

Title	Involvement of puromycin-sensitive aminopeptidase in proteolysis of tau protein in cultured cells, and attenuated proteolysis of FTDP-17 mutant tau
Author(s)	柳, 健太郎
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49942">https://hdl.handle.net/11094/49942</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 【87】

氏名	柳 健太郎
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 22796 号
学位授与年月日	平成21年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学位論文名	Involvement of puromycin-sensitive aminopeptidase in proteolysis of tau protein in cultured cells, and attenuated proteolysis of FTDP-17 mutant tau (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と FTDP-17 変異によるタウ蛋白質分解過程の遅延に関する検討)
論文審査委員	(主査) 教授 武田 雅俊 (副査) 教授 佐古田三郎 教授 遠山 正彌

## 論文内容の要旨

## 〔目的〕

神経原線維変化はアルツハイマー病を含むタウオパチーの神経病理学的な特徴であり、タウ蛋白はその神経原線維変化の主要構成成分である。遺伝性認知症として知られる FTDP-17 (frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17) は、タウ蛋白をコードする遺伝子の変異がその原因であることも知られている。タウオパチーにおいてタウ蛋白は異常リン酸化、ユビキチン化しているが、そのタウ

蛋白の分解過程については不明な点が多い。そのため、今回の実験では培養細胞にて種々の蛋白分解酵素に対する阻害剤や *in vitro* においてタウ蛋白を分解する可能性を示唆されている puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA) に対して阻害作用を有する puromycin を用いて検討をおこなった。また、変異型タウ遺伝子を細胞に導入し、タウ蛋白の分解過程に関する検討を行った。

## 〔方法ならびに成績〕

まず *in vivo* においてタウ蛋白を分解すると既に報告されているプロテアソームおよびカテプシンに対する阻害剤、また PSA 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が変化は認められなかった。さらに野生型タウ蛋白 (最長型 tau441) 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。そこでパルスチェイス法を使用し [<sup>35</sup>S]methionine でラベルされた SH-SY5Y 細胞中のタウ蛋白を免疫沈降により回収し、その分解過程を詳細に調べたところ、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 (V337M;Valin337 の Methionine への変異、R406W; Arginine406 の Tryptophan) を用いて野生型タウとの分解過程の差異を、前述のパルスチェイス法を用いて検討した。2 種類の FTDP-17 変異型タウと野生型タウとを強制発現させた COS-7 細胞において [<sup>35</sup>S]methionine を用いてタウ蛋白をラベルしたところ、ラベルから 48 時間後に野生型 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、どちらも細胞質内に存在し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ェ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 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。

## 〔総括〕

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与することが示唆された。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。FTDP17 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、かついくつか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。

## 論文審査の結果の要旨

本研究では、神経変性疾患を引き起こす主要な原因の1つであるタウ蛋白についての検討がおこなわれ

た。最初にタウオパチーの1つであるFTDP-17に伴う変異型タウと野生型タウの分解を検討においては、FTDP-17変異型タウの分解が有為に遅延していることを明らかにした。更に、今までin vitroでしか示されていなかったpuromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)のタウ蛋白分解への関与を、新たに培養細胞上でも確認した。PSAはFTDP-17変異型タウと野生型タウの両方と細胞質内で共存しており十分に作用しあう可能性が示唆されたが、野生型と変異型と間の局在の差は認められなかった。しかし、変異型タウではいくつかの部位でリン酸化の亢進が確認され、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関与している可能性が示唆された。

本研究は神経変性疾患の原因となりうるタウ蛋白の代謝過程の解明に一定の貢献をしており、よって学位に値すると考える。