

## 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(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591711

研究課題名(和文) タウ遺伝子変異による結合蛋白との関係の変化と神経変性過程の解析

研究課題名(英文) The analysis of neurodegenerative processes and changes of protein interaction of tau by mutation.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：前頭側頭型認知症FTDP-17の神経変性メカニズムは明らかにするために、変異型タウ蛋白と14-3-3蛋白との結合親和性を検討した。変異型タウとの結合親和性は亢進していたが、タウ蛋白はリン酸化されると両者は全て同程度にまで結合親和性は亢進した。次に、14-3-3蛋白を添加して重合をモニターしたところ、野生型タウに比べて変異型のタウは重合が促進されていたが、リン酸化されるとタウ蛋白の重合は全て抑性された。また、リン酸化に関してはSer214部位のリン酸化ができない変異型タウは分解が促進した。そして、PSAによる分解プロセスに関して検討したところ、PSAはタウのN末端のみを分解することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the neurodegenerative mechanisms in FTDP-17, interaction between tau and 14-3-3 protein was investigated. Affinity between two proteins was increased in mutated tau protein than in wild typed tau protein, however the affinity increased at the same extent in both wild typed tau and mutated tau. Then aggregation was monitored and aggregation processes were more facilitated in mutated tau than in wild typed tau, however the aggregation was completely attenuated when tau was phosphorylated. Next effects of phosphorylation of tau at Ser214 were investigated, and intracellular degradation of tau is more facilitated in S214A mutated tau-transfected cells than in wild typed tau &#8211;transfected cells. And involvement of PSA (Puromycin sensitive aminopeptidase) was also investigated. PSA can degrade tau in vitro at only at the N-terminal site, but cannot lead to complete digestion. However attenuation of PSA activity in cultured cells, induced accumulation of tau protein.

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 リン酸化 認知症

## 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。近年、脳血管性認知症は減少し、神経変性性認知症が増大しているが、その中でアルツハイマー病 (Alzheimer Disease:AD) について、前頭側頭型認知症 (Frontotemporal dementia:FTD) も頻度は少なくはないことが判明し、記憶障害よりも人格変異や問題行動などが病態の前景に現れることから、その対応への重要性は増大している。FTD では1998年に17番染色体に関連するものはタウ遺伝子変異によって発症していることが判明した (Hutton M, et al. Nature 393:702-705, 1998)。それによって、今までADにおいてはアミロイド中心の病態仮説が想定してきたが、さらに広い意味で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。タウ蛋白はもともと微小管附随蛋白のひとつであり、微小管重合を促進する機能を有している。また、タウ蛋白はリン酸化蛋白であるが、ADおよびFTDを含むタウオパチー疾患脳内タウ蛋白は異常なリン酸化を受けていることが知られている。タウ蛋白のリン酸化はタウ蛋白の微小管重合能を阻害やプロテアーゼ抵抗性の増大を起こし、細胞内での蓄積化から神経細胞死を誘導する一つのステップと考えられている。他の数多くの機能性蛋白と同様に、このタウ蛋白はさまざまな物質と結合することが報告されており、例えばプロリンイソメラーゼ Pin 1 は Thr231 部位のリン酸化されたタウ蛋白と結合して神経変性過程に関わる可能性や (Lu, Nature, 399, 784-788,1999)、Glycosaminoglycans (ヘパリンなど) Free fatty acids および 14-3-3 蛋白はその結合によりタウ蛋白の自己重合を促進することなどが指摘されている (Hasegawa, M., et al. J.B.C.

272,33118-33124,1997, Wilson, DM., et al. Am.J.Pathol. 150,2181-2195,1997., Hernandez F, et al. Neurosci Lett. 357,143-6.2004.) 特に関しては、細胞内で自己重合が惹起された場合、様々な細胞内輸送が障害されることから、タウ蛋白の細胞毒性を説明するのに有用であるが、自己重合を誘導できる濃度は生理的濃度よりはるかに高濃度であり、重合を促進する因子の関与を想定する必要があると考えられている。我々は、神経細胞内に豊富に (可溶性蛋白の1%以上) 存在する 14-3-3 蛋白に注目し、14-3-3 蛋白が比較的低濃度の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 (SadikG, et al. J Neurochem 108:33-43, 2009)。

タウ蛋白の分解過程に関しても今まで我々は検討し、プロテアーゼ阻害剤を用いた実験からは単独の酵素ではタウ蛋白分解制御を説明できないことが示唆された。また、Puromucin sensitive aminopeptidase (PSA) およびオートファジー・ライソゾームシステムなどもタウの分解に関与することも示唆された (Yanagi K, et al, Psychogeriatrics 9:157-166,2009.) が、詳細は未だ不明である。

ところで、タウ遺伝子の変異による認知症は FTDP-17 (Frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17) と呼ばれるが、アミノ酸置換を伴うエクソン内の変異 ( $\Delta$ K280、P301L、V337M、R406W など) および、アミノ酸置換を伴わないイントロン内の変異 (第10-11エクソン間イントロン内変異 +3、+11、+12、+13、+14、+16 など) さまざまな遺伝子変異家系が知られている。この FTDP-17 におけるタウ遺伝子の変異の影響は、大きく分けて2つ

知られている。アミノ酸置換の伴うエクソ内変異の場合にはタウ蛋白が本来有する微小管重合能の低下が生じている。また、アミノ酸置換を伴わないイントロン内の変異の場合には4リピートタウの発現の増加が生じている。我々の今までの検討では、アミノ酸置換を伴う FTDP-17 変異タウ導入細胞においてはタウ蛋白リン酸化が亢進していることと、タウ蛋白の分解は遅延していることを報告してきた (Yanagi K, et al, *Psychogeriatrics* 9:157-166, 2009)。しかし、これらだけでは、FTD に至る病態過程の理解は十分ではない。そこで、今回我々は、FTDP-17 を中心にタウ遺伝子の変異による機能障害を、結合因子との関係から検討することにした。

## 2. 研究の目的

前頭側頭型認知症 FTDP-17 の神経変性におけるメカニズムは明らかにするために、タウ遺伝子の変異による障害のメカニズムを、結合因子との関係から検討する。つまり、遺伝子変異がタウ蛋白結合因子である 14-3-3 との結合性の変化を与えるかどうか検討し、それによる *in vitro* における自己重合の変化、代謝過程の変化などを解析する。また、リン酸化を介した 14-4-4 蛋白とのタウ蛋白の相互作用に基づいた分解過程への影響を Ser214 変異タウ蛋白を作成して検討する。また、PSA による分解プロセスに関して、*in vitro* の分解過程および細胞内分解過程について検討する。

## 3. 研究の方法

### 変異型タウ蛋白と 14-3-3 蛋白との関係

タウ蛋白の自己重合は 14-3-3 蛋白などの結合因子が作用すると加速されるが、その中で 14-3-3 蛋白は細胞内にける含有量が多いにもかかわらず、リン酸化やタウ遺伝子変異重合に関してはほとんど研究されていなかった。我々は今までにタウ蛋白の Ser214 部

位がリン酸化されると 14-3-3 蛋白との結合親和性が増大することとタウ重合を抑制することを報告してきた。そこでまず、FTDP-17 にて認められた( $\Delta$ K280、P301L、V337M、R406W) のアミノ酸置換をとともなう変異を導入した全長型リコンビナントタウ蛋白を用い、まずタウ蛋白と 14-3-3 蛋白の間の結合親和性を表面プラズモン共鳴法で定量化して、比較検討した。表面プラズモン共鳴法では Biacore2000 (Biacore Inc., Sweden)を用い、マニュアルに従って 14-3-3 蛋白をフローセル上に不動化し、リガンドとしてタウ蛋白を注入して Response Unit を測定し、解離常数を算出し、結合親和性に関して検討をおこなった。さらに、我々はタウ蛋白の Ser214 部位がリン酸化されると 14-3-3 蛋白との結合親和性が増大すると結合親和性が低下することを把握しているので、この部位をリン酸化する Protein Kinase A (PKA) によりタウ蛋白をあらかじめリン酸化し、リン酸化を受けた状態での FTDP-17 変異を受けたタウ蛋白の結合親和性を比較検討した。

さらに 14-3-3 蛋白によるタウ蛋白自己重合誘導性についても検討を行った。野生型タウおよび変異型タウ蛋白 (20 $\mu$ M) を 1 mM DTT の存在下で 37 °C でインキュベートし、これらに 14-3-3 蛋白(20 $\mu$ M) を添加したものとしないものを作成し、*in vitro* の自己重合(線維形成)をおこさせ、その過程をチオフラビン S (5 $\mu$ M)を添加して、430nm の励起波長・520nm の蛍光検出によって蛍光学的にモニターした。また、結果として形成されたタウ蛋白フィラメントを、ネガティブ染色によって電子顕微鏡によって観察した。

### タウ蛋白の細胞内代謝分解

14-3-3 蛋白との間の結合に影響を与える変化がタウ蛋白の分解にどのような影響を与えるかを知るために S214A おとび S214D 変異タウ遺伝子コンストラクトを作成し、

HEK293 細胞発現させて、その分解過程をパルスチェイス法により検討した。細胞を [<sup>35</sup>S]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) 0.5μl/ml, 10nM Okadaic acid) にて溶解し、その lysates を 4、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。

次に、この変異型タウと野生型タウのリコンビナント蛋白を作成し、14-3-3 蛋白との結合性を確認するために pull-down アッセイを行った。

#### タウ蛋白と PSA との関係

タウ蛋白の分解に関しては、我々は Puromycin sensitive aminopeptidase (PSA) の関与が指摘してきたので (Yanagi K, et al, *Psychogeriatrics* 9:157-166,2009.)、PSA による *in vitro* におけるタウ蛋白分解の検討を行った。タウ蛋白を PSA とともに 37 でインキュベートし、経時的にサンプルを回収し、抗タウ抗体を用いてウエスタンブロットを用いて解析した。抗体はタウ全体を認識するポリクローナル抗体 H-150 およびタウ蛋白の N 末端を認識する抗体を用いた。

次に、細胞内発現用に PSA コンストラクトを組み込んだベクターを作成し、培養細胞におけるタウ蛋白分解過程を検討した。まず、正常タウ蛋白を発現させた細胞(HEK293)に、さらに PSA を強制発現させ、その分解過程

をウエスタンブロットにより検討した。また、PSA 発現を抑制するために、PSA に対する siRNA および特異的阻害剤 PAQ22 を添加して、培養細胞におけるタウ蛋白分解過程をウエスタンブロットにより検討した。

#### 4. 研究成果

##### 変異型タウ蛋白と 14-3-3 蛋白との関係

FTDP-17 で認められた遺伝子変異(ΔK280, P301L, V337M, R403W) を導入したリコンビナントタウ蛋白を用い、野生型タウまたは変異型タウと 14-3-3 蛋白との間の結合親和性を測定したところ、野生型タウに比べて変異型タウとの結合親和性の亢進が認められた。さらに、これらを PKA によってリン酸化した上で、結合親和性を測定したところ、野生型タウと変異型タウは全て同程度にまで結合親和性は亢進した。次に、野生型タウと変異型タウに 14-3-3 蛋白を添加してインキュベートし、チオフラビン S を添加して蛍光測定し、重合をモニターしたところ、野生型タウに比べて変異型のタウは重合が促進されていた。また、これらを PKA によってリン酸化した上で同様に重合をモニターしたところ、野生型タウと変異型タウの重合は全て抑性されていた。そして、結果として形成されたものをネガティブ染色によって電子顕微鏡によって観察したところ、リン酸化を行わない状態では野生型・変異型全てのタウは線維性形体が観察されたが、リン酸化を行ったタウではどの場合も線維性成分は認められなかった。

##### タウ蛋白の細胞内代謝分解

14-3-3 蛋白との間の結合に影響を与える変化がタウ蛋白の分解にどのような影響を与えるかを知るために S214A および S214D 変異タウ遺伝子コンストラクトを作成し、HEK293 細胞に導入して、その分解過程をパルスチェイス法により検討したところ、野生型タウに比べて変異型タウの分解は促進していた。この変異型タウと野生型タウのリコ

ンピナント蛋白を作成し、14-3-3 蛋白との結合性を確認するために pull-down アッセイを行ったところ、野生型と変異型は同程度に沈降し、結合が認められたが、タウ蛋白を PKA によりリン酸化して同様の実験を行ったところ、野生型タウをリン酸化したものではありません。よって、リン酸化によって結合の変化しないタウ蛋白では分解が亢進していることが示唆された。

#### タウ蛋白と PSA との関係

タウ蛋白の分解に関しては puromycin sensitive aminopeptidase (PSA)の関与が指摘されてきたので、PSA による in vitro におけるタウ蛋白の分解を行ったところ、タウ全体を認識する抗タウ抗体によるウエスタンブロットではタウの分解は認められなかった。しかし、タウの N 末端を認識する抗体によるウエスタンブロットではタウのバンドは消失し、分解が認められた。次に、タウ遺伝子を導入し作成されたタウ過剰発現 HEK293 細胞に、さらに PSA 遺伝子を導入してタウの発現を検討したところ、PSA 発現細胞ではタウ蛋白は減少していた。また、タウ過剰発現 HEK293 細胞に PSA に対する siRNA を添加して PSA の発現を抑制すると、タウ蛋白は増加した。同様に PSA に対する特異的酵素阻害剤である PAQ22 をウ過剰発現 HEK293 細胞の培養培地に添加した場合もタウ蛋白は増加した。よって、PSA 自身はタウ蛋白の N 末端を分解するだけだが、このことが引き金になり細胞内のおそらく他の分解酵素と協働してタウの分解が制御されている可能性が示唆された。

#### 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 7 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. 田中稔久, 武田雅俊 アルツハイマー病・タウオパチーと MAP キナーゼ Clinical Neuroscience 31(6):719 - 722,2013.
6. 田中稔久, 武田雅俊 タウの分子病理と前頭側頭葉変性症 老年精神医学雑誌 24(12); 1273-1281,2013.
7. 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 5 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 2012,05,23-25(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 アルツハイマー病の記憶障害  
—タウ蛋白異常の観点から 第 18 回日  
本神経精神医学会 2013.12.13-14(13)、  
千里ライフサイエンスセンター(大阪)
5. 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

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

##### (2)研究分担者

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