

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390283

研究課題名(和文) 前頭側頭型認知症における異常蓄積蛋白の分解・重合制御に関わる新規分子の探索と解析

研究課題名(英文) The analysis of regulatory mechanisms of degradation/aggregation of abnormally accumulated protein in frontotemporal dementia brain.

研究代表者

武田 雅俊 (Takeda, Masatoshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00179649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチンリガーゼXIAPによるタウ蛋白ユビキチン化のリン酸化による影響を検討した。野生型タウまたは Metタウをリン酸化し、XIAPのタウ蛋白への結合の影響をpull-downアッセイを用いて行い、さらに、in vitroにおけるユビキチン化へのリン酸化の影響は認められなかった。TDP-43はSer409およびSer410が病態脳においてリン酸化されているが、この部位の非リン酸化ペプチド、Ser409/Ser410リン酸化ペプチドを作成してリン酸化ペプチドに対する結合物を検討したところ、35kDaおよび50kDaの特異的結合蛋白が抽出された。

研究成果の概要(英文)：The effects of phosphorylation on interaction of tau with ubiquitin conjugating enzyme XIAP (X-linked Inhibitor to apoptosis protein) were analyzed. Wild typed tau and Met-deleted tau were prepared and pull-down assay was carried out using XIAP after phosphorylation of both tau and both tau proteins were incubated with ubiquitination enzyme sources together with XIAP, and the effects of phosphorylation on ubiquitination were evaluated. No significant difference was observed between non-phosphorylated samples and phosphorylated ones. Then binding partner to phosphorylated TDP-43 was investigated employing phosphorylated and non-phosphorylated peptides corresponding to Ser409/Ser410 of TDP-43. Then specific binding proteins were purified.

研究分野：老年精神医学、認知症、神経化学

キーワード：タウ蛋白 XIAP アポトーシス

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。神経変性性認知症の中ではアルツハイマー病 (Alzheimer disease : AD) に次いで前頭側頭型認知症 (Frontotemporal dementia :FTD) も数は多く、その対応への重要性は増大している。遺伝性FTDでは、1998年に17番染色体に存在するタウ遺伝子変異によりFTDP-17 (Fronto-TemporalDementiawith 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。

しかし、FTDの中には変性神経細胞内にタウ陰性ユビキチン陽性の封入体を有する症例が存在し、その正体は長い間不明であったが、実はFTD および筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis:ALS) 患者脳内に蓄積するユビキチン化蛋白質の主成分がTDP-43であることが報告された (Neumann M, et al. Science. 314:130-133,2006.、Arai T, et al. BBRC.351:602-611,2006.)。さらに、遺伝性ALS/FTD原因遺伝子としてもこのTDP-43 (Sreedharan J,etal. Science 319:1668- 1672, 2008)と、加えてFUS (Kwiatkowski TJ Jr, etal. Science 323:1205-1208, 2009, Vance C, etal. Science 323:1208-1211, 2009)の遺伝子変異も報告された。このTDP-43およびFUSはDNAおよびRNAに結合し、スプライシング調節機能を有することなどが知られ、何らかの機序で核酸との結合性が病態形成に関与していることが推測される。また、タウ蛋白とともにどちら

の蛋白も神経細胞内にリン酸化されユビキチン化された状態で多量に蓄積するという点で共通する。

2. 研究の目的

前述の背景を総括すると、FTDにおける神経変性過程には、リン酸化およびユビキチン化される蛋白そのもの、ユビキチン化された蛋白との結合・制御に関わる蛋白が病態に深く関わっていると言える。そこで、今回我々は、リン酸化タウの蓄積を防ぐためのプロテオソーム系分解に至る第一段階であるユビキチン化過程を検討し、またTDP-43蛋白蓄積のプロセスを解明すべく、リン酸化TDP-43蛋白と結合する因子を探索することにした。

本研究第一の目的としてタウ蛋白の細胞内蓄積を防ぐための分解のための第一段階のユビキチン化過程を検討し、リン酸化によってどのように影響を受けるか検討を加える。次に、我々がリン酸化による14-3-3蛋白との結合性の変化を見出したように、TDP-43についても同様にリン酸化によって結合性の変化する蛋白を見出す。リン酸化はシグナル伝達や神経変性過程において何らかのシグナルになっている可能性が高く、今まで不明であったTDP-43の重合や分解メカニズムに関して知見を与えてくれる可能性が高いと考えられる。

3. 研究の方法

タウ蛋白とユビキチンリガーゼ XIAP との結合親和性およびユビキチン化の検討

タウ蛋白はリン酸化を受けるとHSP70/CHIP複合体と結合し、ユビキチン化を受けることが報告されている。我々はタウ蛋白のユビキチン化過程として、ユビキチンリガーゼXIAPによる作用を見いだしてきたが、タウ蛋白のリン酸化によってどのような影響を受けるかは明らかではない。そこで、タウ蛋白ユビキチン化のリン酸化による影響を調べることにした。

XIAPとタウ蛋白の結合にはタウ蛋白のN末端が部分分解されているという蛋白修飾が必要であることを我々は予備的実験から確認していたので、Tag-free 組換え蛋白質精製システムProfinia システム eXact (BIO-RAD) を用いて、リコンビナントの野生型タウと第1Metの切断された Δ Met タウを精製し、またXIAPの欠損変異体 (XIAP1-351) コストラクトを作成し、精製した。野生型タウおよび Δ Met タウとXIAPおよびXIAP1-351との間の結合性をpull-downアッセイによって検討した。また、XIAPおよびXIAP1-351のカスパーゼ抑制機能を有するが、これに対する機能抑制に関して検討を行った。SH-SY5Y細胞にスタウロスポリンを添加し、アポトーシスを誘導した状態の細胞ライセートを調整し、これにXIAPのみ、XIAP1-351のみ、XIAPと野生型タウまたは Δ Met タウ、XIAP1-351と野生型タウまたは Δ Met タウを細胞ライセートに添加してカスパーゼ活性を測定した。

次に、タウ蛋白はいくつかのキナーゼによってリン酸化されるが、Protein Kinase A (PKA)または Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3)によって野生型タウまたは Δ Met タウ蛋白のリン酸化をおこない、XIAP のタウ蛋白への結合の影響を pull-down アッセイを用いて行った。

さらに、野生型タウおよび Δ Met タウのXIAPによるin vitroのユビキチン化を検討した。野生型タウおよび Δ Met タウを、ユビキチン化酵素E1、E2 (UbcH5c)、E3(XIAP)、と共にATP存在下37 °Cでインキュベートをおこない、サンプルをウエスタンブロットすることによって、高分子量のタウ蛋白を検出し、ユビキチン化の検討をおこなった。同じシステムで、PKAまたはGSK-3 などであらかじめリン酸化したタウ蛋白を用い、リン酸化の有無によるタウ蛋白のユビキチン化効率を比較した。

リン酸化TDP-43対する結合蛋白の探索

タウ蛋白に対してはリン酸化Ser214 部位に特異的に結合し、タウの重合を制御する14-3-3蛋白を我々は報告してきた。TDP-43もCK-1によりリン酸化されることが報告されており、その部位はSer409 およびSer410である。リン酸化されてターゲットと結合する場合はコンセンサス配列を形成している場合があり、タウ蛋白中のリン酸化Ser214 部位はコンセンサス配列を形成して14-3-3蛋白と結合している。TDP-43 の場合409 S(p)-S(p)-G-W 412 (S(p)はリン酸化Ser) という配列は既知のリン酸化結合モチーフの中に存在しないが、リン酸化Ser をAsp に置換したものに相当するD-D-G-W という配列はインテグリンリガンド中に見出され、インテグリンとの親和性が極めて高いことが報告されている(Stefanidakis M, et al. J Biol. Chem. 278: 34674- 34864, 2003.)。そこで、これらこのリン酸化部位に特異的に結合する蛋白を検索することにした。蛋白リン酸化TDP-43に関しては、3つのペプチド (DSKSSGWGC)、 (DSKDDGWGC)、 (DSKS(p)S(p)GWGC) を作成し、それぞれをアフィニティカラムに結合させて、結合する蛋白を溶出させ、結合蛋白を抽出する。特に、非リン酸化ペプチド (DSKSSGWGC) に親和性が低く、他の2 者に親和性の高い蛋白を溶出し、電気泳動を行った。

4 . 研究成果

タウ蛋白とユビキチンリガーゼ XIAP との結合親和性およびユビキチン化の検討

タウ蛋白の重合・分解過程は未解明の部分が多いが、我々はタウ蛋白とタウ蛋白に対する結合蛋白との関係から研究を行ってきた。まず、神経細胞内に豊富に存在する14-3-3蛋白に注目し、14-3-3蛋白はタウ蛋白を自己重合させることが可能であること、タウ蛋白と14-3-3蛋白との結合親和性はSer214リン酸化によって著しく亢進すること、しかしタウ蛋

白の自己重合はタウ蛋白のSer214リン酸化によって阻害されることなどを報告してきた。今回は、内因性アポトーシス抑制因子XIAPに注目し、XIAPはタウ蛋白と結合すること、タウ蛋白はXIAPのカスパーゼ抑制機能を低下させること、タウ蛋白をユビキチン化することを詳しく検証した。

野生型タウおよびΔMet タウとXIAPおよびXIAP1-351との間の結合性を検討したところ、ΔMet タウとXIAPおよびXIAP1-351との間の結合性は確認されたが、野生型タウとXIAPおよびXIAP1-351との間の結合性は認められなかった。また、XIAPおよびXIAP1-351のカスパーゼ抑制機能はΔMetタウによって抑制されたが、野生型タウには認められなかった。そして、タウのユビキチン化に関しては、XIAPとΔMetタウとの組み合わせにおいてのみ認められた。

さらに、タウ蛋白のリン酸化とXIAPとの結合性に関して検証をおこなった。タウ蛋白をPKAおよびGSK-3によって充分リン酸化し、非リン酸化タウ蛋白とリン酸化タウ蛋白をそれぞれXIAPとインキュベートしたのちにpull-downアッセイを行ったところ、結合性においてリン酸化による変化は認められなかった。さらに、タウ蛋白のリン酸化とユビキチン化の相互関係において検討した。タウ蛋白を同様にリン酸化し、非リン酸化タウ蛋白とリン酸化タウ蛋白をそれぞれユビキチン化酵素E1、E2、XIAP、ATP、ユビキチンとともにインキュベートして比較をしたところ、両群のユビキチン化には大きな変化は認められず、タウ蛋白のユビキチン化にはリン酸化は影響を与えなかった。

リン酸化TDP-43に対する結合蛋白の探索

さらに、別の前頭側頭型認知症関連分子としてTDP-43に関する検討をおこなった。TDP-43はSer409およびSer410が病態脳においてリン酸化されているが、この部位のペプチドを作成し、非リン酸化ペプチド、

Ser409/Ser410リン酸化ペプチド、Ser409/Ser410をAspに置換したペプチドを作成し、これをアガロースに結合させて、神経系培養細胞ホモジネートとインキュベートし、結合物を抽出した。そして、非リン酸化ペプチド付きアガロースには結合せずにリン酸化ペプチド付きアガロースおよびAsp置換ペプチド付きアガロースに特異的に結合する35kDaおよび50kDaの蛋白を抽出した。

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 6 件)

1. Tanaka T, Maruyama D, Takeda M Alzheimer disease and tau protein. Rinsho Shinkeigaku 52(11):1171-1173. 2012.
2. 田中稔久, 武田雅俊 アミロイド沈着、神経原線維変化と認知機能低下 老年精神医学雑誌 23(4):434-440,2012.
3. 田中稔久, 武田雅俊 認知症の薬理学的理解と臨床への活用 臨床精神薬理 15(8):1285 - 1296,2012.
4. 田中稔久, 武田雅俊 アルツハイマー病の薬物療法の展開 臨床精神医学 41(12):1681-1691,2012.
5. Okochi M, Tagami S, Yanagida K, Takami M, Kodama TS, Mori K, Nakayama T, Ihara Y, Takeda M. γ -secretase modulators and presenilin 1 mutants act differently on presenilin/ γ -secretase function to cleave A β 42 and A β 43. Cell Rep. 3(1):42-51,2013.
6. 田中稔久, 武田雅俊 アルツハイマー病の新規薬物の開発と臨床応用の可能性 精神科治療学 30(1):63-70,2015.

[学会発表](計 4 件)

1. 田中稔久 アルツハイマー病とタウ蛋白

シンポジウム アルツハイマー病の新展開—分子病態から治療戦略へ New Development for Alzheimer's Disease—From Molecular Pathogenesis to Therapeutic Strategy 第53回日本神経学会学術大会 2012,05,24 東京国際フォーラム(東京)

2. Tanaka T, Maruyama D, Takeda M
Phosphorylation of tau at Ser214 regulates degradation process of tau. Alzheimer's Association International Conference (AAIC2012), Vancouver, Canada, July 14-19(17), 2012.
3. Tanaka T, Maruyama D, Sato M, Terada M, Takeda M. N-terminal modification of tau regulates its degradation. Alzheimer's Association International Conference (AAIC2013), Boston, U.S.A., July 13-18(17), 2013.
4. 田中稔久 認知症におけるタウの分子病理 第20回近畿老年期認知症研究会 2014.7.5、リーガロイヤルNCB(大阪)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0件)
- 取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

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(研究院)・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(研究院)・准教授
研究者番号: 10294068

工藤 喬 (KUDO, Takashi)
大阪大学・保健センター・教授

研究者番号: 10273632

森原 剛史 (MORIHARA, Takashi)
大阪大学・医学(系)・研究科(研究院)・助教
研究者番号: 10294068