

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

アルツハイマー病神経原線維変形包括的抑止法  
に関する研究

平成 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 武田 雅俊

平成 19 年(2007 年)3 月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

- アルツハイマー病神経原線維変形包括的抑止法に関する研究…………… 3  
武田 雅俊

## II. 分担研究報告書

1. 低分子化合物によるアミロイド線維形成の阻害…………… 1 1  
長谷川 成人
2. 分子シャペロンとユビチキン・プロテアソーム系の連携を介したタウ蛋白代謝機構 1 6  
高島 明彦
3. プロテアソーム・トレランスとタウ代謝…………… 1 8  
工藤 喬
4. タウ蛋白自己重合における結合因子に関する研究…………… 2 1  
田中 稔久
5. オートファジー/プロテアソームとタウ代謝…………… 2 6  
武田 雅俊

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 3 0

## IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 3 5

研究課題名：アルツハイマー病神経原線維変化包括的抑止法

主任研究者 武田雅俊 大阪大学大学院医学系研究科  
分担研究者 高島明彦 独立行政法人理化学研究所  
分担研究者 長谷川成人 東京都精神医学総合研究所  
分担研究者 工藤 喬 大阪大学大学院医学系研究科  
分担研究者 田中稔久 大阪大学大学院医学系研究科

**研究要旨：**神経原線維変化の治療として、対象をタウの重合抑制と代謝促進に絞り、タウの凝集・線維化抑制剤、ユビキチン化促進、プロテアソームの活性化、オートファジーの活性化に検討を加え、包括的な神経原線維変化の治療法確立をめざした。神経原線維変化の形成を抑止する化合物を探索し、ポリフェノール、フェノチアジン、ポルフィリン、コンゴレッド誘導体の系統の化合物に強い線維化抑制効果を認めた。また、タウを特異的に認識するユビキチンリガーゼ CHIP が同定された。プロテアソームを活性化させるプロテアソームトレランス現象についてマイクロアレイによる解析を行い、Nrf2 によってプロテアソーム活性が上昇し、タウの蓄積を抑えることが示された。タウ結合蛋白 14-3-3 蛋白はタウのリン酸化によってその結合を増強することが示され、タウ代謝への関与が示唆された。アミロイド蛋白は、プロテアソーム活性を低下させることがマクロオートファジーの誘導に関与する可能性が示唆された。アルツハイマー病脳において、プロテアソーム機能とマクロオートファジーは相補的關係を示すことが示唆された。

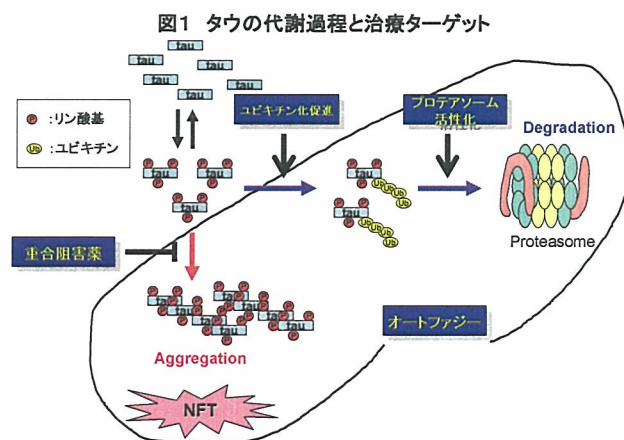
キーワード：神経原線維変化、タウ、ユビキチン、プロテアソーム、14-3-3 蛋白 Aβ、マクロオートファジー

### A. 研究目的

高齢化社会の到来に伴い認知症の治療法開発は社会的急務である。認知症で最も多いアルツハイマー病（AD）の治療法の検討はアミロイドカスケード仮説に則り行われ、アミロイド病理に対する治療法開発は飛躍的に進んでいる。一方、神経変性と直接関係あるとされる神経原線維変化（NFT）に関する治療戦略は未熟である。比較的重症例のADやタウオパチーの疾患にはNFTの治療法は重要であり、またその治療戦略はアミロイドの治療法と補完しあえる可能性がある。

タウはAD脳内でリン酸化酵素や脱リン酸化酵素の異常により高度にリン酸化され、それら

が凝集しβ構造を形成し、NFTへと変化する（図1）。タウのリン酸化には複数の酵素が指摘されているが、一義的に決まらない感があり、



この段階での治療法開発は困難と考えられる。一方、リン酸化されたタウは同時にユビキチン化されており、タウの代謝にユビキチン-プロテアソーム (UPS) 系が関与していると考えられている (図1)。近年、UPSが関与して異常蛋白が蓄積する病理は、多くの神経変性疾患に共通してみられるとされるようになってきている。また、UPSのユビキチンによる選択的な代謝に対し、オートファジーは包括的に細胞内凝集蛋白や細胞小器官の代謝を担う機構とされ、凝集したタウの代謝に応用できる可能性がある。申請者らは、タウの重合阻害剤の研究や神経変性疾患のUPSに関する研究を既に開始しており、本研究で大いに成果を上げられると確信している。

そこで、本研究は NFT の抑止法として、従来のリン酸化の研究から視点を変えて、タウの重合抑制とタウの代謝促進にターゲットを絞って行うものである。具体的には、①タウ重合抑制剤の検索、②タウのユビキチン化促進法の検討、③プロテアソーム活性化法の検討、④タウ結合蛋白とタウ代謝への関与の検討、⑤凝集タウの除去をめざしたマクロオートファジー促進法の検討を行う (図1)。

## B. 研究方法

### ①タウ重合抑制剤の検索

大腸菌に発現、精製したヒトリコンビナントタウをヘパリンと共に 37°C でインキュベートするタウの線維形成試験管内モデルを用いて観察した。評価方法としては電子顕微鏡観察による定性的評価と、凝集実験によく用いられる  $\beta$  シート構造を認識して結合するとされるチオフラビン S の蛍光測定による定量的評価に加え、我々が独自に工夫したサルコシル不溶性タウを検出、定量する方法の3種類の方法で行った。

### ②タウのユビキチン化促進法の検討

タウを選択的にユビキチン化するユビキチンリガーゼの同定を行う。培養細胞におけるユビキチンリガーゼ CHIP のタウ蛋白分解代謝への作用を検討し、CHIP ノックアウトマウス (東京都臨床研・村田茂穂先生より提供) の解析、

更に CHIP ノックアウトマウスとタウオパチーマウスの交配させ、解析を行う。

### ③プロテアソーム活性化法の検討

プロテアソーム機能を促進する現象に着目し、実験を行った。その現象とは、あらかじめ低濃度のプロテアソーム阻害剤を投与しておく、その後高濃度のプロテアソーム阻害剤を投与してもある程度の阻害抵抗性を示すというものである。この現象をプロテアソームトレランスと名付け、マイクロアレイによってその現象に関連する遺伝子の検討を行った。

### ④タウ結合蛋白とタウ代謝への関与の検討

SY5Y 細胞にフォルスコリンやリチウムを用いてタウ Ser214 部位がリン酸化されるかをウエスタンブロットで確認し、免疫沈降法にてそのリン酸かタウが 14-3-3 蛋白と結合しているかを確かめる。リコンビナントタウ蛋白と活性化 PKB あるいは PKA catalytic subunit とを 200  $\mu$ M ATP 存在下にて 30°C でインキュベートし、タウ蛋白のリン酸化レベルについて抗リン酸化タウ抗体 pSer214 をもちいたウエスタンブロットによって検討をおこなった。そして、これらのサンプルをニッケルビーズによって沈降し、抗 14-3-3 蛋白抗体によるウエスタンブロットによってタウ蛋白と 14-3-3 蛋白との結合に対する *in vitro* でのリン酸化の影響を検討した。

### ⑤凝集タウの除去をめざしたマクロオートファジー促進法の検討

本年度は、AD の原因である A $\beta$  とマクロオートファジーの関連について検討を進めた。

SK 細胞に A $\beta$  (preaggregated A $\beta$ ) を負荷し、LC3 抗体を用いたウエスタンブロットを行い LC3-II を検出することでマクロオートファジーを評価した。また、LC3-GFP を導入した SK 細胞に対して同様に A $\beta$  とマクロオートファジーの関係を形態学的に確認した。また、GFPu を導入した SK 細胞に対し同様に A $\beta$  を負荷し、ウエスタンブロットを用いて GFPu を検出した。GFPu はプロテアソームにより分解される分子でありその蓄積はプロテアソーム

活性の低下を反映する。更に、SK 細胞にプロテアソーム阻害薬を負荷し、LC3 抗体でのウェスタンブロットや形態変化にてマクロオートファジーを評価した。

(倫理面への配慮)

動物研究はすべて当該施設の倫理委員会の承諾を得て行った。

## C. 研究結果

### ①タウ重合抑制剤の検索

myricetin, ferric-dehydroprophyrin IX, epicatechin 3-gallate, methylene blue, azure B, gossypetin 等で  $IC_{50}$  が 1~2  $\mu$ M と強いタウの線維化阻害効果が、2,3,4,2',4'-pentahydroxybenzophenone, azure A と C, quinacrine mustard, exifone, purepurogallin 等の化合物も  $IC_{50}$  が 2~10  $\mu$ M と比較的強いタウの線維化阻害効果が認められた。また、hematin, thionin, 2,3,4-trihydroxybenzophenone, hypericin, pseudopypericin, quinacrine, lacmoid, phthalocyanine 等は  $IC_{50}$  が 10~70  $\mu$ M であったが明らかな線維化阻害効果が認められた。また、コンゴレッド、及びその誘導体である BSB, FSB にも強い効果が認められた。Apigenin, epicatechin, chlorpromazine hydrochloride, perphenazine, promazine hydrochloride, acetopromazine, propinylpromazine 及び、その他の系統のベンゾチアゾール、リファマイシン、ポリエンマクロライドアントラサイクリン、スルホン化色素、その他の色素などの化合物は  $IC_{50}$  が 200  $\mu$ M 以上であった。また、ポルフィリン、ポリフェノール、フェノチアジン、コンゴレッド及びその誘導体の 4 系統の化合物については、タウの線維化阻害効果と A $\beta$  凝集抑制作用、及び  $\alpha$  シヌクレインの線維化阻害効果との間に強い相関が認められた。

### ②タウのユビキチン化促進法の検討

タウを特異的に認識するユビキチンリガーゼ CHIP が同定された。細胞モデル系では、CHIP が関与する UPS 系は異常なタウを選択

的に分解し細胞死を抑制した。CHIP ノックアウトマウスではタウのリン酸化が亢進していた。タウオパチーマウスモデル JNPL3 マウスでは CHIP の亢進が認められた。CHIP ノックアウトマウスとタウオパチーマウスの交配による、CHIP のタウ病変への作用は今のところ有意な変化を認めていない。

### ③プロテアソーム活性法の検討

細胞をプロテアソーム阻害剤で処理すると濃度依存的に細胞死を起こす。しかし、低濃度のプロテアソーム阻害剤 (Epoxomicin 20nM, Lactacystin 500nM) を 8 時間前処理しておく、前処理なしの群と比較して高い生存性を示した。また、同様の処理を GFP<sup>u</sup> を導入した細胞で行った所、前処理を行った群では GFP<sup>u</sup> の分解が行われたのに対し、未処理群では GFP<sup>u</sup> の蓄積が見られた。これらのことから、低濃度プロテアソーム阻害剤の前処理はプロテアソーム機能を上昇させ、プロテアソーム阻害に対して抵抗性に働くということが示唆された。我々はこの現象をプロテアソームトレランスと名付けた。

プロテアソームトレランスが獲得されると、プロテアソームのカタリティックサブユニットである PSMB1, PSMB6 で発現量の増加が見られ、タウの蓄積が約 40% 減少していた。プロテアソームトレランスが獲得された神経細胞をマイクロアレイで検討した結果、Nrf2 という転写因子をコードする NFE2L2 という遺伝子を抽出した。この Nrf2 をトランスフェクトすると、プロテアソームサブユニットの増加やタウの代謝促進などが起こることを確認した。

### ④タウ結合蛋白とタウ代謝への関与の検討

SY5Y 細胞にフォルスコリンおよび塩化リチウムを添加したところ、Ser214 部位におけるリン酸化のレベルは亢進していた。さらに免疫沈降法にて検討したところ、14-3-3 蛋白の結合は亢進していた。

リコンビナントタウ蛋白を活性化 PKB および PKA catalytic subunit とをインキュベートし、タウ蛋白のリン酸化レベルについて抗リン酸化タウ抗体 pSer214 をもちいたウェスタンブロットによって検討をしたところ、どちらの

場合も pSer214 による染色性は亢進し、タウ蛋白は PKB および PKA によって Ser214 の部位のリン酸化を受けることが確認された。さらに、このようにリン酸化されたタウ蛋白と 14-3-3 蛋白の結合を検討したところ、Ser214 リン酸化によってタウ蛋白 14-3-3 蛋白との結合が増加することが判明した。

#### ⑤凝集タウの除去をめざしたマクロオートファジー促進法の検討

A $\beta$  負荷した SK 細胞の免疫ブロットにて LC3-II の上昇が見られマクロオートファジー誘導が示唆された。GFP-LC3 導入細胞でもドット状の GFP-LC3 が顕微鏡観察され A $\beta$  によってマクロオートファジーを誘導されていることを示唆する所見が得られた。

A $\beta$  負荷した GFPu 導入 SK 細胞の免疫ブロットにて GFPu の上昇がみられ、プロテアソーム活性の低下が示唆された。また、プロテアソーム阻害薬を負荷した SK 細胞の免疫ブロットにて LC3-II の上昇が見られた。また GFP-LC3 導入細胞でもドット状の GFP-LC3 が観察され同様にプロテアソーム阻害薬にてマクロオートファジーが誘導されていることが示唆された。

#### D. 考察

AD の治療法の検討はアミロイドカスケード仮説に則り行われ、アミロイド病理に対する治療法開発は飛躍的に進んでいる。一方、神経変性と直接関係あるとされる NFT に関する治療戦略は未熟である。比較的重症例の AD やタウオパチーの疾患には NFT の治療法は重要であり、またその治療戦略はアミロイドの治療法と補完しあえる可能性がある。タウは AD 脳内でリン酸化酵素や脱リン酸化酵素の異常により高度にリン酸化され、それらが凝集し $\beta$ 構造を形成し、NFT へと変化する。タウのリン酸化には複数の酵素が指摘されているが、一義的に決まらない感があり、この段階での治療法開発は困難と考えられる。そこで、本研究は NFT の抑止法として、従来のリン酸化の研究から視点を変えて、タウの重合抑制とタウの代謝促進に

ターゲットを絞って行った。

今回、タウ重合抑制剤の検索の観点から、ポリフェノール、フェノチアジン、ポルフィリンの 3 系統 21 種類の化合物にタウの線維化阻害効果が認められた。またこれらはタウの線維化だけでなく A $\beta$  の凝集を共に阻害することが明らかとなった。A $\beta$  とタウの両方の分子の線維化に阻害効果を有する化合物は AD の老人斑と NTF の形成を抑制することが期待され、AD の新しい治療、予防薬への応用の可能性が考えられる。

タウはプロテアソームで代謝を受けるが、そのためにはユビキチン化を受ける必要がある。今回、タウを特異的に認識するユビキチンリガーゼ CHIP が同定された。CHIP ノックアウトマウスではタウのリン酸化が亢進していたこと、タウオパチーマウスモデル JNPL3 マウスでは CHIP の亢進が認められたことや、CHIP の細胞導入によって異常なタウを選択的に分解し細胞死を抑制したことなどから、CHIP の発現誘導は異常タウの代謝を促進し、凝集を阻止する治療戦略になることが示されている。

今回発見されたプロテアソームトレランス現象は、タウ代謝に関与するプロテアソームを活性化する方法として注目され、実際、トレランスを獲得することでタウの代謝が促進されることが確認された。さらに、転写因子 Nrf2 を発現導入することでプロテアソームトレランスが誘導され、タウ代謝が亢進することも確認された。従って、このような転写因子の発現誘導が異常タウの代謝に役立照られる可能性がある。

AD において A $\beta$  はマクロオートファジーを誘導することが示されたが、それはプロテアソーム機能とのバランスの関連で発動されていることが示され、マクロオートファジーの活性化がプロテアソーム機能の調整に役立てられ可能性が示された。

14-3-3蛋白はタウのリン酸化に依存して結合することが示され、今後、この蛋白とタウ代謝との関連が注目される。

## E. 結論

タウの重合抑制と代謝促進の方策の候補として、タウ重合抑制剤、タウのユビキチン化を促進するCHIPの発現誘導法、プロテアソームトランス誘導法、タウ結合蛋白14-3-3の調節、マクロオートファジーの調節などが重要であることが示された。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Arai T#, Hasegawa M#, (# equally contributed, corresponding authors) Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T (2006) TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351:602-611.
2. Kim EJ, Sung JY, Lee HJ, Rhim H, Hasegawa M, Iwatsubo T, Min DS, Kim J, Paik SR, Chung KC (2006) Dyrk1A phosphorylates alpha-synuclein and enhances intracellular inclusion formation. *J Biol Chem* 281: 33250-33257.
3. Masuda M, Suzuki N, Taniguchi S, Oikawa T, Nonaka T, Iwatsubo T, Hisanaga SI, Goedert M, Hasegawa M (2006) Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly. *Biochemistry* 45:6085-6094.
4. Masuda M, Dohmae N, Nonaka T, Oikawa T, Hisanaga S, Goedert M, Hasegawa M (2006) Cysteine misincorporation in bacterially expressed human alpha-synuclein. *FEBS Lett* 580:1775-1779.
5. Hasegawa M (2006) Biochemistry and molecular biology of tauopathies. *Neuropathology* 26: 484-490.
6. Sakai K, Piao YS, Kikugawa K, Ohara S, Hasegawa M, Takano H, Fukase M, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H (2006) Corticobasal degeneration with focal, massive tau accumulation in the subcortical white matter astrocytes. *Acta Neuropathol*(Berl) 112: 341-348.
7. Wakabayashi K, Mori F, Hasegawa M, Kusumi T, Yoshimura I, Takahashi H, Kaneko S (2006) Co-localization of beta-peptide and phosphorylated tau in astrocytes in a patient with corticobasal degeneration. *Neuropathology* 26: 66-
8. 増田雅美, 長谷川成人 (2006) タウ病理の阻害薬. *Pharma Medica* 24:55-58.
9. 長谷川成人, 新井哲明, 野中隆, 亀谷富由樹, 秋山治彦, 池田研二 (2006) 前頭側頭型認知症の生化学. *Dementia Japan* 20:36-
10. 長谷川成人 (2006) タウ: 老年期認知症ナビゲーター (平井俊策監修), pp218-219. 東京: メディカルレビュー社
11. 長谷川成人 (2006) 神経原線維変化: 老年期認知症ナビゲーター (平井俊策監修), pp214-215. 東京: メディカルレビュー社
12. Kentaro Tanemura, Du-Hua Chui, Tetsuya Fukuda, Miyuki Murayama, Jung-Mi Park, Takumi Akagi, Yoshitaka Tatebayashi, Tomohiro Miyasaka, Tetsuya Kimura, Tsutomu Hashikawa, Yuka Nakano, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda, and Akihiko Takashima  
Formation of Tau Inclusions in Knock-in Mice with Familial Alzheimer Disease (FAD) Mutation of Presenilin 1 (PS1). *J. Biol. Chem.* 281(8) 5037-5041 2006
13. Tanaka T, Isoe-Wada K, Yamamori H, Kato K, Nessa BN, Sadik GM, Takeda M. Neurobiological studies of dementia-biological markers and neuroprotective strategies for Alzheimer disease. *Acta Neurol Taiwan.* 15:68-71, 2006
14. Kimura R, Kamino K, Yamamoto M, Akatsu H, Uema T, Kobayashi T, Hattori

- H, Nuripa A, Nessa BN, Kazui H, Ikejiri Y, Tanaka T, Tanii H, Kudo T, Yoneda H, Yamagata H, Miki T, Takeda M. Albumin gene encoding free fatty acid and beta-amyloid transporter is genetically associated with Alzheimer disease. *Psychiatry Clin Neurosci.* 60 Suppl 1:S34-39,2006.
15. Nessa BN, Tanaka T, Kamino K, Sadik G, Ansar AB, Kimura R, Tanii H, Okochi M, Morihara T, Tagami S, Kudo T, Takeda M. Toll-like receptor 3 mediated hyperphosphorylation of tau in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Psychiatry Clin Neurosci.* 60 Suppl 1:S27-33,2006.
16. Fukumori A, Okochi M, Tagami S, Jiang J, Itoh N, Nakayama T, Yanagida K, Ishizuka-Katsura Y, Morihara T, Kamino K, Tanaka T, Kudo T, Tanii H, Ikuta A, Haass C, Takeda M. Presenilin-dependent gamma-secretase on plasma membrane and endosomes is functionally distinct. *Biochemistry.* 45:4907-4914, 2006.
17. Morihara T, Cole GM, Tanii H, Tanaka T, Kudo T, Takeda M. Multiple anti-Alzheimer disease activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs *Psychogeriatrics* 6; 1-3, 2006
18. Takeda M, Kudo T, Tanaka T, Kamino K, Okochi M, Tagami S Biological markers for diagnosis of MCI and neurodegenerative dementia *Functional and Molecular Imaging of Stroke and Dementia* (Nishimura T & Sorensen GA eds), 101-107, Elsevier, 2006
19. 田中稔久、武田雅俊 第5章 原因疾患 アルツハイマー型認知症 (痴呆) p96-97 「老年期認知症ナビゲーター」 監修 平井俊作 編集 荒井啓行 浦上克哉 武田雅俊 本間昭 メジカルレビュー社 (東京) 2006.
20. 田中稔久、武田雅俊 第10章 遺伝子関連 PS 蛋白変異とアルツハイマー病 p288-289 「老年期認知症ナビゲーター」 監修 平井俊作 編集 荒井啓行 浦上克哉 武田雅俊 本間昭 メジカルレビュー社 (東京) 2006.
21. 武田雅俊、田中稔久、大河内正康 軽度認知障害と認知症診断のための生物学的マーカー 1-9「プロシーディングス アルツハイマー病とその関連疾患に対する早期診断マーカー：最新の話題」*メディカルフロントインターナショナル* (東京) 2006
22. 田中稔久、和田健二、山森長英、ベグムヌルネッサ、ゴラムムハマドサディク、武田雅俊 アルツハイマー病の生物学的診断マーカーとしての修飾型タウ蛋白 19-28「プロシーディングス アルツハイマー病とその関連疾患に対する早期診断マーカー：最新の話題」*メディカルフロントインターナショナル* (東京) 2006
23. 田中稔久、武田雅俊 アルツハイマー病は予防できるかー①予防薬の将来 から だの科学 251:118-122,2006.
24. Ryo Kimura, Kouzin Kamino, Mitsuko Yamamoto, Aidaralieva Nuripa, Tomoyuki Kida, Hiroaki Kazui, Ryota Hashimoto, Toshihisa Tanaka, Takashi Kudo, Hidehisa Yamagata, Yasuharu Tabara, Tetsuro Miki, Hiroyasu Akatsu, Kenji Kosaka, Eishi Funakoshi, Kouhei Nishitomi, Gaku Sakaguchi, Akira Kato, Hideyuki Hattori, Takeshi Uema, and Masatoshi Takeda The *DYRK1A* gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between  $\beta$ -amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum.Mol.Genet* 16 (1) 15-23
25. Akio Fukumori, Jingwei Jiang, Hisashi Tanii, Takashi Morihara, Kojin Kamino, Toshihisa Tanaka, Takashi Kudo, Naohiro Ito, Shinji Tagami, Masayasu



Okochi, Masatoshi Takeda

Inhibition of endocytosis activates alternative degradation pathway of  $\beta$ APP in cultured cells.

Psychogeriatrics 6(3) 107-113 2006

26. Daisuke Kanayama, Takashi Kudo, Ryo

Kimura, Nobuhiko Tabuchi, Akio

Fukumori, Takashi Morihara, Shinji

Tagami, Hisashi Tanii, Masayasu

Okochi, Kojin Kamino, Toshihisa

Tanaka, Kazunori Imaizumi, Takeshi

Tabira, Masatoshi Takeda

A $\beta$  induces endoplasmic reticulum

stress causing possible proteasome

impairment via the endoplasmic

reticulum-associated degradation

pathway.

Psychogeriatrics 6(3) 100-106 2006

27. Kenji Nakamura, Wakana Ohya, Hiroshi

Funakoshi, Gaku Sakaguchi, Akira Kato,

Masatoshi Takeda, Takashi Kudo,

Toshikazu Nakamura

Possible Role of Scavenger Receptor

SRCL in the Clearance of Amyloid- $\beta$  in

Alzheimer's Disease. J Neurosci Res

84 874-890 2006

28. Kudo T, Okumura M, Imaizumi K,

Araki W, Morihara T, Tanimukai H,

Kamagata E, Tabuchi N, Kimura R,

Kanayama D, Fukumori A, Tagami S

Okochi M, Kubo M, Tanii H, Tohyama

M, Tabira T, Takeda M

Altered localization of amyloid

precursor protein under endoplasmic

reticulum stress.

Biochem Biophys Res Commun.

344 525-530 2006

#### 学会発表

1. 長谷川成人 シヌクレイノパチーの基礎研究. 第25回日本認知症学会, シンポジウム3「シヌクレイノパチーの臨床と基礎研究」,

広島 [2006/10/07].

2. Oikawa T, Yonetani M, Masuda M, Nonaka T, Hisanaga S, Hasegawa M (2006) Effect of alpha-synuclein on microtubule assembly. The 6th Annual Meeting of International College of Geriatric Psychoneuropharmacology (ICGP), Hiroshima, Japan [2006/10/05].
3. Masuda M, Suzuki N, Taniguchi S, Oikawa T, Nonaka T, Iwatsubo T, Hisanaga S, Hasegawa M (2006) Small molecular inhibitors of alpha-synuclein filament assembly. The 6th Annual Meeting of International College of Geriatric Psychoneuropharmacology (ICGP), Hiroshima, Japan [2006/10/05].
4. Nonaka T, Hasegawa M (2006) Inhibition of the proteasome activity by alpha-synuclein in SH-SY5Y cells. The 6th Annual Meeting of International College of Geriatric Psychoneuropharmacology (ICGP), Hiroshima, Japan [2006/10/05].
5. Hasegawa M, Ishii A, Nonaka T, Saito T, Arai T, Hisanaga S, Iwatsubo T (2006) CK2 is the major enzyme in brain that generates P<sub>Ser129</sub> epitope of alpha-synuclein. The 6th Annual Meeting of International College of Geriatric Psychoneuropharmacology (ICGP), Hiroshima, Japan [2006/10/05].
6. Tabuchi N, Kudo T, Morihara T, Kanayama D, Minami T, Takeda M (2006) Application of "proteasome tolerance" to therapies for neurodegenerative disease. The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders (ICAD), Madrid, Spain [2006/07/15].
7. Tanaka T, Sadik MG, Begum NN, Takeda M. Phosphorylation of tau at Ser214 mediates a novel interaction of tau with 14-3-3 that leads to reduction

- of tau aggregation. The 10<sup>th</sup> international conference on Alzheimer disease and related disorders Jul,16-20,2006, Madrid, U.S.A.
8. Begum NN, Tanaka T, Kamino K, Sadik G, Bin A, Kudo T, Takeda M. Amyloid beta upregulates Toll-Like Receptor 3 implication in the pathogenesis of Alzheimer disease. The 10<sup>th</sup> international conference on Alzheimer disease and related disorders Jul,16-20,2006, Madrid, U.S.A.
  9. Tanaka T, Begum NN, Sadik G, Kato K, Kamino K, Takeda M Increased expression of Toll Like Receptor-3 in amyloid beta-treated cells and Alzheimer's brain The 10<sup>th</sup> international conference on Alzheimer disease and related disorders ICGP 日本認知症学会 合同学会 Oct ,4-7,2006, Hiroshima, Japan.
  10. 田中稔久、Golam Sadik, 加藤希世子, Begum Nurun Nessa, 紙野晃人, 工藤喬, 大河内正康, 田上真次, 森原剛史, 橋本亮太, 木村亮, 姜経緯, Aidaralieva Nuripa, 鎌形英一郎, 田淵信彦, 森康治, 武田雅俊 タウの蛋白修飾制御にもとづいた認知症性疾患治療法の開発 第39回精神神経系薬物治療研究報告会、2006.12.8、千里ライフサイエンスセンター (大阪)
  11. Eiichiro Kamagata, Takashi Kudo, Daisuke Kanayama, Kazunori Imaizumi, Masatoshi Takeda(2006) Amyloid  $\beta$  protein induce macroautophagy. 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders (ICAD), Madrid, Spain [2006/7/16-20].

#### G. 健康危険情報

特記すべきことなし。

研究要旨:アルツハイマー神経原線維変化の形成を抑止する化合物を探索するため、12系統79種類の化合物のタウの線維化抑制効果を調べた。その結果、ポリフェノール、フェノチアジン、ポルフィリン、コンゴレッド誘導体の系統の化合物に強い線維化抑制効果を認めた。

キーワード：タウ、線維化、低分子化合物、ポリフェノール、A $\beta$ 、 $\alpha$ シヌクレイン

## A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) は老人斑と神経原線維変化(Neurofibrillary tangle: NFT)の2種類の線維性凝集物の蓄積を特徴とする変性疾患である。老人斑はAPPから切り出された40あるいは42個のアミノ酸からなるアミロイド $\beta$ 蛋白(A $\beta$ )が細胞外に蓄積した構造物であり、NFTは高度にリン酸化されたタウ蛋白を主成分とするPHF (paired helical filament)とよばれる線維の束である。家族性ADの遺伝学的解析からAPPの遺伝子変異が同定され、A $\beta$ の産生や凝集がAD発症の中核的存在として確立された。また、第17番染色体に連鎖する前頭側頭型認知症(FTDP-17)にタウの遺伝子変異が発見され、タウの機能、発現異常が神経変性のプロセスにおける中心であることが立証された。この二つのタンパク質の凝集、蓄積を抑えることができればADの治療につながる可能性が考えられる。

A $\beta$ やプリオンなど細胞外に蓄積するタンパク質の凝集に対しての研究は多いが、細胞内のタウの線維形成阻害を狙った治療戦略に関するレポートはまだ少ない。A $\beta$ とタウの両方のタンパク質の凝集に対して効果がある化合物はADに有効であると考

えられることから、これまでにA $\beta$ の凝集阻害や抗プリオン効果などが報告されている化合物を中心に検討した。構造の類似性により分類した12系統の79種類の化合物について、タウの線維化を阻害する効果をもつかどうかを調べると共に、その阻害機構に関する解析を行った。また並行して、タウと類似のアミロイド線維を形成するA $\beta$ と $\alpha$ シヌクレインについても同様の検討を行った。

## B. 研究方法

大腸菌に発現、精製したヒトリコンビナントタウをヘパリンと共に37°Cでインキュベートするタウの線維形成試験管内モデルを用いて観察した。

評価方法としては電子顕微鏡観察による定性的評価と、凝集実験によく用いられる $\beta$ シート構造を認識して結合するとされるチオフラビンSの蛍光測定による定量的評価に加え、我々が独自に工夫したサルコシル不溶性タウを検出、定量する方法の3種類の方法で行った。サルコシルは患者脳に蓄積したタウを精製する際によく用いられる陰イオン性界面活性剤の一種である。後述す

るようにこの方法を用いることで感度よくタウの線維化を定量することが可能となると同時にタウ凝集阻害の機構に関する情報を得ることができた。この3種類の方法を用いて評価した結果、ポリフェノール、ポルフィリポルフィリン、フェノチアジン系の複数の化合物がタウの線維形成阻害効果を示すことが明らかとなった。図1に代表的な化合物についての検討結果を示す。多くの場合、電子顕微鏡での観察、チオフラビンSの蛍光、不溶性タウの定量の3種類の方法で一致する結果が得られたが、一部の化合物では電子顕微鏡観察で沢山の線維が観察されるにも関わらずチオフラビンSの蛍光に著しい減少がみられるものがあった。これらの化合物はタウの線維形成を阻害とは関係なく、チオフラビンSの結合を阻害することで蛍光測定系を妨害していると考えられ、以降の定量はサルコシル不溶性タウの検出で行うこととした。

次に、線維形成阻害効果の強さを調べるため、化合物の濃度を0.02~200  $\mu\text{M}$  の範囲で変えてタウとインキュベートし、サルコシル不溶性タウを定量することによって阻害効果の強さを数値化した。42種類すべての化合物についてタウの線維化に対する50%阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ )を算出すると共に、 $\text{A}\beta$ ペプチドの凝集に対する $\text{IC}_{50}$ を算出し、両者の阻害効果を比較した。

### C. 研究結果

myricetin、ferric-dehydroporphyrin IX、epicatechin 3-gallate、methylene blue、azure B、gossypetin等で $\text{IC}_{50}$ が1~2  $\mu\text{M}$ と強いタウの線維化阻害効果が、2,3,4,2'4'-pentahydroxybenzophenone、azure AとC、quinacrine mustard、exifone、purepurogallin

等の化合物も $\text{IC}_{50}$ が2~10  $\mu\text{M}$ と比較的強いタウの線維化阻害効果が認められた。また、hematin、thionin、2,3,4-trihydroxybenzophenone、hypericin、pseudopypericin、quinacrine、lactoid、phthalocyanine等は $\text{IC}_{50}$ が10~70  $\mu\text{M}$ であったが明らかな線維化阻害効果が認められた。また、コンゴレッド、及びその誘導体であるBSB、FSBにも強い効果が認められた。Apigenin、epicatechin、chlorpromazine hydrochloride、perphenazine、promazine hydrochloride、acetopromazine、propinylpromazine及び、その他の系統のベンゾチアゾール、リファマイシン、ポリエニマクロライドアントラサイクリン、スルホン化色素、その他の色素などの化合物は $\text{IC}_{50}$ が200  $\mu\text{M}$ 以上であった。また、ポルフィリン、ポリフェノール、フェノチアジン、今後—レッド及びその誘導体の4系統の化合物については、タウの線維化阻害効果と $\text{A}\beta$ 凝集抑制作用、及び $\alpha$ シヌクレインの線維化阻害効果との間に強い相関が認められた。それ以外の系統の化合物については、 $\text{A}\beta$ 凝集阻害効果は認められたにもかかわらず、タウの線維化阻害効果は認められなかった。

線維化阻害の機構を調べる目的で、サルコシル不溶性タウを検出する方法で線維化タウの定量を行う際に、沈殿に回収される不溶性タウだけでなく、上清に回収される可溶性タウの変動についても解析をおこなった。その結果、興味深いことに線維化の阻害がみられた試料の上清には単量体のタウのバンドの増加だけでなく、二量体、及びそれ以上の高分子量域にタウの多量体が検出された。このようなバンドは阻害効果を示さない化合物を添加した場合には検出されなかった。

同様のSDS安定な二量体やオリゴマーは、A

$\beta$ でも $\alpha$ シヌクレインの線維化実験においても検出され、その存在は化合物の阻害効果と非常に強い相関が観察された。

#### D. 考察

今回の解析から、ポリフェノール、フェノチアジン、ポルフィリンの3系統21種類の化合物にタウの線維化阻害効果が認められた。またこれらはタウの線維化だけでなくA $\beta$ の凝集を共に阻害することが明らかとなった。A $\beta$ とタウの両方の分子の線維化に阻害効果を有する化合物はADの老人斑と神経原線維変化の形成を抑制することが期待され、ADの新しい治療、予防薬への応用の可能性が考えられる。

A $\beta$ の凝集阻害剤についてはこれまでも、いくつかのポリフェノール、ポルフィリン化合物などの検討やアミロイドイメージングのプロープとして注目されているベンゾチアゾール化合物などの報告があるが、フェノチアジン化合物のA $\beta$ 凝集阻害効果についてはこれまでに報告はなく新しい知見である。タウの凝集阻害剤としては、N744と呼ばれるベンゾチアゾール化合物が、アラキドン酸の誘導するタウの凝集を阻害することが報告されている。この化合物はA $\beta$ や $\alpha$ シヌクレインの凝集、線維化は抑制せずに、タウのみの凝集を抑制するという。

ポルフィリン化合物によるタウの線維化阻害効果についてはこれまでに報告はなく、今回が初めての報告である。タウの線維化形成の過程は、はじめにタウ分子がジスルフィド結合を介してアンチパラレルに結合した二量体を形成し、それが重合することによって線維が伸長するモデルが提唱されている。しかしながら、その実際は不明な点が多く、A $\beta$ など

でよく話題にのぼるオリゴマーが存在するかどうかについても報告されていなかった。我々は今回、*in vitro*の線維形成過程において、タウは可溶性のオリゴマーを形成すること、またそのオリゴマータウは線維とほぼ同様のトリプシン耐性を示すことを明らかにした。オリゴマータウにはジスルフィド結合を介したタウ分子間の結合がみられたが、システインをすべてアラニンに置換した変異体でも野生型と同じ速度で線維形成が観察されることから副次的におこった反応であり線維化に大きな役割をはたしていないと考えられた。

線維化阻害の機構については、個別の分子、個別の化合物について様々な議論がなされてきたが、今回の解析で我々は、線維化阻害がみられる可溶性画分にSDS安定なオリゴマータウが形成されること、阻害剤は可溶性のオリゴマータウとSDS安定な複合体を形成するのを見だし、多くの阻害剤が共通の分子機構を通して阻害効果を発揮している可能性が示された。

阻害剤は用いたタウの濃度に比べてかなり低い濃度でもその効果を発揮することから、モノマータウに直接結合して作用するというよりは線維化の律速段階にあるような分子に作用する可能性が高い。タウの線維化形成は、二量体形成や核形成などの様々な過程を経て線維が形成されると考えられるが、線維の核になる不溶性のseed形成までがひとつの律速段階と考えられる。オリゴマータウのseeding効果(線維化促進効果)は認められないこと(data not shown)や、阻害された試料は電子顕微鏡観察では特定の形態を確認できないことから、今回用いた化合物が、可溶性の二量体やオリゴマーが形成された段階でそれらに結合し、安定化して線維形成を阻害することが

示唆される(図5)。以上のことなどから、低分子有機化合物によるタウの線維化阻害の機構は、線維形成の初期に形成されるタウの二量体、あるいはそれ以上のオリゴマータウに結合し、その後のseedの形成や線維の伸長反応を阻害する可能性が考えられる。

#### E. 結論

低分子化合物はタウや A $\beta$ 、 $\alpha$ シヌクレインの線維形成初期に形成される二量体やオリゴマーに結合し、アミロイド線維形成を抑制すると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Arai T#, Hasegawa M#, (# equally contributed, corresponding authors) Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T (2006) TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351:602-611.
2. Kim EJ, Sung JY, Lee HJ, Rhim H, Hasegawa M, Iwatsubo T, Min DS, Kim J, Paik SR, Chung KC (2006) Dyrk1A phosphorylates alpha-synuclein and enhances intracellular inclusion formation. *J Biol Chem* 281: 33250-33257.
3. Masuda M, Suzuki N, Taniguchi S, Oikawa T, Nonaka T, Iwatsubo T, Hisanaga SI, Goedert M, Hasegawa M (2006) Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly. *Biochemistry* 45:6085-6094.
4. Masuda M, Dohmae N, Nonaka T, Oikawa T, Hisanaga S, Goedert M, Hasegawa M (2006) Cysteine misincorporation in bacterially expressed human alpha-synuclein. *FEBS Lett*

580:1775-1779.

5. Hasegawa M (2006) Biochemistry and molecular biology of tauopathies. *Neuropathology* 26: 484-490.
6. Sakai K, Piao YS, Kikugawa K, Ohara S, Hasegawa M, Takano H, Fukase M, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H (2006) Corticobasal degeneration with focal, massive tau accumulation in the subcortical white matter astrocytes. *Acta Neuropathol (Berl)* 112: 341-348.
7. Wakabayashi K, Mori F, Hasegawa M, Kusumi T, Yoshimura I, Takahashi H, Kaneko S (2006) Co-localization of beta-peptide and phosphorylated tau in astrocytes in a patient with corticobasal degeneration. *Neuropathology* 26: 66-
8. 増田雅美, 長谷川成人 (2006) タウ病理の阻害薬. *Pharma Medica* 24:55-58.
9. 長谷川成人, 新井哲明, 野中隆, 亀谷富由樹, 秋山治彦, 池田研二 (2006) 前頭側頭型認知症の生化学. *Dementia Japan* 20:36-
10. 長谷川成人 (2006) タウ: 老年期認知症ナビゲーター (平井俊策監修), pp218-219. 東京: メディカルレビュー社
11. 長谷川成人 (2006) 神経原線維変化: 老年期認知症ナビゲーター (平井俊策監修), pp214-215. 東京: メディカルレビュー社

##### 学会発表

1. 長谷川成人 (2006) シヌクレイノパチーの基礎研究. 第25回日本認知症学会, シンポジウム3「シヌクレイノパチーの臨床と基礎研究」, 広島 [2006/10/07].
2. Oikawa T, Yonetani M, Masuda M, Nonaka T, Hisanaga S, Hasegawa M (2006) Effect of alpha-synuclein on microtubule assembly. The 6th Annual Meeting of International College of

- Geriatric Psychoneuropharmacology (ICGP), Hiroshima, Japan [2006/10/05].
3. Masuda M, Suzuki N, Taniguchi S, Oikawa T, Nonaka T, Iwatsubo T, Hisanaga S, Hasegawa M (2006) Small molecular inhibitors of alpha-synuclein filament assembly. The 6th Annual Meeting of International College of Geriatric Psychoneuropharmacology (ICGP), Hiroshima, Japan [2006/10/05].
  4. Nonaka T, Hasegawa M (2006) Inhibition of the proteasome activity by alpha-synuclein in SH-SY5Y cells. The 6th Annual Meeting of International College of Geriatric Psychoneuropharmacology (ICGP), Hiroshima, Japan [2006/10/05].
  5. Hasegawa M, Ishii A, Nonaka T, Saito T, Arai T, Hisanaga S, Iwatsubo T (2006) CK2 is the major enzyme in brain that generates P<sup>Ser129</sup> epitope of alpha-synuclein. The 6th Annual Meeting of International College of Geriatric Psychoneuropharmacology (ICGP), Hiroshima, Japan [2006/10/05].
  6. Yonetani M, Masuda M, Oikawa T, Nonaka T, Hisanaga S, Hasegawa M (2006) analysis of the core structures of wild type and mutant alpha-synuclein filaments. The 6th Annual Meeting of International College of mutant alpha-synuclein filaments. The 6th Annual Meeting of International College of Geriatric Psychoneuropharmacology (ICGP), Hiroshima, Japan [2006/10/05].
  7. Nonaka T, Hasegawa M (2006) Proteasome inhibition by alpha-synuclein in living cells. The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, Madrid, Spain [2006/07/19].
  8. Masuda M, Suzuki N, Taniguchi S, Oikawa T, Nonaka T, Iwatsubo T, Hisanaga S, Goedert M, Hasegawa M (2006) Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly. The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, Madrid, Spain [2006/07/19].
  9. Zhu YS, Yotsumoto K, Saito T, Asada A, Hasegawa M, Hisanaga S (2006) Regulation of the kinase activity and membrane association of Cdk5-p35 and phosphorylation of p35 in fetal brains. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan [2006/06/22].
  10. Masuda M, Dohmae N, Nonaka T, Oikawa T, Hisanaga S, Goedert M, Hasegawa M (2006) Cysteine misincorporation in bacterially expressed human alpha-synuclein. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan [2006/06/20].

分子シャペロンとユビキチン・プロテアソーム系の連携を介した  
タウ蛋白代謝機構

分担研究者 高島明彦 独立行政法人理化学研究所  
アルツハイマー病研究チーム チームリーダー

研究要旨: タウ蛋白の分解系に焦点を絞り、分子シャペロン・ユビキチン・プロテアソーム系の連携による分解機構を、細胞モデルおよびマウスモデルを用いて明らかにする。

キーワード: ユビキチン・プロテアソーム系、分子シャペロン、ユビキチンリガーゼ、CHIP ノックアウトマウス

#### A. 研究目的

タウ蛋白の分解系に焦点を絞り、細胞モデルならびにマウスモデルを用いて分子シャペロンとユビキチン・プロテアソーム系の連携を介した代謝機構を明らかにし、新規のタウオパチー治療法を探索する。

#### B. 研究方法

タウを選択的にユビキチン化するユビキチンリガーゼの同定。培養細胞におけるユビキチンリガーゼ CHIP のタウ蛋白分解代謝への作用。CHIP ノックアウトマウス（東京都臨床研・村田茂穂先生より提供）の解析。

CHIP ノックアウトマウスとタウオパチーマウスの交配。

(倫理面への配慮)

研究はすべて当該施設の倫理委員会の承諾を得て行った。

#### C. 研究結果

タウを特異的に認識するユビキチンリガーゼ CHIP が同定された。

細胞モデル系では、CHIP が関与するユビキチン・プロテアソーム系は異常なタウを選択的に分解し細胞死を抑制した。

CHIP ノックアウトマウスではタウのリン酸化が亢進していた。タウオパチーマウスモデル JNPL3 マウスでは CHIP の亢進が認められた。CHIP ノックアウトマウスとタウオパチーマウスの交配による、CHIP のタウ病変への作用は今のところ有意な変化を認めていない。

#### D. 考察

近年、protein misfolding disease という概念が受け入れられるようになり、各疾患で沈着する主要構成タンパク質が異なるものの、その分解異常を標的とした治療法の開発が試みられている。その中で、我々は CHIP がタウ蛋白を基質としてユビキチン化しうることを報告した (Hatakeyama et al. 2004)。

さらに、ヒト剖検脳、モデルマウスを用いて CHIP と Hsp (Heat shock protein) 90 が連携してタウ蛋白の不溶化を制御している可能性についても報告した (Sahara et al. 2005)。CHIP は品質管理ユビキチンリガーゼとして知られており、分子シャペロンと提携して再生できなくなった変性蛋白質を迅速に分解すると考えられていることから、タウ蛋白の不溶化に対しても同様な効果がみられることが期待される。



## E. 結論

今回の結果より、細胞モデルにおいてCHIPのタウ蛋白分解系への作用が明らかになった。今後は生体モデルによるタウ病変の制御を証明することが重要である。

## F. 研究発表

- 論文発表
  1. Yamamoto N, Matsubara E, Maeda S, Minagawa H, Takashima A, Maruyama W, Michikawa M, Yanagisawa K: A ganglioside-induced toxic soluble Abeta assembly: Its enhanced formation from Abeta bearing the Arctic mutation. *J Biol Chem*. 2006 Nov 29; [Epub ahead of print]
  2. Yamada M, Tanemura K, Okada S, Iwanami A, Nakamura M, Mizuno H, Ozawa M, Ohyama-Goto R, Kitamura N, Kawano M, Tan-Takeuchi K, Ohtsuka C, Miyawaki A, Takashima A, Ogawa M, Toyama Y, Okano H, Kondo T: Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2006 Nov 16; [Epub ahead of print]
  3. Kondo T: Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2006 Nov 16; [Epub ahead of print]
  5. Ide M, Ohnishi T, Murayama M, Matsumoto I, Yamada K, Iwayama Y, Dedova I, Toyota T, Asada T, Takashima A, Yoshikawa T.: Failure to support a genetic contribution of AKT1 polymorphisms and altered AKT signaling in schizophrenia.
  6. Araya R, Noguchi T, Yuhki M, Kitamura N, Higuchi M, Saido TC, Seki K, Itohara S, Kawano M, Tanemura K, Takashima A, Yamada K, Kondoh Y, Kanno I, Wess J, Yamada M.: Loss of M5 muscarinic acetylcholine receptors leads to cerebrovascular and neuronal abnormalities and cognitive deficits in mice. *Neurobiol Dis*. 2006 Nov;24(2):334-44. Epub
  6. Akihiko Takashima, Masafumi Shimojo, Benjamin Wolozin: The players on the  $\gamma$ -secretase team. *Nature Medicine* 12(7), 766-777(2006)
  7. Akihiko Takashima: GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Disease Suppl Alzheimer's disease, Academy of Scientific and Clinical Research*, pp309-317 (2006)
  8. Maeda S, Sahara N, Saito Y, Murayama S, Ikai A, Takashima A: Increased levels of granular tau oligomers: an early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience Research* 54, 197-201 (2006)
  9. Hirohisa Shiraishi, Toshihiro Marutani, Hua-Qin Wang, Yasuhiro, Maeda, Yukihisa Kurono, Akihiko Takashima, Wataru Araki, Masaki, Nishimura, Katsuhiko Yanagisawa and Hiroto Komano: Reconstitution of  $\gamma$ -secretase by truncated presenilin (PS) fragments revealed that PS C-terminal transmembranedomain is critical for formation of  $\gamma$ -secretase complex. *Genes Cells* 11, 83-93 (2006)
  10. Tanemura K, Chui D-H, Fukuda T, Murayama M, Park Akagi T, Tatebayashi Y, Miyasaka T, Kimura T, Tatebayashi Y, Miyasaka T, Kimura T, Hashikawa T, Nakano Y, Kudo T, Takeda M, and Takashima A: Formation of TAU inclusions in knock-in mice with familial Alzheimer's disease (FAD) mutation of presenilin 1(PS1). *J. Biol. Chem* 281-8, 5037-5041(2006)
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

プロテアソーム・トレランスとタウ代謝

分担研究者 工藤 喬 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学

研究要旨: 細胞内タンパク分解機構の一つである、プロテアソームを活性化させるプロテアソームトレランスについてマイクロアレイによる解析を行った。その結果見出された Nrf2 によってプロテアソーム活性が上昇し、タウの蓄積を抑えることが解った。

キーワード: プロテアソーム、マイクロアレイ、Nrf2、タウ

### A. 研究目的

細胞内の異常タンパクの蓄積は細胞死を誘導し、様々な神経変性疾患の原因と考えられている。これらの異常タンパクは通常ユビキチンの修飾を受けプロテアソームによって選択的に分解される経路（UPS）をたどる。凝集した異常タンパクは UPS を直接阻害し、その機能を低下させる。UPS 機能の低下はパーキンソン病（PD）、アルツハイマー病（AD）といった神経変性疾患との関連が示されている。これらの疾患では神経細胞内の異常タンパクの蓄積によって神経細胞死が起こっていると考えられている。つまり、これらの神経変性疾患では異常タンパクの蓄積によって UPS、プロテアソーム機能が低下させられ細胞死を引き起こしていると考えられる。これらのことから、プロテアソーム機能を活性化することができればこういった神経変性疾患の治療法につながる可能性が考えられる。そこで、我々はプロテアソーム機能を上昇させる方法を調査した。

### B. 研究方法

我々は、プロテアソーム機能を促進する現象に着目し、実験を行った。その現象とは、あらかじめ低濃度のプロテアソーム阻害剤を投与し

ておくと、その後に高濃度のプロテアソーム阻害剤を投与してもある程度の抵抗性を示すというものである。我々は、この現象をプロテアソームトレランスと名付け、マイクロアレイによってその現象に関連する遺伝子の検討を行った。

### C. 研究結果

プロテアソームを活性化させる方法を探すため、プロテアソームの機能が促進される現象について検討を行った。細胞をプロテアソーム阻害剤で処理すると濃度依存的に細胞死を起こす。しかし、低濃度のプロテアソーム阻害剤（Epoxomicin20nM, Lactacystin500nM）を8時間前処理しておく、前処理なしの群と比較して高い生存性を示した。また、同様の処理を GFP<sup>u</sup> を導入した細胞で行った所、前処理を行った群では GFP<sup>u</sup> の分解が行われたのに対し、未処理群では GFP<sup>u</sup> の蓄積が見られた。これらのことから、低濃度プロテアソーム阻害剤の前処理は高濃度プロテアソームに対して細胞障害性、プロテアソーム活性の双方に対して抵抗性に働くということが示唆された。我々はこの現象をプロテアソームトレランスと名付けた。次に、この現象はプロテアソームの増加に伴う

ものと仮定し、プロテアソームのサブユニットの発現量比較を行った。定量PCRでGAPDHを内部標準として比較したところ、プロテアソームのカタリティックサブユニットであるPSMB1、PSMB6で発現量の増加が見られた。これらの増加したサブユニットが機能的に働くことによってプロテアソームトレランスが起きているのであれば細胞内の細胞内の不要タンパクの分解も促進されているのではないかと考え、ADに特徴的な神経原線維変化のPaired Helical Filament (PHF)の主要構成要素であるタウをプロテアソームトレランスを誘導した細胞にトランスフェクションしその影響を調べた。その結果、プロテアソームトレランスを誘導した群では誘導を行わなかった群と比較して約40%、タウの蓄積が減少していた。我々はこの現象を起こす要素をさらに調査するため、マイクロアレイを用いた解析を行った。プロテアソームトレランスが誘導される際プロテアソームサブユニットの発現量が増加していることから、転写因子に着目し解析を進めた。転写因子解析の結果とサンプル中の発現量の比較から、NFE2L2という遺伝子を抽出した。NFE2L2はNrf2という転写因子をコードする遺伝子である。このNrf2のプロテアソームに与える影響を調べるため、Nrf2を過剰発現させプロテアソームサブユニットの発現量を比較した。PSMB1、PSMB6の両方でMock群と比較してNrf2過剰発現群で発現量が増加していることが解った。また蛍光基質を用いたin vitroでのプロテアソーム活性測定でも過剰発現群でその活性が高くなる傾向が見られた。さらに、タウへの影響を見るために、Nrf2とタウを共発現させ、タウの蓄積を確認した。Nrf2とタウを共発現させた群では、Mockとタウを共発現させた群と比較してタウの蓄積が抑えられることが解った。

#### D. 考察

PDやADをはじめとする神経変性疾患は凝集したタンパクによって惹き起こされると考えられている。これらのタンパクの蓄積とUPSによるタンパク分解機構との間には関連があると言われている。こういった病態の際のプロテアソーム活性は、事実低下しているとヒトや細胞系による研究によって示されている。プロテアソーム阻害剤を脳内に注入したラットではPD様の症状を示し、PDの特徴であるレビー小体様のタンパクの蓄積が見られる。このこともプロテアソームの機能とこれらの疾患が関連していることを示している。このため、われわれはプロテアソームの活性化がこれらの疾患の治療法につながると考えた。

今回の研究で我々はプロテアソームトレランスについての報告を行った。この現象はプロテアソーム機能の上昇に伴って起こると考え、この現象の解析がプロテアソームの活性化の方法の手がかりになると考え研究を進めた。プロテアソームトレランスにおけるプロテアソーム機能の上昇はプロテアソームサブユニットの発現の増加によっておきていた。さらに、プロテアソームトレランスを誘導することによってADで見られるPHFの主要構成物質であるタウの蓄積を抑えることが解った。

次に我々はこの一連の現象はどのようにして惹き起こされるのかを知るためにマイクロアレイを用いて遺伝子の発現の変化を調べた。プロテアソームサブユニットの発現が上昇していたことを踏まえ、転写因子に注目し解析を進めNFE2L2という遺伝子を抽出しその機能を調べた。NFE2L2はNrf2をコードしている遺伝子である。Nrf2はAntioxidant Responsible Element (ARE)という配列を認識し転写を調整する分子である。我々はこの分子を過剰発現させることによって、プロテアソ-

ムサブユニットが誘導されることを示した。またそれに伴いプロテアソーム活性が上昇することも確認した。さらに、タウの蓄積を抑えることも示した。これらの結果は Nrf2 がプロテアソームトレランスの誘導に必要な遺伝子の一つであることを示している。つまり、Nrf2 を誘導することが毒性タンパク過剰状態にある神経細胞の生存に効果的に働くことが考えられる。

#### E. 結論

プロテアソームトレランスを誘導する分子の一つとして Nrf2 が抽出された。Nrf2 が神経細胞保護的に働くことが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Eiichiro Kamagata, Takashi Kudo, Daisuke Kanayama, Kazunori Imaizumi, Masatoshi Takeda(2006) Amyloid  $\beta$  protein induce macroautophagy.
2. Kentaro Tanemura, Du-Hua Chui, Tetsuya Fukuda, Miyuki Murayama, Jung-Mi Park, Takumi Akagi, Yoshitaka Tatebayashi, Tomohiro Miyasaka, Tetsuya Kimura, Tsutomu Hashikawa, Yuka Nakano, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda, and Akihiko Takashima J. Biol. Chem., 281(8): 5037-5041, 2006
3. Kudo T, Okumura M, Imaizumi K, Araki W, Morihara T, Tanimukai H, Kamagata E, Tabuchi N, Kimura R, Kanayama D, Fukumori A, Tagami S, Okochi M, Kubo M, Tanii H, Tohyama M, Tabira T, Takeda M Biochem Biophys Res Commun. 344,525-530, 2006
4. Daisuke Kanayama, Takashi Kudo, Ryo Kimura, Nobuhiko Tabuchi,

Akio Fukumori, Takashi Morihara, Shinji Tagami, Hisashi Tanii, Masayasu Okochi, Kojin Kamino, Toshihisa Tanaka, Kazunori Imaizumi, Takeshi Tabira, Masatoshi Takeda

Psychogeriatrics 6(3) 100-106, 2006

5. 工藤 喬, 今泉和則, 原英彰, 武田雅俊  
小胞体ストレスのシャペロン誘導  
特集アルツハイマー病診断・治療の新しい展開  
Pharma Medica 24(7) 59-62, 2006
6. 工藤 喬, 武田雅俊  
臨床精神医学 35(7) 1026-1027, 2006  
小胞体ストレス  
シリーズ 精神医学用語解説
7. 工藤 喬, 武田雅俊  
老年期認知症ナビゲーター  
荒井啓行ら編集 平井俊策監修  
小胞体ストレス  
メディカルレビュー社 東京 2006  
pp232-pp233

#### G. 健康危険情報

特記すべきことなし。