

分担研究報告書

分担研究課題名：培養細胞内におけるタウの分解過程に関する研究

分担研究者 田中稔久 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学

分担研究協力者 Golam Sadik、柳健太郎 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学

研究要旨

神経原線維変化はタウオパチーの神経病理学的な特徴であり、タウ蛋白はその主要構成成分であるがタウ蛋白の分解過程については不明な点が多い。FTDP-17 (Frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17) はタウ遺伝子変異によって引き起こされる認知症であるが、どのようなメカニズムで神経変性が生じるかに関しては未解明な部分が多い。そこで、野生型タウおよび変異型タウ (V337M および R406W) を強制発現させた培養細胞を用いて、タウ蛋白の変化に関して解析をおこなった。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、野生型タウ に比べて変異型タウの有意な分解遅延が認められた。さらに、リン酸化レベルについてリン酸化特異抗体を用いて検討をおこなったところ、V337M 変異型タウにおいて Thre231 のリン酸化が、R406W 変異型タウにおいて Serine396 および Serine409 のリン酸化が有意に亢進していた。そこで、このリン酸化の亢進が分解遅延の原因である可能性が示唆された。

キーワード：アルツハイマー病、タウ蛋白、リン酸化、

A. 研究目的

アルツハイマー病の神経細胞内には神経原線維変化として異常なリン酸化および重合をしたタウ蛋白の存在が知られているが、それ以外の一次変性痴呆疾患、例えばピック病、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症においてもグリア細胞内におけるタウ蛋白異常蓄積が知られており、また、このタウ蛋白の遺伝子変異により認知症が引き起こされる FTDP-17 (Front Temporal Dementia with Parkinsonism, linked to chromosome-17) という家族性疾患も報告され、これらの病態におけるタウ蛋白の異常重合の重要性が言われている。この異常重合の原因は不明な点が多いが、さまざまな疾患において蓄積したタウ蛋白は必ず異常なリン酸化を受けているという点については共通である。このリン酸化タウ蛋白は微小管との結合能力を喪失し、さらに正常型タウ蛋白と容易に結合し、結果的に微小管系の破壊をもたらすことが知られている。またこの異常リン酸化はもう一つの蛋白修飾であるユビキチン化に先じて生じることも知られており、神経細胞の脱落の発端の機序として重要であるものと考えられる。

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、プロテアソーム、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) (アミノペプチダーゼの一種) 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.)。この PSA はポリグルタミン蛋白の分解にも関わっており、神経変性疾患における重要性が指摘されている (Bhutani N, EMBO 26:1385-1396.)。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。

そこで、タウ蛋白の分解される過程および重合・蓄積する過程の統一的理解を得るために、分解のための細胞内局在と結合因子の関与、遺伝子変異・リン酸化の関与などに関して検討をおこなうことに

した。

B. 研究方法

ヒト神経芽細胞種(SH-SY5Y)およびタウ遺伝子(最長型 tau441)を導入した非神経系細胞(COS7)を5% FCSを含むD-MEM/F-12にて培養し、以下のプロテアーゼ阻害剤を培地に添加して、20時間後のライセートを採取した。[プロテアソーム阻害剤: Lactacystin (Calbiochem, San Diego, CA, USA) (0-10 μ M)、MG-132 (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) (0-20 μ M)、カテプシン阻害剤: CA-074Me (Calbiochem) (0-10 μ M)、PSA 阻害剤; Puromycin (Sigma-Aldrich Japan) (0-2 μ M)]そして、抗タウ抗体 Tau-5 を用いたウエスタンブロットにより、タウ蛋白の分解過程を解析した。さらに、より微細な変化を追跡するために、 35 S-Met を用いたパルスチェイス法のもとで上記薬剤を添加して、20時間後のライセートを用い抗タウ抗体による免疫沈降によりタウ蛋白を回収し、タウ蛋白の分解過程を解析した。

次に、タウ蛋白の分解過程に重要な役割を持つ PSA に対する siRNA を SH-SY5Y 細胞に添加し、36時間処理後のライセートを作成し、抗タウ抗体 Tau-5 を用いたウエスタンブロットにより、PSA の発現の程度によるタウ蛋白分解への影響を確認した。

そして、FTDP-17 において報告された変異型タウ遺伝子 (V337M; Va337 の Met への変異、R406W; Arg406 の Trp への変異) を pcDNA3.1 に組み込み、野生型および変異型タウを COS-7 細胞に強制発現させて、 35 S-Met を用いたパルスチェイス法のもとでラベルから 48 時間後までのライセートを用い抗タウ抗体による免疫沈降によりタウ蛋白を回収し、タウ蛋白の分解過程を解析した。

さらに、PSA とタウ蛋白の細胞内局在の関係を調べるために、ProteoExtract™ Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem) を用いて細胞分画をおこない、核分画、細胞膜/オルガネラ分画および細胞質分画に分けた。そして、抗タウ抗体 Tau-5 および抗 PSA 抗体を用いたウエスタンブロットにより、それぞれの局在を検討した。また、細胞を蛍光免疫染色法により染色し、それぞれの局在を検討した。

最後に、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。

C. 研究結果

まず、ヒト神経芽細胞種(SH-SY5Y)にプロテアソームおよびカテプシンに対する阻害剤、PSA に対して阻害作用を有する puromycin を添加し、タウ蛋白をウエスタンブロットにて検討したところ、有意な変化は認められなかった。さらに野生型タウ蛋白を強制発現させた COS-7 細胞に同様の実験を行ったところ、puromycin のみにタウ蛋白発現レベルを増加させる傾向が認められたが有意なものではなかった。そこで 35 S-Met を用いたパルスチェイス法のもとで上記薬剤を添加して、20時間後のタウ蛋白分解過程を調べたところ、200 nM の puromycin を添加した際に有意にタウ蛋白分解の遅延が認められた。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。以上より、培養細胞上においてもタウ蛋白の代謝分解過程に PSA が関与していることが示唆された。

次に FTDP-17 において報告された変異型タウおよび野生型タウを COS-7 細胞に強制発現させて、 35 S-Met を用いたパルスチェイス法のもとで検討したところ、ラベルから 48 時間後において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。そして分解遅延の原因として、PSA とタウ蛋白の細胞内局在の関係を細胞分画法および免疫蛍光染色によって検討したところ、どちらの方法においてもタウ蛋白と PSA は細胞質内に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リン酸化特異抗体を用いたウエスタンブロットにより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。

D. 考察

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（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。また、最近の報告から PSA もタウ蛋白の分解に重要であることが報告されている。そこで、今回の研究ではタウ蛋白の分解経路について種々の阻害剤を用いた実験を行った。Puromycin によりタウ蛋白の分解遅延が認められたことから、PSA が培養細胞上でもタウ蛋白の代謝分解過程に深く関わることを示唆された。これに関しては、PSA に対する siRNA によってタウ蛋白の発現レベルの増加が認められたことから示唆された。

次に、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、ラベルから 48 時間後において野生型 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。この分解遅延の原因を調べるために、タウ遺伝子変異による細胞内局在の変化により、PSA による分解が遅延する可能性を検討した。野生型および変異型タウの導入の後、PSA とタウ蛋白の細胞内局在の関係を細胞分画法および免疫蛍光染色によって検討したところ、どちらの方法においてもタウ蛋白と PSA は細胞質内に共在していることが分かり、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。よって、タウ遺伝子変異による細胞内局在の変化により PSA によるタウ蛋白分解が遅延する可能性は否定的であった。次に、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。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。

E. 結論

今回の研究では未解明な部分が多いタウ蛋白の分解経路について種々の阻害剤を用いた実験を行った。ここでは *in vitro* において分解されるとの報告のあった PSA が培養細胞上でもタウ蛋白の代謝分解過程に深く関わることを示唆された。また、タウ蛋白と PSA はどちらも細胞質内に共在し、局在論的に十分機能することが示唆された。FTDP-17 に変異型タウの検討では、タウ蛋白の分解が有意に遅延しており、かついくつもの部位にてタウ蛋白のリン酸化の亢進が起こっていることが判明したが、

分解の遅延の原因としてこのリン酸化の亢進が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

- 論文発表
1. 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.
2. 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.
3. Yanagi K, Tanaka T, Kato K, Sadik G., Morihara T, Kudo T, Takeda M Involvement of puromycine-sensitive aminopeptidase in proteolysis of tau protein in cultured cells, and attenuated proteolysis of FTDP-17 mutant tau. Psychogeriatrics 9:157-166, 2009.
4. 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.
5. Tanimukai H, Kudo T, Tanaka T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Takeda M. Novel therapeutic strategies for neurodegenerative disease. Psychogeriatrics. 9:103-109, 2009.
6. Itoh N, Okochi M, Tagami S, Nishitomi K, Nakayama T, Yanagida K, Fukumori A, Jiang J, Mori K, Hosono M, Kikuchi J, Nakano Y, Takinami Y, Dohi K, Nishigaki A, Takemoto H, Minagawa K, Katoh T, Willem M, Haass C, Morihara T, Tanaka T, Kudo T, Hasegawa H, Nishimura M, Sakaguchi G, Kato A, Takeda M. Destruxin E Decreases Beta-Amyloid Generation by Reducing Colocalization of Beta-Amyloid-Cleaving Enzyme 1 and

- Beta-Amyloid Protein Precursor. Neurodegener Dis. 6:230-239, 2009.
7. Tanaka T, Kazui H, Sadik G, Tanimukai H, Tagami S, Morihara T, Okochi M, Kudo K, Takeda M. Prevention of psychiatric illness in the elderly I Path to Prevention of Dementia Psychogeriatrics 9:111-115, 2009.
 8. 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 Aβ-like peptide is a surrogate marker for Aβ42 production in the central nervous system. EMBO Molecular Medicine, 1:223-235, 2009.
 9. 田中稔久、武田雅俊 タウオパチーと前方型認知症 タウオパチーとは Clinical Neuroscience 27:258-261,2009
 10. 田中稔久、武田雅俊 薬の使い方シリーズ Quetiapine を使いこなす 第9回「高齢者への投与」臨床精神薬理学雑誌 12:523-529,2009.
 11. 武田雅俊、田中稔久 アルツハイマー病のバイオマーカー 総論 Cognition and Dementia 8:263-269,2009.
 12. 田中稔久、武田雅俊 タウおよびリン酸化を含む修飾関連蛋白 Cognition and Dementia 8:276-282,2009.
 13. 田中稔久 特別企画—認知症研究への貢献と到達点—故西村健先生を偲んで— タウの病理 Cognition and Dementia 8:349-353,2009.
2. 学会発表
 1. 田中稔久 タウ蛋白とその他の生化学マーカー「ADの診断を中心に」、シンポジウム 認知症の診断—この10年とこれから—アルツハイマー病研究会 第10回学術シンポジウム 2009,04,18 グランドプリンスホテル新高輪(東京)
 2. 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,11-16,2009, Vienna, Austria..
 3. 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.1-5, 2009 Montreal, Canada.
 4. 田中稔久、加藤希世子、馬場都、武田雅俊 生薬成分 berberine によるタウ蛋白リン酸化亢進の抑制 第16回日本未病システム学会学術総会 2009.10.31-11.1. (大阪府吹田市、千里ライフサイエンスセンター)
 5. 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 2009.11.20-21. (宮城県仙台市)
 6. 田中稔久、柳健太郎、Golam Sadik, 加藤希世子、馬場都、武田雅俊 FTDP-17 タウ変異によるタウ蛋白代謝過程の変化 日本老年医学会：第20回近畿地方会 2009.12.1、新大阪チサンホテル(大阪)
 7. 山本大介、杉山博通、上甲統子、野村慶子、和田民樹、高屋雅彦、木藤友実子、数井裕光、田中稔久、武田雅俊 失語症が急速に進行した認知症の一例 日本老年医学会：第20回近畿地方会 2009.12.1、新大阪チサンホテル(大阪)
 8. 田中稔久 タウの病理—運動ニューロン疾患を呈する前頭側頭型認知症の分子病態 第19回神経科学の基礎と臨床 2009.12.19、千里ライフサイエンスセンター(大阪)
 9. 田中稔久 アルツハイマー病の分子メカニズムと治療薬開発 熊本大学精神医学教室 2010.2.19、熊本大学(熊本)
 - H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
 1. 特許取得 なし。
 2. 実用新案登録 なし。
 3. その他 なし。

厚生労働科学研究費補助金(認知症対策総合研究事業)
分担研究報告書

タウ繊維凝集阻害物質の臨床治験を行うための臨床研究プロトコルの作成

分担研究者 数井 裕光 大阪大学医学部附属病院

研究要旨:タウ繊維凝集阻害物質の臨床治験を行うための臨床研究プロトコルを検討、作成した。被験者の選択に当たって、まずは疾患の診断基準を設定する必要がある。当研究では、アルツハイマー病(AD)の診断基準は、NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders Association and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association)で probable AD の基準を採用した。AD に対しての効果を検証した後は、同じタウオパチーである前頭側頭型認知症(FTD)、皮質基底核変性症(CBD)、進行性核上性麻痺(PSP)についても検討する必要があると考え、それぞれの疾患の診断基準について検討し、設定した。また、被験者選択後のAD及びその他のタウオパチーの疾患について、それぞれの評価方法を検討し、設定した。

キーワード:タウ繊維凝集阻害物質、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺

A. 研究目的

リン酸化タウを標的としたアルツハイマー病の根本治療薬のための、タウ繊維凝集阻害化合物開発後、臨床治験を行うためのプロトコルを作成する。

B. 研究方法

主任研究者、分担研究者が新しい治療薬を開発した後に、その効果を確認するための臨床治験を行うため、アルツハイマー病及びその他のタウオパチーについての診断基準、評価項目、評価方法について検討し、作成する。

(倫理面への配慮)

大阪大学倫理委員会に承認を申請中

C. 研究結果

1. 診断基準

I. ADの診断基準

ADの診断基準は、NINCDS-ADRDAでprobable ADの基準を採用した。診断基準は以下の通りである。

- 臨床診察で認知症が認められ、Mini-Mental State Examination、Blessed Dementia Scale、あるいは同様の検査などで立証され、神経心理検査で確認される
- 2つ以上の認知領域の障害がある
- 記憶および他の認知機能領域の進行性に悪化する。
- 意識障害がない

- 40歳から90歳の間で発症
- 記憶や認知の進行性障害の原因となる身体疾患ないしは他の脳疾患がない

上記の診断基準を満たすことに加え、今回のADを対象とした臨床治験の選択基準を以下の通り設定した。目標症例数は20名である。

- ① 年齢60歳－85歳
- ② Mini-Mental State Examination (MMSE)23点以下
- ③ Clinical Dementia Rating (CDR) 1以上

AD以外のタウオパチー (FTD, CBD, PSP) の診断基準は以下の通り設定した。

II. FTDの診断基準 (International collaborative workshop on FTD 1998による)

・性格変化と社会的接触性の障害が病初期から全疾患経過を通して優勢な特徴である。認知、空間的機能、行為、記憶などの道具的機能は正常か比較的良好に保たれる。

- ① 中核的診断特徴(すべて必要)
 - ア. 潜在性に発症し緩徐に進行する
 - イ. 社会的対人行動の早期からの障害 (行儀・社交マナー・礼儀正しさの障害と、反社会的・脱抑制的な、言語的・身体的・性的な行動異常)
 - ウ. 自己行動の調整の早期からの障害 (受動性・無気力・不活発から過活動・行ったり来たりを繰り返す・徘徊などの習慣行動の量的な異常、話す・笑う・歌う・性的行動・攻撃性などの増加)
 - エ. 早期からの情意鈍麻 (無頓着、感情的な温かみ・共感・同情の欠如、他者への無関心、を伴う不適切な感情の浅薄化)

オ. 早期からの病識の欠如

② 支持的診断特徴

ア. 行動障害

- ・自己の衛生や整容の障害
- ・思考の硬直化と柔軟性の消失
- ・注意の転導性の亢進と維持困難
- ・過食、口唇傾向と食行動変化
- ・保続的行動と常同的行動
- ・使用行動

イ. 発話および言語

- ・発話量の変化 a. 自発話の減少と発話の簡素化 b. 発話促進
- ・常同的発話
- ・反響言語
- ・保続
- ・無言症

ウ. 身体所見

- ・原始反射
- ・失禁
- ・無動、筋強剛、振戦
- ・低く不安定な血圧

エ. 検査所見

- ・神経心理学的検査: 重度の健忘・失語
- ・空間的認知障害を伴わない明らかな前頭葉機能検査の異常
- ・脳波検査: 臨床的に明らかな認知症症状があるにもかかわらず通常の脳波検査では正常
- ・脳画像検査 (形態および/または機能画像): 前頭葉および/または前部側頭葉の著明な異常

III. CBDの診断基準 (厚生労働省特定疾患調査研究班 (神経変性疾患調査研究班) の診断基準による)

・中核的特徴

- 潜在性に発症し進行性の経過をとる
- 他に特定できる原因がない (腫瘍、梗塞など)

- 以下の皮質症状が少なくとも1つ存在する
- 局所的もしくは非対称性の観念運動失行
- 他人の手徴候
- 皮質性感覚障害
- 視覚性もしくは感覚性の半側無視
- 構成失行
- 局所的もしくは非対称性ミオクローヌス
- 発語失行／非流暢性失語
- 以下の錐体外路障害が少なくとも1つ存在する
 - L-ドーパの反応が乏しく効果が持続しない、局所的もしくは非対称性の四肢の筋強剛
 - 局所的もしくは非対称性の四肢のジストニア
- 支持的検査所見
 - 神経心理検査所見で単症状もしくはいずれかの左右半球に偏った様々な程度の認知機能障害を認めるが、学習や記憶機能は比較的保たれている
 - CTやMRIで局所的または非対称性の萎縮(典型的には頭頂・前頭皮質に最も目立つ)
 - SPECTやPETで局所的または非対称性の血流低下が認められる(典型的には頭頂・前頭皮質に最も目立つが、大脳基底核や視床に認めることもある)

IV. PSPの診断基準(厚生労働省の診断基準による)

- probable PSP(下記の項目の全てを満たす)
 - 緩徐進行性である
 - 40歳以降の発症
 - 垂直性核上性眼球運動障害(上方視もしくは下方視)、および発症後1年以内の転倒を伴う顕著な姿勢の不安定

- 性の両方が存在する
- 上記の特徴を説明しうる除外診断基準に記載されているような他の疾患がない
- 除外基準(いずれか一つでもあればPSPと診断しない)
 - 最近の脳炎の既往
 - 他人の手徴候、皮質性感覚障害、前頭葉もしくは側頭頭頂葉の限局性脳萎縮
 - ドパミン療法に関係しない幻覚もしくは妄想
 - アルツハイマー型の皮質性認知症(NINCDS-ADRDAの診断基準による、重度の健忘、失語、あるいは失認)
 - 早期の顕著な小脳症状、あるいは早期の原因不明の顕著な自律神経障害(著明な低血圧、排尿障害)
 - 重度の非対称性パーキンソン兆候(運動緩慢など)
 - 関連する構造異常が神経放射線画像的に示される(大脳基底核や脳幹梗塞、葉性萎縮など)
 - PCRによって確認されたウィップル病
- 支持的基準
 - 近位部に強い対称性の無動や筋強剛
 - 異常な頸部の姿勢、特に頸部後屈
 - パーキンソニズムがレボドパ療法に反応しない、もしくは乏しい
 - 早期の嚥下障害、構音障害
 - 以下のうち少なくとも2つの認知障害が早期に出現する
 - アパシー、抽象的思考の障害、語列挙の現象、使用行動もしくは模倣行動、前頭葉解放徴候

2. 評価項目

臨床治験における評価項目は以下の通りである。

I. 共通の評価項目

全ての疾患に共通の評価項目としては以下を選択した。

- ① MMSE—全般的な認知機能の評価
- ② Alzheimer's Disease Assessment Scale for Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (J-ADNI版ADAS)—主要評価項目、全般的な認知機能評価
- ③ Neuropsychiatry Inventory-Care burden distress (NPI-D)—精神行動障害の評価
- ④ 3D-SPGR-MRI
- ⑤ IMP-SPECT
- ⑥ 髄液中タウ・リン酸化タウ定量

II. ADの評価項目

ADの臨床研究に有用な評価項目として、ADでは神経原線維変化は病初期より海馬、海馬傍回に出現するため、記憶機能を詳細に評価するため、以下を選択した。

- ① Wechsler Memory Scale-Revised (WMS-R)の論理的記憶I、II、視覚性対連合、言語性対連合—記憶機能の評価
- ② 3D-SPGR-MRIで側頭葉内側部の構物の体積測定

III. AD以外のタウオパチーの評価項目

AD以外のタウオパチー (FTD, CBD, PSP)の臨床治験に有用な評価項目として、それぞれの疾患に特異的な前頭葉機能障害、精神行動障害等の評価ができるよう、以下を選択した。

- ① Frontal Assessment Battery (FAB)—前頭葉機能の評価

- ② Verbal Fluency Test—前頭葉機能の評価
- ③ Trail Making Test—遂行機能など、前頭葉機能の評価
- ④ Behavioral Assessment of the Dysexecutive Syndrome (BADS)—遂行機能の評価
- ⑤ Stereotypy Rating Inventory (SRI)—精神行動障害のうち、常同行動についての評価
- ⑥ Dysexecutive Questionnaire (DEX)—遂行機能障害についての質問紙(感情、人格変化、認知の変化、動機付けの変化、行動の変化について問う)

上記検査項目を用いて、主任研究者、分担研究者が新しい治療薬を開発した後に、その効果を確認するため、臨床治験を実施する予定である。

D. 考察

タウオパチーには、AD以外にも、FTD、CBD、PSPもあるので、ADに対する効果の検証の後には、上記のように各疾患の診断基準、評価方法を用い、同様の検討を行う予定である。今回、評価項目を上記の通り設定したが、今後の動物実験等の結果も踏まえ、現在のプロトコルについては臨床研究開始前に再検討する予定である。

E. 結論

タウに関する新しい治療薬を開発した際の、臨床治験のプロトコルを作成した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）
分担研究報告

シャペロン誘導剤のアルツハイマー病への応用に関する研究

分担研究者 武田雅俊 大阪大学大学院医学系研究科

研究要旨: 我々は、小胞体ストレス反応のひとつであるシャペロン分子 BiP 誘導を人為的に起こすコンパウンドをスクリーニングし、BiP inducer X (BIX)を発見した。神経細胞実験から、BIX は若干 GRP94 や calreticulin などのシャペロンを誘導するが、特異的に BiP を誘導することが確かめられた。神経芽細胞腫に BIX を作用させておくと、ER ストレスによるアポトーシスを防ぐことが示され、BIX はアルツハイマー病(AD)をはじめとする ER ストレスによる神経変性に対する治療薬となりうる可能性がある。

キーワード: 小胞体ストレス、シャペロン、アルツハイマー病

A. 研究目的

近年、アルツハイマー病 (AD) の治療薬開発は、アミロイドカスケード仮説に則って、アミロイド前駆体蛋白の β/γ セクレターゼ阻害薬やアミロイドワクチンなどが精力的に開発されている。しかし、これらの最近の臨床試験成績はことごとく厳しいものとなっている。従って、新たな AD の治療ターゲットを模索する必要性が論議されつつある。AD をはじめとして、パーキンソン病、レビー小体病、前頭側頭型認知症、ポリグルタミン病などの神経変性疾患は未だ病態過程が不明な点が多いと言わざるを得ないが、これらの疾患では、異常蛋白が神経細胞内に蓄積凝集するという点が共通であり、興味深い。我々は、従来からアルツハイマー病の病態を小胞体 (ER) ストレスに対する反応、即ち unfolded protein

response (UPR)の見地から検討してきた。この UPR は異常蛋白蓄積に直接関与していると考えられ、神経変性疾患研究のひとつのトレンドとして多くの検討が行われている。近年我々は、ER ストレスについて蓄積してきた知見を踏まえ、治療戦略への応用を検討し始め、分子シャペロン誘導剤の開発を進めている。

B. 研究方法

我々は、新たな治療薬ターゲットとして、UPR のうち分子シャペロン誘導に着目し、分子シャペロン BiP 誘導剤の検索を行った。BiP のプロモーター配列に luciferase 配列をつなげたレポーターアッセイ系を確立し、コンパウンドライブラリーをハイスループットスクリーニングにて検索した。最も BiP のメッセージを誘導し

たコンパウンドを BiP inducer X (BIX) と名付けて採用した。

C. 研究結果

BIX を神経芽細胞腫 SK-N-SH に投与すると BIX の濃度依存的に BiP を誘導することが示されたが、古典的な ER ストレス誘導剤である thapsigargin 等が誘導するような BiP の高レベルよりは低く観察された。また、BIX による BiP 誘導は、投与 2 時間後から起り 4 時間後をピークに減衰していくことが観察され、BIX の効果は一過性であることが示された。以上の観察されたメッセージレベルの BiP 誘導は、BiP 蛋白発現を伴っていることが、Western 法にて確認されている。

もしこの BIX が BiP 以外の ER ストレスによって発現される分子を活性化すれば、ER ストレスによるアポトーシスに繋がりがねず、治療法とはなり得ない。そこで、BiP 以外の ER ストレス分子 XBP1、CHOP、ERdj4/MDG1、PDI について、BIX の効果を検討した。BIX を SK-N-SH 細胞に投与しても、BiP は誘導するが、XBP1 のスプライシング (活性化)、CHOP の誘導、ERdj4/MDG1 の誘導、PDI の誘導は起きないことが確認された。また、BiP 誘導と相対する蛋白翻訳抑制を起こす eIF2 α のリン酸化についても BIX の効果を検討したが、そのリン酸化は観察されなかった。以上の結果から、BIX は BiP のみを誘導し、他の ER ストレス反応分子を誘導

しないことが示された。

BIX の ER ストレス保護作用を検討する目的で、BIX を神経芽細胞の培地に添加し、12 時間後に tunicamycin を投与して ER ストレスをかけた。BIX を投与していない細胞では tunicamycin 投与後 36 時間後より細胞死が観察されたが、BIX 投与細胞では有意な細胞死の減少が観察された。ER ストレスから誘導されるアポトーシスで活性化される caspase 4 についてウエスタン法で検討したところ、BIX 投与細胞ではその活性化が抑制されていることが確認され、BIX は ER ストレスによるアポトーシスを抑制し、神経細胞を保護することが示されている。

D. 考察

ER には不整タンパクの蓄積に対し UPR という生理的な反応機構が存在する。アルツハイマー病におけるタウのように、神経変性疾患には異常タンパクが蓄積するという共通した病理過程が想定されている。従って、UPR を何らかの方法で活性化してやることで、異常タンパクの処理が進み、神経変性を防止できるかもしれない。そこで我々は、UPR のうちシャペロン誘導に注目し、誘導剤の開発に着手した。

ER ストレスシャペロンの BiP のプロモーターを利用して BiP 誘導剤 BIX を得た。この BIX は、BiP を選択的に誘導し、他の ER ストレス関連分子の発現を変化させないことが確

認され、治療への応用が期待される。

神経細胞を使用した実験では、BIXを投与しておくこと、ERストレスに対して抵抗性を示し、ERストレスによりもたらされるアポトーシスが回避された。

今後は、BIXのBiP誘導の詳細なメカニズムの検討とin vivoでの検証にすすみたい。

E. 結論

BiP誘導剤BIXを発明した。BIXはほぼBiPのみを誘導し、ERストレスによるアポトーシスを回避する事が示された。

F. 研究発表

論文発表

1. Decrease of dynamin 2 levels in late-onset Alzheimer's disease alters A β metabolism. Eiichiro Kamagata, Takashi Kudo, Ryo Kimura, Hitoshi Tanimukai, Takashi Morihara, Md.Golam Sadik, Kouzin Kamino and Masatoshi Takeda Biochem Biophys Res Commun 379: 691-695, 2009
2. Differential interaction and aggregation of 3-repeat and 4-repeat tau isoforms with 14-3-3zeta protein. Sadik G, Tanaka T, Kato K, Yanagi K, Kudo T, Takeda M. Biochem Biophys Res Commun. 383(1):37-41, 2009
3. Association study of the G72 gene

with schizophrenia in a Japanese population: a multicenter study. Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Yoshida T, Takahashi H, Iike N, Fukumoto M, Takamura H, Iwase M, Kamino K, Ishii R, Kazui H, Sekiyama R, Kitamura Y, Azechi M, Ikezawa K, Kurimoto R, Kamagata E, Tanimukai H, Tagami S, Morihara T, Ogasawara M, Okochi M, Tokunaga H, Numata S, Ikeda M, Ohnuma T, Ueno S, Fukunaga T, Tanaka T, Kudo T, Arai H, Ohmori T, Iwata N, Ozaki N, Takeda M. Schizophr Res. 109(1-3):80-85, 2009

4. SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease in a Japanese population. Kimura R, Yamamoto M, Morihara T, Akatsu H, Kudo T, Kamino K, Takeda M. Neurosci Lett. 461(2):177-180, 2009.
5. 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. Kanta Yanagida, Masayasu Okochi, Shinji Tagami, Taisuke Nakayama, Takashi S. Kodama, Kouhei Nishitomi, Jingwei Jiang, Kohji Mori, Shin-ichi Tatsumi, Tetsuaki Arai, Takeshi Ikeuchi, Kensaku Kasuga, Takahiko Tokuda, Masaki Kondo, Masaki Ikeda, Kentaro Deguchi, Hiroaki Kazui, Toshihisa Tanaka, Takashi Morihara, Ryota Hashimoto, Takashi Kudo,

Harald Steiner, Christian Haass,
Kuniaki Tsuchiya, Haruhiko
Akiyama, Ryozo Kuwano, Masatoshi
Takeda EMBO Molecular Medicine 1,
223-235, 2009

6. 認知症の脳研究—見えてきた神経変性の
共通機序 工藤 喬、阪上由香子、武
田雅俊 医学のあゆみ 231, 1084—
1088, 2009
7. アルツハイマー病治療法開発の現状
武田雅俊、田中稔久、大河内正康、田
上真次、森原剛史、工藤 喬 老年精神
医学雑誌 20 増刊号□, 61—65, 2009

G. 健康危険情報

特記すべきことなし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga SI, Kato K, Hasegawa M.	Characterization of inhibitor-bound alpha-synuclein dimer: role of alpha-synuclein N-terminal region in dimerization and inhibitor binding.	J Mol Biol	395	445-56	2010
Yonetani M, Nonaka T, Masuda M, Inukai Y, Oikawa T, Hisanaga SI, Hasegawa M.	Conversion of wild-type alpha-synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant.	J Biol Chem	284	7940-7950	2009
Masuda M, Hasegawa M, Nonaka T, Oikawa T, Yonetani M, Yamaguchi Y, Kato K, Hisanaga S, Goedert M.	Inhibition of alpha-synuclein fibril assembly by small molecules: Analysis using epitope-specific antibodies.	FEBS Lett	583	787-791	2009
Yamashita M, Nonaka T, Arai T, Kametani F, Buchman VL, Ninkina N, Bachurin SO, Akiyama H, Goedert M, Hasegawa M.	Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models.	FEBS Lett	583	2419-24	2009
Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M.	Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43.	Hum Mol Gene	18	3353-3364	2009

Nonaka T, Hasegawa M.	A Cellular Model To Monitor Proteasome Dysfunction by alpha-Synuclein.	Biochemistry	48	8014-22	2009
Yotsumoto K, Saito T, Asada A, Oikawa T, Kimura T, Uchida C, Ishiguro K, Uchida T, Hasegawa M, Hisanaga SI.	Effect of Pin1 or microtubule binding on dephosphorylation of FTDP-17 mutant TAU.	J Biol Chem	284	16840-7	2009
Takashima A.	Tauopathy and tau oligomer.	Acta Neuropath			in press
Takashima, A		Springer, NY			in press
Naohito Kitamura, Runa Araya, Moeko Kudoh, Haruo Kishida Tetsuya Kimura, Miyuki Murayama, Akihiko Takashima, et al	Beneficial effect of Estrogen in a Mouse Cerebrovascular Insufficiency	PloS one	44	1-13	2009
Takashima A	Amyloid- β , Tau, and Dementia	J Alzheimers Dis	17	729-736	2009
Kohji Mori, Masayasu Okochi, Shinji Tagami, Taisuke Nakayama, Kanta Yanagida, Takashi Kodama, Shin-ichi Tatsumi, Kana Fujii, Hitoshi Tanimukai, Ryota Hashimoto, Takashi Morihara, Toshihisa Tanaka, Takashi Kudo, Satoru Funamoto, Yasuo Ihara and Masatoshi Takeda	The production ratios of AICD ϵ 51 and A β 42 by Intramembrane proteolysis of β APP do not always change in parallel	Psychogeriatrics			in press
Kimura R, Yamamoto M, Morihara T, Akatsu H, <u>Kudo T</u> , Kamino K, Takeda M.	SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease in a Japanese population.	Neurosci Lett	461 (2)	177-180	2009

Hino S-I, Kondo S, Yoshinaga K, Saito A, Murakami T, Kanemoto S, Sekiya H, Chihara K, Aikawa Y, Hara H, Kudo T, Sekimoto T, Funamoto T, Chosa E, and Imaizumi K	Regulation of ER molecular chaperone prevents bone loss in a murine model for osteoporosis	J Bone Miner Metab	28	131-138	2010
Eiichiro Kamagata, Takashi Kudo, Ryo Kimura, Hitoshi Tanimukai, Takashi Morihara, Md.Golam Sadik, Kouzin Kamino and Masatoshi Takeda	Decrease of dynamin 2 levels in late-onset Alzheimer's disease alters A β metabolism	Biochem Biophys Res Commun	379	691-695	2009
Yuta Inokuchi, Yoshimi Nakajima, Masamitsu Shimazawa, Takanori Kurita, Mikiko Kubo, Atsushi Saito, Hironao Sajiki, Takashi Kudo, Makoto Aihara, Kazunori Imaizumi, Makoto Araie, and Hideaki Hara	Effect of an Inducer of BiP, a Molecular Chaperone, on Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-Induced Retinal Cell Death.	Invest Ophthalmol Vis Sci	50	334-344	2009
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
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	37-41	2009

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
--	--	------------------	---	---------	------

和文雑誌

著者名	論文名	雑誌名	巻	ページ	出版年
長谷川成人.	概論-因子から解明される神経変性疾患の分子基盤.	実験医学	27	1318-1323	2009
野中隆, 新井哲明, 長谷川成人	神経変性疾患の細胞病理学	細胞工学	28	437-442	2009
杉山博通、数井裕光、武田雅俊	老年期の記憶障害 特集 老年期にみられる症候から診断への手順	老年精神医学雑誌	20	1250-1255	2009
数井裕光、武田雅俊	健忘症状の診方	高次脳機能研究	29	304-311	2009
数井裕光、武田雅俊	認知症の BPSD を考える; AD,DLB,FTD を中心に - BPSDと関連する脳障害部位	老年精神医学雑誌	20 増刊号I	128-133	2009
数井裕光、武田雅俊	認知症に対する神経心理学的研究 一阪大精神科の研究を中心に一 特別企画 認知症研究への貢献と到達点 一西村健先生を偲んで一	Cognition and Dementia	8	109-111	2009
田中稔久、武田雅俊	タウおよびリン酸化を含む修飾関連蛋白	Cognition and Dementia	8	276-282	2009

Characterization of Inhibitor-Bound α -Synuclein Dimer: Role of α -Synuclein N-Terminal Region in Dimerization and Inhibitor Binding

Yoshiki Yamaguchi^{1,2*†}, Masami Masuda^{3,4†}, Hiroaki Sasakawa^{1,5}, Takashi Nonaka³, Shinya Hanashima², Shin-ichi Hisanaga⁴, Koichi Kato^{1,5,6} and Masato Hasegawa^{3*}

¹Department of Structural Biology and Biomolecular Engineering, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan

²Structural Glycobiology Team, Systems Glycobiology Research Group, Chemical Biology Department, RIKEN, Advanced Science Institute, 2-1 Hirosawa Wako, Saitama 351-0198, Japan

³Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Institute of Psychiatry, 2-1-8 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8585, Japan

⁴Molecular Neuroscience Laboratory, Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University, 1-1 Minami-Osawa, Hachioji-shi, Tokyo 192-0397, Japan

⁵Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences, 5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan

α -Synuclein is a major component of filamentous inclusions that are histological hallmarks of Parkinson's disease and other α -synucleinopathies. Previous analyses have revealed that several polyphenols inhibit α -synuclein assembly with low micromolar IC₅₀ values, and that SDS-stable, noncytotoxic soluble α -synuclein oligomers are formed in their presence. Structural elucidation of inhibitor-bound α -synuclein oligomers is obviously required for the better understanding of the inhibitory mechanism. In order to characterize inhibitor-bound α -synucleins in detail, we have prepared α -synuclein dimers in the presence of polyphenol inhibitors, exifone, gossypetin, and dopamine, and purified the products. Peptide mapping and mass spectrometric analysis revealed that exifone-treated α -synuclein monomer and dimer were oxidized at all four methionine residues of α -synuclein. Immunoblot analysis and redox-cycling staining of endoprotease Asp-N-digested products showed that the N-terminal region (1–60) is involved in the dimerization and exifone binding of α -synuclein. Ultra-high-field NMR analysis of inhibitor-bound α -synuclein dimers showed that the signals derived from the N-terminal region of α -synuclein exhibited line broadening, confirming that the N-terminal region is involved in inhibitor-induced dimerization. The C-terminal portion still predominantly exhibited the random-coil character observed in monomeric α -synuclein. We propose that the N-terminal region of α -synuclein plays a key role in the formation of α -synuclein assemblies.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Corresponding authors. Y. Yamaguchi is to be contacted at Structural Glycobiology Team, Systems Glycobiology Research Group, Chemical Biology Department, RIKEN, Advanced Science Institute, 2-1 Hirosawa Wako, Saitama 351-0198, Japan. E-mail addresses: yyoshiki@riken.jp; masato@prit.go.jp.

† Y.Y. and M.M. contributed equally to this work.

Abbreviations used: PD, Parkinson's disease; Exi-monomer, exifone-bound monomer; Exi-dimer, exifone-bound dimer; HSQC, heteronuclear single quantum coherence; NBT, nitroblue tetrazolium; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight; MS, mass spectrometry.

⁶Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences, 5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan

Received 3 April 2009;
received in revised form
26 September 2009;
accepted 27 October 2009
Available online
3 November 2009

Edited by S. Radford

Keywords: NMR; α -synuclein; dimer; dopamine; Parkinson's disease

Introduction

Parkinson's disease (PD) and other α -synucleinopathies are progressive neurodegenerative diseases characterized by the selective loss of dopaminergic neurons and deposition of filamentous Lewy bodies, of which α -synuclein is the major component. Formation of amyloid fibrils and/or intermediate oligomers of α -synuclein is a complex process, and small-molecular inhibitors have been used to investigate the pathways involved. Conway *et al.* reported that catechol-containing compounds, including dopamine, inhibited the formation of α -synuclein fibrils, causing the accumulation of α -synuclein protofibrils.¹ It was also reported that α -synuclein fibrillization was inhibited by dopamine analogues, and α -synuclein oligomers were stabilized by these compounds.² We have previously reported that several polyphenols inhibited α -synuclein assembly with IC₅₀ values in the low micromolar range, and that noncytotoxic, SDS-stable α -synuclein oligomers were formed in the presence of inhibitory compounds.³

Analyses of the interactions between small-molecular inhibitory compounds and α -synuclein have been reported by many groups, but the mechanisms involved remain controversial. It was proposed that amyloid fibril formation is inhibited by polyphenol compounds *via* noncovalent aromatic interactions with the amyloidogenic core.⁴ A recent report showed that chemical aggregates inhibited amyloid formation of the yeast and mouse prion proteins in a manner characteristic of colloidal inhibition, suggesting a nonspecific mechanism.⁵ Mutagenesis and competition studies with specific synthetic peptides suggested α -synuclein residues 125–129 (YEMPS) as an important region for dopamine-induced inhibition of α -synuclein fibrillization, and the inhibition was proposed to be due to conformational alterations of α -synuclein induced by noncovalent interaction with oxidized dopamine.⁶ Molecular dynamics simulations suggest that dopamine binds to the YEMPS region, and the bound dopamine is further stabilized by long-range electrostatic interactions with E83 in the NAC region.⁷ A recent NMR analysis indicated that a polyphenol compound, epigallocatechin gallate, noncovalently binds to the C-terminal region of

α -synuclein (D119, S129, E130, and D135).⁸ NMR analysis showed that A53T mutant α -synuclein, which is linked to autosomal dominant forms of PD, has a greater propensity to aggregate in the presence of dopamine, compared to wild-type α -synuclein.⁹ Meanwhile, NMR characterization of the interaction between α -synuclein and various small molecules indicated that residues 3–18 and 38–51 act as noncovalent binding sites for inhibitory compounds.¹⁰

Covalent attachment of inhibitors to α -synuclein, on the other hand, has been proposed by several groups. Conway *et al.* suggested that 5–10% of dopamine was covalently incorporated into α -synuclein by radical coupling (dopamine-derived orthoquinone to Tyr) and/or nucleophilic attack (e.g., Lys forming a Schiff base with the orthoquinone).¹ Mass spectrometry (MS) and NMR characterization suggested that the oxidation product (quinones) of a dopamine analogue was covalently linked to the amino groups of the α -synuclein chain, thereby generating α -synuclein–quinone adducts.² Thus, the binding mode and binding site(s) of small-molecular inhibitors remain controversial.

The conformation of inhibitor-induced α -synuclein oligomers is also a matter of debate. Norris *et al.* reported that spherical oligomers of dopamine-modified α -synuclein take a predominantly random-coil structure with some β -pleated sheets on the basis of CD and Fourier-transform infrared spectroscopy studies.⁶ Another group demonstrated that in the presence of small inhibitory molecules, α -synuclein is still dominated by random-coil character.¹⁰ Ehrnhoefer *et al.* proposed that epigallocatechin prevented the conversion of monomeric α -synuclein into toxic on-pathway aggregation intermediates and resulted in the formation of unstructured, nontoxic α -synuclein oligomers that they considered to be off-pathway.⁸ On the other hand, it has recently been reported that a flavonoid, baicalein, stabilized β -sheet-enriched oligomers based on CD and Fourier-transform infrared spectroscopy analysis.¹¹ The baicalein-stabilized oligomers were characterized as quite compact globular species based on small-angle X-ray scattering data and atomic force microscopy.

Masuda *et al.* isolated α -synuclein dimers formed in the presence of inhibitory compounds,³ and the isolated soluble dimers were recently characterized using a panel of epitope-specific α -synuclein antibodies.¹² The reactivities of the antibodies indicated that the conformations of polyphenol-bound α -synuclein dimers differ from those of unbound monomers, but resemble those of amyloid fibrils, suggesting that inhibitor-bound molecular species are on-pathway intermediates.

This situation prompted us to carry out a comprehensive analysis of inhibitor-treated α -synucleins by means of NMR spectroscopy in conjunction with other biochemical methods, such as peptide mapping, immunoblotting, and redox-cycling staining. We have previously analyzed the antibody binding and site-specific phosphorylation of α -synuclein using ultra-high-field NMR spectroscopy.¹³ For the structural characterization, we prepared and purified a ¹⁵N-labeled α -synuclein dimer in the presence of polyphenol inhibitors on a milligram scale and analyzed it by ultra-high-field NMR spectroscopy recorded at a proton observation frequency of 920 MHz.

Results and Discussion

Isolation and characterization of inhibitor-bound α -synuclein dimer and monomer

SDS-stable, noncytotoxic α -synuclein oligomers were detected in the soluble fraction in the presence of inhibitory compounds such as polyphenols.³ For detailed characterization of inhibitor-induced α -synuclein oligomers, we attempted to prepare

exifone-, gossypetin-, and dopamine-induced α -synuclein dimer and monomer (for inhibitor structures, see Fig. 1) and to separate them by gel-filtration chromatography as described.¹² Fig. 2a shows the HPLC patterns of control and exifone-treated α -synucleins. The HPLC fractions of exifone-treated α -synuclein were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting (Fig. 2b). The data indicate that the exifone-treated α -synuclein dimer (Exi-dimer) was successfully purified by gel-filtration chromatography. The homogeneity of inhibitor-induced monomer and dimer was also checked by diffusion NMR experiments (data not shown). α -Synuclein monomer and dimer treated with exifone, as well as control monomer (without inhibitor), were subjected to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) MS measurements (Fig. 2c). α -Synuclein monomer (control) showed a major signal at 14,460 Da, which matched the predicted mass (14,460 Da). On the other hand, exifone-treated monomer (Exi-monomer) gave a major signal at 14,524 Da, which corresponded to that of α -synuclein plus 64 Da. Exifone-bound α -synuclein (molecular mass of exifone, 278.2 Da) was not detected, presumably because exifone binding was noncovalent. The MS spectrum of Exi-dimer showed a broad peak at around 30 kDa and 15 kDa, and we could not obtain an accurate molecular mass. The peak at 15 kDa might be the doubly charged ion of the Exi-dimer and/or the monomer released from the Exi-dimer in the ionization process. To estimate the ratio of exifone bound to α -synuclein dimer and monomer, absorption of exifone at 385 nm was measured for Exi-dimer and Exi-monomer. The results indicate that Exi-dimer contains around 3 molecules of exifone per α -synuclein monomer, while Exi-monomer

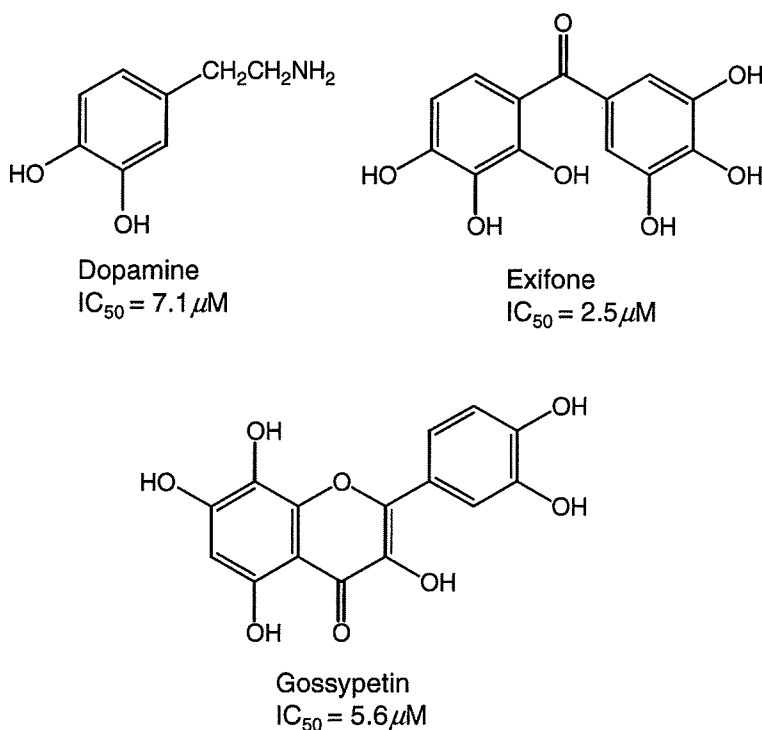


Fig. 1. Chemical structures of dopamine, exifone, and gossypetin with their IC₅₀ values for inhibition of α -synuclein filament assembly.³