

氏名	よしもと ゆうこ 吉本祐子
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第503号
学位授与年月日	平成17年 3月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	L-dopa and dopamine enhance the formation of aggregates under proteasome inhibition in PC12 cells (L-ドーパ、ドーパミンはPC12細胞においてプロテアソーム阻害による凝集体形成を促進する)
学位論文審査委員	(主査) 井上貴央 (副査) 山田一夫 中島健二

学位論文の内容の要旨

中脳黒質のドーパミン(DA)ニューロンにおけるレビー小体(LB)形成は、パーキンソン病(PD)患者の脳における最も特徴的な病理学的所見であり、PDの病態と関連があると考えられている。家族性パーキンソン病の原因遺伝子産物である α -シヌクレイン(α syn)やパーキンはLBの構成成分であり、神経変性疾患におけるLBなどの細胞内凝集体はその病態と関連があることが示唆される。一方、ユビキチン(Ub)は α synと同様、LBの主要な構成成分であり、LB形成にUb-プロテアソーム系が重要な役割を担っていることを示唆している。PD脳においてLBは主にDAニューロンに観察され、神経細胞様に分化させたPC12細胞においては、過剰なDA添加によってプロテアソーム活性の低下を引き起こすことが報告されている。本研究では、L-ドーパ(L-DOPA)およびDAがUb-プロテアソーム系関連凝集体の形成に影響を及ぼしているとの仮説を立て、PC12細胞を用いた実験的凝集体モデルを用いてL-DOPAおよびDAと細胞内凝集体の形成過程との関連を検討した。

方法

LB類似の細胞内凝集体モデルは、神経細胞様に分化させたPC12細胞にプロテアソーム阻害剤であるMG132(250 nM)を添加したものをを用いた。凝集体へのL-DOPAおよびDAの関与を調べるために、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)の競合的阻害剤である α -メチルチロシン(α MT)やカテコラミン代謝に関連した酵素阻害剤をプロテアソーム阻害下で添加し、凝集体形成への影響を調べた。さらに、TH阻害下においてL-DOPAおよびDAを添加し、凝集体形成への影響を調べ

た。また、L-DOPA および DA のプロテアソーム活性への影響、Ub 重合への影響、さらには TH 阻害による細胞生存率への影響を検討した。

結 果

α MT を添加することによって、MG132 による凝集体形成は劇的に減少した。さらに、TH 阻害下において L-DOPA および DA を添加したところ、 α MT の影響は相殺され、凝集体形成が起こった。しかし、カテコラミン代謝に関連した他の酵素阻害剤を添加しても凝集体の形成には変化が認められなかった。 α MT により L-DOPA 産生を抑制すると、プロテアソーム活性が上昇した。一方、*in vitro* の実験系で、Ub と L-DOPA および DA を混合したところ非酵素的に Ub の重合が観察された。また、TH による L-DOPA 産生抑制は MG132 添加時の細胞生存率に影響を与えなかった。

考 察

PD における LB 形成機序を検討することは、PD の病態把握に重要と考えられる。今回 L-DOPA および DA などのカテコラミンと細胞内凝集体の形成過程との関連を検討した。本研究において、TH 転写活性が高い細胞で多く凝集体が形成されていたこと、 α MT 添加によって凝集体形成は劇的に減少したこと、さらに α MT 添加と同時に L-DOPA および DA を加えることにより凝集体形成が起こったこと、カテコラミン代謝に関連した他の酵素阻害剤を添加しても凝集体形成は変化しなかったことなどから、L-DOPA および DA はプロテアソームが阻害されている状況下で凝集体形成を促進していると考えられた。 α MT により L-DOPA 産生を抑制するとプロテアソーム活性が上昇したこともこれらの結果に矛盾しない。一方、*in vitro* で Ub に L-DOPA および DA を混合したところ、エネルギー非依存的、酵素非依的に Ub の重合がみられたことから、L-DOPA および DA の凝集体形成促進能に、プロテアソーム系への影響に加えて、Ub そのものの重合促進との両者が関連していると考えられた。近年、細胞内凝集体そのものには毒性がなく、保護的ないし一過性の毒性回避的に働いているとの報告が相次いでいる。本研究における L-DOPA および DA による細胞内凝集体形成促進も毒性には作用せず、これらの報告とは矛盾しない。PD における LB 形成においても、同様の機序が働いている可能性が示唆された。

結 論

L-DOPA および DA はプロテアソーム阻害による凝集体形成を促進していた。その機序として、プロテアソーム活性の低下と非酵素的な Ub 重合の両者が考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は PD における凝集体の意義を解明するために、L-DOPA および DA が Ub-プロテアソーム系関連凝集体の形成に影響を及ぼしているとの仮説のもと、PC12 細胞を用いた実験的な封入体モデルを用いて L-DOPA および DA と細胞内凝集体の形成過程との関連を検討したものである。その結果、凝集体形成は α MT による TH 阻害によって劇的に減少した。さらに、TH 阻害下において L-DOPA および DA を添加したところ、 α MT の影響は相殺され凝集体形成が起こった。また、 α MT により L-DOPA 産生を抑制するとプロテアソーム活性が上昇した。一方、*in vitro* で Ub と L-DOPA および DA を混合したところ非酵素的に Ub の重合が観察された。また、TH による L-DOPA 産生抑制は MG132 添加時の細胞生存率に影響を与えなかった。本論文の内容は、L-DOPA および DA はプロテアソーム阻害による凝集体形成を促進し、その機序としてプロテアソーム活性の低下と非酵素的な Ub 重合の両者があることを示唆するもので、明らかに学術水準を高めたものと認める。