



Title	Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by protein kinase C δ : Implication on regulation of tau phosphorylation.
Author(s)	辻尾, 一郎
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41834
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	辻 尾 一 郎
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 2 9 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by protein kinase C δ : Implication on regulation of tau phosphorylation. (GSK-3 の PKC δ による不活性化について ; 細胞死とタウ蛋白リン酸化への影響)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 杉田 義郎 (副査) 教 授 武田 雅俊 教 授 吉峰 俊樹

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

アルツハイマー病の発症のメカニズムには不明な点が多いが、神経原線維変化の主要構成成分である異常リン酸化タウ蛋白の生成はその重要な部分の一つである。この異常リン酸化タウ蛋白は可溶性の状態でも微小管の重合を強力に阻害し、さらに不溶性の状態となって神経細胞内に蓄積し、正常な神経細胞の活動を阻害することは既に知られており、正常なタウ蛋白がどのようにして異常にリン酸化されるかを知ることは重要なことであると考えられる。このようにタウ蛋白をリン酸化するキナーゼの一つとして glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) があるが、これは細胞増殖因子などの細胞外からの刺激が与えられない時に活性化状態を示し、老化に伴って徐々に神経細胞が変性していくアルツハイマー病の場合このようなキナーゼの関与が考えやすい。細胞増殖因子のレセプターから GSK-3 に至る細胞内情報伝達系として phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) から phosphoinositide dependent kinase (PDK) へ、そして protein kinase B (PKB) へと続くカスケードが知られており、最終的には PKB の活性化による GSK-3 のリン酸化によって GSK-3 は抑制される。そこで、我々は PI3K 阻害剤である wortmannin を用いて間接的に GSK-3 を活性化させリン酸化タウ蛋白の変化をヒト神経芽細胞腫 SY5Y を用い検討した。そして、さらにアポトーシスを含む細胞死のメカニズムとの関係についても検討した。

【方法ならびに結果】

ヒト神経芽細胞腫 SY5Y を培養し、その培地に wortmannin (PI3K 阻害剤)、Z-DEVD-fmk (caspase 3 阻害剤)、GF109203X (protein kinase C (PKC) 阻害剤) を添加し各時間で採取した cell lysate の supernatant を Western blot や kinase assay に使用した。タウ蛋白、GSK-3、PKB のリン酸化レベルは抗リン酸化タウ認識抗体、抗脱リン酸化タウ認識抗体、抗リン酸化 GSK-3 認識抗体、抗リン酸化 PKB 抗体を用いた Western blot にて検討した。また、GSK-3 活性は特異な基質として phospho GS-2 peptide を用いて、PKC δ 活性は抗 PKC δ 抗体による免疫沈降後に基質として histon H1 を使用し測定した。結果としては、wortmannin を添加することにより、PKB 活性が抑制され GSK-3 活性が上昇しており、Tau-1、PHF-1、M4 各抗体認識部位ではタウのリン酸化の亢進が認められたが、その変化は一時的なものであった。それは PKB 抑制のためにアポトーシスが起り、結果として caspase 3 活性の上昇によって PKC δ の制御ドメインの切断が起り、この切断により活性化された PKC δ が GSK-3 をリン酸化するため GSK-3 活性が抑制され、タウのリン酸化レベルも低下した。また、

wortmannin と同時に caspase 3 阻害剤を添加すると PKC δ の断片化はおさえられ、GSK-3 活性は上昇したまま高いレベルを保ち、タウのリン酸化レベルも高いレベルを保った。また、wortmannin と同時に PKC 阻害剤を添加しても、GSK-3 活性は上昇したまま高いレベルを保った。

【総括】

SY 5 Y 神経芽細胞腫では PI 3 K から GSK-3 のシグナル経路が、タウのリン酸化を制御していることを示した。また、アポトーシスにおける PKC δ の断片化は GSK-3 活性を抑制しタウを脱リン酸化の方向へ誘導することを示した。この現象は caspase 3 の関与するアポトーシスのメカニズムでは、大量に異常リン酸化タウ蛋白の生成が認められるアルツハイマー病の病理を説明しにくいことを示唆しており、リン酸化タウの生成を伴う神経細胞変性過程は単純なアポトーシスだけではないことを示唆した。

論文審査の結果の要旨

本研究ではヒト神経芽細胞腫 SY 5 Y に PI 3 K 阻害剤である wortmannin を用いて間接的に GSK-3 を活性化させることによるタウ蛋白のリン酸化の変化と、それと同時に起こるアポトーシスとの関係を検討したものである。結果として、PI 3 K から GSK-3 に至る経路がタウ蛋白のリン酸化を制御にとって極めて重要であることと、アポトーシスという現象の中心に位置するカスパーゼ 3 の活性化はこの経路に関与していて、PKC δ の制御ドメインの切断を通じた活性化から GSK-3 活性が抑制すること、およびタウ蛋白の脱リン酸化が誘導されることを明らかにしている。この現象はカスパーゼ 3 の関与するアポトーシスのメカニズムでは、大量に異常リン酸化タウ蛋白の生成が認められるアルツハイマー病の病理を説明しにくいことを示唆し、この神経変性過程にカスパーゼの関与があるかどうかという論争のある中で意義のある報告をしているものと考えられる。本研究は将来の神経変性疾患に対する研究に対しても、貴重な方向付けをした報告であり、学位論文に値すると判断される。