

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2008～2013

課題番号：20228006

研究課題名(和文) 認知症における微小管重合調節異常と薬剤探索

研究課題名(英文) Drug Discovery of Alzheimer Disease from Molecules- Regulating Microtubule Polymerization

研究代表者

内田 隆史 (Uchida, Takafumi)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80312239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 80,800,000円、(間接経費) 24,240,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の病因は微小管重合の低下だという仮説に基づき、新規微小管重合制御蛋白質、Pin1およびGas7b(Pin1WWドメインと類似構造を有するタンパク質)の機能について研究し、これら分子の診断・治療への応用の可能性を示した。Pin1のプロリン異性化酵素活性を阻害する低分子物質を探索する高速スクリーニング法を確立し、新規阻害剤、DTM、TME-1、ワカメポリフェノール(974B)を見出した。Gas7bがリン酸化タウと結合し微小管重合を促進すること、微小管重合を直接制御し細胞の形態を変化させる機能を有すること、アルツハイマー病患者脳で発現が低下していることを明らかにした。原著論文41報。

研究成果の概要(英文)：Based on the hypothesis that Alzheimer disease is caused by the defect of microtubule polymerization, we have studied the functions of the newly identified the microtubule- regulatory molecules, Pin1 and Gas7b (the proteins consisting of the similar sequence to the WW domain of Pin1). We suggested that Pin1 and Gas7b are useful to the diagnosis and treatment of the age-related diseases. We succeeded in establishing the high throughput screening technology for the low molecular inhibitors of Pin1 and identifying DTM, TME-1 and seaweed polyphenol (974B). We showed that Gas7b accelerates microtubule polymerization by binding phosphorylated tau, regulates neuronal cell morphology by regulating the bundling of microtubules and cross linking of microtubule and actin filament, and exists less level in the brains of patients with Alzheimer disease. (original papers; 41)

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：細胞機能 発生・分化制御 タンパク質・糖鎖工学

1. 研究開始当初の背景

長寿大国であるわが国においてはアルツハイマー病（AD）の治療や予防は国民的課題である。アルツハイマー病の病理学的メルクマールとして、凝集アミロイドとタウが凝集して形成される神経原線維変化が知られている。我々の作製した *Pin1*-K0 マウスを解析した結果、*Pin1* がこれらの脳病理に関与していることが明らかになり、*Pin1* が AD の発症を抑制している可能性を示した。一方、*Pin1* はリン酸化タウの微小管重合活性を回復させることも報告されている。これらの事実を考え合わせ、我々は微小管重合を制御できれば AD の発症も抑制できるのではないかという仮説を持つに至った。

2. 研究の目的

第一に、*Pin1* の機能について明らかにすること、第二に、*Pin1* だけでなくその他の微小管重合制御蛋白質を探索・同定し、そのタンパク質の作用機構の解明すること、第三に、微小管重合と AD の関係を分子細胞生物学レベルで明確にすること、第四に、AD 型認知症の予防・治療に効果のある薬剤や飲食料品を発見することである。これらの研究は相互に関連しており、順番に行うのではなく平行して進める。

3. 研究の方法

Pin1 の生物活性について総合的な研究をさらに進める。本研究では微小管重合の制御と認知症についての研究が最重要課題であるが、認知症のメカニズムがそもそも解明されていない現状もある。したがって、本研究では予断を許さず、*Pin1* の多様な生物機能について検討を行う。*Pin1* によるリン酸化タウを介した微小管重合の制御だけでなく、微小管に直接結合する分子や *Pin1* のホモログ探索により微小管重合制御分子を発見し、これら分子と AD との関連について明らかにする。これらの研究は分担者である産総研の広瀬恵子博士と電子顕微鏡解析を行い進める。

次に、微小管重合を制御する低分子物質を探索する。*Pin1* が重合を制御していることから、*Pin1* の阻害剤のハイスループット探索系を構築し大規模探索を行う。特に、食品など天然物からの低分子物質の探索を行う。微小管重合を直接制御する薬剤としてパクリタクセルが知られているのでこの誘導体入手し活性を調べる。

4. 研究成果

(1) 微小管重合制御タンパク質

1 Growth arrest specific protein

7b (*Gas7b*) : リン酸化タウと結合するタンパク質を探索し、*Gas7b* を見出した。*Gas7b* は、脳神経に特異的に存在し微小管重合促進能を有していた。*Gas7b* は微小管のプラス端のシート構造を安定化させており、そのために微小管重合が促進されると予測された。*Gas7b* は AD 脳で減少していたことから AD の発症に関与していると推察している。しかし、*Gas7b*-K0 マウスを作成したところ目立った表現型を見つけないことはできず、AD との関連性を証明できなかった。一般に、ヒトと比べ、マウスは寿命が短いのでマウスでの AD の表現型は見られなかったのだろうと考察した。*Gas7b* の機能の詳細を生化学的に検討した。*Gas7b* はタウを介さずとも微小管に直接結合し、微小管同士を束化したり、微小管とアクチン線維との架橋を促進した。この作用により神経細胞の形態形成、特に突起形成や軸索形成を制御していることを示した。*Gas7b* は AD だけでなく多様な神経疾患の発症に関与していると予測された。

2 *Pin1* : *Pin1*-K0 マウスを用いて、*Pin1* が、TGF β シグナル伝達の制御、パラサイロイドホルモン量の制御、アレルギーショックの調節、CREB 活性化制御、インシュリンシグナル伝達分子 IRS-1 の活性化転写活性抑制、心臓肥大への影響などを明らかにした。いずれも加齢と関連した疾患でありこれらの異常の集積が組み合わさって AD などの脳の病理を生み出している可能性もあると考察している。

微小管重合制御に関しては、*Pin1* によるタウオパチーの発症抑制、タウ脱リン酸化促進などを明らかにした。*Pin1* がタウの特定の部位の脱リン酸化や構造変化に関わりその結果として神経原線維変化を起こしていることは本研究により確定した。脳研究をはじめ、*Pin1*-K0 マウスに関しては分担者の内田千代子博士らと解析を行った。

(2) 微小管重合制御化合物

1 PPIase 活性調節剤のハイスループットスクリーニング法を確立した。本方法は室温では難しいとされていたプロリン異性化酵素の活性調節剤の探索を可能にした方法で、現在、多くの薬品会社で実際に使用されている。我が国の製薬会社には直接技術を教授し薬剤開発に応用されている。我々自身も本方法により *Pin1* 酵素活性阻害剤、DTM と TME-1 を発見した。天然物からの化合物の探索を分担者の山下まり博士、奥田徹博士らと行い、

昆布から抽出したポリフェノールがマイルドにPin1を阻害することを見出した。ここで発見した海藻ポリフェノールは線維芽細胞の脂肪細胞への分化抑制も行うことを明らかにした。今回はPin1の活性促進剤は発見できなかった。しかし、細胞導入型Pin1であるTat-Pin1を作成した。Tat-Pin1は細胞内に侵入しPin1として機能した。

2 微小管重合を安定化する低分子天然物として薬剤にもなっているパクリタクセルに注目しその作成した。パクリタクセル誘導体には微小管重合を安定化させる化学物だけでなく、全く逆に重合を不安定化させるものもあった。構造活性相関を検討した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計41件)

以下41件すべて査読有

1. Inoue H, Uchida T, Tanemura K*(略) (9番/11人) (2014) Site-specific Phosphorylation of Tau Protein is Associated with Deacetylation of Microtubules in Mouse Spermatogenic Cells During Meiosis. *FEBS Lett*, in press
2. Katayama M, Uchida T, Fukuda T*(略) (11番/16人) (2014) Coffee consumption delays the hepatitis and suppresses the inflammation related gene expression in the Long-Evans Cinnamon rat. *Clin Nutr*, in press.
3. Mori T, Uchida T*(略) (10番/10人) (2014) A High-Throughput Screen for Inhibitors of the Prolyl Isomerase, Pin1, Identifies a Seaweed Polyphenol that Reduces Adipose Cell Differentiation *Biosci Biotechnol Biochem*, in press.
4. Toko H, Uchida T, Sussman MA*(略) (13番/14人) (2014) Differential Regulation of Cellular Senescence and Differentiation by Prolyl Isomerase Pin1 in Cardiac Progenitor Cells *J Biol Chem*, 289, 5348-5356.
5. Fukuda T*, Uchida T (略) (10番/14人) (2013) Primary fibroblast cultures and karyotype analysis for the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) *In Vitro Cell Dev Biol Anim*,
6. Gotoh A, Uchida T*(略) (4番/4人) (2013) Growth arrest specific protein 7b (Gas7b) regulates neuronal cell morphology by enhancing microtubule and actin filament assembly. *J Biol Chem*, 288, 34699-34706.
7. Zhang J, Uchida T, Asano T*(略) (17番/18人) (2013) Par14 associates with IRS-1, thereby enhancing insulin-induced IRS-1 phosphorylation and metabolic actions. *J Biol Chem*, 288, 20692-701.
8. Yoon WJ, Uchida T, Ryoo HM*(略) (6番/14人) (2013) Pin1-mediated Runx2 modification is critical for skeletal development. *J Cell Physiol* 228, 2377-2385
9. Toko H, Uchida T, Sussman MA*(略) (15番/16人) (2013) Regulation of Cardiac Hypertrophic Signaling by Prolyl Isomerase Pin1. *Circ Res*. 112:1244-1252.
10. Kimura T, Uchida T, Hisanaga S*(略) (8番/12人) (2013) Pin1 Stimulates Dephosphorylation of Tau at Cdk5-Dependent Alzheimer Phosphorylation Sites. *J Biol Chem*, 288, 7968-7977.
11. Yamashita YM*, Uchida T (略) (8番/8人) (2013) Isolation and structural determination of two novel phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* Okamura, and their radical scavenging activities. *Mar Drugs*, 11, 165-183.
12. Uchida T*(略) (1番/7人) (2012) Prolyl Isomerase Pin1 Regulates Mouse Embryonic Fibroblast Differentiation into Adipose Cells. *PLoS One*, 7(3) e31823, [10.1371/journal.pone.0031823](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031823)
13. Nakatsu Y, Uchida T Asano T*(略) (20番/21人) (2012) Role of Pin1 in the pathogenesis

of non-alcoholic steatohepatitis in a rodent model. *J Biol Chem*, 287, 44526- 44535.

14. Fukuda T*, Uchida T(略) (10 番/15 人) (2012) Efficient establishment of primary fibroblast cultures from the hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*) *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 48, 660-665.

15. Komine A, Uchida T* (略) (6 番/6 人) (2012) Establishment of an adipose-derived mesenchymal stem cell line from a *p53*-knockout mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 426, 468–474.

16. Fukuda T*, Uchida T (略) (14 番/14 人) (2012) Efficient Establishment of Pig Embryonic Fibroblast Cell lines with Conditional Expression of the Simian Vacuolating Virus 40 Large T Fragment. *Biosci Biotechnol Biochem*, 76, 1372-1377.

17. Shimazaki K, Uchida T* (略) (2 番/4 人) (2012) *p53* retards cell-growth and suppresses etoposide-induced apoptosis in *Pin1*-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 422, 133-138.

18. Hidaka M, Uchida T* (略) (6 番/6 人) (2012) Alzheimer's Disease-Related Protein *hGas7b* Interferes with Kinesin Motility, *J Biochem*, 151, 593-598.

19. Hidaka M, Uchida T* (略) (7 番/7 人) (2012) Relationship between structure of Taxane derivatives and their microtubule polymerization activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 76, 349-352.

20. Park JE, Uchida T, Cho S* (略) (8 番/10 人) (2012) A critical step for JNK activation: Isomerization by the prolyl isomerase *Pin1*, *Cell Death Differ*, 19, 153-161

21. Riera J, Uchida T, Kawashima R* (略) (3 番/5 人) (2011) Quantifying the uncertainty of

spontaneous Ca^{2+} oscillations in astrocytes: Particulars of ns in astrocytes: Particulars of Alzheimer's disease. *Biophys J*, 101, 554-564.

22. Nakatsu Y, Uchida T, Asano T* (略) (21 番 /22 人) (2011) Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase NIMA-interacting 1 associates with IRS-1 and enhances insulin actions and adipogenesis. *J Biol Chem*, 286, 20812-20822.

23. Tanaka T, Uchida T, Keicho N* (略) (13 番 /14 人) (2011) Identification of tuberculosis-associated proteins in whole blood supernatant *BMC Infectious Diseases* 11: 71 [10.1186/1471-2334-11-71](https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-71)

24. Mori, T, Uchida T* (略) (11 番/11 人) (2011) A dual inhibitor against prolyl isomerase *Pin1* and cyclophilin discovered by a novel real-time fluorescence detection method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 406, 439-443.

25. Akiyama H, Uchida T* (略) (5 番/5 人) (2011) Prolyl isomerase *Pin1* protects mice from endotoxin shock *PLoS One*, 6(2): e14656. [10.1371/journal.pone.0014656](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014656)

26. Miyake M, Uchida T, Yamaguchi T* (略) (5 番/9 人) (2011) TIEG1 negatively controls the myoblast pool indispensable for fusion during myogenic differentiation of C2C12 cells *J Cell Physiol*, 226, 1128-1136.

27. Tatara Y, Terakawa T, Uchida T* (2010) Identification of *Pin1*-binding phosphorylated proteins in mouse brain. *Biosci Biotechnol Biochem* 74, 2480-2483

28. Ohashi T, Uchida T* (4 番/4 人) (2010) Preparation of protein transduction domain fused peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase *Pin1*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74, 2067-2070.

29. Nakatsu Y, Uchida T, Asano T* (17 番/18 人) (2010) *Pin1* associates with and induces

translocation of CRT2 to the cytosol, thereby suppressing CRE transcriptional activity. *J Biol Chem*, 285, 33018-33027.

30. Matsunaga, H, Uchida T, Ueda H* (略) (7番/10人) (2010) Endocrine disrupting chemicals bind to a novel receptor, microtubule-associated protein 2, and positively and negatively regulate dendritic outgrowth in hippocampal neurons, *J Neurochem*, 114, 1333-1343.

31. Matsuura I, Uchida T, Liu F* (7番/10人) (2010) Pin1 promotes TGF-beta-induced migration and invasion. *J Biol Chem*, 285, 1754-1764.

32. Akiyama H, Uchida T* (略) (11番/11人) (2009) hGas7b that promotes tubulin polymerization is decreased in Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem*, 284, 32695-32699.

33. Nechama M, Uchida T, Naveh-Many T* (略) (2番/5人) (2009) The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 determines parathyroid hormone mRNA levels and stability in secondary hyperparathyroidism. *J Clin Invest*, 119, 3103-3114.

34. Uchida T* (略) (1番/8人) (2009) Direct Optical Microscopic Observation of the Microtubule Polymerization Intermediate Sheet Structure in the Presence of Gas7. *J Mol Biol*, 391, 849-857.

35. Tataru Y, Uchida T* (略) (5番/5人) (2009) Dipentamethylene thiuram monosulfide is a novel inhibitor of Pin1, *Biochem Biophys Res Commun*, 384, 394-398.

36. Yotsumoto K, Uchida T, Hisanaga S* (略) (8番/10人) (2009) Effect of Pin1 or microtubule binding on dephosphorylation of FTDP-17 mutant tau *J Biol Chem*, 284, 16840-16847.

37. Mori T, Uchida T* (略) (6番/6人) (2009) Use of a Real-time Fluorescence Monitoring System for High-Throughput Screening for Prolyl Isomerase Inhibitors. *J. Biomol Screen*, 14(4), 419-424.

38. Nakano A, Uchida T, Imamura T* (略) (4番/10人) (2009) Pin1 downregulates TGF-beta signaling by inducing degradation of Smad proteins. *J Biol Chem*, 284, 6109-6115.

39. Kitayama K, Uchida T, Harata M* (略) (5番/10人) (2008) The human actin-related protein hArap5: Nucleo-cytoplasmic shuttling and involvement in DNA repair. *Exp Cell Res*. 315(2):206-217.

40. Tataru Y, Uchida T, Ichishima, E* (略) (5番/6人) (2008) Acid activation of protyrosinase from *Aspergillus oryzae*: homo-tetrameric protyrosinase is converted to active dimers with an essential intersubunit disulfide bond at acidic pH. *Pigment Cell Melanoma Res*, 21, 89-96.

41. Tataru Y, Uchida T* (略) (4番/4人) (2008) *Pseudomonas fluorescens* proliferates in a mouse organ homogenate at low temperature. *Int J Mol Med*, 21, 621-626.

[学会発表] (計64件)

1. Significance of Pin1- Knock Out Mouse Creation Speaker ; Uchida T International symposium on "Cyclophilins and other Foldases: Cell Signaling Catalysts and Drug Targets", Halle, Germany, Sep. 19-21, 2013

[その他] (計10件)

アウトリーチ活動

1) リン酸化タンパク質の立体構造を特異的に変化させる酵素 Pin1 はアルツハイマー病を防御するか? 講師; 内田 隆史 自治医大セミナー (自治医科大学大学院医学研究科 精神医学) 2013年11月5日
2) Peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase pin1, target of drug for cancer, infectious disease, Alzheimers disease and diabetes Speaker ; Uchida T

International Symposium "Science for Society", Dhaka, Bangladesh, Feb. 25, 2012.

3) "Phosphorylated tau-binding proteins, Pin1 and Gas7 are implicated in Pathogenesis of Alzheimer Disease"

Uchida T *Albert Einstein College of Medicine*, PATHOLOGY RESEARCH SEMINAR
March 23, 2010

4) 内田隆史、アルツハイマー病に関する新規因子の生物機能解析 第370回精神研セミナー (2008年東京都精神医学総合研究所 5月25日)

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/enzyme/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 隆史 (UCHIDA, TAKAFUMI)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：80312239

(2) 研究分担者

内田 千代子 (UCHIDA, CHIYOKO)

福島大学・人間発達文化学類・教授

研究者番号：80312776

山下 まり (YAMASHITA, MARI)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：50192034

広瀬 恵子 (HIROSE, KEIKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・主任研究員

研究者番号：90357872

奥田 徹 (OKUDA, TORU)

玉川大学・学術研究所・教授

研究者番号：403280