

<シンポジウム (2)—11—4>アルツハイマー病の新展開—分子病態から治療戦略へ

アルツハイマー病とタウ蛋白

田中 稔久 丸山 大輔 武田 雅俊

(臨床神経 2012;52:1171-1173)

Key words : タウ蛋白, アルツハイマー病, リン酸化, 14-3-3蛋白, puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)

アルツハイマー病の神経病理学的所見の一つは神経原線維変化であり, その主要構成成分はタウ蛋白である. 神経原線維変化はアルツハイマー病以外にも前頭側頭型認知症, 進行性核上性麻痺, 皮質基底核変性症などの疾患にもみとめられ, さらにタウ遺伝子の変異によって生じる家族性前頭側頭型認知症 FTDP-17 (Fronto-Temporal Dementia and Parkinsonism, linked to chromosome 17) にもみとめられ, これらは総称してタウオパチーと呼ばれている. これらの神経変性疾患において, タウ蛋白は高度にリン酸化され, 自己重合をおこし, 細胞内に異常蓄積をしているが, そのメカニズムの詳細は不明である. そこで, われわれはタウ蛋白の重合過程と分解過程に関して検討をおこなった.

タウ蛋白の重合過程に関しては, 自己重合を誘導するための因子が重要となる. たとえば, heparan sulphate などの glycosaminoglycan や arachidonic acid などの物質はタウの重合を誘導するが, われわれはタウ重合誘導物質であり神経細胞内に豊富に存在する蛋白である 14-3-3 蛋白との関係について検討をおこなった¹⁾²⁾. 14-3-3 蛋白は scaffold 蛋白として知られ, ターゲットとなる結合蛋白がリン酸化されることによって親和性が変化することから, 各種キナーゼによりリン酸化したタウ蛋白を 14-3-3 蛋白によって pull down するアッセイにより検討したところ, PKA および PKB によりリン酸化されたタウ蛋白は結合量が亢進していた. そこで, タウ蛋白と 14-3-3 蛋白との結合親和性に関して BIACORE をもちいて解析したところ, 14-3-3 蛋白に対する野生型タウ蛋白の解離定数は $3.12 \pm 1.02 \times 10^{-7}$ であるの対し, PKA および PKB によってリン酸化されたタウ蛋白の解離定数は $2.74 \pm 0.13 \times 10^{-8}$ $2.24 \pm 0.57 \times 10^{-8}$ となり, 結合親和性は 10 倍以上亢進していた. そこで, タウの部分欠質蛋白を作成して解析したところ, 14-3-3 蛋白との結合部位は, タウ蛋白上に少なくとも 2 カ所あるものと推定され, 1 つは微小管結合部位であり, これはリン酸化の影響を受けていなかった. そして, もうひとつは Ser 214 部位であり, これはこの Ser 残基のリン酸化に依存していた. 14-3-3 蛋白によって誘導されるタウ蛋白の自己重合に関して thioflavin-S によるモニタリングをおこなったところ, 野生型タウ蛋白や glycogen synthase kinase-3 (Ser214 をリン酸化しない) によってリン酸化したタウ蛋白は重合亢進がみとめられたが, PKA および PKB によってリン酸化された

タウ蛋白は重合が完全に抑制されていた (Fig. 1). FTDP-17 に関連したタウ遺伝子変異に関しても同様に解析をおこなったところ, 14-3-3 蛋白に対する野生型タウ蛋白の解離定数は $3.12 \pm 1.02 \times 10^{-7}$ であるのに対し, delK280, P301L, V337M, R406W 変異タウ蛋白の解離定数はそれぞれ, $7.81 \pm 1.97 \times 10^{-8}$ M, $7.69 \pm 1.09 \times 10^{-8}$ M, $6.56 \pm 1.60 \times 10^{-8}$ M, $1.15 \pm 0.19 \times 10^{-7}$ M となり, 結合親和性は 3~4 倍増強していた. しかし, 野生型および変異型タウ蛋白を PKA によってリン酸化し, リン酸化状態にて解離定数を測定したところ, 解離乗数は $2.6 \sim 3.0 \times 10^{-8}$ M となり, すべてリン酸化によって同定度にまで結合親和性が亢進した. 同様に, *in vitro* の自己重合モニタリングをおこなったところ, P301L 変異タウ蛋白はもっとも重合傾向が強く, delK280, R406W 変異タウ蛋白も野生型タウ蛋白より重合傾向が強かった. しかし, これらの変異タウ蛋白を PKA によってリン酸化し, リン酸化状態にて自己重合実験をおこなったところ, 野生型および変異型タウ蛋白すべてにおいて重合は抑制された. よって, 14-3-3 蛋白によるタウ蛋白の線維形成には微小管結合部位との結合が重要であり, FTDP-17 変異によってその重合は加速されるが, Ser214 部位のリン酸化はしらべられたすべてのタウ蛋白に対して結合親和性を更新はさせると同時に, 重合を完全に抑制する働きを有することが判明した. よって, タウ蛋白重合を阻害する治療戦略としてはこの Ser214 部位のリン酸化を亢進させることが重要である可能性が示唆された.

タウ蛋白の分解過程に関しては, 培養 SH-SY5Y 細胞およびタウ遺伝子を導入した COS-7 細胞に対しさまざまなプロテアーゼ阻害剤を添加し, その分解過程を検討した³⁾. プロテアソーム (ユビキチン依存性分解酵素) に対する阻害剤 (MG132, Lactacystin) およびカテプシンに対する阻害剤 (CA-074Me), また PSA (puromycin-sensitive aminopeptidase) に対して阻害作用を有する puromycin を SH-SY5Y 細胞培養する培地に添加し, タウ蛋白をウェスタンブロットにて検討した. この結果, 野生型タウ蛋白を大量に強制発現させた COS-7 細胞において, puromycin 処理をした細胞のみにタウ蛋白発現レベルを増加させる傾向がみとめられた. 次にパルスチェイス法に基づき ³⁵S-Methionine によりラベルして, 細胞中のタウ蛋白を免疫沈降により回収し, 細胞中のタウ蛋白分解過程の検討では, 200nM の puromycin を添加した際にタ

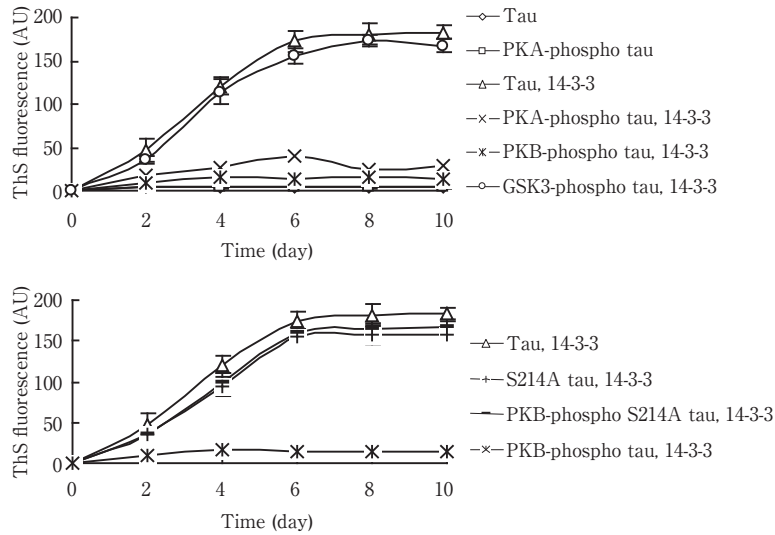


Fig. 1

ウ蛋白分解の有意な遅延がみとめられた。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、tau蛋白の発現レベルの増加がみとめられた。以上より、培養細胞上においてtau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2種類(V337M, R406W)のFTDP-17変異型tauと野生型tauとを強制発現させたCOS-7細胞においてパルスチェイス法をもちいてtau蛋白の分解過程を検討したところ、ラベルから48時間後に野生型tau蛋白と比較してFTDP-17変異型tau蛋白の有意な分解遅延がみとめられた。さらに、FTDP-17変異型tauのリン酸化レベルについて検討をおこなったところ、V337M変異型tauにおいてThr231のリン酸化が、R406W変異型tauにおいてSer396およびSer409のリン酸化が有意に亢進していた。tau蛋白が細胞内でどのように分解されるかに関しては多くの意見があり、統一されていない。この理由としては、いくつかの阻害経路(プロテソーム系、カルパイン系、オートファジー系)が独立しているのではなく、一方が阻害されると他方が活性化されるといった機序が存在し、そのため単に阻害剤を添加する実験経路では矛盾する結果が現れると考えられる⁴⁾。この点で、PSAは影響を与えるような分解経路が存在していないため有意な結果がえられたのではないかと考えられる。また、FTDP17に変異型tauの検討では、tau蛋白の分解が有意に遅延しており、かついくつかの部位にてtau蛋白のリン酸化の亢進がおこな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。

以上のように、tau蛋白の重合過程と分解過程をふくむ神経変性過程においては、リン酸化をふくむ蛋白修飾がきわめて重要であることが明らかとなった。これらの制御を検討することによって、病態を抑制する方法が開発されることが期待される。

※本論文に関連し、開示すべきCOI状態にある企業、組織、団体はいずれもありません。

文 献

- 1) Sadik G, Tanaka T, Kato K, et al. Phosphorylation of tau at Ser214 mediates its interaction with 14-3-3 protein: Implications for the mechanism of tau aggregation. *J Neurochem* 2009;108:33-43.
- 2) Sadik G, Tanaka T, Kato K, et al. Differential interaction and aggregation of 3-repeat and 4-repeat tau isoforms with 14-3-3zeta protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;383:37-41.
- 3) Yanagi K, Tanaka T, Kato K, et al. Involvement of puromycin-sensitive aminopeptidase in proteolysis of tau protein in cultured cells, and attenuated proteolysis of FTDP-17 mutant tau. *Psychogeriatrics* 2009;9:157-166.
- 4) Delobel P, Leroy O, Hamdane M, et al. Proteasome inhibition and Tau proteolysis: an unexpected regulation. *FEBS Lett* 2005;579:1-5.

Abstract**Alzheimer disease and tau protein**

Toshihisa Tanaka, Daisuke Mayuyama and Masatoshi Takeda
Department of Psychiatry, Osaka University Graduate School of Medicine

To elucidate involvement of tau protein in neurodegenerative processes in Alzheimer disease and related disorders, self-assembly process and degradative process of tau protein were examined. To understand the mechanisms of the aggregation, binding affinity of tau protein to 14-3-3 protein, which converts tau to a filamentous or aggregated form, was investigated employing a surface plasmon resonance assay. Phosphorylation of tau by protein kinase A increased affinity of tau to 14-3-3, whereas the phosphorylation attenuated formation of filaments or aggregates. FTDP-17 mutation increased affinity of unphosphorylated tau to 14-3-3, compared to wild typed unphosphorylated tau. However the phosphorylation increased its affinity further to the similar level of the affinity of phosphorylated wild typed tau. Similarly the phosphorylation also attenuated formation of filaments or aggregates from FTDP-17 mutated tau. To understand the mechanisms of the intracellular accumulation, possible involvement of proteases were studied. Among several proteases, puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA) was found as a predominant regulator of degradation of tau protein. In addition FTDP-17 mutation increased phosphorylation of tau protein in cells, and attenuated intracellular degradation of tau protein. These results suggest that self-assembly and accumulation of tau protein are regulated by phosphorylation, and FTDP-17 mutation affects those complexed processes.

(Clin Neurol 2012;52:1171-1173)

Key words: Tau protein, Alzheimer disease, Phosphorylation, 14-3-3 protein, Puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)
