

平成24年2月

# 寺岡麻梨 学位論文審査要旨

主 査 中 島 健 二  
副主査 林 一 彦  
同 松 浦 達 也

## 主論文

Cytoprotective effect of chlorogenic acid against  $\alpha$ -synuclein-related toxicity in catecholaminergic PC12 cells

(カテコールアミン産生性PC12細胞における $\alpha$ -シヌクレイン毒性に対するクロロゲン酸の保護効果)

(著者：寺岡麻梨、中曾一裕、楠本智章、片野諭、田島奈緒子、山下敦、岡子哲平、伊藤悟、松浦達也)

平成24年 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 掲載予定

# 学位論文要旨

Cytoprotective effect of chlorogenic acid against  $\alpha$ -synuclein-related toxicity in catecholaminergic PC12 cells

(カテコールアミン産生性PC12細胞における $\alpha$ -シヌクレイン毒性に対するクロロゲン酸の保護効果)

$\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$ -syn) はパーキンソン病 (PD) 患者の神経細胞に出現するLewy小体の主要構成成分であり、ドーパミン (DA) 神経の選択的細胞死にも関与すると考えられている。DAなどのカテコールアミン (CA) 存在下において $\alpha$ -synは細胞毒性を示し、 $\alpha$ -synを過剰発現させたCA産生性PC12細胞は、種々の刺激に対して脆弱であることが報告されている。また、 $\alpha$ -synは可溶性オリゴマーとなった場合に毒性を示し、この重合開始には $\alpha$ -synにおける種々の翻訳後修飾が関与していると言われている。CA存在下においてのみ $\alpha$ -synが毒性を示す機序として、DAの酸化産物であるドーパミンキノン (DAQ) が $\alpha$ -synに何らかの修飾を与える可能性が示唆されているが、詳細は明らかとなっていない。近年、コーヒーに含まれるクロロゲン酸 (CGA) の抗酸化効果、疾患予防効果が注目されており、コーヒー多飲者はPD発症率が低いという疫学研究結果もある。本研究では、DA酸化により生じるDAQ生成をCGAが抑制し、結果的にCA存在下における $\alpha$ -synの毒性を軽減するという仮説をたて、 $\alpha$ -syn発現PDモデル細胞におけるCGAの細胞保護効果およびその詳細な機序について検討した。

## 方法

DA/DOPA酸化物の生成量を吸光度測定によって求めた後、試験管内で $\alpha$ -synはDA/DOPA酸化物の存在下で重合することをSDS-PAGE/銀染色により確認した。CA酸化物が $\alpha$ -synに何らかの修飾を行うことを想定し、これが直接結合によるものであるか確認するため、 $^3\text{H}$ -DAを用いて $\alpha$ -syn/DA (DAQ) 結合量を測定した。キノン特異的に結合する性質を持つPBAを用いた親和性アッセイにより、DAはDAQを形成して $\alpha$ -synに結合することを確認した。これらの反応にCGAが与える影響を確認した後、 $\alpha$ -synを過剰発現したCA産生性PC12細胞に対するCGAの細胞保護効果をMTT法により検討した。

## 結果

(1)  $\alpha$ -syn毒性のCA依存性： $\alpha$ -syn発現増加に伴いCA産生性PC12細胞の細胞生存率は低

下した。 $\alpha$ -syn過剰発現下におけるaMT（チロシン水酸化酵素の特異的阻害剤）の添加により細胞生存率が有意に改善したことから、 $\alpha$ -syn毒性はCA代謝依存的であることが示唆された。

(2)  $\alpha$ -syn重合におけるDA/DOPA酸化物の関与：試験管内で $\alpha$ -synにDA/DOPAを添加し、CAが酸化する条件で反応させたところ、 $\alpha$ -synの重合化が生じ可溶性オリゴマーの形成が認められた。システイン及びCGA添加によりDA/DOPA酸化物の生成量は減少し、DA/DOPA存在下での $\alpha$ -synの重合が抑制された。

(3) CAキノンの $\alpha$ -synへの結合：PBAを用いた親和性アッセイにおいて、DA存在下では $\alpha$ -synとPBAの結合が確認されたがDA非存在下ではこれが認められなかったことから、DAがキノン体（DAQ）を形成し $\alpha$ -synおよびPBAに結合していることが示唆された。同様の手法により、細胞抽出液においてもCAがキノン体として $\alpha$ -synに結合していることが観察された。また、システインがDA/DOPAの $\alpha$ -synへの結合を抑制したことから、CAが $\alpha$ -synに結合するためにはキノン体への変化が必要であることが示唆された。DAはアルカリ条件下でDAQに酸化されるが、 $\alpha$ -syn/ $^3$ H-DA（DAQ）結合はpH依存的に増加した。

(4) CGAの $\alpha$ -syn/ $^3$ H-DA（DAQ）結合に対する影響： $\alpha$ -syn/ $^3$ H-DA（DAQ）結合はpH依存的に増加したが、CGA添加により有意に抑制された。

(5) CGAのPDモデル細胞に対する保護効果： $\alpha$ -synの過剰発現下でも、CGA添加により細胞生存率は有意に改善した。

## 考 察

本研究において、 $\alpha$ -synへのCA酸化物の結合が $\alpha$ -synの重合化を惹起し、形成された可溶性オリゴマーが細胞毒性を示すことが示唆された。さらに、システインやPBAを用いた実験結果より、CA酸化物はキノン体を形成して $\alpha$ -synに結合していることが推察された。コーヒーポリフェノールCGAは $\alpha$ -synを過剰発現したCA産生性PC12細胞に対して細胞保護効果を有することが確認された。これは、CGAがCA酸化によるDAQ生成を抑制し、DAQ結合による $\alpha$ -synの重合を抑制するためであると考えられた。これらの結果は、コーヒー多飲者にはPD発症が少ないとする疫学研究結果を裏付けるものであり、CGAの摂取はPD発症予防効果を有することが期待され、新たな創薬の可能性を示唆するものと考えられた。

## 結 論

本研究において、CGAはCA産生細胞における $\alpha$ -syn毒性に対して保護効果を有することが示された。