

平成 21 年 6 月 22 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007~2008
 課題番号：19390305
 研究課題名（和文） 遺伝性認知症関連蛋白群とユビキチンシステムの関与による神経変性メカニズム
 研究課題名（英文） Involvement of proteins coded by causative genes for familial dementia and ubiquitin system in neurodegenerative mechanisms
 研究代表者
 武田 雅俊 (TAKEDA MASATOSHI)
 大阪大学・医学系研究科・教授
 研究者番号：00179649

研究成果の概要：

タウ蛋白分解機構にユビキチンシステムがどのように関与しているかに関して検討をおこなうため、培養細胞にプロテアーゼに対する各阻害剤を添加してタウ蛋白の分解過程の検討をおこなったところ、ピューロマイシンのみに分解抑制効果が認められた。さらに、FTDP-17 にて報告された V337M と R406W 変異タウに関して検討をおこなったところ、分解の遅延が認められた。ピューロマイシン感受性ペプチダーゼと強制発現タウはどちらも細胞質内に局在し、変異タウ蛋白はリン酸化が亢進していたことより、変異タウの分解遅延はリン酸化亢進にともなうプロテアーゼ抵抗性によることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	11,500,000	3,450,000	14,950,000
2008 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：前頭側頭型認知症、神経変性、タウ蛋白、ユビキチン、プロテオソーム、蛋白分解

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。近年は脳血管性認知症は減少し、神経変性性認知症が増大している。その中で、アルツハイマー病 (Alzheimer Disease:AD) は最も頻度が高いが、前頭側頭型認知症 (Frontotemporal dementia:FTD) およびレビー小体型認知症

(Lewy Body Disease; LBD) も頻度は少ないことが判明し、その対応への重要性は増大している。AD では 1991 年にアミロイド前駆体蛋白 (Amyloid precursor protein; APP) 遺伝子や 1995 年にプレセニリン (Presenilin; PS)-1 または -2 遺伝子の遺伝子変異が家族性 AD の原因となることが判明したことから、以後精力的にその遺伝子と翻訳された蛋白質の機能が解析され、AD の病態解

明に大きく寄与してきた経緯がある。一方、FTD では 1998 年に 17 番染色体に関連する疾患はタウ遺伝子変異によって発症していることが判明してから (Hutton M, et al. Nature 393:702-5, 1998)、FTDP-17 (frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17) と名づけられ、AD におけるアミロイド中心の病態仮説から広い意味での神経変性性認知症疾患の原因としてタウ蛋白の重要性があらためて位置づけられた。

2. 研究の目的

神経原線維変化はアルツハイマー病を含むタウオパチーの神経病理学的な特徴であり、タウ蛋白はその神経原線維変化の主要構成成分である。遺伝性認知症として知られる FTDP-17 は、タウ蛋白をコードする遺伝子の変異がその原因であることも知られている。タウオパチーにおいてタウ蛋白は異常リン酸化、ユビキチン化しているが、そのタウ蛋白の分解過程については不明な点が多い。そのため、今回の実験では培養細胞にて種々の蛋白分解酵素(ユビキチン依存性分解酵素を含む)に対する阻害剤や *in vitro* においてタウ蛋白を分解する可能性を示唆されている puromycin-sensitive aminopeptidase(PSA) に対して阻害作用を有する puromycin を用いて検討をおこなうことにした。また、変異型タウ遺伝子を細胞に導入し、タウ蛋白の分解過程に関する検討を行うことにした。

3. 研究の方法

まず *in vivo* においてタウ蛋白を分解すると既に報告されているプロテアソーム(ユビキチン依存性分解酵素)に対する阻害剤(MG132, Lactacystin)およびカテプシンに対する阻害剤(CA-074Me)、また PSA に対して阻害作用を有する puromycin を SH-SY5Y 細

胞培養する培地に添加し、タウ蛋白をウェスタンブロットにて検討した。また野生型タウ蛋白(最長型 tau441)を強制発現させた COS-7 細胞に同様の実験を行った。さらに、パルスチェイス法を使用し [³⁵S]methionine でラベルされた SH-SY5Y 細胞中のタウ蛋白を免疫沈降により回収し、その分解過程を詳細に検討した。加えて、SH-SY5Y 細胞における PSA に対して siRNA による発現抑制を施行して、タウ蛋白の発現レベルの検討をおこなった。

次に FTDP-17 において報告された変異型タウ (V337M、R406W) を用いて野生型タウとの分解過程の差異を、前述のパルスチェイス法を用いて検討し、PSA とタウ蛋白の細胞内局在の関係を細胞分画法および免疫蛍光染色によって解析した。さらに、FTDP-17 変異型タウのリン酸化レベルについてリン酸化特異抗体を用いたウェスタンブロットにより検討した。

4. 研究成果

プロテアソーム(ユビキチン依存性分解酵素)に対する阻害剤(MG132, Lactacystin)およびカテプシンに対する阻害剤(CA-074Me)、また PSA に対して阻害作用を有する puromycin を SH-SY5Y 細胞培養する培地に添加し、タウ蛋白をウェスタンブロットにて検討したが、ユビキチン化と指定され高分子量のタウ蛋白の出現や通常の分子量のタウ蛋白の増加などの変化は認められなかった。さらに野生型タウ蛋白を強制発現させた COS-7 細胞に同様の実験を行ったところ、puromycin のみにタウ蛋白発現レベルを増加させる傾向が認められたが有意なものではなかった。パルスチェイス法による SH-SY5Y 細胞中のタウ蛋白分解過程の検討では、200 nM の puromycin を添加した際にタウ蛋白分解の有意な遅延が認められた。加え

て、SH-SY5Y細胞におけるPSAに対して siRNAによる発現抑制を施行したところ、タウ蛋白の発現レベルの増加が認められた。以上より、培養細胞上においてタウ蛋白の代謝分解過程にPSAが関与していることが示唆された。

次に2種類のFTDP-17変異型タウと野生型タウとを強制発現させたCOS-7細胞においてパルスチェイス法を用いてタウ蛋白の分解過程を検討したところ、ラベルから48時間後に野生型タウと比較してFTDP-17変異型タウの有意な分解遅延が認められた。そしてPSAとタウ蛋白の細胞内局在の関係を細胞分画法および免疫蛍光染色によって検討したところ、どちらも細胞質内に存在し共在していることが分かったが、FTDP-17変異によるタウ蛋白の局在の変化は特に認められなかった。さらに、FTDP-17変異型タウのリン酸化レベルについて検討をおこなったところ、V337M変異型タウにおいてThr231のリン酸化が、R406W変異型タウにおいてSer396およびSer409のリン酸化が有意に亢進していた。

今回の研究では未解明な部分が多いタウ蛋白の分解経路について種々の阻害剤を用いた実験を行った。ここではin vitroにおいて分解されるとの報告のあったPSAが培養細胞上でもタウ蛋白の代謝分解過程に深く関わることを示唆された。また、タウ蛋白とPSAはどちらも細胞質内に共在し、局在論的に十分機能することが示唆された。FTDP-17に変異型タウの検討では、タウ蛋白の分解が有意に遅延しており、かついくつかの部位にてタウ蛋白のリン酸化の亢進が起こっていることが判明したが、分解の遅延の原因としてこのリン酸化の亢進が示唆された。

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10件)

- 1) Yanagi K, Tanaka T, Kato K, Sadik G,, Morihara T, Kudo T, Takeda M Involvement of puromycin-sensitive aminopeptidase in proteolysis of tau protein in cultured cells, and attenuated proteolysis of FTDP-17 mutant tau. *Psychogeriatrics in press*, 2009. (査読有)
- 2) Sadik G, Tanaka T, Kato K, Yanagi K, Kudo T, Takeda M Differential interaction and aggregation of 3-repeat and 4-repeat tau isoforms with 14-3-3zeta protein. *Biochem Biophys Res Commun* 383(1):37-41,2009. (査読有)
- 3) Sadik G, Tanaka T, Kato K, Yanagi K, Morihara T, Takeda M Phosphorylation of tau at Ser214 mediates its interaction with 14-3-3 protein: Implications for the mechanism of tau aggregation. *J Neurochem* 108:33-34,2009. (査読有)
- 4) Takeda M, Morihara T, Okochi M, Sadik G, Tanaka T Mild Cognitive Impairment (MCI) and Subjective Cognitive Impairment (SCI) *Psychogeriatrics* 8:155-160, 2008. (査読有)
- 5) Aidaraliev NJ, Kamino K, Kimura R, Yamamoto M, Morihara T, Kazui H, Hashimoto R, Tanaka T, Kudo T, Kida T, Okuda J, Uema T, Yamagata H, Miki T, Akatsu H, Kosaka K, Takeda M. Dynamin 2 gene is a novel susceptibility gene for late-onset Alzheimer disease in

- non-APOE-epsilon4 carriers. *J Hum Genet.* 53:296-302, 2008. (査読有)
- 6) Tanaka T., Kazui H., Tanimukai H., Morihara H., Sadik G., Kudo T., Takeda M. Post-marketing surveillance of donepezil hydrochloride in Japanese patients with Alzheimer's disease with behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD). *Psychogeriatrics* 8:114-123, 2008. (査読有)
 - 7) Tagami S., Okochi M., Fukumori A., Jingwei J., Yanagida K., Nakayama T., Morihara T., Tanaka T., Kudo T., Takeda M. Processes of β -amyloid and intracellular cytoplasmic domain generation by presenilin/ γ -Secretase. *Neurodegenerative Dis.* 5:160-162, 2008. (査読有)
 - 8) Tagami S., Okochi M., Yanagida K., Ikuta A., Fukumori A., Matsumoto N., Ishizuka-Katsura Y., Nakayama T., Ito N., Jiang J., Nishitomi K., Kamino K., Morihara T., Hashimoto R., Tanaka T., Kudo T., Chiba S., Takeda M. Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision in S3 cleavage of Notch-1. *Mol Cell Biol* 28:165-176 2008. (査読有)
 - 9) Takeda M., Okochi M, Tagami S, Tanaka T., Kudo T. Biological markers as outcome measures for Alzheimer's disease interventions--real problems and future possibilities. *Int Psychogeriatr.* 19:391-400, 2007. (査読有)
 - 10) Kimura R, Kamino K, Yamamoto M, Nuripa A, Kida T, Kazui H, Hashimoto R, Tanaka T., Kudo T., Yamagata H, Tabara Y, Miki T, Akatsu H, Kosaka K, Funakoshi E, Nishitomi K, Sakaguchi G, Kato A, Hattori H, Uema T, Takeda M. The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between β -amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum Mol Genet.* 16:15-23, 2007. (査読有)
- [学会発表] (計 14 件)
- 1) Sadik G, Tanaka T., Kato K, Yanagi K, Takeda M. 14-3-3 Protein is a potential candidate inducer for fibrillization of 3-repeat Tau Society for Neuroscience the 38th Annual Meeting, Nov, 15-19, 2008, Washington, U.S.A.
 - 2) 加藤希世子、田中稔久、Golam Sadik, 柳健太郎、武田雅俊 GSK3 抑制によるカススペース阻害因子XIAPの亢進機序について 第 27 回日本認知症学会 2008.10.10-12. (群馬県前橋市)
 - 3) Tanaka T., Sadik G, Kato K, Yanagi K, Takeda M. Involvement of tau protein in neurodegeneration 第 51 回日本神経化学大会 2008.9.11-13. (富山)
 - 4) Sadik G, Tanaka T., Kato K, Yanagi K, Takeda M. 14-3-3 differentially induces 3-repeat and 4-repeat tau aggregation 第 51 回日本神経化学大会 2008.9.11-13. (富山)
 - 5) Sadik G, Tanaka T., Kato K, Yanagi K, Takeda M. 14-3-3 Protein Exhibits Strong Affinity for 3-repeat Tau and Increases Its Filament Formation The 11th international conference on Alzheimer disease and related

- disorders Jul,26-31,2008, Chicago, U.S.A..
- 6) Sadik G, Tanaka T, Kato K, Takeda M FTDP-17 mutations of tau affect the interaction between tau and 14-3-3 Society for Neuroscience the 37th Annual Meeting, Nov, 3-7, 2007, San Diego, U.S.A.
 - 7) Tanaka T, Kazui H, Morihara T, Kamino K, Okochi M, Tagami S, Kudo T, Takeda M. Symposium S34, Prevention, early diagnosis and treatment of dementia. The 13th Congress of the International Psychogeriatrics Association, Oct.14-18, 2007 Osaka, Japan.
 - 8) Tanaka T, Nessa BN, Sadik G, Kato K, Takeda M. Increased expression of Toll like receptor 3 in Alzheimer disease brain. The 13th Congress of the International Psychogeriatrics Association, Oct.14-18, 2007 Osaka, Japan.
 - 9) Nessa BN, Tanaka T, Kamino K, Sadik G, Ansar AB, Kudo T, Takeda M. Toll like receptor 3 mediated pathogenesis in Alzheimer's disease. The 13th Congress of the International Psychogeriatrics Association, Oct.14-18, 2007 Osaka, Japan.
 - 10) Sadik G, Tanaka T, Kato K, Takeda M Phosphorylation of tau with or without FTDP-17 mutations similarly affects the interaction with 14-3-3 protein The 13th Congress of the International Psychogeriatrics Association, Oct.14-18, 2007 Osaka, Japan.
 - 11) Kato K, Tanaka T, Sadik G, Takeda M. Neuroprotective effects of lithium. The 13th Congress of the International Psychogeriatrics Association, Oct.14-18, 2007 Osaka, Japan.
 - 12) Yanagi K, Tanaka T, Sadik G, Kato K, Takeda M. Degradation of tau protein in cultured cells. The 13th Congress of the International Psychogeriatrics Association, Oct.14-18, 2007 Osaka, Japan.
 - 13) Nakayama T, Okochi M, Tagami S, Yanagida K, Nishitomi K, Oguri T, Jiang J, Mori K, Morihara T, Hashimoto R, Tanaka T, Kudo T, Takeda M. Secretase inhibitors DAPT and L-685,458 perturb Wnt signaling The 13th Congress of the International Psychogeriatrics Association, Oct.14-18, 2007 Osaka, Japan.
 - 14) Tanaka T, Kamino K, Morihara T, Sadik G, Kimura R, Kudo T, Takeda M. Genetic approaches in Dementia Study. Japan-Taiwan Dementia Symposium Oct.13, 2007 Osaka, Japan.
- 〔図書〕(計1件)
- 1) 田中稔久、武田雅俊 タウオパチー、KEY WORD 精神 第4版 188-189, 先端医学社(東京)2007.
6. 研究組織
(1)研究代表者
武田 雅俊 (TAKEDA MASATOSHI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号 : 00179649
- (2)研究分担者
田中 稔久 (TANAKA TOAHIHISA)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号 : 10294068

工藤 喬 (KUDO TAKASHI)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：10273632

森原 剛史 (MORIHARA TAKASHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：90403196

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
ゴラム・サディック (GOLAM SADIK)
大阪大学・医学系研究科・特任研究員

柳 健太郎 (YANAGI KENTARO)
大阪大学・医学系研究科・大学院生

加藤 希世子 (KATO KIYOKO)
大阪大学・医学系研究科・大学院生