

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440064

研究課題名(和文) タウタンパク質の神経原線維変化の形成抑制を目指したプロリン異性化酵素改変体の創製

研究課題名(英文) Novel methods to inhibit neurofibrillary tangles of tau protein: functional modifications of peptidyl prolyl isomerases

研究代表者

伊倉 貞吉 (Ikura, Teikichi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：50251393

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)：本研究は、アルツハイマー病の主要な原因と知られるタウタンパク質の神経原線維変化(NFT)の形成を標的とし、このNFTの形成抑制、また、その結果としての微小管の安定化とアルツハイマー病の発症抑制を目指した。この目的のため、近年明らかになってきたプロリン異性化酵素FKBP12とPin1とタウタンパク質との特異的な相互作用に注目した。本研究では、まず、両プロリン異性化酵素の活性部位に網羅的変異を導入し、プロリン異性化活性の向上に成功した。さらに、Pin1の機能の大幅な改変に取り組み、タウタンパク質が有するpS/pT-Pモチーフも標的とするプロリン残基指向性プロテアーゼ活性の創出に成功した。

研究成果の概要(英文)：The Alzheimer's disease-related protein, tau, aggregates into neurofibrillary tangles (NFT) when it is hyperphosphorylated. In this research project, I aimed to inhibit formation of NFT, stabilize microtubule, and furthermore prevent the Alzheimer's disease. In my strategy, I focused on the specific interactions between tau protein and peptidyl-prolyl isomerases (PPIases), Pin1 and FKBP12. PPIases restored the function of tau protein by presumably catalyzing isomerization of a specific pS/T-P or X-P motif. In this study, I introduced the comprehensive mutations at the active site of the PPIases and finally succeeded in discovery of several mutant proteins with higher activity than wild-type protein. Moreover, I tackled a functional change of Pin1 in which Pin1 was converted from a PPIase to a protease, and finally succeeded in creating a novel protease with the specificity to Proline residue including pS/pT-P motif of tau protein.

研究分野：生物物理学

キーワード：タウタンパク質 プロリン異性化酵素 神経原線維変化 機能改変

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) アルツハイマー病はタンパク質の構造異常に起因すると考えられているが、その原因タンパク質のひとつにタウタンパク質がある。タウタンパク質は、主に中枢神経系で発現し、正常時には微小管に結合し、微小管の重合の促進や安定化に寄与するが、過剰リン酸化を受けることにより構造転移をおこし、微小管への結合能を失うとともに神経原繊維変化(NFT)を生じ蓄積する。この過程で、タウタンパク質はアルツハイマー病の発症に関わると考えられている。
- (2) 近年、Pin1 や FKPB 等のプロリン異性化酵素とタウタンパク質との特異的な相互作用が、微小管の安定化や NFT の形成抑制に関与していることが明らかになってきた。Pin1 はリン酸化セリンあるいはリン酸化トレオニンの後ろにプロリンが続く配列(pS/pT-P 配列)を標的として、それらの間のペプチド結合(プロリンイミド結合)を異性化する酵素であり、神経細胞での発現が多い。Pin1-ノックアウトマウスを用いた研究により、当初から、Pin1 が NFT の形成抑制とともに微小管の安定化に効くことが示唆されていたが、最近、シス型の pS/pT-P 配列を含むタウタンパク質が NFT を形成しやすいこと、さらに、シス型からトランス型への反応を実際に Pin1 が触媒することが明らかになってきた。また、Pin1 はリン酸化酵素 GSK3 $\beta$ によるタウタンパク質の過剰リン酸化を阻害するという報告もある。一方、FKBP は一般的なプロリンイミド結合(X-P 配列)を標的とする異性化酵素の一種であり、神経細胞ではFKBP12、FKBP51、FKBP52の発現が多い。FKBP51とFKBP52は、共に過剰リン酸化タウタンパク質に特異的に

結合するものの、前者が脱リン酸化と微小管重合を促進するのに対し、後者は微小管重合を抑制することが報告されている。また、FKBP12についてはNFTへの集積が観測されているが、その働きについてはまだよくわかってはいない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、次の2つである。

- (1) プロリン異性化酵素が、タウタンパク質の凝集をどのようにして抑制的に作用するのかという問題を、タンパク質科学の観点から解明する。
- (2) プロリン異性化酵素をタウタンパク質の凝集阻害剤として捉えた時に、その阻害活性を向上させる変異を導入して、蛋白質製剤としての可能性を探る。

## 3. 研究の方法

- (1) タウタンパク質のアミノ酸配列上で、凝集の原因となっていることが知られている微小管結合部位とその周辺アミノ酸残基を含むペプチドを化学合成し、それを標的とする。
- (2) PHF6 という高凝集性配列を含む微小管結合部位中の第3リピート(R3)は、X-P配列を含むものの、リン酸化部位は含まないため、Pin1ではなくFKBP12が作用すること考えられた。そこで、R3の凝集におけるFKBP12の作用を、蛍光分光法により解析する。
- (3) タウタンパク質のリン酸化部位のほとんどは微小管結合部位以外にあるものの、第1リピート(R1)の物性への影響が示唆された。そこで、リン酸化部位とR1を含むペプチド(DR1-p231)の凝集

における Pin1 の作用を、蛍光分光法と動的散乱法とにより解析する。

- (4) DR1-p231 中の pT231-P232 のペプチド結合の異性化反応における Pin1 の触媒活性を測定するための新規 ELISA 法を開発し、Pin1 に導入した変異が異性化活性とタウタンパク質の凝集阻害活性の両方にどのように影響するかという問題に適用した。また、既存の NMR 法によっても検証する。
- (5) タウタンパク質を特異的に攻撃するようなタンパク質分解酵素活性を Pin1 に付与し、タウタンパク質の凝集阻害活性の向上を狙う。

#### 4. 研究成果

- (1) R3 ペプチドは、それ自身、著しい凝集特性を示したが、主に親水性の相互作用に起因することを明らかにした。
- (2) R3 ペプチドの凝集において、FKBP12 は高い阻害活性を示すことを明らかにした。
- (3) FKBP12 は、R3 中の PHF6 に直接作用して、K311-P312 の異性化反応を触媒することにより R3 ペプチドの凝集を阻害することを明らかにした。
- (4) Pin1 の触媒活性を測定するための新規 ELISA 法を開発において、脱リン酸化酵素 PP2A と抗タウ[pT231]抗体を用いることにより、Pin1 の異性化活性の定量的な評価を可能にした。
- (5) Pin1 の活性部位に網羅的変異を導入し、それらの異性化活性への影響を解析した結果、異性化活性と DR1-p231 の凝集阻害活性とは相関しないことを明らかにした。このことは、NMR 法によっても確認した。
- (6) Pin1 の凝集阻害活性は、N 端側にある

WW ドメインと DR1-p231 との結合に起因するのであって、C 端のプロリン異性化酵素ドメインは全く機能しないということを示した。

- (7) Pin1 の C 端のプロリン異性化酵素ドメインに部位特異的に変異を導入するとプロテアーゼ活性が発現することを明らかにした。このプロテアーゼ活性では、プロリン残基を特異的に認識しており、タウタンパク質を特異的に分解消化する可能性を示唆した。

#### 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 1 件)

Ikura, T., Ito, N. (2013). Peptidyl-prolyl isomerase activity of FK506 binding protein 12 prevents tau peptide from aggregating. *Protein Eng. Des. Sel.*, **26**, 539-546.  
DOI: 10.1093/protein/gzt033.

[学会発表](計 8 件)

伊倉貞吉, 伊藤暢聡. Pin1 由来のタンパク質分解酵素の触媒機構の解析. Pin1 由来のタンパク質分解酵素の触媒機構の解析. 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016 年 6 月 8 日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

伊倉貞吉, 伊藤暢聡. 1 アミノ酸置換によるプロリン異性化酵素からタンパク質分解酵素への機能転換. 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015 年 9 月 15 日, 金沢大学(石川県・金沢市)

伊倉貞吉, 栃尾尚哉, 川寄亮佑, 楯真一, 伊藤暢聡. Pin1 はタウペプチドの pT231-P232 の異性化を触媒しないが、凝集を抑制する. 第 15 回日本蛋白質科学

会年会, 2015年6月26日, あわぎんホール(徳島県・徳島市)

伊倉貞吉, 伊藤暢聡. Pin1 のプロリン異性化活性とタウタンパク質に対する凝集抑制活性との関係. 第52回日本生物物理学会年会, 2014年9月26日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

Ikura, T., Ito, N. How do peptidyl-prolyl isomerases rescue tau protein from aggregating? 2014 International Biophysics Congress (IUPAB), 2014年8月5日, Brisbane (Australia)

伊倉貞吉, 伊藤暢聡. タウタンパク質の脱リン酸化におけるPin1とPP2Aの協同性の分子機構. 第14回日本蛋白質科学会年会, 2014年6月26日, ワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリア(神奈川県・横浜市)

伊倉貞吉, 伊藤暢聡. タウタンパク質に対するPin1のプロリン異性化活性を測定するための新しい方法. 第51回日本生物物理学会年会, 2013年10月30日, 京都国際会議場(京都府・京都市)

伊倉貞吉, 伊藤暢聡. プロリン異性化反応がタウタンパク質の凝集を阻害する. 第13回日本蛋白質科学会年会, 2013年6月14日, とりぎん文化会館(鳥取県・鳥取市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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

<http://www.tmd.ac.jp/mri/guide/pamphlet/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊倉 貞吉 (IKURA, Teikichi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号: 50251393

### (2) 研究分担者

該当無し

### (3) 連携研究者

該当無し