

研究マインド支援グラント 報告書

平成27年度 研究マインド支援グラント(若手) 報告書

リン酸化タウレベルの増減と認知機能との関連性の解明

研究代表者 柳下 聡介(医学部 薬理学)

緒 言

タウは微小管結合タンパク質の一つであり、多くのリン酸化部位をもつ。記憶障害を呈するアルツハイマー病では、過剰なリン酸化を受けたタウが神経細胞内に凝集した神経原線維変化が見られる。これまでタウ過剰発現マウスが多く作製され、リン酸化タウの蓄積が認知機能障害を惹起することが示されてきた^{1,2)}。また、近年では、シナプスにもタウが存在し、グルタミン酸受容体の取り込み制御に関わっている可能性も示唆されている^{3,4)}。

長期的に見れば、認知症を予防もしくは治療する手だてを講じるためには、まずアルツハイマー病をはじめとする認知症の発症過程や進行過程を理解することが必要であろう。その中には、所謂「記憶・学習」において、タウがどのような役割を果たしているかを理解することも含まれる、と私は考えている。そこで本研究では、その点についてアプローチするべく、予備的な検討を行うこととした。

従来のタウ研究では、タウを過剰発現させたマウス、および欠損させたマウスが用いられ、多くの知見が得られてきた。上記で示した知見も、その一部である。しかし、一方で、多くのデータが世に溢れてくる中で、遺伝子操作に依る影響が皆無とは言えず、それぞれのモデルで、何処までが生理的に意味があるデータなのか、どの部分がartifactなのか、ということが問題になってきた。もし、遺伝子操作を伴わず、リン酸化タウのレベルを増加、ないしは減少させることが出来れば、従来の過剰発現モデルと欠損モデルとの間を繋ぐものであり、生理的意義のあるデータの抽出に貢献できるものと思われる。

そこで、私はこれまでに野生型マウスを用いて、内在性タウのリン酸化が変動する条件を探索してきた。その過程で、タウのリン酸化を亢進させる条件として間歇的低酸素負荷(Intermittent hypoxia treatment; IHT)を見出した⁵⁾。また、タウのリン酸化を減少させる条件も新たに見出した。ここでは、それらのモデルを用いた検討の一部を報告する。

材料と方法

1) 実験動物

C57BL/6Jマウス(オス、9週齢)を購入し、1週間後から

実験に使用した。動物の取り扱いに際しては、埼玉医科大学実験動物部門の定める規定を厳守した。

2) 間歇的低酸素負荷(Intermittent Hypoxia Treatment; IHT)

マウスに間歇的低酸素負荷(IHT)を施した⁵⁾。マウスをチャンバーに入れ、そこに窒素ガスを約16 L/minで1分間注入し、マウスケージ内の酸素濃度を5%まで低下させた。その後、酸素濃度21%の室内空気を約14 L/minで2分間注入し、マウスケージ内の酸素濃度を21%まで回復させた。この3分間の操作を1日8時間(9時~17時)、28日間行った。

3) Y字迷路

行動試験はY字迷路装置を用いた。三本のアームをそれぞれA、B、Cとし、三本のアームの延長線が交わる正三角形内にマウスを置き、10分間、迷路内を自由に探索させた。マウスが進入したアームを順に記録した。異なるアームに3回連続で進入した場合を「コレクト」、それ以外の場合を「エラー」とした。そして、評価は総進入回数及び交替行動(コレクトの数)を総進入回数-2で割って100をかけた値(交替行動率)を求めることによって行った。

4) 新奇物体探索試験

まず試験ケージ内に、同一の物体Aを2つ置き、自由にマウスに10分間探索させた。その後、ホームケージに戻し、5分間置いた。その後、試験ケージの方は、片方の物体を新たな物体Bと取り替えておき、マウスに5分間探索させた。このときのA、Bそれぞれの物体を探索する時間を T_A 、 T_B とし、 $(T_B - T_A) / (T_A + T_B)$ で定義されるIndexを算出した。

5) サンプルの調整

脳組織は、タンパク質分解酵素阻害剤を含むTris-buffered saline (TBS)中で破碎し、超遠心に供し、TBS-soluble画分(上清)を得た。ここに含まれるタウについて、一般的なWestern blotting法に依る解析を行った。

結 果

1) 長期IHTによるY-maze試験への影響

これまでに私は、28日間のIHTが、顕著なタウのリン酸化亢進を引き起こすことを見出している。本研究では、これがY-maze試験の遂行に与える影響を調べた。マウスを対照群

及びIHT群に分け、処置前及び処置後にY-maze試験を実施した。

総進入回数は、IHT群においてやや高い傾向が認められたものの、特に有意な差は検出されなかった (Fig.1 A)。また、交替行動率にも差は認められなかった (Fig.1 B)。よって、長期IHTによって引き起こされるリン酸化タウの増加は、作業記憶には大きな影響を与えないと考えられた。

2) リン酸化タウが減少する条件の発見

すでに、IHTが内在性のタウのリン酸化を亢進させることを確認している。このモデルに対して、タウのリン酸化が減少するモデルがあれば、タウの生理機能解明を進める

ことが出来る。そこで私は、タウのリン酸化が下がる条件を探索した。その結果、ある処置 (特許申請等を鑑みて、以下、処置Aと略する) に着目した。処置Aを行うと、タウの総量自体には影響がないが、AT8という抗体で標識されるリン酸化タウは、顕著に減少することが分かった (Fig.2)。今後、IHT群と比較を進めていきたい。

3) タウのリン酸化減少が、新奇物体探索試験に与える影響

処置Aを行ってリン酸化タウが減少したマウスの認知機能を評価する目的で、新奇物体探索試験を実施した。これは、マウスが新しい物体を好んで探索する傾向を利用した試験である。その結果、処置Aの有無にかかわらず、新奇物体を見分ける能力には差がないことが分かった。

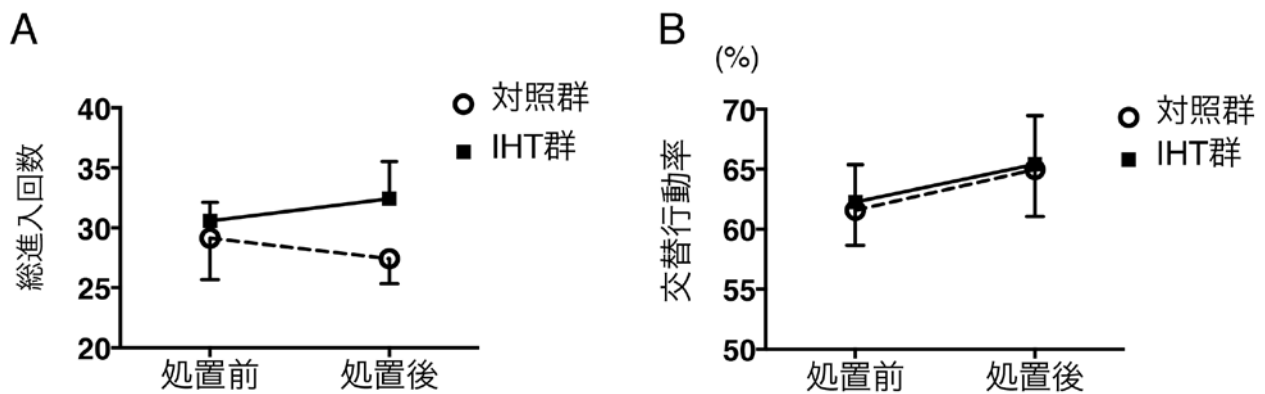


Fig. 1. IHT28日間がY-maze試験の結果に与える影響 (A) 総進入回数の結果を示す。対照群は、平均 - SEM (n = 7)、IHT群は平均 + SEM (n = 7) を示す。(B) 交替行動率の結果を示す。対照群は、平均 - SEM (n = 7)、IHT群は平均 + SEM (n = 7) を示す。

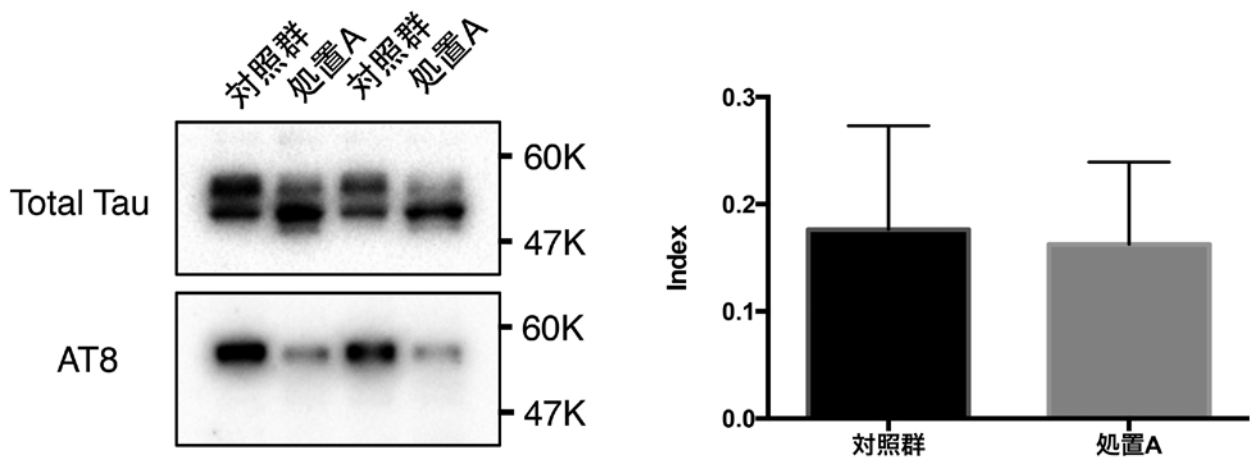


Fig. 2. 処置Aがタウのリン酸化に与える影響 対照群および処置Aを施されたマウスの脳組織からTBS可溶性画分を調整し、総タウ及びAT8陽性のリン酸化タウを検出した。

Fig. 3. 処置Aが新奇物体探索試験に与える影響 新奇物体を探索する程度を評価するIndexを示す。

考 察

本研究内では、まずタウのリン酸化が亢進した状態でのY-mazeの評価を行ったが、有意な差は認められなかった。IHTという実験系は睡眠時無呼吸症候群のモデルであり、認知機能障害が認められることが報告されている。別の種類の記憶には影響がある可能性、またはIHTを施す期間を長くすることで影響がある可能性が考えられるため、今後の検討課題としたい。一方で、顕著な認知機能低下を示さないことから、比較的、認知症初期のモデルであるとの解釈も成り立つ。

また、内在性タウのリン酸化が減少する処置を発見した。特許申請等の関係上、詳細は割愛するが、IHTと同様、比較的生理的な処置であり、タウの生理機能解明に踏み込める新たなモデルであると考えている。新奇物体探索試験では、特に差はなかったが、今後、別の種類の記憶に対する影響や、認知症モデルに対する処置Aが及ぼす影響等を検討していきたい。

謝 辞

薬理学教室、動物施設、中央機器施設関係者各位と助成をしていただいた埼玉医科大学に感謝します。また、行動試験のビデオ解析を一手に担ってくれた小林滯さんには、特に謝意を表します。

参考文献

- 1) Roberson ED, et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 2007; 316: 750-4.
- 2) Kimura T, et al. Hyperphosphorylated tau in parahippocampal cortex impairs place learning in aged mice expressing wild-type human tau. *EMBO J* 2007; 26: 5143-52.
- 3) Kimura T, et al. Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B* 2014; 369: 20130144.
- 4) Yagishita S, et al. Glycogen Synthase Kinase 3beta-mediated Phosphorylation in the Most C-terminal Region of Protein Interacting with C Kinase 1 (PICK1) Regulates the Binding of PICK1 to Glutamate Receptor Subunit GluA2. *J Biol Chem* 2015; 290: 29438-48.
- 5) 鈴木正彦, 平成 26 年, 神経変性疾患モデルマウスを用いた新規行動解析法の構築と認知機能改善薬の探索, 埼玉医科大学雑誌, 第 41 巻, 第 1 号 2014; 66-70