

機関番号：34413

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590111

研究課題名（和文）タウ蛋白質のタンブル形成阻害剤の開発：認知症治療薬・予防薬開発のための基盤研究

研究課題名（英文）Development of the inhibitor for tangle formation of tau protein: Basic research for prevention of Alzheimer disease

研究代表者

石田寿昌（Ishida Toshimasa）

大阪薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00111021

研究成果の概要（和文）：（1）タウ蛋白質の PHF (paired helical filament) 形成に重要なマイクロチューブリン結合ドメイン（MBD）を認識する抗体 Tau2r3 の作成に成功し、その可変領域である Fab2r3 と MBD の VQ I I N K ペプチドとの複合体の結晶化、データ測定、初期構造決定に成功した。（2）当研究室で見出した一連のタンブル形成阻害分子と MBD との相互作用を  $^1\text{H-NMR}$  をはじめとする物理化学的手法で解析した。阻害分子が MBD の分子会合を阻害するための必要な構造要件として、芳香性の平面構造で芳香環上に極性基や極性原子を有していることを明らかにした。一方、タウの PHF 形成に不可欠な構造要素として R3 リピート内の 308 番目のイソロイシンと 310 番目のチロシン残基との C-H... $\pi$  結合を明らかにした

研究成果の概要（英文）：(1) The microtubule-binding domain (MBD) of tau protein is the region responsible for the PHF formation. We succeed in the preparation of an antibody Tau2r3, which selectively recognizes the MBD. The X-ray crystal structure analysis of the complex crystal of its variable region, Fab2r3, with the VQIINK fragment peptide of MBD clarified the overall complex structure. Now, we are investigating the recognition mode of MBD by the antibody at the atomic level. (2) The MBD interaction of a series of inhibitors we discovered so far were investigated by  $^1\text{H-NMR}$  and other physicochemical methods, and clarified the structural elements necessary for exhibiting the inhibitory activity, i.e., inhibitor has a planar aromatic ring including the polar atom (O or N) or polar group (NH or OH) on the ring. On the other hand, the PHF formation experiment of a series of tau mutants clarified the important of CH... $\pi$  interaction between Ile308 and Tyr310 residues in the third repeat of MBD.

交付決定額

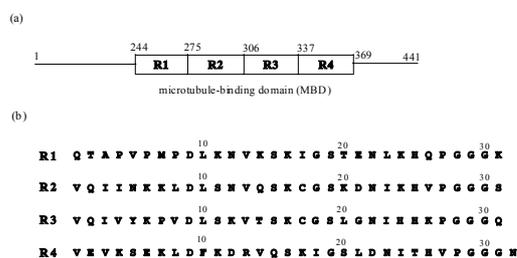
（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	2,300,000	690,000	2,990,000
平成21年度	700,000	210,000	910,000
平成22年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学  
科研費の分科・細目：薬学・創薬化学  
キーワード：医薬分子設計

### 1. 研究開始当初の背景

神経変性型痴呆の脳組織に共通する神経病変としてタングルと呼ばれる不溶性沈着物の脳内蓄積があり、その主要構成成分はタウ蛋白質である。タウ蛋白質の異常リン酸化やタウ遺伝子の点突然変異がPHF (paired helical filament) 構造のタングル形成を引き起こすことはよく知られている。タングルの数と痴呆の程度は相関することから、タングル形成機構の解明は痴呆性疾患の発症メカニズムとそれを治療・予防する手段を考える上で極めて重要であるが、現在、不明である。それ故、本来可溶性であるタウ蛋白質が病的変化（タウ遺伝子の変異やタウ蛋白質の異常なリン酸化等）により構造変化を受けて不溶性のタングルとして沈着する形成機構を分子レベルで解明する目的で、これまでに、蛍光やCDを始めとする分光学的解析、X線、NMR、分子動力学計算による立体構造解析、種々のMBD変換体を用いたPHF形成能実験と電子顕微鏡測定によるトポロジー解析等を精力的に進めてきた。



その結果、441のアミノ酸残基よりなるタウ蛋白質の全体構造や各機能ドメイン構造、特にタングル形成に不可欠な3回(R1-R3-R4)あるいは4回(R1-R2-R3-R4)繰り返し構造を持つ微小管結合ドメイン(MBD)のPHF形成における役割や形成機構についての重要な新知見を明らかにした。

### 2. 研究の目的

本研究は、これまでの知見を基に、PHF形成開始の引き金となることを明らかにしたMBD R2-R3の構造を選択特異的に認識・結合してPHF形成をブロックする化合物を設計し、痴呆治療・予防薬の開発へ繋げることを目的としている。

### 3. 研究の方法

シアニジンをはじめとする一連の阻害分子とMBDドメインのR2、R3およびR23構造との相互作用の解明

- (a)  $^1\text{H-NMR}$  測定による阻害分子とR2、R3、およびR23構造との相互作用解析
- (b) 分子動力学計算による阻害分子-リピート分子複合体の立体構造構築
- (c) X線結晶構造解析による阻害分子-リピート分子複合体の相互作用解析

**R3リピート構造中のチロシン残基を選択特異的に修飾する化合物の開発**

チロシン残基を他の特徴的なアミノ酸残基に置換したMBD変換体を作製し、そのPHF形成能について蛍光法で調べ、CD、NMRによる溶液中でのコンフォメーション解析を行い、チロシン残基含有の天然型MBDとの差異を明らかにする。

**MBDのR2、R3あるいはR2-R3リピート構造を認識する抗体の設計**

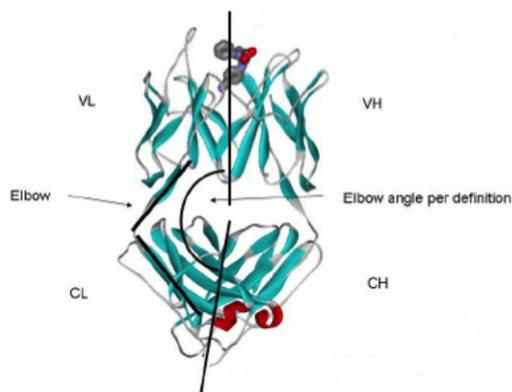
MBDのR2、R3あるいはR2-R3リピート構造の特定の機能性領域あるいは全体を選択的に認識する抗体、特にR2、R3ドメインを認識する抗体ならびにR3のN-末端6残基の $\beta$ シート形成能力が高くMBD凝集に関与するVQIVYKを認識する抗体を種々作成し、タウ蛋白質のタングル形成阻止能を調べる。さらに、顕著な形成阻害を示した抗体については、これまで用いてきた物理化学的手法によりその特異的認識領域を解明し、その認識部位に選択的に結合する一連の低分子ペプチドあるいは化合物を分子設計する。

### 4. 研究成果

**MBDのR2-R3リピート構造を認識する抗体の作成とその認識機構の解明**

TauのR2-R3リピート構造を選択的に認識する抗体Tau2r3の単離精製に成功した。ついで、その抗原結合性フラグメント(Fab2r3)とR2-R3ペプチドとの結合確認をプルダウン法、表面プラズモン法により確認し、その結合の核心をなすVQIINKペプチドとの複合体の結晶化に成功した。そして、硫黄原子の異常分散による位相決定に成功し、現在、全

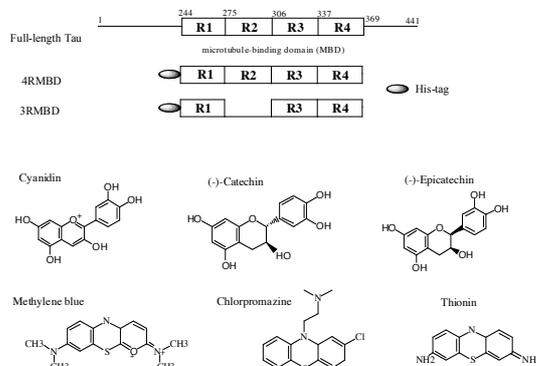
体構造の8割以上の立体構造を同定している。本年中に精密な構造解析を完成させ、本目的であるタウ抗体によるタウ MBD の選択特異的認識機構を原子レベルで解明し、この情報を基に新規タウ重合阻害剤の開発に取り組んでいる。



り組んでいる。

### チオニン、シアニジンをはじめとする PHF 形成阻害分子とタウ MBD ドメインとの相互作用解析と、それに基づく阻害分子の開発と医薬品への展開

これまで当研究室で見出したチオニン、シアニジンをはじめとする一連のタウ蛋白の PHF 形成阻害分子の MBD との相互作用様式について、<sup>1</sup>H-NMR 測定による溶液構造解析および分子動力学計算および分光化学的手法により解析を行った。その結果、一連の阻害分子が、R2-R3 リピート分子や MBD の分子会合を阻害するために必要な構造特徴として、芳香性の平面構造を有しているとともに R2-R3 リピートや MBD と水素結合や静電結合が形成できる極性原子を芳香環中または環に直接結合していることが不可欠であることを明らかにすると共に、これにより、MBD 分子の  $\beta$ -シート構造の形成を阻害できることを明らかにした。

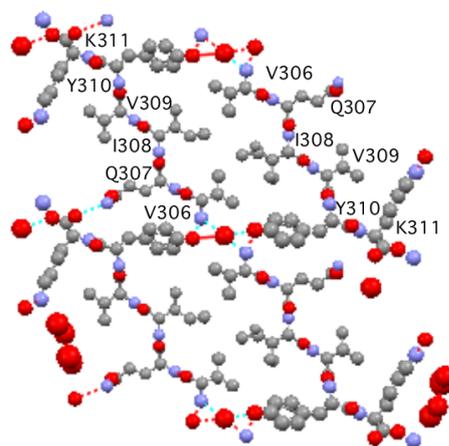
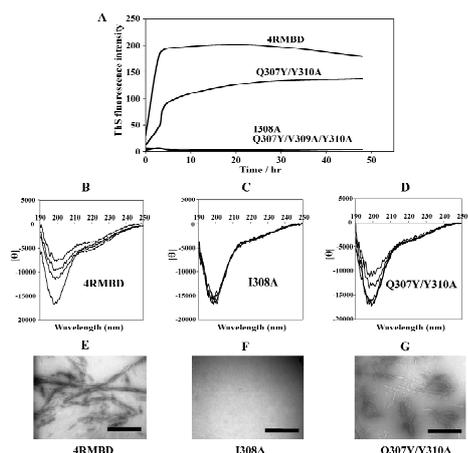


この知見に基づき、チオニンより強い PHF 形成阻害能を示す天然分子ジュグロンおよびシコニンの発見に成功し、医薬への応用のための分子改良を試み、現在、鋭意研究を進めている。

### R3 ドメイン内チロシン残基を選択特異的に修飾する化合物の開発

一連のタウ蛋白の変換体を作成し、変換体残基の PHF 形成との構造活性相関について研究した。その結果、タウ蛋白の PHF 形成に不可欠な構造要素として MBD 中の R3 リピート内の 308 番目のイソロイシンと 310 番目のチロシン残基との間で形成される C-H $\cdots$  $\pi$  結合が PHF 形成に不可欠であることを明らかにした。

一方、これまでに明らかにしてきた PHF 形成反応を阻害する低分子化合物を用いて、その C-H $\cdots$  $\pi$  結合を選択特異的にブロックするか否かについて NMR をはじめとする分光化学的手法により、C-H $\cdots$  $\pi$  結合阻害と PHF 形成抑制との間に相関性のあることを明らかにした。



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)

K. Minoura, K. Okuyama, C. Nishiura, F. Mizushima, M. Sumida, T. Taniguchi, K. Tomoo, T. Ishida, Role of each peptide in aggregation of tau microtubule-binding domain, *Peptide Science*, 査読有、2007, 2008, 59-62

K. Okuyama, C. Nishiura, F. Mizushima, K. Minoura, M. Sumida, T. Taniguchi, K. Tomoo, T. Ishida, Linkage-dependent contribution of repeat peptides to self-aggregation of three- or four-repeat microtubule-binding domains in tau protein, *FEBS Journal*, 査読有, 275, 2008, 1529-1539

M. Hattori, E. Sugino, K. Minoura, Y. In, M. Sumida, T. Taniguchi, K. Tomoo, T. Ishida, Different inhibitory response of cyanidin and methylene blue for filament formation of tau microtubule-binding domain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有, 374, 2008, 158-163

C. Nishiura, K. Takeuchi, K. Naruto, K. Minoura, M. Sumida, T. Taniguchi, K. Tomoo, T. Ishida, Importance of tyrosine residue for filament formation of tau microtubule-binding domain, *Peptide Science*, 査読有、2008, 2009, 235-238

E. Sugino, M. Hattori, K. Minoura, Y. In, M. Sumida, T. Taniguchi, K. Tomoo, T. Ishida, Inhibitory behavior of cyanidine and methylene blue for filament formation of tau microtubule-binding domain, *Peptide Science*, 査読有, 2008, 2009, 331-334

E. Sugino, C. Nishiura, K. Minoura, Y. In, M. Sumida, T. Taniguchi, K. Tomoo, T. Ishida, Three-/four repeat-dependent aggregation profile of tau microtubule-binding domain clarified by dynamic light scattering analysis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 385, 2009, 236-240.

T. Ishida, Structural studies of specific intermolecular interactions and self-aggregation of biomolecules and their application to drug design, *Chem.Pharm.Bull.* 査読有, 57, 2009, 1309-1334.

C.Nishiura, K. Takeuchi, K. Minoura, M. Sumida, T. Taniguchi, K. Tomoo, T. Ishida, Importance of Tyr310 residue in the third repeat of microtubule

binding domain for filament formation of tau protein, *J. Biochem.*, 査読有, 147, 2010, 405-414

K. Naruto, K. Minoura, R. Okuda, T. Taniguchi, Y. In, T. Ishida, K. Tomoo, Interplay between I308 and Y310 residues in the their repeat of microtubule-binding domain is essential for tau filament formation, *FEBS Lett.*, 査読有, 584, 2010, 4233-4236

K. Minoura, K. Takeuchi, C. Nishiura, K. Naruto, M. Sumida, T. Taniguchi, K. Tomoo, T. Ishida, Structural role of tyrosine residue in the their repeat of microtubule binding domain for filament formation of tau protein, *Peptide Science*, 査読有, 2009, 2010, 227-230

[学会発表] (計 14 件)

服部正幹、箕浦克彦、友尾幸司、石田寿昌, tauタンパク質の凝集抑制物質の検索とその抑制機構解明, 日本薬学会第128年会, 2008, 横浜

西浦千里、竹内健悟、箕浦克彦、友尾幸司、石田寿昌, Tauタンパク質微小管結合ドメイン(MBD)の自己重合におけるTyrosine残基の重要性について, 第58回日本薬学会近畿支部大会, 2008, 神戸

竹内健悟、西浦千里、箕浦克彦、友尾幸司、尹康子、石田寿昌, Tauタンパク質の微小管結合ドメインに存在するTyrosineが構造に与える影響, 第58回日本薬学会近畿支部大会, 2008, 神戸

杉野恵津子、服部正幹、箕浦克彦、尹康子、友尾幸司、石田寿昌, Cyanidine(Cy)とMethylene Blue(MB)におけるTauタンパク質微小管結合部位のフィラメント形成抑制作用の差異, 第58回日本薬学会近畿支部大会, 2008, 神戸

服部正幹、箕浦克彦、友尾幸司、石田寿昌, tauタンパク質の凝集抑制物質の検索とその抑制機構解明, 第58回日本薬学会近畿支部大会, 2008, 神戸

杉野恵津子、服部正幹、箕浦克彦、尹康子、友尾幸司、石田寿昌, tauタンパク質微小管結合ドメインのフィラメント形成に対するCyanidin(Cy)とMethylene Blue (MB)の阻害作用の差異について, 日本薬学会第129年会, 2009, 京都

西浦千里、竹内健悟、鳴戸佳子、箕浦克彦、友尾幸司、石田寿昌, Tauタンパク質微小

管結合ドメインに存在する Tyrosine の構造学的役割, 日本薬学会第129年会, 2009, 京都

竹内健悟、西浦千里、箕浦克彦、友尾幸司、石田寿昌, Tau タンパク質微小管結合ドメインに存在する Tyrosine の構造学的役割, 日本薬学会第129年会, 2009, 京都

木挽友博、土屋孝弘、箕浦克彦、尹康子、友尾幸司、辻坊裕、石田寿昌, Tau 蛋白質の自己凝集抑制能を有する特異的認識抗体の作成とその構造解析, 第59回日本薬学会近畿支部大会, 2009, 大阪

鳴戸佳子、箕浦克彦、尹康子、友尾幸司、辻坊裕、石田寿昌, Tau タンパク微小管結合ドメイン(MBD)の自己重合における Tyrosine 残基の重要性について, 第59回日本薬学会近畿支部大会, 2009, 大阪

木挽友博、土屋孝弘、箕浦克彦、尹康子、友尾幸司、谷口泰造、辻坊裕、石田寿昌, Tau タンパク質の自己凝集抑制能を有する特異的認識抗体の作成とその構造機能解析, 日本薬学会第130年会, 2010, 岡山

鳴戸佳子、箕浦克彦、尹康子、友尾幸司、石田寿昌, Tau タンパク質微小管結合ドメイン(MBD)の自己重合における Tyrosine 残基と周囲のアミノ酸残基の重要性について, 日本薬学会第130年会, 2010, 岡山

曾川甲子朗、箕浦克彦、尹康子、友尾幸司、石田寿昌, Tauタンパク質微小管結合ドメイン(MBD)におけるCH— $\pi$ 相互作用がもたらすフィラメント形成能への影響について, 第130回日本薬学会近畿支部大会, 2010, 大阪

奥田良平、鳴戸佳子、箕浦克彦、尹康子、友尾幸司、谷口泰造、石田寿昌, Full length tau の自己重合におけるCH— $\pi$ 相互作用の重要性について, 第130回日本薬学会近畿支部大会, 2010, 大阪

〔図書〕(計1件)

石田寿昌, 京都廣川書店, 物理化学—熱力学、その基礎と応用, 2010, 176

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石田寿昌 (ISHIDA TOSHIMASA)  
大阪薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：00111021

##### (2) 研究分担者

友尾幸司 (TOMOO KOJI )  
大阪薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：70257898

尹康子 (IN YASUKO)  
大阪薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：50257896

箕浦克彦 (MINOURA KATSUHIKO)  
大阪薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：10278591

##### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：