

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390333

研究課題名（和文）家族性認知症関連蛋白の重合・蓄積・分解過程の検討と治療薬開発

研究課題名（英文）The mechanisms of aggregation, accumulation and degradation of the genetically causative protein related to familial dementia diseases.

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（和文）：家族性認知症である FTDP-17 の原因遺伝子はタウであり、タウ蛋白の凝集・分解過程については不明な点が多い。タウ蛋白の分解過程の検討をおこなったところ、puromycin sensitive amino peptidase (PSA) が優位にタウ蛋白分解を制御していることが示唆された。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が、変異型タウにおいてはリン酸化の亢進が認められた。さらに、Methionin aminopeptidase を検討したところ、PSA の場合と同様にタウ蛋白の分解制御に関わっており、N 末端からの分解が重要な意義を持つことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Tau protein is hyperphosphorylated, ubiquitinated and accumulated in FTDP-17 brains, however mechanisms of the accumulation is still unclear. To understand the involvement of proteases in metabolisms of tau protein, some of protease inhibitors were employed in cultured cells. Pulse-chase experiments revealed proteolysis of tau protein was attenuated when treated with puromycin. And increased tau protein levels were also observed in cells treated with siRNA to puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA) for inhibition of its expression. Those data suggest that PSA is a protease which regulates proteolysis of tau predominantly in cells. The protein metabolism of tau containing FTDP-17 mutations was also investigated employing pulse-chase experiments and attenuated proteolysis of tau was observed in the cells transfected with the mutant tau. Phosphorylation of tau at Thr231, Ser396 and Ser409 was increased in the cells transfected with V337M, R406W, and R406W mutant tau gene, respectively. These results suggest that attenuated proteolysis of FTDP-17 mutant tau might be explained by the increased phosphorylation levels resulting in resistance to proteolysis. Furthermore, in cells treated with fumagilin, an inhibitor to methionine aminopeptidase, tau protein with N-terminal methionine increased similar to puromycin-treated cells, suggesting that aminoterminal processing of tau protein is important for tau degradation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2010 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

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：老年精神医学

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。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) も少なくはなく、その対応への重要性は増大している。家族性 FTD では、1998 年に 17 番染色体に存在するタウ蛋白をコードする遺伝子変異により FTDP-17 (Fronto-Temporal Dementia with Parkinsonism, linked to chromosome 17) が引き起こされることが報告され、このことをきっかけとしてタウ蛋白が細胞内に異常蓄積する疾患をタウオパチーと総称するようになった。そして、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。タウオパチーにおいて、タウ蛋白は高度なリン酸化とその自己重合化 (線維形成) が認められているが、これらは神経変性における重要なステップと考えられている。

蛋白分解に関する今までの知見を整理すると、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 (Johnson GV, et al. BBRC 163;1505-1511, 1989, Kenessey A, et al. J Neurochem 69;2026-2038, David DC, et al. J Neurochem 83;176-185, 2002.)。また、最近の報告から puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA) (エクソプロテアーゼ) もタウ蛋白の分解に重要であることが報告されている (Karsten SL, et al. Neuron 51:549-560, 2006.)。個々の分解酵素ではなく、経路としてはプロテオソーム経路、オートファジー/ライソソーム経路などが想定されているが、分解経路の詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

タウ蛋白の分解過程に関する理解を得る

ために、遺伝子変異・リン酸化の影響、個々の蛋白分解酵素の関与について検討をおこなうことにした。さまざまな分解酵素阻害剤を添加して検討を加えるとともに、タ FTDP-17 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った。さらに、N 末端の分解が重要である可能性を考慮して、検討を行うことにした。

3. 研究の方法

変異タウ蛋白の作成

野生型タウ (4 リピート最長型 tau441) コンストラクトをもとに、Quick Change Kit (Stratagen) をもちいた PCR 法によって、V337M、R406W の 2 種類の FTDP-17 変異を導入した。

遺伝子の細胞への導入

COS-7 細胞を 5% FCS を含む D-MEM (Gibco BRL) にて培養し、Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて、トランスフェクションを行なった。

タウ分解過程の解析 (ウエスタンブロット)

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、タウ蛋白をウエスタンブロットにて検討した。

タウ分解過程の解析 (パルスチェイス法)

SH-SY5Y 細胞を [³⁵S]methionine でラベルし、24 時間後および 48 時間後、RIPA バッファー (50mM Tris-HCl、pH7.4、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、1% Triton X-100、1% Sodium deoxycholate、0.1% Sodium dodecylsulphate、Protease inhibitor cocktail (Sigma) 0.5 μl/ml、10nM Okadaic acid) にて溶解し、その lysates を 4°C、40K x G にて遠心した。この supernatant を回収したのちに、抗タウ蛋白モノクローナル抗体 Tau-5 ((Calbiochem, San Diego, CA, USA) および Protein G-Sepharose (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) をもちいた免疫沈降をおこない、ラベルされたタウ蛋白を回収した。このサンプルを用いて電気泳動を行い、オートラジオグ

ラフィーを行って、タウ蛋白の分解過程を検討した。

細胞内タウ蛋白リン酸化レベルの検討

野生型および変異型タウを COS-7 細胞に強制発現させたものからライセートを抽出し、抗タウ蛋白リン酸化特異抗体(リン酸化 Thr231、リン酸化 Ser396、リン酸化 Ser409)を用いたウエスタンブロットにより、タウ蛋白のそれぞれのリン酸化の程度を検討した。

タウ蛋白 N 末端分解過程の解析

タウ蛋白アミノ末端分解の解析のために、タウ N 末端抗体を作成した。ペプチド MAEPRQEFVEMDC および AEPRQEFVEMDHC (アミノ酸 1 文字表記)を作成し、前者のペプチドに対する抗血清を得た。2 種類のペプチドをレジンに結合させ、アフィニテカラムを作成し、作成した抗血清を前者ペプチドの結合したアフィニテカラムに結合・溶出させ、さらに得られた抗体を後者ペプチドの結合したアフィニテカラムに通して吸収させ、N 末端の methionine を含むタウのみに対する特異的ペプチド抗体を作成した。

蛋白の N 末端の分解に関与する methionine aminopeptidase を阻害する fumagilin を SH-SY5Y 細胞培養する培地に添加し、上記の抗体を用いたウエスタンブロットにてタウ蛋白の N 末端の分解を検討した。

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、タウ蛋白をウエスタンブロットにて検討したが、タウ蛋白の増加などの変化は認められなかった。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。

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によって検討したところ、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。

さらに、methionine aminopeptidase を阻害する fumagilin を SH-SY5Y 細胞培養する培地に添加し、タウ蛋白の N 末端の分解を検討したところ、fumagilin 添加によって N 末端 methionine 特異的抗タウ蛋白抗体によって染色されるタウ蛋白のバンドおよび全タウ蛋白のバンドは亢進した。

タウ蛋白の分解過程については、カルパイン、カテプシン、プロテアソーム、カスパーゼなどの蛋白分解酵素が *in vitro* でタウ蛋白を分解することが知られていた。しかし、培養細胞内では分解酵素系が様々なフィードバック作用を行っており、統一した見解が得られていなかったが、PSA はタウ蛋白の分解に影響を与えていることが示唆された。さらに methionine aminopeptidase を阻害する fumagilin を用いた検討からも、タウ蛋白の N 末端の分解がタウ蛋白全体の分解の制御に関わっていることが示唆された。

遺伝性認知症 FTDP-17 の原因遺伝子と考えられるタウ遺伝子の変異の影響をパルスチェイス法のもとで検討したが、FTDP-17 変異型タウの有意な分解遅延が認められた。この分解遅延の原因を調べるために、プロテアーゼ耐性を惹起する可能性が知られているリン酸化に関して検討をおこなったところ、FTDP-17 変異型タウのリン酸化レベルに関しては、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。このことより、FTDP-17 変異型タウの分解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 15 件)

- 1) Kato K, Tanaka T, Sadik G, Baba M, Maruyama D, Yanagida K, Kodama T, Morihara T, Tagami S, Okochi M, Kudo T, Takeda M. Protein kinase C stabilizes X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) through phosphorylation at Ser87 to suppress apoptotic cell death. *Psychogeriatrics* 11:90-97, 2011. (査読有)
- 2) Currais A, Kato K, Canuet L, Ishii R, Tanaka T, Takeda M, Soriano S. Caffeine Modulates Tau Phosphorylation and Affects Akt Signaling in Postmitotic Neurons. *J Mol Neurosci*. 43(3):326-332, 2011. (査読有)
- 3) Takeda M, Tanaka T, Kudo T. Elderly depression and diffusion tensor imaging. *Psychogeriatrics*. 11(1):1-5, 2011. (査読有)
- 4) Kazui H, Yoshida T, Takaya M, Sugiyama H, Yamamoto D, Kito Y, Wada T, Nomura K, Yasuda Y, Yamamori H, Ohi K, Fukumoto M, Iike N, Iwase M, Morihara T, Tagami S, Shimosegawa E, Hatazawa J, Ikeda Y, Uchida E, Tanaka T, Kudo T, Hashimoto R, Takeda M. Different characteristics of cognitive impairment in elderly schizophrenia and Alzheimer's disease in the mild cognitive impairment stage. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 1(1):20-30, 2011. (査読有)
- 5) Mori K, Okochi M, Tagami S, Nakayama T, Yanagida K, Kodama TS, Tatsumi S, Fujii K, Tanimukai H, Hashimoto R, Morihara T, Tanaka T, Kudo T, Funamoto S, Ihara Y, Takeda M. The production ratios of AICD ϵ 51 and A β 42 by intramembrane proteolysis of β APP do not always change in parallel. *Psychogeriatrics*. 10(3):117-123, 2010. (査読有)
- 6) Hayashi N, Kazui H, Kamino K, Tokunaga H, Takaya M, Yokokoji M, Kimura R, Kito Y, Wada T, Nomura K, Sugiyama H, Yamamoto D, Yoshida T, Currais A, Soriano S, Hamasaki T, Yamamoto M, Yasuda Y, Hashimoto R, Tanimukai H, Tagami S, Okochi M, Tanaka T, Kudo T, Morihara T, Takeda M. KIBRA genetic polymorphism influences episodic memory in Alzheimer's disease, but does not show association with disease in a Japanese cohort. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 30(4):302-308, 2010. (査読有)
- 7) Takeda M, Tanaka T. Depression in the elderly. *Geriatr Gerontol Int*. 10(4):277-279, 2010. (査読有)
- 8) Takeda M, Martínez R, Kudo T, Tanaka T, Okochi M, Tagami S, Morihara T, Hashimoto R, Cacabelos R. Apolipoprotein E and central nervous system disorders: reviews of clinical findings. *Psychiatry Clin Neurosci*. 64(6):592-607, 2010. (査読有)
- 9) 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* 9:157-166, 2009. (査読有)
- 10) Tanaka T, Kazui H, Sadik G, Tanimukai H, Tagami S, Morihara T, Okochi M, Kudo T, Takeda M. Prevention of psychiatric illness in the elderly I -Path to Prevention of Dementia- *Psychogeriatrics* 9:111-115, 2009. (査読有)
- 11) 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* 108:33-43, 2009. (査読有)
- 12) 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)
- 13) Kazui H, Ishii R, Yoshida T, Ikezawa K, Takaya M, Tokunaga H, Tanaka T, Takeda M. Neuroimaging studies in patients with Charles Bonnet Syndrome. *Psychogeriatrics*. 9:77-84, 2009. (査読有)
- 14) Tanimukai H, Kudo T, Tanaka T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Takeda M. Novel therapeutic strategies for neurodegenerative disease. *Psychogeriatrics*. 9:103-109, 2009. (査読有)
- 15) Yanagida K, Okochi M, Tagami S, Nakayama T, Kodama T, Nishitomi K, Jiang J, Mori K, Tatsumi S, Arai T, Ikeuchi T, Kasuga K, Tokuda T, Kondo M, Ikeda M, Deguchi K, Kazui H, Tanaka T, Morihara T, Hashimoto R, Kudo T, Steiner H, Haass C, Tsuchiya K, Akiyama H, Kuwano R, Takeda M. The 28-amino acid form of an APLP1-derived A β -like peptide is a surrogate marker for A β 42 production in the central nervous system. *EMBO Molecular Medicine*, 1:223-235, 2009. (査読有)
- [学会発表] (計 13 件)
- 1) Tanaka T, Yanagi K, Maruyama D, Takeda M. Involvement of puromycin-sensitive aminopeptidase in metabolism of tau protein in cultured cells. The 15th Congress of the International Psychogeriatrics Association, Sept. 8, 2011, Den Haag, Holland.
- 2) Tanaka T, Sadik G, Yanagi K, Kato K, Takeda M. Accumulation and aggregation of tau protein in tauopathies. The 3rd World Congress of Asian Psychiatry, Aug 2, 2011, Melbourne, Australia.
- 3) Morihara T, Hayashi N, Yokokoji M, Akatsu H, Saito Y, Suzuki T, Takamura A, Katayama T, Ito N, Nishitomi K, Kimura N, Kazui H, Yanagida K, Kato K, Yatsumi S, Kodama T, Tagami S, Okochi M, Tanaka T, Kudo T, Takeda M. Identification of a gene which controls Abeta accumulation using APP Tg mice with mixed genetic background: Splicing variant specific-effect of Kinesin Light Chain 1 (Klcl). Alzheimer's Association International Conference (AAIC2011), Parris, France, July 20, 2011.
- 4) Tanaka T, Kato K, Yanagi K, Maruyama D, Takeda M. Involvement of protein kinase C in neuronal cell apoptosis by phosphorylation of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) at Ser87. The 10th World Congress of Biological Psychiatry. May 30, 2011, Prague, Czech Republic.
- 5) 加藤希世子、田中稔久、Golam Sadik、Antonio Currais、柳健太郎、馬場都、丸山大輔、武田雅俊 アポトーシス阻害蛋白 XIAP の PKC によるリン酸化を介した細胞死抑制性メカニズムの解析 第 29 回日本認知症学会 2010. 11. 6. (愛知県名古屋市)
- 6) Morihara T, Hayashi N, Yokokoji M, Fukusyo E, Tanimukai H, Tagami S, Okochi M, Tanaka T, Kudo T, Takeda M. Identification of a gene which controls Abeta accumulation using App Tg mice with mixed genetic background The 13th International Conference on Alzheimer Disease and related disorders Jul, 14, 2010, Hawaii, U. S. A
- 7) Takaya M, Tanaka T, Ataka S, Shimada H, Morihara T, Miki T, Kazui H, Takeda M. PIB-PET images, compared with MR,

- FDG-PET, and IMP-SPECT images, of a patient with Alzheimer's disease with presenilin-1 mutation (Met233Leu) showing a new phenotype The 13th International Conference on Alzheimer Disease and related disorders Jul, 13, 2010, Hawaii, U. S. A.
- 8) 田中稔久、柳健太郎、Golam Sadik、加藤希世子、武田雅俊 培養細胞におけるタウ蛋白の分解における puromycin 感受性 アミノペプチダーゼの関与 第28回日本認知症学会 2009.11.21. (宮城県仙台市)
- 9) Takeda M, Tanaka T. dementia service in Japan. The 14th Congress of the International Psychogeriatrics Association, Sept. 5, 2009 Montreal, Canada.
- 10) Tanaka T, Kato K, Yanagi K, Sadik G, Takeda M. Attenuated proteolysis of FTDP-17 mutant tau in cultured cells and involvement of increased phosphorylation of tau. The 14th Congress of the International Psychogeriatrics Association, Sept. 4, 2009 Montreal, Canada.
- 11) Tanaka T, Sadik G, Kato K, Yanagi K, Takeda M. 14-3-3 protein differentially interacts with 3-repeat and 4-repeat tau. The 12th International Conference on Alzheimer Disease and related disorders Jul, 14, 2009, Vienna, Austria.
- 12) Morihara T, Takeda M. Genetics and Genomics of Alzheimer's disease. International Meeting of the International Psychogeriatric Association May, 6, 2009, Rio de Janeiro, Brazil.
- 13) Takeda M, Morihara T. Genomics and Cognitive Function of the elderly. International Meeting of the International Psychogeriatric Association May, 6, 2009, Rio de Janeiro, Brazil.

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 TOSHIHISA)
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：90403198