

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790841
 研究課題名 (和文) SSRI により活性化される AKT によりリン酸化される転写因子の同定とクローニング
 研究課題名 (英文) The identification and cloning for trans factor phosphorylated by AKT kinase activated after treatment with SSRI .

研究代表者
 御園生 篤志 (MISONOO ATUSHI)
 聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
 研究者番号：20410128

研究成果の概要：PC12 細胞に Fluvoxamine (FLV) 投与後、AKT-Ser473, Thr308 のリン酸化が亢進していた。また BDNF を PC12 細胞に投与後、同様に AKT のリン酸化が起こり、PI-3 kinase の活性化を抑制する LY294002 にて、BDNF による AKT のリン酸化が抑制された。また同様に LY294002 にて、フルボキサミンによる AKT のリン酸化が抑制されたことから、フルボキサミンによる AKT のリン酸化は BDNF を介して起っていると考えられた。FLV, Milnacipran (MIL) を 3 週間投与後の大脳皮質において、Akt-Ser473 のリン酸化、AKT-Thr308 のリン酸化が亢進していると考えられた。FLV、MIL を 3 週間投与後、大脳皮質の核内での AKT リン酸化の増加とリン酸化された AKT の核への移行を認められた。核内に移行した AKT は転写因子をリン酸化し、転写因子とコファクターの結合を調節し、転写を制御していることが考えられた。

抗うつ薬作用が 2 週間以上かかることの仮説として、抗うつ薬がリン酸化を介して AKT を活性化し、転写を調節し RNA の合成を制御し、さらに RNA が DNA に作用するカスケードを介することで蛋白質の発現を最終的に調節している可能性を示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：AKT, SSRI, リン酸化

1. 研究開始当初の背景

抗うつ薬の代表として使用されている SSRI(Selective Serotonin Reuptake

Inhibitors)などの作用機序は、セロトニンの再取り込み阻害作用の単純な作用では説明できない。そこで新たな作用機序の解明のた

め細胞内情報伝達において重要な役割をしているセリン-スレオニンリン酸化酵素である AKT に注目して研究を行った。

2. 研究の目的

AKT は bHLH 転写因子を活性化しノルアドレナリンの分泌を調節していることが報告されている。抗うつ薬作用が2週間以上かかることの仮説として、抗うつ薬がリン酸化を介して AKT を活性化し、転写を調節し RNA の合成を制御し、さらに RNA が DNA に作用するカスケードを介することで蛋白質の発現を最終的に調節している可能性が考えられる。そこで本研究では抗うつ薬による AKT のリン酸化の機構をより詳細に生体内で検討することを目的とした。

3. 研究の方法

PC12 細胞に Fluvoxamine (FLV) 100 μ M, 40 min を処置後、各サンプルを用いイムノブロットを施行した。BDNF (50 ng/ml, 5 min) も同様に PC12 細胞に処置し、さらに PI 3-K inhibitor である LY294002 (50 μ M, 30 min) を同時に処置し、イムノブロットを施行した。

Wistar 系雄性ラット(150-300g)に FLV, Milnacipran (MIL) を各 5 mg/k g、3 週間皮下投与した。大脳皮質をホモジネートし、遠心分離により細胞質成分を分離した。さらに DEAE クロマトグラフィー施行後の各サンプルを用いイムノブロットの実験を施行した。また大脳皮質切片を作成し avidin-biotin complex method を用い免疫染色を施行した。なお、実験動物に関しては、聖マリアンナ医科大学動物実験委員会の指針に基づき、倫理的配慮をふまえた上で実験を行った。

4. 研究成果

(1) PC12 細胞に 100 μ M, FLV 40 min を処置後、Ser473-phosphorylated AKT-1 抗体を用いたイムノブロットの結果が 3.8 倍増加していた(図 1)。しかし AKT-1 のタンパク量の

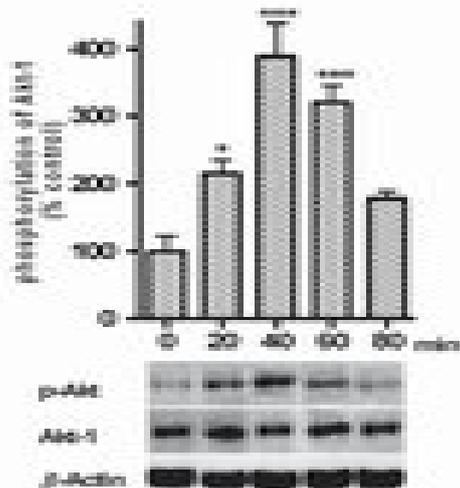
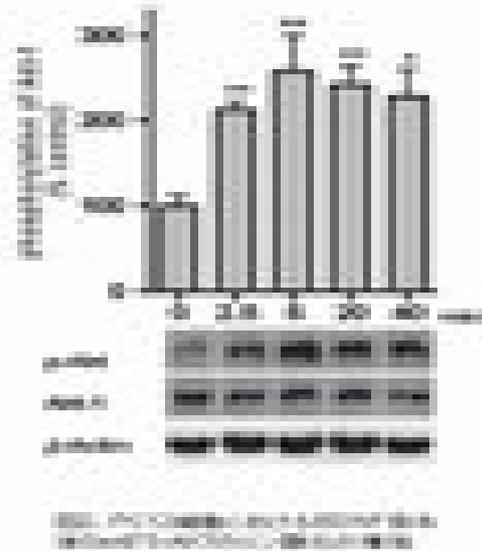


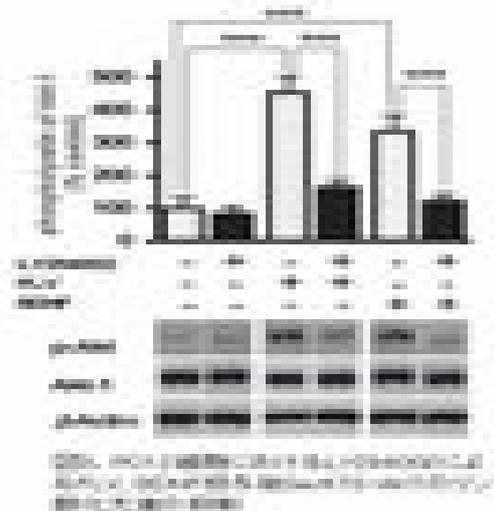
図1. PC12細胞に100 μ M FLVを40分間投与後、Ser473-AKT1のリン酸化の増加

変化は認められなかった。また β -Actin のタンパク量の変化は認められなかった。従って、FLV により Ser473- AKT-1 のリン酸化が亢進していることが示された。

(2) PC12 細胞に 50 ng/ml BDNF 5 min を処置後、Ser⁴⁷³-phosphorylated AKT-1 抗体を用いたイムノブロットの結果が 2.6 倍増加していた(図 2)。しかし AKT-1、 β -Actin のタンパク量の変化は認められなかった。従って、BDNF により Ser⁴⁷³- AKT-1 がリン酸化が亢進していることが示された。

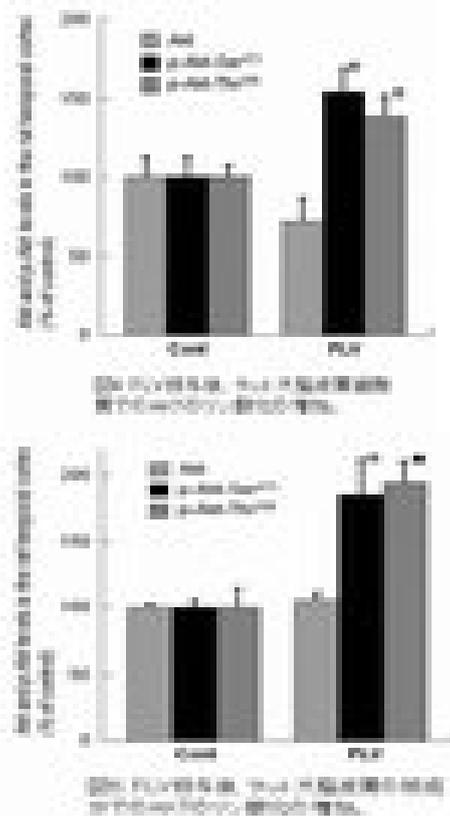


(3) PC12 細胞に PI 3-K inhibitor である 50 M LY294002 を 30 min 前処置後、100 μ M, FLV、50 ng/ml BDNF を投与した。50 M LY294002 前処置後、FLV、BDNF により増加していた Ser⁴⁷³- AKT-1 のリン酸化は有意に抑制された(図 3)。



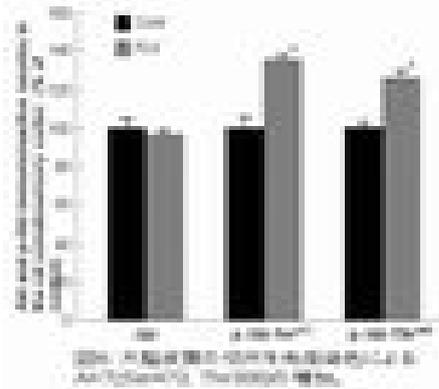
従って、FLV、BDNFによるSer⁴⁷³-AKT-1がリン酸化が亢進はPI 3-Kを介していることが証明された。SSRIであるFLVがBDNFと同様の機序で受容体型 tyrosine kinaseを活性化し、PI-3キナーゼを活性化し、さらにAKTも活性化し、Ser⁴⁷³-AKT-1のリン酸化を起こしていることが海外を含めて初めて証明された。

(4) FLVを3週間投与後の大脳皮質において、AKT抗体を用いてのイムノプロットの結果は、Aktは細胞質成分では、22%の減少を認め(図4)、核蛋白においては、130%の増加を認めた。FLV投与後、リン酸化AKT-Thrの変化は細胞質成分では、180%の増加を認め(図4)、核蛋白においても、111%の増加を認めた(図5)。リン酸化AKT-Serの変化は細胞質成分では、145%の増加を認め、核蛋白においても、173%の増加を認めた(図4.5)。



(5) Phospho-AKT (Ser473)、phospho-AKT (Thr308)抗体を用いて大脳皮質の切片を免疫染色した結果は、FLVを3週間投与後、リン酸化AKT-Thrはそれぞれ25%の増加を認めた(図6)。同様にリン酸化AKT-SerはFLV投与後、それぞれ17%の増加を認めた(図6)。さらに強拡大では、ラット大脳皮質内にて、抗うつ薬投与後の核内でのAKTリン酸化の増加とリン酸化されたAKTの核への移行を

認められた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① A. Misonoo, et al. Chronic treatment with fluvoxamine stimulates phosphorylation of Ser473 and Thr308 of AKT in the rat cerebral cortex. 聖マリアンナ医科大学大学雑誌, 36, 207-214, 2008、査読有
- ② 長田 賢一他、向精神薬の脳内濃度の調節するP糖蛋白質について、精神科、12、434-439、2008、査読無、(14人中6番)
- ③ 長田 賢一他、P糖蛋白質 - 向精神薬の脳内濃度の調節について、分子精神医学、8、83-85、2008、査読無、(6人中3番)

[学会発表] (計7件)

- ① K. Osada, et al. Antidepressants induces phosphorylation of Akt in PC12. 38rd Annual Meeting of Neuroscience, 2008.11.17, Washington, D. C.
- ② Y. Ogawa, et al. Fluorescence-based high-throughput method for Milnacipran in vivo cells, 38rd Annual Meeting of Neuroscience, 2008.11.16, Washington, D. C.
- ③ T. Haga, et al. Neurotransmitter (serotonin, dopamine, noradrenaline) were labeled NBD-F and detected fluorescence in vivo, 38rd Annual Meeting of Neuroscience, 2008.11.18, Washington, D. C.
- ④ S. Kanai et al. The long-lasting sensitization to footshock after chronic stress on the acoustic startle reflex. 39th European Brain and Behaviour Society, 2007,9, Trieste,
- ⑤ K. OSADA et al. Chronic trifluoperazine treatment increased P-glycoprotein in the rat brain. Neuroscience 2007 meeting, 2007,11,5,

San Diego,

- ⑥ K. NAKANO et al. Fluvoxamine induces phosphorylation of Akt in PC12, Neuroscience 2007 meeting, 2007,11,8, **San Diego**,
- ⑦ 長田賢一 他, Trifluoperazine のラット慢性投与後の脳内P糖蛋白質への影響, 第 26 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会, 2007,5,16, 広島、
〔図書〕(計 1 件)
- ① 西岡久寿樹編、繊維筋痛症ハンドブック、日本医事新報社、2007、総 220 頁、精神科医からみた薬物療法、121-129,

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
御園生 篤志 (MISONOO ATUSHI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号：20410128
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし