様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 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： 2015～2017
課題番号： １５Ｋ０９８２８

研究課題名（和文）認知症に関連する細胞内異常蓄積蛋白の分解過程におけるリン酸化の影響

研究課題名（英文）The effects of phosphorylation on degradative processes of abnormally accumulated intracellular protein in dementia

研究代表者
田中　稔久（Tanaka, Toshihisa）

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：１０２９４０６８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：認知症関連細胞内異常蓄積蛋白の分解に関してはいまだ明らかでない部分が多いが、我々はその蓄積蛋白のリン酸化が分解過程に与える影響を検討した。タウ蛋白のUPS分解、およびTDP-43のCaspaseによる分解においてはリン酸化は影響を与えなかった。しかし、タウ蛋白のCMA分解においては、タウがPKAによりリン酸化されるとライソゾームへの取り込みが増加した。また、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤を添加するとタウ蛋白の一部の部位でリン酸化が亢進することが認められた。統一的に解釈することはできないが、タウ蛋白においては、ある部位のリン酸化が一部の分解過程を促進することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Degradative processes of abnormally accumulated intracellular protein in dementia, are still unknown. We studied effects of phosphorylation of the protein on the degradative processes. Ubiquitination and its priming proteolysis of tau was not affected by phosphorylation. Proteolysis of TDP-43 by caspase was not affected by phosphorylation. However incorporation of tau into lysosome in chaperone-mediated autophagy was increased by PKA-phosphorylation. It is suggested that some of degradative processes of tau might be affected by its phosphorylation.

研究分野： 老年精神医学

キーワード： タウ蛋白　TDP-43　リン酸化　認知症

１．研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた現在、認知症の病態メカニズムの解明とそれにもとづく早期診断・治療法の開発は緊急の課題である。神経変性性認知症の中ではアルツハイマー病(Alzheimer disease : AD) が最も多く、レビー小体型認知症および前頭側頭型認知症(Frontotemporal dementia : FTD)がそれに次いでいる。家族性FTDでは、1998年に17番染色体に存在するタウ遺伝子変異によりFTDP-17 (Fronto-TemporalDementiawith Parkinsonism, linked to chromosome 17)が引き起こされることが報告され、タウ蛋白が細胞内に異常蓄積するタウオパチーの重要性が指摘されてきた。また、FTDの中には変性神経細胞内にタウ陰性ユビキチン陽性の封入体を有する症例が存在したが、FTD および筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis:ALS) 患者脳内に蓄積するユビキチン化蛋白質の主成分がTDP-43であることが報告されたこのタウ蛋白とTDP-43はどちらも神経細胞内に高度にリン酸化されユビキチン化された状態で多量に蓄積するという点で共通する。

ところで、これらの認知症・神経変性疾患における異常蓄積蛋白の分解過程に関する知見を整理すると、タウ蛋白については、カルパイン、カテプシン、プロテオソーム、カスパーゼなどの蛋白分解酵素（エンドプロテアーゼ）が*in vitro*でタウ蛋白を分解することが知られている。細胞内の分解経路としてはユビキチン・プロテアソームシステム (UPS; Ubiquitin proteasome system)、シャペロン依存性オートファジー(CMA; Chaperone-mediated autophagy) などが想定されているが、タウ蛋白の分解経路の詳細は明らかではない。今まで我々のおこなった各種プロテアーゼ阻害剤を培養細胞に添加する実験からは、タウ蛋白分解酵素の中でもPuromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)が重要であるということを明らかにしてきた。このPSAはペプチドのアミノ末端からアミノ酸を切り出す酵素の一つである。我々はPSAによるタウの分解が、次の蛋白分解システムを誘導することを見出した。また、TDP-43の場合は、FTD脳内のTDP-43は部分切断を受けており､そのC端フラグメントは42kDa、35kDa、25kDaと3種類ある。そこで､タウ蛋白およびTDP-43をさまざまなリン酸化酵素でリン酸化することによって、タウ蛋白のPSAによるN末端部分分解過程、TDP-43のCaspaseによる部分分解過程、およびその後のユビキチン化とプロテアソームによる分解を検討することにした。

また、我々は今まで抗認知症薬の神経薬理作用を検討する過程で、細胞内の不溶性画分に存在するタウ蛋白がアセチルコリンエステラーゼ阻害剤の添加によって減少することも確認している。この時、可溶性画分に存在するタウ蛋白量に大きな変化はなく、重合形態のタウ蛋白が減少していることが示唆された。この過程にもリン酸化が影響を与えていないかを検討することにした。

２．研究の目的

認知症に関連して神経細胞内に異常蓄積するタウ蛋白とTDP-43は病態脳においてはどちらも高度にリン酸化され、ユビキチン化されていることが知られている。一般にこれらの蛋白はUPSおよびCMAによって分解されるが、その詳細は未だよく理解されていない。我々はPSAによる分解がトリガーとなってタウ蛋白がユビキチンリガーゼと結合してユビキチン化される経路を見出しており、またTDP-43がCaspaseによって切断されることが知られている。さらに、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤に

よって細胞内の不溶性タウ蛋白量が減少することも確認されている。 そこで、これらUPSおよびCMAの経路が重要な蛋白修飾であるリン酸化によって影響を受けるかどうかに関して検討を行い、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤による分解亢進に関して解析を行うことにした。

３．研究の方法

I　タウ蛋白のUPSによる分解とリン酸化の影響

タウ蛋白を*in vitro*においてPSAにより分解するとN末端のみが分解される。このことは第1 Metを含むタウN末端を認識する抗体とタウ全体を認識する抗体によって今までに明らかにした。そこで、あらかじめ各種キナーゼによりリン酸化したタウ蛋白をPSAとともにインキュベートし、その分解速度をウエスタンブロットにて評価する。さらに、部分分解されたタウ蛋白をE1、E2(UbcH5)、XIAP、ユビキチン、ATPとともにインキュベートし、ユビキチン化レベルを検討する。

II　TDP-43のUPSによる分解とリン酸化の影響

TDP-43を*in vitro*においてCaspaseにより分解すると42kDa、35kDa、25kDaのフラグメントが出現する。その中の35kDaフラグメントはXIAPと結合するので、あらかじめCK-1によりリン酸化したTDP-43をCaspaseとともにインキュベートし、出現するフラグメントをウエスタンブロットにて評価する。次に、部分分解されたTDP-43をE1、E2(UbcH5)、XIAP、ユビキチン、ATPとともにインキュベートし、ユビキチン化レベルを検討する。

III　タウ蛋白のCMAによる分解の解析

タウ蛋白の336-340 QVEVQ配列および347-351 KDRVQ配列がタウのCMA分解に必須と考えられている。そこでまずこの部位を欠損した変異タウ蛋白（Δ226-351）を作成する。そして、ラット肝臓よりライソゾームを抽出し、これにリコンビナントタウ蛋白（野生型および変異型）を添加してインキュベートし、取り込まれたタウおよび分解レベルに関して評価する。この両者の差がCMAによるタウの取り込みと分解と考えられる。そして、あらかじめ各種キナーゼによりリン酸化したタウ蛋白を添加して、同様の評価を行う。

IV　アセチルコリンエステラーゼ阻害剤によるシャペロン発現量の変化

今までの報告ではシャペロン量の変化がCMAの速度を規定しているという報告が多い。そこで、培養細胞にアセチルコリンエステラーゼ阻害剤を添加し、さまざまなHSPsの発現量をブロット法にて検討する。

V　アセチルコリンエステラーゼ阻害剤によるタウ蛋白リン酸化の変化

培養細胞にアセチルコリンエステラーゼ阻害剤を添加することそのもので、タウのリン酸化レベルが変化しその影響で分解に影響を与える可能性を考慮し、タウ高発現HEK293T 細胞とリン酸化特異抗体を用いて、タウのリン酸化の変化を評価する。

４．研究成果

I　タウ蛋白のUPSによる分解とリン酸化の影響

タウ蛋白のPSAによる切断、それに続くユビキチン化、におけるリン酸化の影響を検討した。4リピートの野生型タウ蛋白をPKAおよびGSK-3 によってリン酸化し、このリン酸化タウ蛋白と非リン酸化タウ蛋白を同時にPSAによって切断したところ、それぞれN末端は分解されたが、その程度に際は認められなかった。さらにそれを、E1、E2 (UbcH5)、E3 (IAPs)、ユビキチン、ATPとともにインキュベートし、ユビキチン化の程度を検討したところ、これも有意な差は認められなかった。

II　TDP-43のUPSによる分解とリン酸化の影響

TDP-43を*in vitro*においてCaspaseにより分解するといくつかのフラグメントが出現するが、CK-1によりリン酸化したTDP-43をCaspaseによって切断して変化を見たところ、リン酸化の影響は認められなかった。また、部分分解されたTDP-43のその後のユビキチン化過程を検討したが、リン酸化による影響は確認できなかった。

III　タウ蛋白のCMAによる分解の解析

また、タウ蛋白のCMAについても検討を行った。タウ蛋白の336-340 QVEVQ配列および347-351 KDRVQ配列がタウのCMA分解に必須と考えられているので、この部位を欠損した変異タウ蛋白（Δ336-351）を作成することができた。そして、ラット肝臓由来のライソゾームにリコンビナントタウ蛋白（野生型および変異型）を添加してインキュベートし、取り込まれたタウレベルを検討したところ、野生型タウはライソゾームに取り込まれ、変異タウ蛋白（Δ336-351）は少量しか取り込まれなかった。そして、PKAおよびGSK-3によってそれぞれの蛋白をリン酸化したところ、PKAによってリン酸化された野生型タウのライソゾームへの取り込みは亢進した。

IV　アセチルコリンエステラーゼ阻害剤によるシャペロン発現量の変化

さらに、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤による不溶性タウ蛋白の減少効果のメカニズムに関しても検討を行った。今までの報告ではシャペロン量の変化がCMAの速度を規定しているというものが多かったので、培養細胞に薬剤を添加し、数多くのHSPsの発現量に関してブロット解析を行ったところ、HSP10の発現亢進が認められた。そこで、タウ蛋白をライソゾームへ取り込みさせる過程でHSP10を過剰に添加したところ、タウ蛋白の取り込みは増加した。

V　アセチルコリンエステラーゼ阻害剤によるタウ蛋白リン酸化の変化

タウ高発現HEK293T細胞にアセチルコリンエステラーゼ阻害剤を添加し、抗リン酸化タウ抗体を用いてタウ蛋白のリン酸化レベルを検討したところSer214部位、Thr231部位、Ser396/404部位ではリン酸化レベルの変化は認められなかったが、Ser202部位ではリン酸化が亢進していることがわかった。

結果をまとめて考えると、タウ蛋白のUPS分解においてリン酸化は影響を与えなかった。また、TDP-43においてもCaspaseによる分解においてリン酸化は影響を与えなかった。しかし、タウ蛋白のCMAによる分解においてはPKAによりリン酸化されるとライソゾームへの取り込みが亢進した。また、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤を添加するとタウ蛋白の一部の部位でリン酸化が亢進することが認められた。全てを統一的に解釈することはできないが、タウ蛋白においてはある部位のリン酸化がCMAなどによる一部の分解過程を促進することが示唆された。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計16件）

1. Ikeda S, Kazui H, Tanaka T, et al. Association of CSF tap-related oscillatory activity and shunt outcome in idiopathic normal pressure hydrocephalus. Psychogeriatrics. 15(3):191-197,2015.
2. Aoki Y, Kazui H, Tanaka T, et al. Noninvasive prediction of shunt operation outcome in idiopathic normal pressure hydrocephalus. Sci Rep. 5:7775. doi: 10.1038/srep07775.　2015.
3. Yasuno F, Kazui H, Yamamoto A,

Morita N, Kajimoto K, Ihara M, Taguchi A, Matsuoka K, Kosaka J, Tanaka T, et al. Resting-state synchrony between the retrosplenial cortex and anterior medial cortical structures relates to memory complaints in subjective cognitive impairment. Neurobiol Aging. 36(6):2145-2152, 2015.

4. Kabeshita Y, Adachi H, Matsushita M, Kanemoto H, Sato S, Suzuki Y, Yoshiyama K, Shimomura T, Yoshida T, Shimizu H, Matsumoto T, Mori T, Kashibayashi T, Tanaka H, Hatada Y, Hashimoto M, Nishio Y, Komori K, Tanaka T, et al. Sleep disturbances are key symptoms of very early stage Alzheimer disease with behavioral and psychological symptoms: a Japan multi-center cross-sectional study (J-BIRD). Int J Geriatr Psychiatry. 32(2):222-230,2016. doi: 10.1002/gps.4470.
5. Hata M, Kazui H, Tanaka T, et al. Functional connectivity assessed by resting state EEG correlates with cognitive decline of Alzheimer's disease - An eLORETA study－ Clin Neurophysiol. 127(2):1269-1278,2016. doi: 10.1016/j.clinph.2015.10.030.
6. Hata M, Tanaka T, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease correlate with electroencephalography parameters assessed by exact Low-Resolution Electromagnetic Tomography (eLORETA). Clin EEG Neurosci. 2016 Aug 11. pii: 1550059416662119.
7. Kazui H, Kanemoto H, Yoshiyama K, Kishima H, Suzuki Y, Sato S, Suehiro T, Azuma S[1)], Yoshimine T, Tanaka T. Association between high biomarker probability of Alzheimer's disease and improvement of clinical outcomes after shunt surgery in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus. J Neurol Sci. 369:236-241,2016. doi: 10.1016/j.jns.2016.08.040.
8. Kazui H, Yoshiyama K, Kanemoto H, Suzuki Y, Sato S, Hashimoto M, Ikeda M, Tanaka H, Hatada Y, Matsushita M, Nishio Y, Mori E, Tanimukai S, Komori K, Yoshida T, Shimizu H, Matsumoto T, Mori T, Kashibayashi T, Yokoyama K, Shimomura T, Kabeshita Y, Adachi H, Tanaka T. Differences of Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia in Disease Severity in Four Major Dementias. PLoS One. 11(8):e0161092,2016. doi: 10.1371/journal.pone.0161092.
9. 田中稔久 **認知機能低下に対する薬物療法─根治的治療薬開発の現状 臨床精神薬理** 19(9):101-108,2016.
10. Sato S, Kazui H, Shimizu Y, Yoshida T, Yoshiyama K, Kanemoto H, Suzuki Y, Morikami T, Fujisue H, Tanaka T, Ikeda M. Usefulness of carer-held records to support informal caregivers of patients with dementia who live at home. Psychogeriatrics. 2018 Feb 6. doi: 10.1111/psyg.12304.
11. Kazui H, Takahashi R, Yamamoto Y, Yoshiyama K, Kanemoto H, Suzuki Y, Sato S, Azuma S, Suehiro T,

Shimosegawa E, Ishii K, Tanaka T. Neural Basis of Apathy in Patients with Amnestic Mild Cognitive Impairment.J Alzheimers Dis. 2017;55(4):1403-1416. doi: 10.3233/JAD-160223.

12. Kazui H, Adachi H, Kanemoto H, Yoshiyama K, Wada T, Tokumasu-Nomura K, Tanaka T, Ikeda M.　Effects of donepezil on sleep disturbances in patients with dementia with Lewy bodies: an open-label study with actigraphy. Psychiat Res. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2017.02.039
13. 田中稔久 アミロイド蓄積とタウタンパク、タウオパチーに関する最近の知見　老年精神医学雑誌 28(2):115-122,2017.
14. 鐘本英輝、数井裕光、鈴木由希子、佐藤俊介、吉山顕次、田中稔久　字形想起障害による漢字の純粋失書を認め、皮質基底核症候群を呈したアルツハイマー病の１例　高次脳機能研究 37(1): 15-21,2017
15. 田中稔久 池田学　リスク因子を背負った認知症治療研究　（特集　あしたのアルツハイマー病治療）Brain and Nerve 69 (7) :723-731,2017
16. 田中稔久 現在考えられているアルツハイマー型認知症のメカニズムと薬物療法の可能性　臨床精神薬理 21(1):3-18,2018

〔学会発表〕（計 4 件）

1. Tanaka T, Terada M, Sato M, Takeda M. CSF biomarkers in differential diagnosis of dementia.　The 12th World Congress of Biological Psychiatry (WFSBP2015).　June 14-18 (17), 2015, Megaron Athens International Conference Center, Athen, Greece.
2. 田中稔久　認知症性疾患の分子病態　-タウ蛋白を中心に-　第 15 回奈良認知症研究会　2015.7.30、奈良ホテル（奈良）
3. 田中稔久　抗認知症薬の薬理作用とその期待される効果　第20回認知神経科学会学術集会　2015.8.9、東京大学伊藤国際学術研究センター（東京）
4. 田中稔久　ランチョンセミナー　アルツハイマー病の根本原因にせまる　－　タウの分子病理と治療薬開発　第39回日本神経科学大会　2016.7.21、パシフィコ横山（神奈川）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）
○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等　なし

６．研究組織
(1)研究代表者
田中　稔久　（ TANAKA, Toshihisa ）
大阪大学・医学（系）・研究科（研究院）・准教授
研究者番号： 10294068

(2)研究分担者
森原　剛史（ MORIHARA, Takashi ）
大阪大学・医学（系）・研究科（研究院）・助教
研究者番号： 10294068

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし