

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591709

研究課題名(和文) 蛋白質品質管理機構を観点としたタウオパチーの病態解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of tauopathies in terms of protein quality control mechanism

研究代表者

工藤 喬 (Kudo, Takashi)

大阪大学・学内共同利用施設等・教授

研究者番号：10273632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体(ER)ストレスは、神経細胞においてタウ蛋白質を増加させることを示した。ERストレスはタウの転写および翻訳には影響を及ぼさないが、タウの分解速度を20%減少させることが示された。ERストレスは、タウのカルボキシル末端と、タウのためのユビキチンE3リガーゼであるCHIPとの間の結合を減少させた。すなわち、ERストレスによるタウ蛋白質が増加は、タウとCHIPとの間の結合の減少によって、ユビキチン-プロテアソーム経路におけるタウ蛋白質の分解を遅延させることによってもたらされることが示唆された。この機構は、タウオパチーの治療への手がかりを提供することができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We show that ER stress, induced by glucose deprivation or chemicals, increases total endogenous tau protein in cultured neurons and primary cultured neurons. Under ER stress, no significant differences were observed in the transcription of tau, and no differences were observed in the translation of tau with or without the 50-untranslated region (50UTR) of tau. In contrast, the degradation rate of tau was decreased by 20% under ER stress. ER stress reduced the binding between tau and carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP), ubiquitin E3 ligase for tau. These results suggest that ER stress increases total tau protein and its mechanism is due to the decrease in the binding between tau and CHIP, which delays the degradation of tau protein through the ubiquitin proteasome pathway. This mechanism may provide clue to treatment for tauopathy.

研究分野：精神医学、神経化学

キーワード：アルツハイマー病 タウオパチー 小胞体ストレス タウ ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病 (AD) の病因仮説の一つは、タウ蛋白による神経原線維変化の形成につながるアミロイド蛋白の蓄積から神経変性が始まるとしている。「アミロイドカスケード仮説」と呼ばれるこの仮説は'現在広く受け入れられている。この仮説に基づいて、アミロイドワクチンやアミロイド蛋白の切り出し酵素である セクレターゼ阻害剤を標的とする新しい治療戦略が開発されているが、期待できる結果は今までのところ得られていない。従って、新しいAD治療の開発のため、アミロイドカスケード仮説以外の仮説が求められている。

(2) ADの原因として、異常リン酸化タウの蓄積は、アミロイドの蓄積と同様に重要である。言い換えれば、タウオパチーは、ADの病因の一部とも考えられる。さらに、第17染色体の変位によって生じる FTDP-17 の発見は、異常なタウ蛋白自体が直接、神経変性に関与していることで関心を集めている。ADの病因におけるタウの重要性は、いくつかの研究で指摘されている。タウノックアウトマウスとアミロイド前駆体蛋白質を過剰発現するマウスを交配すると、アミロイド蓄積のレベルは変化しなかったにもかかわらず、異常な空間知覚異常行動などの認知症の表現型は観察されなかった。これは、タウ蛋白がADの進行に不可欠な要素であることを示唆している。

(3) ADの病因におけるタウの蓄積に関する最近の新しい知見は、タウオリゴマーレベルが有意に早期のAD患者皮質で上昇することが示されている。野生型4リピートタウ蛋白を過剰発現するトランスジェニックマウスと野生型マウスの研究では、可溶性タウは、線維状タウよりも毒性であることを示唆してお

り、カスパーゼ活性化が神経原線維変化形成の前に起こっていることを示している。これらの知見は、可溶性タウオリゴマーは毒性作用を有し、タウ蛋白質自体の上昇はADの初期段階において重要な因子であり得ることであり、神経原線維変化を形成する前に、神経変性を引き起こし得ることを示唆している。別の研究では、細胞外の凝集タウは、細胞によって取り込まれ、タウ蛋白の細胞内蓄積を誘導し、そしてそれは、共培養された細胞との間で転送されることを示している。これは、タウ凝集体が外側から内側に向かって伝播し、タウオパチーを広げる可能性があることを示唆しています。このような背景から、タウ蛋白の発現/分解の研究は、AD治療開発に新たな標的とするという意味で重要である。

2. 研究の目的

以前、我々は、変異プレセニリン1は、小胞体 (ER) ストレス応答を阻害し、ER ストレスにして神経細胞がより脆弱になることを報告した。即ち、ER ストレスは、ADなどの神経変性疾患に関与していることが示唆されている。また、他の研究では、ER ストレスは、AD患者の海馬において活性化されることが報告されている。最近では、リン酸化タウの上昇とER ストレスの活性化が患者海馬に発生していることが報告され、ER ストレスがADとタウオパチーに関連していることを示唆している。しかし、病理学的メカニズムはまだほとんど知られていない。そこで、本研究では、ER ストレス下でのタウ蛋白の発現と分解を、タウオパチーのメカニズムを同定する目的で評価した。

3. 研究の方法

(1) プラスミド作成

使用したヒトタウ遺伝子は、50UTR の 320 ヌ

クレオチドおよびコード領域の 1239 ヌクレオチドを含む。 -50UTR はヒトタウコード領域 (1239 BPS) のみを pcDNA3.1D/ V5-His の -TOPO に挿入、 +50UTR はヒトタウ 50UTR (320 BPS) とヒトタウコード領域を pcDNA3.1D/ V5-His の -TOPO に挿入した。

(2) 細胞培養およびトランスフェクション
SH-SY5Y 細胞および HEK293 細胞は、10%ウシ胎児血清および 1%ペニシリンストレプトマイシンを添加した DMEM 培地 (DMEM) / F12 および DMEM でそれぞれ培養した。グルコース欠乏実験は、細胞を D-グルコース (4500 mg / L で) 含有 DMEM またはグルコースを含有しない DMEM 中で培養した。ツニカマイシンまたはジチオスレイトール (DTT) は、ER ストレスを誘導するために細胞培地に添加した。プロテアソーム阻害のため、MG132 を細胞培地に添加した。HEK293 細胞での一過性トランスフェクションは、製造業者の指示に従ってリポフェクタミン LTX を用いて行きました。

(3) 初代神経細胞培養

初代培養神経細胞は、PERK ノックアウト E18.5 マウス (PERK - / -) と野生型 E18.5 マウス (+ / +PERK) から調整し、ツニカマイシン処理に使用 DMEM で 7 日間培養しました。

(4) 細胞処理法および免疫プロット法

細胞を、プロテアーゼ阻害剤カクテルおよびホスファターゼ阻害剤カクテル含有 RIPA 緩衝液に溶解した。細胞抽出物は 4 で 31,000xg で 10 分間の遠心分離によって処理した。蛋白質濃度は、BCA 法によって測定した。等量の蛋白質を SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し、PVDF 転写膜に転写した。5%ECL ブロッキング剤でブロッキング後、膜を 4 で一晩、一次抗体と共にインキュベートし、膜を増強化学発光を用いて発色させた。

(5) 免疫沈降

HEK293 細胞にタウコーディング領域 (50UTR) を遺伝子導入し、細胞をグルコース含有あるいは含有しない DMEM 中で 24 時間培養した。細胞抽出物をプロテイン G セファロースと抗タウ抗体を用いて免疫沈降した。免疫沈降物を SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し、免疫プロットングを行った。

(6) パルスチェイス

パルス標識の前に、SH-SY5Y 細胞をメチオニン欠損 DMEM で 40 分間培養した。細胞は 20 分間、0.28 mCi の 35 S-メチオニン/システインを補充した同じ培地 4ml でパルス標識しました。細胞を 1 回洗浄しグルコース含有あるいは含有しない DMEM で培養した。標識の 24 時間後に、細胞をプロテアーゼ阻害剤カクテルおよびホスファターゼ阻害剤カクテル RIPA 中で溶解し、蛋白質 G セファロースと抗タウ抗体で免疫沈降した。免疫沈降物を 4-20%SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し、ゲルを固定後乾燥し、フィルムに曝露した。

(7) RNA 単離および RT-PCR

SH-SY5Y 細胞をツニカマイシンで刺激し、全 RNA はトリゾールによって細胞から抽出した。RT-PCR のために、各試料からの総 RNA はプライムスクリプト II を用いて cDNA 合成のために使用した。PCR は、95 で 1 分間、60 で 1 分間、72 °C で 1 分間 25 サイクルを、cDNA、0.5 mM の下流プライマー、0.5 mM の上流プライマー、0.2 mM の dNTPs、1.5 mM の MgCl₂、および 1 単位の Taq ポリメラーゼを用いて行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により分離し、エチジウムブロマイドで染色して可視化した。増幅に用いたプライマーは、ヒトタウを、50-TCATGAAGGGCCTAAACCAC-30 と 50 CACCCTCCTCAGTCTTCTG- 30、b-アクチ

ンを、 50-GTTTGAGACCTTCAACACC-30 と 50 GTGGTGGTGAAGCTGTAG-30 であった。

4. 研究成果

(1) ER ストレスは、タウ蛋白質を増加させる

ER ストレス下の総タウ蛋白質の変化を評価した。グルコース欠乏は、ER ストレスを誘導するとされる。そこで、SH-SY5Y 細胞で ER ストレス下の総タウ蛋白質の量の変化を評価するために、グルコース欠乏を負荷したところ、コントロール (D-グルコース : 4500 mg / L) と比べて、ER ストレスマーカーのレベル、すなわち、eIF2a のリン酸化と BiP は、グルコース欠乏 24 時間および 48 時間の両方で増加し、ER ストレスを確認した。これらの条件下で、抗 TAU-5 を使用して評価した総タウ蛋白質の量は有意に増加していた。SH-SY5Y 細胞を ER ストレス誘導剤ツニカマイシンまたは DTT で処理した場合にも、総タウ蛋白質は増加していた。これらの事実は、ER ストレスは、一般的に総タウ蛋白質の量を増加させることを示していると考えられる。近年、神経変性疾患ではタウ蛋白をはじめとする様々な原因となる蛋白質が蓄積する病態が想定されている。このような蛋白質の 1 つに TDP-43 がある。そこで、我々は TDP-43 と ER ストレスとの関係についても評価した。24 時間および 48 時間のグルコース欠乏で、全タウ蛋白質の量を増加させたが、TDP-43 の量は変化させなかった。このことは、今回報告する現象がタウ蛋白に特異的であることを示唆するものである。

(2) ER ストレスによるタウ蛋白質誘導のメカニズム

まず我々は、タウ蛋白質の ER ストレス誘導増加は、タウ蛋白質の産生の増加によるものであるかどうか、タウの転写または翻訳を検討

した。SH-SY5Y 細胞を、1-3 時間ツニカマイシンと共にインキュベートし、細胞から単離した RNA を、XBP1 およびタウプロンプを用いた RT-PCR に供した。XBP1 スプライシングによって ER ストレスの存在を確認しながら、タウ mRNA における変化を評価した。その結果、タウの mRNA の増加は観察されず、は、ER ストレス下でタウの転写が誘導されないことが示された。ER ストレス下では、PERK の活性化は、ほとんどの蛋白質の翻訳を阻害する eIF2a のリン酸化を引き起こす。しかし、50UTR のある種の配列によって、いくつかの分子の翻訳、例えば活性化転写因子 4 (ATF4) 翻訳は逆に誘導されることが知られている。タウの増加がこのような翻訳誘導によるものであるかどうかを調べるために、タウ蛋白質の発現をタウ 50UTR の存在下および非存在下で比較した。HEK293 細胞に 50UTR 付きタウ (+50UTR) または 50UTR 欠損タウ (-50UTR) のいずれかをトランスフェクトし、グルコース欠乏によって誘導される ER ストレスを負荷した。コントロールと比較して、総タウ蛋白質の発現は、両方 (+50UTR 及び -50UTR) で観察され、有意差は総タウ蛋白質量に認められなかった。次に、ER ストレス下の総タウ蛋白質の変化を、E18.5 PERK ノックアウト (PERK^{-/-}) と野生型 (PERK^{+/+}) マウスの胎児の大脳皮質から調製した初代培養神経細胞を用いて評価した。その結果、タウ蛋白のレベルの上昇は、PERK の有無に関係なく認められた。これらの知見は ER ストレスによる総タウ蛋白質の増加は転写または翻訳によるものではないことを示している。

最後に、ER ストレスによる総タウ蛋白質上昇がタウ蛋白質の分解低下によるものかを調べた。そこでラジオ標識されたタウについてパ

ルスチエイヌ実験を行った。SH-SY5Y 細胞を 20 分間 35 S-メチオニン/システインでパルス標識し、グルコースの非存在下で 24 時間培養しました。コントロールと比較して、総タウ蛋白質の分解速度は、グルコース欠乏培地中で減少した。デンストメトリー分析は、対照培養物と比較して、代謝速度は 24 時間のインキュベーションの後にグルコース欠乏培地中で約 20%減少したことを示された。この結果は、タウ蛋白質のレベルは、その分解の遅延によってそれを増加させることを示唆している。さらに、この総タウ蛋白質の遅延のメカニズムに関して、タウ蛋白質の主要な分解経路であるプロテアソーム系について検討した。まず、SH-SY5Y 細胞を可逆的プロテアソーム阻害剤 MG132 で処理したところ、総タウ蛋白質が増加した。タウのユビキチン E3 リガーゼ CHIP は、タウに結合し、ユビキチン - プロテアソーム系を介して、そのユビキチン化によってタウの分解を促進すると考えられている。そこで CHIP と総タウ蛋白質との関係を調べました。ER ストレス下でタウ蛋白と CHIP との間の結合の変化を評価するために、HEK293 細胞にタウを遺伝子導入し、グルコース欠乏を負荷した。抗タウ抗体 TAU-5 を用いた免疫沈降を行ったところ、対照培養と比較して、タウと CHIP との間の結合は、グルコース欠乏培養中で減少した。これらの知見は、グルコース欠乏によって誘導される ER ストレス下で、タウと CHIP の結合が減少し、ユビキチン - プロテアソーム系を介してのタウ蛋白分解が抑制され、総タウ蛋白質の増加をもたらすことが示唆される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Omi T, Tanimukai H, Kanayama D,

Sakagami Y, Tagami S, Okochi M, Morihara T, Sato M, Yanagida K, Kitasyoji A, Hara H, Imaizumi K, Maurice T, Chevallier N, Marchai S, Takeda M, Kudo T, Fluvoxamine alleviates ER stress via induction of Sigma-1 receptor, *Cell Death and disease*, 査読あり, 5, 2014, e1332, 201410.1038/cddis.2014.301

Morihara T, Hayashi N, Yokokoji M, Akatsu H, Silverman MA, Kimura N, Sato M, Saito Y, Suzuki T, Yanagida K, Kodama TS, Tanaka T, Okochi M, Tagami S, Kazui H, Kudo T, Hashimoto R, Itoh N, Nishitomi K, Yamaguchi-Kabata Y, Tsunoda T, Takamura H, Katayama T, Kimura R, Kamino K, Hashizume Y, Takeda M, Transcriptome analysis of distinct mouse strains reveals kinesin light chain-1 splicing as an amyloid-accumulation modifier, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 査読あり, 111, 2014, 2638-2643, 10.1073/pnas.1307345111

Tamimukai H, Kanayama D, Omi T, Takeda M, Kudo T, Paclitaxel induces neurotoxicity through endoplasmic reticulum stress, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読あり, 43, 2013, 151-155

Nakanishi T, Shimazawa M, Sugitani S, Kudo T, Imai S, Inokuchi Y, Tsuruma K, Hara H, Role of endoplasmic reticulum stress in light-induced photoreceptor degeneration in mice, *J Neurochem*, 査読あり, 125, 2013,

111-124, 2013

Sakagami Y, Kudo T, Tanimukai H,
Kanayama D, Omi T, Horiguchi K, Okochi
M, Imaizumi K, Takeda M, **Involvement
of endoplasmic reticulum stress in
tauopathy**, *Biochem Biophys Res
Commun*, 査読あり, 430, 2013,
500-504

6 . 研究組織

(1)研究代表者

工藤 喬(KUDO, Takashi)

大阪大学・保健センター・教授

研究者番号：10273632

(2)研究分担者

田上真次(TAGAMI, Shinji)

大阪大学大学院・医学系研究科・助教

研究者番号：40362735

森原剛史(MORIHARA, Takashi)

大阪大学大学院・医学系研究科・助教

研究者番号：90403196