

# ストレスにより誘発される脳内微小管結合蛋白tauのリン酸化に関する神経薬理学的研究

著者	吉田 茂
著者別名	Yoshida, Shigeru
雑誌名	博士学位論文要旨 論文内容の要旨および論文審査結果の要旨 / 金沢大学大学院自然科学研究科
巻	平成19年9月
ページ	58-62
発行年	2007-09-01
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/26686">http://hdl.handle.net/2297/26686</a>

氏名	吉田 茂
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第848号
学位授与の日付	平成18年9月28日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	ストレスにより誘発される脳内微小管結合蛋白 tau のリン酸化に関する神経薬理学的研究
論文審査委員(主査)	山田 清文(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副主査)	米田 幸雄(自然科学研究科・教授), 宮本 謙一(医学部附属病院・教授), 谷浦 秀夫(自然科学研究科・助教授), 田熊 一徹(自然科学研究科・助教授)

## Summary

The abnormal hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in brain is attributable to a number of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. Recently, it has been suggested that tau phosphorylation caused by stress plays a role in early stages of Alzheimer's disease. In the present study, we investigated the effect of cold water stress (CWS) on tau phosphorylation in the hippocampus of mouse by immunoblot analyses using phosphorylation-dependent or -independent tau antibodies. Furthermore, the effects of LiCl, an inhibitor of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) used for treatment of affective disorders, on CWS-induced changes in tau phosphorylation were examined. Exposure to CWS in mice resulted in an increase in tau phosphorylation at Tau-1 (Ser199/202), AT8 (Ser202/Thr205) and Ser396 sites in the hippocampus. At Thr231 site, phosphorylation level did not change despite a significant increase in one of the separated band intensity. The CWS-induced changes in tau phosphorylation at Tau-1 (Ser199/202) and Ser396, but not at AT8 (Ser202/Thr205), were significantly attenuated by pretreatment with LiCl. Total tau protein levels, detected by phosphorylation-independent antibody TAU-5, showed a decided tendency to increase in the extracted samples from CWS-exposed mice, which was also restored by pretreatment with LiCl. Finally, we showed that CWS increased active form of GSK-3 $\beta$  that was phosphorylated at Tyr216. These results suggest that CWS-induced increase in phosphorylated tau levels in the hippocampus is mediated, at least partly, by the activation of GSK-3 $\beta$ .

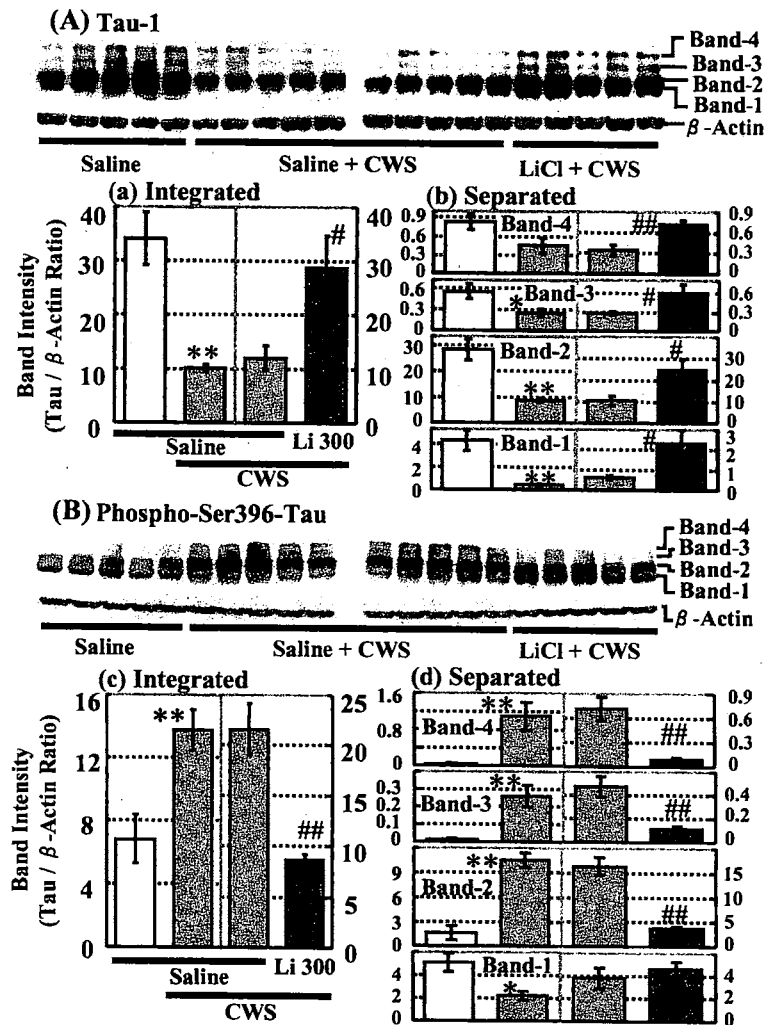
## 1. 序論

アルツハイマー病は、著明な記憶障害と人格変化を特徴とする進行性の神経変性疾患である。アルツハイマー病の主な病理学的特徴は、大脳皮質全体に沈着した老人斑、神経細胞内の神経原線維変化 (NFTs) に認められる過度にリン酸化された tau 蛋白の凝集および特定の神経細胞群の細胞死である。

一方、ストレス関連疾患であるうつ病はアルツハイマー病患者において高頻度で認められる合併症状である。いくつかの長期間にわたる疫学研究により、高齢者のうつ症状はアルツハイマー病発症のリスクファクターであることが示唆されている。ストレスとアルツハイマー病との関連を示唆する基礎研究として、絶食あるいは冷水中での水泳が、正常マウスの脳、特に海馬において、tau 蛋白のリン酸化を顕著に亢進することが報告されている。

GSK-3 $\beta$  は tau 蛋白に対する生理的なリン酸化酵素であり、tau 蛋白の過剰リン酸化およびアルツハイマー病の発症に GSK-3 $\beta$  が重要な役割を果たしていることが示唆されている。一方、Lithium および valproate が GSK-3 $\beta$  を阻害することが知られている。これら薬物は治療抵抗性うつ病や双極性感情障害の治療に用いられており、うつ病に対する治療効果が GSK-3 $\beta$  の阻害と関係している可能性が示唆されている。

以上の知見は、ストレス過剰状態によるうつ病症状、tau のリン酸化および GSK-3 $\beta$  の活性化とアルツハイマー病発症の危険性の増加の間に関連があることを示唆している。そこで本研究では、強制水泳ストレス (cold water stress: CWS) を負荷したマウスの海馬に惹起される tau 蛋白のリン酸化に対する GSK-3 $\beta$  阻害薬 LiCl の影響を、Western blot 法を用いた神経薬理学的手法により検討した。



**Fig. 1. Effects of LiCl on CWS-induced changes in anti-Tau-1 and anti-phospho-Ser396-tau immunoreactivities in the hippocampus.**

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. saline-treated non-stressed group (t-test). #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs. saline-treated CWS-exposed group (t-test).

## 2. 材料および方法

実験には 8~10 週齢の雄性 ICR 系マウスを用いた。CWS として、マウスを氷水 (0°C) に投入し、5 分間の強制水泳を負荷した。LiCl 投与 90 分後に、マウスに CWS を負荷し、LiCl 投与 2 時間後にマウスを断頭により屠殺し、海馬を摘出した。Western blot 解析には、Ser199/202 部位が脱リン酸化された tau 蛋白を認識する抗 Tau-1 抗体、Ser396、Ser202/Thr205 および Thr231 部位がリン酸化された tau 蛋白をそれぞれ

認識する抗リン酸化 Ser396-tau, AT8 および抗リン酸化 Thr231-tau 抗体、総 tau 蛋白量を検出する TAU-5 を用いた。さらに総 GSK-3 $\beta$  量、活性型および非活性型 GSK-3 $\beta$  をそれぞれ検出する抗 GSK-3 $\beta$  抗体、抗リン酸化 Tyr216-GSK-3 $\beta$  抗体および抗リン酸化 Ser9-GSK-3 $\beta$  抗体を用いた。

## 3. 結果および考察

対照群マウスの海馬サンプルでは、抗 Tau-1 抗体および抗リン酸化 Ser396-tau 抗体を用いた Western blot 解析により 4 本の tau 蛋白のバンドが検出された (Fig. 1)。CWS

負荷により、抗 Tau-1 抗体反応性の累積バンド強度は有意に減少し (Fig. 1a), 抗リン酸化 Ser369-tau 抗体反応性累積バンド強度は有意に増加した (Fig. 1c)。LiCl (300 mg/kg, i.p.) の前処置は CWS 負荷によるこれらの反応を抑制した。これらの結果は、CWS 負荷によって tau 蛋白の Ser199/202 および Ser396 部位のリン酸化が亢進したこと、このリン酸化反応に lithium 感受性リン酸化酵素が関与することを示している。AT8 を用いた解析では、CWS 負荷により累積バンド強度は顕著に増加し、LiCl 前処置は抑制傾向を示した。抗リン酸化 Thr231-tau 抗体を用いた解析では、累積バンド強度には CWS 負荷による顕著な影響は観察されなかったが、個々のバンドの解析では Band-2 のみ有意な増加を示し、この増加は LiCl の前処置により抑制された。一方、TAU-5 により検出された総 tau 蛋白量は、CWS 負荷により明らかな増加傾向を示し (Fig. 2a), Band-2 の有意な増加が確認され (Fig. 2b), LiCl は CWS 負荷による総 tau 蛋白量の変化を抑制した。CWS 負荷後の Band-2 の有意な変化は、今回の抗リン酸化 tau 抗体を用いた全ての Western blot 解析において共通した特徴であったことから、CWS を負荷されたマウスの海馬の抽出液中で Band-2 に相当する分子量の tau 蛋白が増加しており、この tau 蛋白量の増加と tau 蛋白のリン酸化量の増加の間に相互関係があることが示唆された。LiCl が抗 tau 抗体により検出された CWS による累積あるいは個別バンド

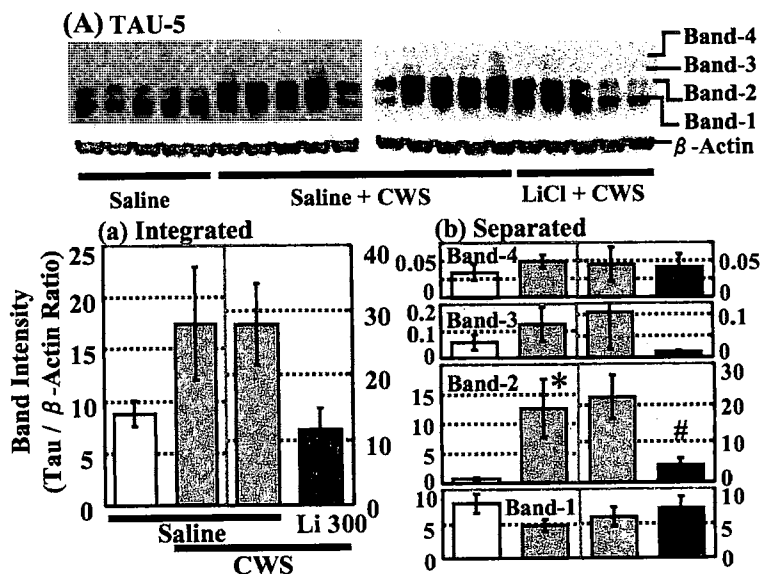


Fig. 2. Effect of LiCl on CWS-induced change in TAU-5 immunoreactivity in the hippocampus.

\*P < 0.05 vs. saline-treated non-stressed group (t-test). # P < 0.05 vs. saline-treated CWS-exposed group (t-test).

強度の変化を抑制したことから、CWSの tau 蛋白リン酸化に対する影響は、活性化した lithium 感受性リン酸化酵素の関与を、少なくとも部分的に、受けている可能性がある。

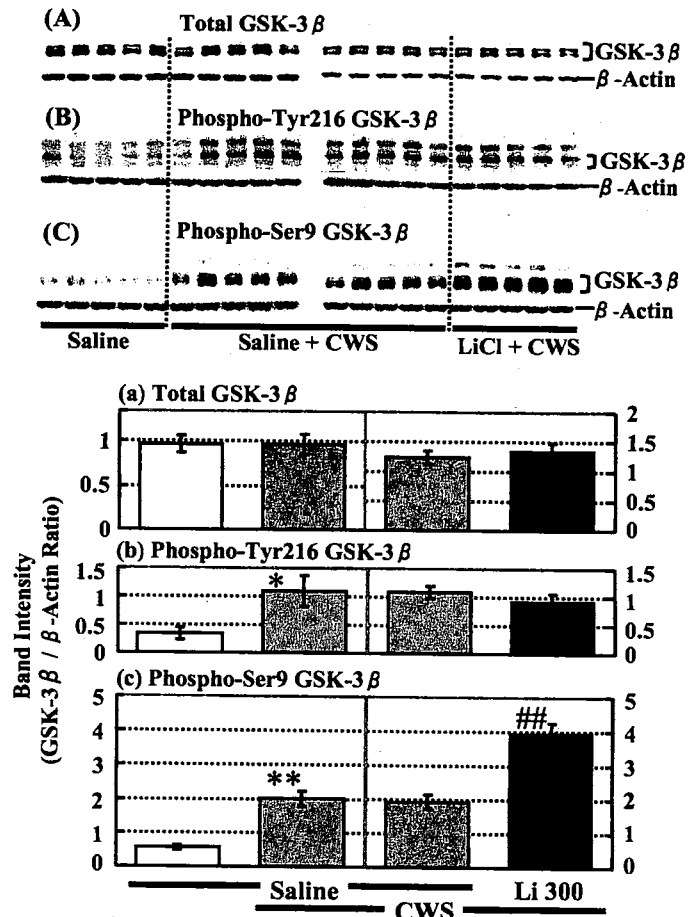
GSK-3 $\beta$  の Western blot 解析により、CWS の負荷による活性型および非活性型 GSK-3 $\beta$  の増加が認められた (Fig. 3). 活性型 GSK-3 $\beta$  の増加は、CWS 負荷後に見られる tau 蛋白のリン酸化レベルの変化が、少なくとも部分的に、活性化 GSK-3 $\beta$  を介しており、LiCl の前処置が tau 蛋白に対する活性化 GSK-3 $\beta$  の影響を抑制した可能性を示唆している。また、LiCl は CWS 負荷による非活性型 GSK-3 $\beta$  の増加に対して増強作用を示した。これは GSK-3 $\beta$  の活性化に対する lithium の阻害作用を反映した反応であると考えられる。

#### 4. 結論

ストレス負荷後の海馬の tau 蛋白リン酸化における変化は、ストレスとアルツハイマー病の間の関係を支持しているものと考えられる。今回の知見は、ストレス後の tau 蛋白の過剰リン酸化に GSK-3 $\beta$  が、少なくとも部分的に関与していることを示唆している。したがって、GSK-3 $\beta$  の阻害薬がうつ症状を有する高齢者あるいは軽度認知障害患者におけるアルツハイマー病発症の危険性を低下させることが期待される。

#### 5. 参考文献

Yoshida, S., Maeda, M., Kaku, S., Ikeya, H., Yamada, K., Nakaike, S., 2006. Lithium inhibits stress-induced changes in tau phosphorylation in the mouse hippocampus. *J. Neural Transm.* in press.



**Fig. 3. Changes in the phosphorylation levels in GSK-3 $\beta$  after CWS with or without LiCl pretreatment in the hippocampus.**

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. saline-treated non-stressed group (t-test). ##  $P < 0.01$  vs. saline-treated CWS-exposed group (t-test).

## 学位論文審査結果の要旨

アルツハイマー病 (AD) 患者脳の新経病理学的特長の一つである神経原線維変化は異常リン酸化 tau 蛋白により構成されており、ストレスおよび tau 蛋白リン酸化と AD 発症との関係が示唆されている。本研究では、強制水泳ストレスにより惹起されるマウス海馬における tau 蛋白のリン酸化および tau 蛋白をリン酸化する酵素の一つである glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) の変動、さらに lithium の作用を Western blot 法により解析し、ストレスによる tau 蛋白の過剰リン酸化における GSK-3 $\beta$  の関与について検討した。強制水泳ストレスによりマウス海馬においてリン酸化された tau 蛋白の顕著な増加が観察された。このリン酸化 tau 蛋白の増加は LiCl の前処置により抑制されたことから、lithium 感受性リン酸化酵素が関与する可能性が示唆された。一方、強制水泳ストレスにより活性型および非活性型 GSK-3 $\beta$  が共に増加し、LiCl の前処置により非活性型 GSK-3 $\beta$  はさらに増加した。以上の研究成績は、ストレスにより tau 蛋白の過剰リン酸化が惹起されること、この過剰リン酸化には少なくとも部分的に GSK-3 $\beta$  の活性化が関与していること、さらに高齢者のうつ症状を GSK-3 $\beta$  阻害剤を用いて治療することで AD の発症を抑制できる可能性を示した点で高く評価されるので、論文審査委員会は本論文が博士 (薬学) に値すると判断する。