

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19790616  
 研究課題名（和文） 解糖酵素アルドラーゼとリン酸化タウとの相互作用の解析

研究課題名（英文） Phosphorylated Tau Associates with Aldolase

研究代表者

志村秀樹（SHIMURA HIDEKI）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50286746

研究成果の概要：

リン酸化タウはアルドラーゼに結合し、酵素活性を阻害することを明らかにした。リン酸化タウは脱リン酸化タウに比べアルドラーゼにより結合し酵素活性も低下させた。このことよりリン酸化タウ蓄積は解糖障害をきたし、神経細胞変性を惹起させる可能性があることが分かりリン酸化タウ蓄積による新たな神経細胞死機構を明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：タウ、リン酸化タウ、神経原線維変化、解糖、アルドラーゼ

#### 1. 研究開始当初の背景

①高齢者社会とあいまって認知症の原因解明、治療法の確立は医学的のみならず社会的要請となっている。認知症の原因疾患群であるアルツハイマー病、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、ピック病、FTDP-17などの神経変性疾患ではタウの蓄積が神経細胞、

グリア細胞にみられタウオパチーと総称されている。タウオパチーにおいて蓄積しているタウは異常リン酸化されており、異常リン酸化タウが神経細胞死を引き起こす原因因子の一つであることが強く示唆されている。しかしながら何故リン酸化タウの蓄積が細胞死・変性をひき起こすかは依然として明ら

かにされていない。

我々は過去の研究において異常リン酸化タウに結合する蛋白質をリン酸化タウカラムを用いてヒト剖検脳より抽出・精製し質量分析にて明らかにしてきた。同様の手法を用いて解糖酵素の一つであるアルドラーゼ A, C (フルクトース-1, 6-二リン酸⇌グリセロアルデヒド-3-リン酸+ジヒドロキシアセトンリン酸 可逆反応を触媒する酵素) を過去の研究においてリン酸化タウに結合する蛋白質として同定していた。今回私達は神経細胞死・変性の観点からアルドラーゼ A, C とリン酸化タウとの相互作用を解析することを目的とした。リン酸化タウによりアルドラーゼ A, C の機能低下が引き起こされ細胞変性・死がおこることが本研究により明らかになれば、アルツハイマー病における神経細胞障害の原因が明らかにされ、新たな治療法の開発につながる可能性がある。

## 2. 研究の目的

異常リン酸化タウとアルドラーゼ A, C との相互作用を解析することを本研究の目的とした。過去の研究においてリン酸化タウがアルドラーゼ A, C と結合することは既に明らかにしている。主要な課題としてリン酸化タウがアルドラーゼ A, C の酵素活性を阻害し神経細胞変性・死を引き起こすかを重点的に検討する。

- ①合成蛋白質を用いたリン酸化タウとアルドラーゼ A, C との結合の検討
- ②免疫沈降反応を用いたリン酸化タウとアルドラーゼ A, C との結合についての検討
- ③アルツハイマー病剖検脳、リン酸化タウ発現細胞でのアルドラーゼ A, C の細胞内局在の検討
- ④リン酸化タウのアルドラーゼ酵素活性への影響

⑤アルドラーゼはリン酸化タウ誘導細胞死を抑制するか

## 3. 研究の方法

アルツハイマー病患者剖検脳 6 例、脳疾患のない患者剖検脳 4 例の凍結脳を生化学的解析、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を免疫組織科学的解析に使用した。

アルドラーゼ酵素活性は 5 mM Fructose 1,6-Diphosphate を 2 単位アルドラーゼ、4 単位 glycerol-3-phosphate dehydrogenase、8 単位 triose-phosphate isomerase の存在下で 30 度で反応させ β-NADH の減少率を 340nm で計測した。

Fructose 1,6-Diphosphate + H<sub>2</sub>O Aldolase>

G 3-P + DHAP<

G 3-P TPI<DHAP

2 DHAP + 2 β-NADH α-GDH<

2 α-Glycerophosphate + 2 β-NAD

G 3-P = Glyceraldehyde 3-Phosphate

DHAP = Dihydroxyacetone Phosphate

TPI = Triosephosphate Isomerase

α-GDH = α-Glycerophosphate Dehydrogenase

β-NADH = β-Nicotinamide Adenine

Dinucleotide, Reduced Form

β-NAD = β-Nicotinamide Adenine

Dinucleotide, Oxidized Form

## 4. 研究成果

①合成蛋白質を用いたリン酸化タウとアルドラーゼ A, C との結合部位の検討  
結果) アルドラーゼは脱リン酸化タウよりもリン酸化タウに結合し易い  
リン酸化合成 tau は脱リン酸化合成 tau よりもヒト剖検脳由来のアルドラーゼ A, C に結合した。

図 1

②免疫沈降反応を用いたリン酸化タウとアルドラーゼ A, C との結合についての検討結果) アルドラーゼは脱リン酸化タウよりもリン酸化タウに結合し易い

アルツハイマー病患者剖検脳では、抗タウ抗体(全てのタウを認識する抗体)の免疫沈降物にはアルドラーゼ A, C が認められた。一方健常人剖検脳では抗タウ抗体の免疫沈降物にはアルドラーゼ A, C は認められなかった。

#### 図 2

抗アルドラーゼ抗体の免疫沈降物には Tau1 抗体で認識される脱リン酸化タウはほとんど認められなかった。

この実験系においても①と同様にアルドラーゼ A, C は脱リン酸化 tau よりもリン酸化 tau に結合することを明らかにした。

③アルツハイマー病剖検脳、リン酸化タウ発現細胞でのアルドラーゼ A, C の細胞内局在の検討

結果) アルツハイマー病剖検脳でのリン酸化タウ発現細胞におけるアルドラーゼ A, C の細胞内局在に大きな変化は認められなかった。

アルツハイマー病剖検脳において抗アルドラーゼ抗体を用いて免疫組織化学を行った。①、②の結果より神経原線維変化にアルドラーゼ A, C が局在することが予想されたが、現在までに用いた手法では明らかな染色性は認められなかった。

神経原線維変化陽性細胞におけるアルドラーゼ A, C 量にも明らかな変化は認められなかった。

④リン酸化タウのアルドラーゼ酵素活性への影響

in vitor の系でリン酸化タウ、脱リン酸化タウがアルドラーゼ酵素活性を減弱させるか

を検討した。

アルドラーゼ酵素活性を 10mM, 1mM, 0.1mM のリン酸化タウ、脱リン酸化タウ、ウシ血清アルブミンの存在下で計測した。

リン酸化タウは脱リン酸化タウよりアルドラーゼ酵素活性を低下させる傾向があった。10mM, 1mM では有意に ( $p < 0.05$ ) リン酸化タウは脱リン酸化タウよりアルドラーゼ酵素活性を低下させた。

10mM, 1mM, 0.1mM 濃度において脱リン酸化タウはウシ血清アルブミンよりアルドラーゼ酵素活性を低下させたことより脱リン酸化タウもアルドラーゼ酵素活性を低下させた。

またリン酸化タウ、脱リン酸化タウ、ウシ血清アルブミンとも glycerol-3-phosphate dehydrogenase、triose-phosphate isomerase 活性は有意に低下させなかった。

#### 図 3

⑤アルドラーゼはリン酸化タウ誘導細胞死を抑制するか

過去の研究において確立している蛋白質導入法を用いて検証した。

PC12細胞にリン酸化タウとアルドラーゼまたはリン酸化タウとウシ血清アルブミンを細胞内に導入し細胞死を測定した。

リン酸化タウと10倍量のアルドラーゼを導入することにより神経細胞死が10%程度減少したが統計学的な有意差は認められなかった。

現在ヒト神経細胞を用いて引き続き検討している。

#### まとめ

リン酸化タウはアルドラーゼに結合し、酵素活性を阻害することを明らかにした。リン酸化タウは脱リン酸化タウに比べアルドラーゼにより結合し酵素活性も低下させた。

このことよりリン酸化タウ蓄積は解糖障害をきたし、神経細胞変性を惹起させる可能性があることが分かった。

リン酸化タウ蓄積による新たな神経細胞死機構を明らかにした。

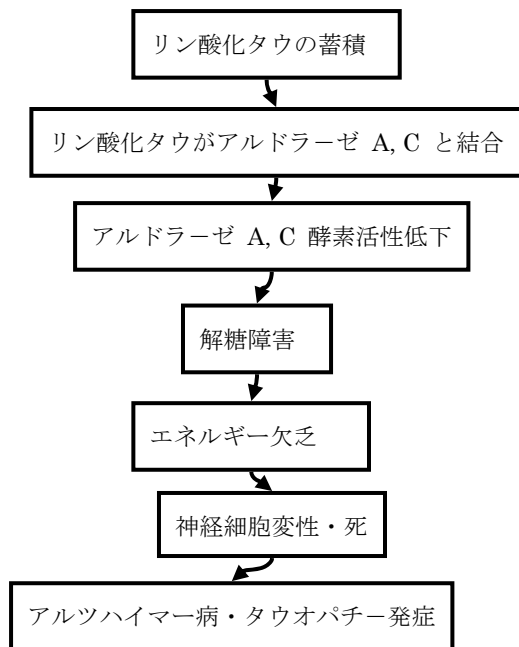


図1 リン酸化タウはアルドラーゼと結合する recombinant tau による pull down assay

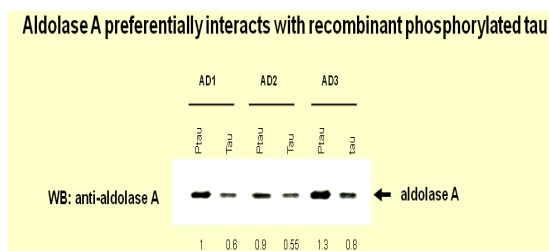


図2 リン酸化タウはアルドラーゼと結合する 抗タウ抗体による免疫沈降実験

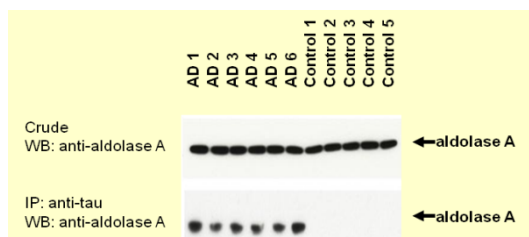
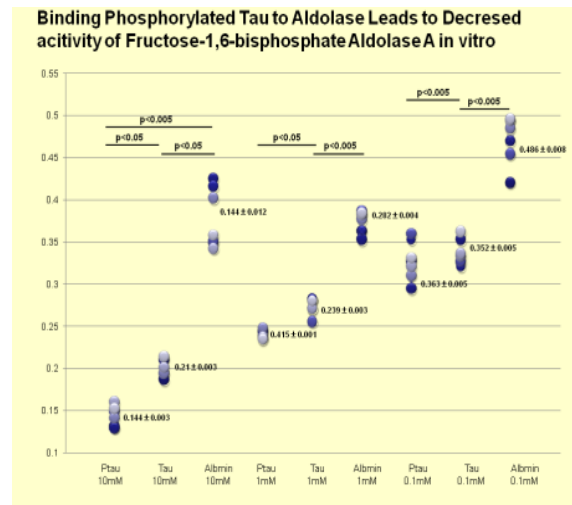


図3 リン酸化タウはアルドラーゼ酵素活性を低下させる



### 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2件)

①Sasaki K, Shimura H, Itaya M, Tanaka R, Mori H, Mizuno Y, Kosik KS, Tanaka S, Hattori N, Excitatory amino acid transporter 2 associates with phosphorylated tau and is localized in neurofibrillary tangles of tauopathic brains. FEBS Letters. 2009 in press

②Miyamoto N, Tanaka R, Zhang N, Shimura H, Onodera M, Mochizuki H, Hattori N, Urabe T. Crucial role for Ser133-phosphorylated form of cyclic AMP-responsive element binding protein signaling in the differentiation and survival of neural progenitors under chronic cerebral hypoperfusion. Neuroscience. 2009 in press

[学会発表] (計7件)

①Tadaaki Kawanabe, Asako Yoritaka, Hideki Oizumi, Hideki Shimura, Shigeki

Tanaka, Nobutaka Hattori Successful treatment of Yi-Gan San for Behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD) of the patients with Parkinson's Disease and Parkinson's Disease with Dementia 12th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, June 2008, Chicago, USA

②Kumi Sasaki, Hideki Shimura, Masako Itaya, Ryota Tanaka, Hideo Mori, Yoshikuni Mizuno, Kenneth Kosik, Shigeki Tanaka, Nobutaka Hattori: Excitatory Amino Acid Transporter 2 Associates with Phosphorylated Tau 8<sup>th</sup> Biennial Meeting of Asia-Pacific Society for Neurochemistry June 23-26 上海

③山内芳也、川鍋伊晃、田中亮太、志村秀樹、田中茂樹、MR ワクチン接種後に抗神経細胞抗原性脳炎を発症した18歳男性例 第186回日本神経学会関東地方会：9.6.2008

④Kumi Sasaki, Hideki Shimura, Masako Itaya, Ryota Tanaka, Hideo Mori, Yoshikuni Mizuno, Kenneth Kosik, Shigeki Tanaka, Nobutaka Hattori: Excitatory Amino Acid Transporter 2 Associates with Phosphorylated Tau 第27回日本認知症学会 10/10-12 前橋

⑤Hideki Shimura, Kumi Sasaki, Shigeki Tanaka, Nobutaka Hattori Binding Phosphorylated Tau to Aldolase Leads to Decreased activity of Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase A 第27回日本認知症学会 10/10-12 前橋

⑥軟骨肉腫の心臓転移から腫瘍脳塞栓症を発症した65歳男性例佐々木久実、田中亮太、大泉英樹、志村秀樹、小池裕之、田中茂樹 日本塞子学会 embolus Japan 2008 10/31-11/1 倉敷

⑦永田朋子、佐々木久実、田中亮太、志村秀樹、田中茂樹 脳卒中症状を呈し、限局性多発白質病変を認めたメトトレキサート脳症の16歳男性例 第187回日本神経学会関東地方会：11.29.2008

〔図書〕(計2件)

①本当の若年性アルツハイマー病 単著 出版元 アスペクト 志村秀樹 2007

②EBMのコンセプトを取り入れたパーキンソン病ハンドブック p331-340 共著 志村秀樹 2007

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

志村秀樹 (SHIMURA HIDEKI)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：50286746