図)。



我々は、これらのリン酸化酵素のうち、DYRK1A (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A) に注目して研究を行ってきた。DYRK1A は、タウ蛋白質の 212 番目のトレオニン残基のリン酸化を触媒する。この 212 番目のトレオニン残基のリン酸化を足掛かりとして、GSK3 などによってさらにリン酸化されることで、過剰リン酸化タウ蛋白質が生成される。DYRK1A 遺伝子は、第 21 番染色体にコードされており、ダウン症候群の方では、この染色体のトリソミーにより、DYRK1A 遺伝子の発現が約 1.5 倍に亢進している (Dowjat WK et al. Neurosci Lett. 2007)。この DYRK1A 遺伝子発現の亢進は、ダウン症候群でのアルツハイマー病の高率な発症と関連すると考えられている。ダウン症患者は通常は 60 代以降で罹患するアルツハイマー病を 40 代で発症することから、第 21 番染色体にコードされる DYRK1A 遺伝子の過剰発現が、アルツハイマー病発症のトリガーであると考えられている (Woods YL et al. Biochem J. 2001)。

DYRK1A 発現亢進によるアルツハイマー病の発症を抑制することを目的として、我々は DYRK1A のリン酸化酵素活性を阻害する低分子化合物を創製してきた。我々が開発した低分子化合物 INDY は、DYRK1A のリン酸化活性を強力に阻害し、さらに DYRK1A 過剰発現によって引き起こされるツメガエル胚発生での神経系の形成異常を完全に是正する活性を有していた (Ogawa et al. Nat. Commun. 2010, 右上図)。

近年、マウスにおいてタウ遺伝子を破壊し、タウ蛋白質量を減らすことで、アミロイド



によって誘発されるアルツハイマー病の発症を抑制できることが報告された (Roberson ED et al. Science 2007, Ittner EM et al. Cell 2010)。またタウ蛋白質の発現量を任意に調節できる遺伝子改変マウスを用いた解析から、タウ蛋白質の凝集体が形成されてアルツハイマー病を発症しても、その後、タウ蛋白質の発現量を低下させることで認知機能が回復することが示された (SantaCruz K et al. Science 2005)。また、凝集していない可溶性のタウ蛋白質の量を増加させるだけで、神経変性疾患を発症させられることが報告されており (de Calignon A et al. Nature 2010) タウ蛋白質の量を減らすことがアルツハイマー病を含むタウオパチーの予防や治療にとって有効であると考えられる。

我々は、DYRK1A 阻害剤である INDY が、タウ蛋白質の過剰リン酸化を阻害するだけでなく、タウ蛋白質の不安定化も促すことを見出していた (未発表データ)。この結果は、タウ蛋白質の不安定化を誘導する低分子化合物を創製することが可能であることを示唆している。そこで本研究では、タウ蛋白質の不安定化を誘導する新規化合物の探索を行った。さらに得られた化合物のアルツハイマー病を含むタウオパチー治療薬としての可能性を検討するため、タウオパチーを模倣したモデル動物実験系の確立を目指した。

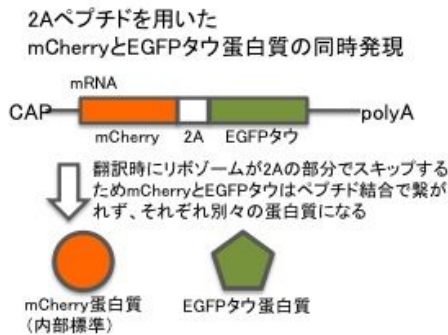
2. 研究の目的

本研究では、タウ蛋白質を不安定化する化合物をセルベース・スクリーニングにより同定し、その化合物の薬効をタウオパチー疾患モデルマウスを用いて検証することで、タウオパチーに対する新しい治療薬を創製することを目指した。

3. 研究の方法

(1) タウ蛋白質を不安定化する化合物のセルベース・スクリーニング系の構築

タウ蛋白質を不安定化する低分子化合物のスクリーニングでは、化合物の転写・翻訳への二次的な影響を極力排除する必要がある。そこで我々は、赤色蛍光蛋白質 mCherry と EGFP タウ (緑色蛍光蛋白質 EGFP とタウの融合蛋白質) を 2A ペプチドで連結し、両者を同時に発現する細胞を樹立した (次ページ左上図)。



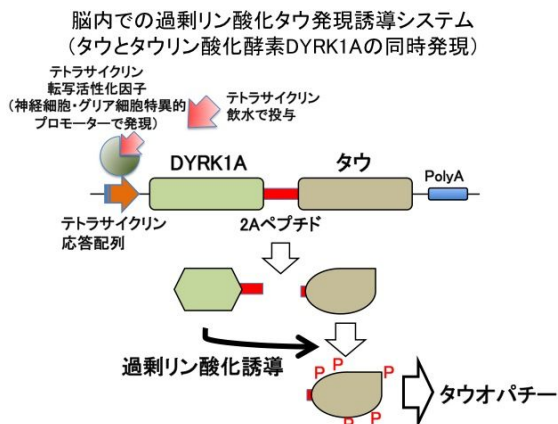
これにより細胞内では、mCherry と EGFP タウ融合蛋白質がそれぞれ独立に発現する。タウ蛋白質を不安定化する低分子化合物は、mCherry 蛋白質には影響を与えず、EGFP タウ蛋白質量を減らすと考えられるため、mCherry の赤色蛍光を内部標準とし EGFP タウの緑色蛍光を定量解析することで、タウ蛋白質を不安定化させる化合物のスクリーニングが可能なセルベース・システムを構築した。

さらに、このシステムを用いて、化合物スクリーニングを行い、タウ蛋白質を不安定化する化合物の探索を進めた。具体的には、研究室保有の低分子化合物ライブラリを対象として、mCherry と EGFP タウの量比を蛍光またはウエスタンブロットにより計測し、量比を変動させる化合物を探索した。さらに得られたヒット化合物からの合成展開を進めた。

また、得られた化合物の作用機序の解明や、取得化合物の疾患適用範囲の検討を目的として、タウ遺伝子にこれまでに報告された疾患関連変異を導入し、化合物が有効性を示すタウ変異体の同定を行った。

(2) 過剰リン酸化タウ蛋白質発現によるタウオパチーモデル動物の作製

タウオパチーモデル動物を作製するため、タウ蛋白質とタウリン酸化酵素 DYRK1A を 2A ペプチドで連結し同時に発現させるベクターを構築した。遺伝子発現制御には、テトラサイクリン転写活性化因子を用いることで、神経細胞への特異的な発現誘導を狙った。このベクターを用いて遺伝子改変マウスの作製を行った(下図)。



さらに遺伝子改変マウスに頼らないタウオパチー発症モデルマウスの構築を進めた。具体的には、急性ストレスをマウスに負荷することにより脳内でのタウリン酸化を亢進させるモデル動物系の構築を行った。

(3) 過剰リン酸化タウ蛋白質発現マウスの病態解析

項目(2)にて確立したモデル動物を用いて、項目(1)にて開発した低分子化合物の評価を行った。具体的には、化合物の医薬品候補化合物としての有効性を検証するための、体内動態解析や簡単な安全性試験などを行った。血中安定性、脳移行性についてのデータを取得し、それらを参考に、投与方法を検討した。化合物投与による脳内のタウ蛋白質量の定量定期的な解析を行った。

4. 研究成果

(1) タウ蛋白質を不安定化する化合物のセルベース・スクリーニング系の構築

「3. 研究の方法」に記載の通り、mCherry と EGFP タウを同時に発現する細胞株を樹立した。この細胞では、mCherry と EGFP タウがそれぞれ独立に発現することを確認した。この細胞株を用いて、当研究室保有の低分子化合物ライブラリを対象としたセルベース・スクリーニングを行った。その結果、タウ蛋白質を減少させる幾つかの化合物を見出した。その中でも新規化合物 FIT-068 は、特に強い活性を有していた。FIT-068 は、培養細胞において、nM オーダーで EGFP タウ蛋白質の不安定化を誘導した。FIT-068 は、nM オーダーでは、mCherry の発現を全く抑制しないことから、タウ蛋白質に対して特異的に作用していると考えられた。また、培養神経芽腫細胞株 SH-SY5Y においても、FIT-068 は nM オーダーにて内在性タウ蛋白質の減少を誘導した。さらに、FIT-068 の構造類縁化合物を合成し、構造と活性の相関を解析した結果、タウの不安定化に關与する特徴的な官能基の同定に成功した。

タウ蛋白質は、細胞内においてプロテアソームやオートファジーによって分解されることが報告されている。我々は、どちらの経路が FIT-068 依存的なタウ蛋白質の分解に關与しているかを検討した。その結果、FIT-068 はオートファジー経路を利用して、タウ蛋白質の分解を誘導していることを見出した。FIT-068 は、オートファジー全般を活性化している訳ではなかったため、FIT-068 はタウ蛋白質のオートファジー依存的な分解を選択的に誘導していると考えられる。

FIT-068 が効果を示すタウオパチーの疾患範囲を検討するため、これまでに遺伝病として報告されているタウ遺伝子の変異を導入した EGFP タウ発現細胞を樹立した。その結果、FIT-068 が効果を示すタイプのタウ遺伝子変異の他に、効果を示さなくなるタイプの変異があることが明らかとなった。例えば、

第 17 番染色体に連鎖する家族性前頭側頭型認知症パーキンソンニズム FTDP-17 の遺伝子変異 (R406W) を有するタウでは、当該化合物による不安定化効果が強く現れることが明らかとなった。他の遺伝性疾患に関与する変異では、不安定化効果が全く見られないものも見出された。これらの結果は、当該化合物の標的分子が、タウ遺伝子変異による疾患発現メカニズムと関係していると考えられる。標的分子は未知であるため、この分子を同定することで、タウオパチーに対する新規治療標的を提案できると期待される。一方、開発した化合物は、R406W 変異を有するタウには効果的に作用することから、FTDP-17 に起因するタウオパチーに対する治療薬となる可能性がある。今後、FTDP-17 モデルマウスなどを用いた検討を進めることにより、治療戦略の構築が可能になると期待される。

(2) 過剰リン酸化タウ蛋白質発現によるタウオパチーモデル動物の作製

タウ蛋白質をタウリン酸化酵素 DYRK1A を 2A ペプチドで連結した遺伝子発現ベクターをマウス受精卵にマイクロインジェクションし、複数のマウス個体を得た。ゲノタイプを決定し、得られた遺伝子改変マウスを解析したところ、タウオパチー様の表現型を示した遺伝子改変マウスは、そのほとんどが様々な異常により、致死となった。認められた異常としては、腫瘍、皮膚のただれ、発作などの行動異常、脱腸が目立って観察された。

このような状態では、病態解析は難しいと考え、遺伝子改変に頼らないタウオパチーモデルマウスの検討を行った。具体的には、マウスに対して急性ストレスを負荷する実験系を構築した。急性ストレスとして、マウスに対する冷水負荷を用いた。この実験系では、冷水中でマウスに強制水泳をさせることで、急性ストレスを負荷している。この急性ストレス負荷によって、一過的にマウスの脳内で 212 番目のトレオニンのリン酸化が引き起こされ、その結果として過剰リン酸化を惹起することに成功した。本モデルでは、リン酸化タウの亢進に加え、タウ蛋白質そのものの増加も認められた。本モデルは、タウを不安定化する化合物の評価系として活用できると期待される。

(3) 過剰リン酸化タウ蛋白質発現マウスの病態解析

上記ストレス負荷モデルを用いて、FIT-068 の有効性を検証した。具体的には、FIT-068 を生理食塩水や界面活性剤を含む溶媒に溶解し、マウスの皮下に注射により投与した。全身に化合物を循環させるため、約 30 分待ち、その後、マウスに対して急性ストレスを負荷した。ストレス負荷後、マウスの脳を摘出し、その抽出液を調整し、SDS-PAGE と Western blot によりタウ蛋白質のリン酸化を解析した。しかしモデルマウスへの FIT-068

の投与では、ストレス負荷によって亢進するタウリン酸化を抑制することは出来なかった。我々は、この原因が化合物の体内動態にあると考え、質量分析装置を用いて当該化合物の体内動態解析を行った。その結果、投与後 30 分から 90 分で脳内濃度が約 $1 \mu\text{M}$ とそれほど高くないことが明らかとなった。

(4) まとめ

本研究では、タウ蛋白質不安定化剤による新しいタウオパチー治療戦略の構築を目指し、細胞内のタウ蛋白質の量を定量的に評価するための実験系を構築し、その系を用いて、我々の保有する低分子化合物ライブラリから、タウ蛋白質の不安定化を誘導する新規低分子化合物 FIT-068 を発見した。FIT-068 は培養細胞において nM オーダーでタウ蛋白質を不安定化する活性を有していた。しかし、モデルマウスを用いた検討では、当該化合物は脳内のタウ蛋白質を不安定化することはなかった。この原因が培養細胞と脳神経の違いである場合、その差異を研究することで、神経でタウが蓄積する原因を解明できると期待される。また当該化合物の薬物動態が原因である可能性も考えられるため、薬物動態の良い化合物の開発を目指した構造展開も順次検討する。これまでに得られたタウ不安定化誘導化合物の開発における基礎研究の成果は、学術論文として発表するため、投稿の準備を進めている。

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 11 件)

Yoshida M, Kataoka N, Miyauchi K, Ohe K, Iida K, Yoshida S, Nojima T, Okuno Y, Onogi H, Usui T, Takeuchi A, Hosoya T, Suzuki T, Hagiwara M.
Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有
112(9) 2015 2764-2769
DOI:10.1073/pnas.1415525112.

Kuwasako K, Takahashi M, Unzai S, Tsuda K, Yoshikawa S, He F, Kobayashi N, Güntert P, Shirouzu M, Ito T, Tanaka A, Yokoyama S, Hagiwara M, Kuroyanagi H, and Muto Y.
RBFOX and SUP-12 sandwich a guanine base to form a stable complex and regulate tissue-specific splicing. Nat. Struct. Mol. Biol. 査読有 21(9) 2014 778-786
DOI:10.1038/nsmb.2870.

Yamamoto M, Onogi H, Kii I, Yoshida S, Iida K, Sakai H, Abe M, Tsubota T, Ito N, Hosoya T, and Hagiwara M. CDK9 inhibitor FIT-039 prevents replication of multiple DNA viruses. J Clin Invest. 査読有 124(8) 2014 3479-3488
DOI:10.1172/JCI173805

Kurihara T, Sakurai E, Toyomoto M, Kii I, Kawamoto D, Asada T, Tanabe T,

Yoshimura M, Hagiwara M, Miyata A. Alleviation of behavioral hypersensitivity in mouse models of inflammatory pain with two structurally different casein kinase 1 (CK1) inhibitors. *Mol Pain*. 査読有 10 2014
DOI:10.11710.1186/1744-8069-10-17,
Gammons MV, Fedorov O, Iverson D, Du C, Clark T, Hopkins C, Hagiwara M, Dick AD, Cox R, Harper SJ, Hancox JC, Knapp S, Bates DO. Topical antiangiogenic SRPK1 inhibitors reduce choroidal neovascularization in rodent models of exudative AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読有 54(9) 2013 6052-6062
DOI:10.1167/iavs.13-12422
Pozo N, Zahonero C, Fernández P, Liñares JM, Ayuso A, Hagiwara M, Pérez A, Ricoy JR, Hernández-Laín A, Sepúlveda JM, Sánchez-Gómez P. Inhibition of DYRK1A destabilizes EGFR and reduces EGFR-dependent glioblastoma growth. *J Clin Invest* 査読有 123 (6) 2013 2475-2487 DOI:10.1172/JCI63623
Dong Z, Noda K, Kanda A, Fukuhara J, Ando R, Murata M, Saito W, Hagiwara M, Ishida S Specific inhibition of serine/arginine-rich protein kinase attenuates choroidal neovascularization. *Mol Vis* 査読有 19 2013 536-543
Kuroyanagi H, Watanabe Y, Suzuki Y, and Hagiwara M. Position-dependent and neuron-specific splicing regulation by the CELF family RNA-binding protein UNC-75 in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res*. 査読有 41(7) 2013 4015-4025
DOI:10.1093/nar/gkt097
喜井勲、萩原正敏、キナーゼの多彩な立体構造を標的とした創薬、*実験医学増刊*、査読無、32(2)巻、2014年、133-139項
萩原正敏、疾患克服をめざしたケミカルバイオロジー「RNAを標的とした新しい創薬戦略」、*実験医学*、査読無、増刊、2012年、46-52項
萩原正敏、新しい構造生命科学の未来を拓くために何をなすべきか、*学術の動向*、査読無、12月号、2012年、46-61項

[学会発表](計21件)

萩原正敏 大学発-セレディピティーの最大化に向けて 薬学会第135年会 2015年3月26日 兵庫
萩原正敏 卓越した基礎研究から迅速な臨床試験まで：京都大学におけるワンストップ創薬の試み 第88回日本薬理学会(招待講演) 2015年3月19日 愛知
萩原正敏 化合物スクリーニングから臨床試験まで：ワンストップ創薬拠点 PDIS 最先端セミナー 創薬に

つなぐ日本の創薬基盤技術 構造生物学とゲノム科学の最前線はここまで来た(招待講演) 2015年2月4日 東京
祖納元りえ、喜井勲、小池悠華、萩原正敏 リン酸化酵素とシャペロンの結合を標的とした阻害剤評価系の構築 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月27日 神奈川
萩原正敏 Drug Discovery and Development in Academia-How to Maximize the Serentivity?(招待講演) 2014年10月9日 Cutting edge information exchange meeting 京都
萩原正敏 遺伝病治療を目指すトランスクリプトーム創薬 第16回「JBI バイオ関連基盤技術研究会(招待講演)」 2014年4月15日 東京
Masatoshi Hagiwara Challenge to Cure Hereditary Diseases with "RNA-targeting" Chemical Compounds International Conference on Chemical Biology 2014(招待講演) 2014年2月7日 インド
萩原正敏 先天性難治疾患に対する創薬の試み：TRNDK 第1回創薬等支援技術基盤プラットフォーム公開シンポジウム(招待講演) 2013年9月24日 東京
萩原正敏 RNAを標的とする創薬によって難治疾患へ挑む 大阪大学セミナー(招待講演) 2013年7月4日 大阪
萩原正敏 京都大学におけるセレディピティ創薬の試み オールジャパンでの創薬支援体制の構築に向けて(招待講演) 2013年5月17日 大阪
萩原正敏 医薬連携によるワンストップ創薬 日本薬理学会アカデミア創薬シーズ探索シンポジウム(招待講演) 2013年3月22日 博多
萩原正敏 mRNAを標的とした新しい創薬研究の展開 長野哲雄教授定年退職記念シンポジウム「ケミカルバイオロジーの大展開」(招待講演) 2013年3月16日 東京
Masatoshi Hagiwara Challenges to congenital genetic disorder with "RNA-targeting" chemical compounds SLAS2013 2nd Annual Conference & Exhibition (招待講演) 2013年1月14日 ORLAND,FL,USA.
萩原正敏 スプライシング異常による疾患とその治療の可能性 オミックス医療研究会 創薬PG×分科会&データベース分科会シンポジウム(招待講演) 2012年12月26日 横浜
萩原正敏 RNAを標的とする創薬で難病に挑む 京大医療薬剤学研究会(招待講演) 2012年11月17日 京都

萩原正敏 RNA を標的とする創薬によって難治疾患に挑む 第 36 回阿蘇シンポジウム(招待講演) 2012 年 8 月 3 日 熊本

Masatoshi Hagiwara Novel DYRK1A inhibitor applicable for Alzheimer disease, AACL 2012 Seoul Symposium (招待講演) 2012 年 11 月 23 日~2012 年 11 月 24 日 Seoul

Masatoshi Hagiwara Chemical targeting of RNA processing for new therapeutics of congenital diseases THE 1st official of the INTERNATIONAL CHEMICALBIOLOGY SOCIETY (招待講演) 2012 年 10 月 4 日~2012 年 10 月 5 日 Cambridge,USA.

Masatoshi Hagiwara New chemical screens for drugs of congenital genetic disorders targeting pre-mRNAs, Gordon Research Conference 2012 年 07 月 19 日 Newport, USA.

萩原正敏 Challenges to Congenital Disorders with "RNA-targeting" Chemical Compounds The 22nd CDB Meeting (招待講演) 2012 年 06 月 11 日 神戸

21 萩原正敏 国際シンポジウム「新規疾患治療にむけたケミカルバイオロジー研究からの挑戦」日本ケミカルバイオロジー学会第 7 会年会 (招待講演) 2012 年 06 月 09 日 京都

〔図書〕(計 3 件)

喜井勲、萩原正敏、化学同人、リン酸化酵素に対する選択的阻害剤の開発「生物活性分子のケミカルバイオロジー、標的の同定と作用機構」、2015 年、6

大江賢治、萩原正敏、医学書院、選択的スプライシング・ネットワークを化合物で操作する。Controlling the alternative splicing network with compounds、2015 年、5

木村亮、萩原正敏、株式会社先端医学社、RNA 病(2014)分子精神医学 Vol014 No.2、2014 年、2

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: Molecules, method for screening that stabilize and/ or destabilize proteins, and method for detecting protein activity.

発明者: 萩原正敏、喜井勲、細谷孝充、吉田優

権利者: 同左

種類: 特許

番号: WO2013/183718

出願年月日: 2013 年 06 月 06 日

国内外の別: 外国

名称: スクリーニング方法、タンパク質の不安定性及び/又は安定性を誘導する物質、及び、タンパク質の活性評価

発明者: 萩原正敏、喜井勲、細谷孝充、隅田有人、吉田優

権利者: 同左

種類: 特許

番号: 2012-129094

出願年月日: 2012 年 06 月 06 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

研究室ホームページ

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral_course/r-002/

6. 研究組織

(1)研究代表者

萩原 正敏 (HAGIWARA, Masatoshi)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 10208423

(2)研究分担者

二宮 賢介 (NINOMIYA Kensuke)

京都大学医学研究科・助教

研究者番号: 00437279

細谷 孝充 (HOSOYA Takamitsu)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号: 60273124

片岡 直行 (KATAOKA Naoyuki)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 60346062

武内 章英 (TAKEUCHI Akihide)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 90436618