

84. 神経変性疾患原因蛋白構造特異的阻害法開発

中村 和裕

Key words : アルツハイマー病, タウ, GFP

群馬大学 大学院医学系研究科
神経生理学

緒言

超高齢化社会の日本において認知症の克服は早急の課題である。代表的な神経変性疾患であるアルツハイマー病の患者数は多く、またアルツハイマー病の前段階としての軽度認知機能障害の患者数は更に多い。

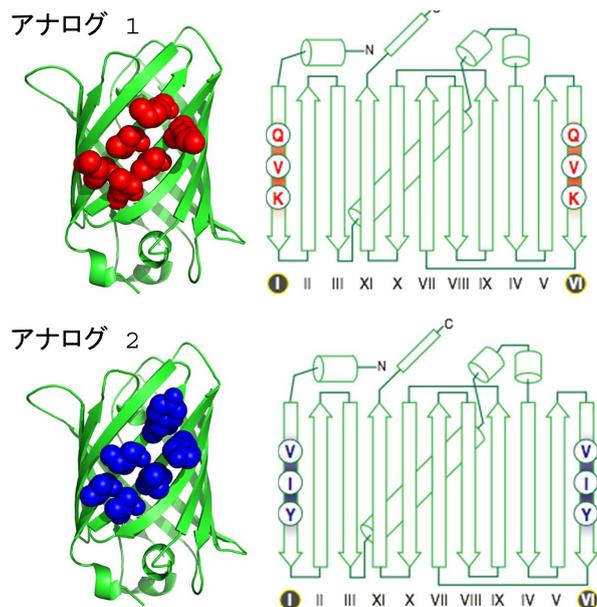
現在までのところアルツハイマー病に対する有効な治療法は確立されていない。アルツハイマー病の病因として細胞外のアミロイドベータと細胞内のタウ蛋白の病的な凝集があげられる。ヒト型のタウ蛋白を内嗅皮質特異的に発現するトランスジェニックマウスを使用した最近の研究からわかったことは、アルツハイマー病の異常タウはシナプスを介して脳内を伝播するということである^{1,2)}。つまり、異常タウを早期からブロックしないと、広範な異常タウ蓄積をきたす可能性があるかもしれない。治療戦略を考えた時に細胞外のアミロイドベータと細胞内に蓄積する異常タウを同時に抑えることが認知機能保持には必要であると思われる。アルツハイマー病の治療として、アミロイド前駆体蛋白やタウ蛋白に作用する酵素を標的とした研究が盛んに行われてきた³⁻⁵⁾。一方、近年アミロイドベータの凝集体の構造を標的とした研究が行われた。アミロイドベータやタウと同様にベータシート構造を取る GFP の中にアミロイドベータのアミノ酸配列中の凝集に重要な領域のアミノ酸を挿入した GFP アナログはアミロイドベータペプチドと相互作用し、アミロイドベータペプチドの凝集体形成を強く阻害することが報告されている⁶⁻⁸⁾。

本研究においては、アルツハイマー病の治療を念頭に置き、タウ蛋白の配列を挿入した変異 GFP 蛋白がタウに結合し、タウ蛋白の量を減少させることができるかどうか調べることを目的とした。

方法および結果

タウ蛋白は自己凝集を起こし、PHF (Paired Helical Filaments) と呼ばれる不溶性線維を形成する。PHF の形成には、タウの C 末端領域に存在する相同性の高い約 30 残基のアミノ酸配列が 3 回ないし 4 回繰り返された配列を有する微小管結合ドメインが凝集のコアとして関与していると考えられている。そしてフィラメント形成は、3 番目の繰り返し配列の微小管結合ドメインの N 末端 (306)VQIVYK(311) のベータシート構造における重合が引き金となり⁹⁾、また、他の論文による報告では (306)VQIVYK(311) の部分はタウの配列の中で最も高いベータ構造を取り得る可能性を有する領域であると推測されている¹⁰⁾。つまり、ベータシート構造を呈するタウ蛋白の (306)VQIVYK(311) がタウ蛋白の凝集にとって重要な配列となる可能性がある。

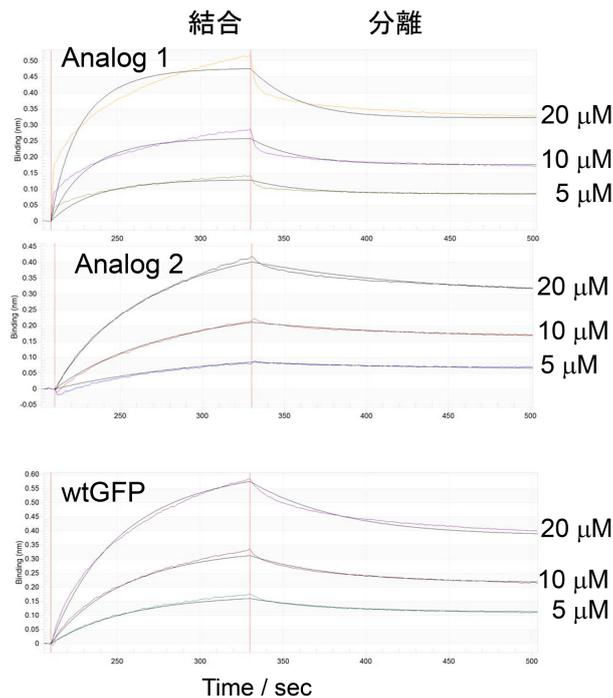
最初に (306)VQIVYK(311) を含むタウペプチド (306)VQIVYKPVDSLKVTSSK(321) を化学合成しヘパリンで凝集を誘導し凝集能を調べた。ペプチドは 100 μ g/ml で、ヘパリンは 10 unit/ml の濃度で添加し、90 分反応させた。凝集は ProteoStat[®] Protein aggregation assay kit (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY) を使用し、蛍光 600 nm の波長で測定した。ヘパリン非存在下では 111.5 でヘパリン存在下では 352.4 と約 3 倍の凝集を示した。この結果より、(306)VQIVYK(311) の領域は凝集能を持つことがわかったので、GFP の一部のアミノ酸をこの配列内のアミノ酸で置き換えた GFP アナログ 1 と 2 をデザインすることとした (図 1)。アナログ 1 では Q, V, K を、アナログ 2 では V, I, Y を用いて GFP の配列を図 1 のように変異させた。



	Strand 1	
野生型GFP	13	21
	PILVELDGD	
アナログ 1	PIQVVLKGD	
アナログ 2	PIVVILYGD	
	Strand 6	
野生型GFP	118	126
	TLVNRIELK	
アナログ 1	TLQNVIKLK	
アナログ 2	TLVNVIYLK	

図1. タウの配列を組み込んだ GFP アナログ.
構造模式図 (上), アミノ酸配列 (下)

次に GFP アナログ 1 と 2 がタウと相互作用することを確認するため、試験管内での実験を行った。まず、GFP アナログ 1 と 2 をそれぞれ、大腸菌を用いた蛋白質発現系により調製した。標的の Tau は、ペプチド Tau(306-321) を用いた。相互作用解析のため、N 末端に chloroacetyl 基を配置した。相互作用測定には、バイオレイヤー干渉法を測定原理とする Blitz システムを用いた。合成したペプチドをチオール基で修飾した基板に固定化し、GFP アナログ 1 および 2、野生型 GFP との相互作用を解析した (図 2)。GFP は 5, 10, and 20 μ M in 10 mM phosphate, 150 mM NaCl (pH 7.5), 0.005% Tween 20, 0.1% BSA の濃度とした。相互作用解析の結果、各解離定数 (Kd) の値は、5.9 μ M (GFP アナログ 1), 4.1 μ M (GFP アナログ 2), 12.5 μ M (野生型 GFP) となった。両アナログとも Kd 値は野生型 GFP より小さく、この結果から、GFP 中にタウ蛋白質のアミノ酸を挿入した変異蛋白はタウと相互作用することがわかった。



vs Tau(306-321)ペプチド

たんぱく	Kd
変異GFP1	5.9 μ M
変異GFP2	4.1 μ M
野生型GFP	12.5 μ M

図2. バイオレイヤー干渉法によるタウと GFP アナログの相互作用.
 バイオレイヤー干渉法データ (上), Kd 値 (下)

最後に, 上記 GFP アナログが細胞内でタウの量を減少させることができるか調べた. 293T 細胞に一過性にタウを強制発現させ, 同時に野生型 GFP または GFP アナログ 1 を強制発現させた細胞の蛋白を使って, タウ, GFP, アクチン抗体でウェスタンブロットを行った (図3). 野生型 GFP を導入した細胞では GFP を導入していない細胞に比べてわずかにタウ量が減少した. アナログ 2 の GFP を導入した細胞では GFP を導入していない細胞および野生型 GFP を導入した細胞に比べて劇的にタウ量が減少した.

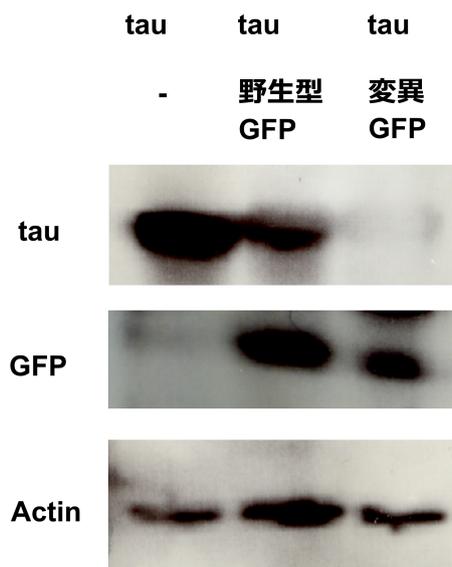


図3. GFP アナログによる細胞内タウ量の減少.

タウおよび野生型または変異 GFP を強制発現させた 293T 細胞の蛋白をタウ, GFP, アクチン抗体でウェスタンブロットした.

考 察

本研究に先駆けて共同研究者の高橋らはアルツハイマー病発症のもう一つの原因蛋白である, アミロイドベータを標的とした分子設計を行ってきている. アミロイドベータは, ベータシート構造を形成しながら自己集合化し, アミロイド線維と呼ばれる不溶性の凝集体を形成する. アミロイドベータのアミノ酸配列中の凝集に重要な領域のアミノ酸 (H14, K16, V18, F20, and E22 または Q15, L17, F19, A21, and D23) を挿入した GFP アナログを設計し, 設計した分子がアミロイドベータと結合し, 結合の結果としてアミロイドベータの凝集体形成過程を阻害することを明らかにしてきた. 本研究において同様の戦略をタウ蛋白に適用し, その変異 GFP がタウペプチドに結合し, 細胞においてタウ量を減少させたという結果は GFP アナログの汎用性を示すと思われる.

アルツハイマー病の発症とタウ蛋白質の過剰リン酸化は密接に関連している. 過剰リン酸化されたタウ蛋白が神経細胞に及ぼす有害な影響にはタウ蛋白が有する正常機能の喪失と有害機能の獲得の2種類が存在する. 正常機能の喪失として, 正常なタウ蛋白は細胞骨格の微小管に結合し, 微小管を安定化させるが, 過剰リン酸化されたタウ蛋白はその機能を発揮できない. また有害機能の獲得として過剰リン酸化されたタウ蛋白質は凝集しやすく, それにより神経細胞の性質変化を引き起こす. アルツハイマー病患者脳においてこのような病的な状態のタウ蛋白の蓄積が見られ, タウ蛋白総量が正常人脳に比べて多くなっている. 本研究において, タウ蛋白過剰発現細胞中のタウ蛋白総量が変異 GFP により減少した. 今後の課題として, アルツハイマー病モデルマウス脳において, タウ蛋白総量が変異 GFP により減少するか調べる予定である. また, アルツハイマー病に特異的な複数のリン酸化タウ抗体を用いて, 病的なタウ蛋白の量を減少させることができるかについても調べる予定である.

共同研究者

本研究の共同研究者は, 群馬大学大学院理工学府の高橋 剛である. 最後に, 本研究の遂行のため上原記念生命科学財団の助成を頂きましたことに厚く御礼申し上げます.

文 献

- 1) Liu, L., Drouet, V., Wu, J. W., Witter, M. P., Small, S. A., Clelland, C. & Duff, K. : Trans-synaptic spread of tau pathology *in vivo*. *PLoS One*, **7** : e31302, 2012.
- 2) de Calignon, A., Polydoro, M., Suárez-Calvet, M., William, C., Adamowicz, D. H., Kopeikina, K. J., Pitstick, R., Sahara, N., Ashe, K. H., Carlson, G. A., Spires-Jones, T. L. & Hyman, B. T. : Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron*, **73** : 685-697, 2012.
- 3) Morris, G. P., Clark, I. A. & Vissel, B. : Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.*, **2** : 135, 2014.
- 4) Gouras, G. K., Olsson, T. T. & Hansson, O. : β -Amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurother.*, **12** : 3-11, 2015.
- 5) Medina, M. & Avila, J. : Further understanding of tau phosphorylation: implications for therapy. *Expert Rev. Neurother.*, **15** : 115-122, 2015.
- 6) Takahashi, T. & Mihara, H. : Peptide and protein mimetics inhibiting amyloid beta-peptide aggregation. *Acc. Chem. Res.*, **41** : 1309-1318, 2008.
- 7) Takahashi, T., Ohta, K. & Mihara, H. : Rational design of amyloid beta peptide-binding proteins: pseudo-Abeta beta-sheet surface presented in green fluorescent protein binds tightly and preferentially to structured Abeta. *Proteins*, **78** : 336-347, 2010.
- 8) Murakoshi, Y., Takahashi, T. & Mihara, H. : Modification of a small β -barrel protein, to give pseudo-amyloid structures, inhibits amyloid β -peptide aggregation. *Chemistry*, **19** : 4525-4531, 2013.
- 9) Sugino, E., Nishiura, C., Minoura, K., In, Y., Sumida, M., Taniguchi, T., Tomoo, K. & Ishida, T. : Three-/four-repeat-dependent aggregation profile of tau microtubule-binding domain clarified by dynamic light scattering analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **385** : 236-240, 2009.
- 10) von Bergen, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. : Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97** : 5129-5134, 2000.