OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	アルツハイマー病脳におけるタウ蛋白リン酸化部位の異なるリン酸化レベル
Author(s)	以倉, 康充
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40018
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	以倉康充（いくらやすみつ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 13032 号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	アルツハイマー病脳におけるタウ蛋白リン酸化部位の異なるリン酸化レベル
論文審査委員	（主査） 教授 武田 雅俊 （副査） 教授 杉田 義郎　教授 福田 淳

論文内容の要旨

【目的】

微小管付随蛋白であるタウはアルツハイマー病（AD）脳で高度にリン酸化され，不溶性のPHFを形成し神経原線維変化を構成している。タウにみられる修飾としてはリン酸化と糖化が知られているが，リン酸化されたタウは本来の機能である微小管への結合・安定化能を失うことが*in vitro*で確認されており，微小管構造の崩壊から神経細胞死に至るとの仮説のもとに，タウのリン酸化の機構を解明する試みがこれまで多数なされてきた。リン酸化自体は正常ではタウの機能を調節する機構であるが，AD脳のタウ（PHFタウ）は正常タウではみられないほど高度かつ不可逆的にリン酸化されている。これまでタウのリン酸化部位として21ヶ所が知られているが，それぞれの部位がどの程度リン酸化されているかについては明らかでない。

本研究では，タウのすべての部位が同程度にリン酸化されているのではなく，よりリン酸化の程度の高い部位が神経原線維変化の形成により重要であると考え，ADの病理過程との関係が示唆されているタウのリン酸化部位のうち，Ser^{199}/Ser^{202}，Thr^{231}，Ser^{262}/Ser^{356}，Ser^{396}/Ser^{404}の4ヶ所について，AD脳ホモジネートおよびその上清中のリン酸化タウ量をradioimmunodot－blot法により測定し，比較検討した。

【方法】

AD（n＝13），正常対照者（n＝10），AD以外の神経疾患者（n＝6）の死後脳より得られた側頭葉皮質上側頭回を対象とした。20%（w／v）ホモジネートを作成後，その一部は100,000×gで遠心し上清を集め，それぞれ総蛋白量1 μgをニトロセルロース膜上に滴下した後乾燥して蛋白を定着させ，ニトロセルロース膜を固層として免疫化学反応を行った。標準物質としてAD脳より精製した可溶性のリン酸化タウ（AD P－tau）あるいはリコンビナント3リピート型ヒトタウを用い，同様に固層化した。異なる部位におけるリン酸化タウ量を測定するために，リン酸化部位を特異的に認識するモノクローナル抗体であるTau－1（Ser^{199}/Ser^{202}を認識），M4，12E8，PHF－1（それぞれリン酸化されたThr^{231}，Ser^{262}/Ser^{356}，Ser^{396}/Ser^{404}を認識）により反応後，^{125}I抗マウスIg抗体により検出し放射活性を測定した。Tau－1は脱リン酸化されたエピトープを認識する抗体であるため，アルカリフォスファターゼによりニトロセルロース膜を脱リン酸化しその前後における測定値の差を異常リン酸化タウ量とした。

【成績】

灰白質ホモジネート中の異常リン酸化タウは，今回調べた全てのリン酸化部位において，AD群では正常者群に比

べはるかに高いリン酸化レベルを示していた。大部分の正常対照者の異常リン酸化タウ量は検出限界以下であった。AD以外の神経疾患群のうち，64歳のダウン症候群患者は高い異常リン酸化タウ量を示したが，ピック病，オリーブ橋小脳萎縮症（OPCA）などの変性疾患では低値であった。

AD脳ホモジネートでは，部位ごとのリン酸化タウ量は $Ser^{199}/Ser^{202} \geqq Ser^{262}/Ser^{356} > Ser^{396}/Ser^{404} > Thr^{231}$ の順に多かった。Ser^{199}/Ser^{202}（Tau－1部位）と Ser^{262}/Ser^{356}（12E8部位）の間にリン酸化タウ量の有意な差はなかった。一方 Tau－1部位と Thr^{231}（M4部位）の間（$P<0.01$），および Tau－1部位と Ser^{396}/Ser^{404}（PHF－1部位）との間（$P<0.005$）には有意差がみとめられた。

上清中においても，AD群は正常者群に比べ異常リン酸化タウは高い値を示していた。しかしながら，ホモジネートと異なり Ser^{199}/Ser^{202} は Thr^{231} を除き（$P<0.05$）他の部位との間に異常リン酸化タウ量に有意な差はなかった。脳ホモジネートの100,000×g上清には正常タウとPHF化されていない異常リン酸化タウが含まれている。PHFは不溶性であるため上清中に遊離しにくいことから，上清中の異常リン酸化タウはタウの異常リン酸化過程の初期状態を反映していると考えられる。

【総括】

1．AD脳のタウは正常対照群に比べ高度にリン酸化されていた。

2．AD脳ホモジネートでは，リン酸化タウ量は部位別にみると Ser^{199}/Ser^{202} は Ser^{262}/Ser^{356} よりやや高いか同程度であり，Ser^{396}/Ser^{404}，Thr^{231} よりも有意に高かった。

3．AD脳上清では，Ser^{199}/Ser^{202}，Ser^{262}/Ser^{356}，Ser^{396}/Ser^{404} の間にはリン酸化タウ量に有意な差はなく，Thr^{231} のみ有意に低かった。

4．AD脳の異常リン酸化タウでは各部位のリン酸化レベルは均一ではなく，Ser^{199}/Ser^{202} および Ser^{262}/Ser^{356} の部位が多くリン酸化されており，こうした部位が神経原線維変化の形成過程で重要な役割を果たす可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

アルツハイマー病脳にみられる神経原線維変化の微細構造である paired helical filaments（PHF）は，微小管付随蛋白タウが主な構成成分であり，正常タウと異なりPHFタウは過剰なリン酸化の修飾を受けている。リン酸化されたタウは微小管に対する結合能が低下し，蛋白分解酵素に抵抗性を示すため，PHFタウにみられる異常修飾の中でもリン酸化は特に注目されている。タウのリン酸化部位は21ヶ所が知られているが，個々の部位がどの程度リン酸化されているかについての報告はない。

本研究は，タウのリン酸化部位にはリン酸化の程度に量的な差が存在し，リン酸化量の多い部位はよりタウの機能障害に関与すると考え，部位ごとにリン酸化タウ量の定量を行ったものである。材料としてアルツハイマー病，正常対照者，アルツハイマー病以外の神経疾患者の死後脳を用い，リン酸化部位を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて，それぞれが認識する部位のリン酸化タウ量を定量した。その結果，1）アルツハイマー病脳のタウは正常対照群に比べ高度にリン酸化されており，また全タウ量も増加していること，2）アルツハイマー病脳ホモジネートでは，リン酸化タウ量は部位別にみると Ser^{199}/Ser^{202} は Ser^{262}/Ser^{356} よりやや高いか同程度であり，Ser^{396}/Ser^{404}，Thr^{231} よりも有意に高いこと，3）アルツハイマー病脳上清では，Ser^{199}/Ser^{202}，Ser^{262}/Ser^{356}，Ser^{396}/Ser^{404} の間にはリン酸化タウ量に有意な差はなく，Thr^{231} のみ有意に低いことを明らかにし，アルツハイマー病脳の異常リン酸化タウでは各部位のリン酸化レベルは均一ではなく，Ser^{199}/Ser^{202} および Ser^{262}/Ser^{356} の部位が多くリン酸化されており，こうした部位が神経原線維変化の形成過程で重要な役割を果たす可能性を示唆した。

本研究によって，アルツハイマー病脳のタウにおいては，各リン酸化部位のリン酸化状態は均一ではなく，特定の部位が他の部位に比べて有意にリン酸化されていることが明らかにされた。これまでの報告から，今回リン酸化量の多かった部位は微小管への結合性に強い影響を及ぼすことが示唆されており，リン酸化量の多い部位は少ない部位に比べタウの機能に重要な意義を持つことが予想される。よって本研究はアルツハイマー病脳における異常リン酸化タウの形成機構を知る上で重要な知見を提示するものであり，学位の授与に値すると思われる。