

平成22年1月

# 伊藤 悟 学位論文審査要旨

主 査 大 野 耕 策  
副主査 松 浦 達 也  
同 中 島 健 二

## 主論文

Endogenous catecholamine enhances the dysfunction of unfolded protein response and  $\alpha$ -synuclein oligomerization in PC12 cells overexpressing human  $\alpha$ -synuclein

( $\alpha$ シヌクレイン過剰発現PC12細胞において内因性カテコラミンは小胞体ストレス応答機能不全と $\alpha$ シヌクレイン重合化を促進する)

(著者：伊藤悟、中曾一裕、今村恵子、竹島多賀夫、中島健二)

平成22年 Neuroscience Research 掲載予定

# 学 位 論 文 要 旨

Endogenous catecholamine enhances the dysfunction of unfolded protein response and  $\alpha$ -synuclein oligomerization in PC12 cells overexpressing human  $\alpha$ -synuclein

( $\alpha$ シヌクレイン過剰発現PC12細胞において内因性カテコラミンは小胞体ストレス応答機能不全と $\alpha$ シヌクレイン重合化を促進する)

パーキンソン病の病理所見は、黒質ドパミン神経や橋青斑核などへのレビー小体出現と神経細胞脱落を特徴とする。 $\alpha$ シヌクレインはレビー小体の主要構成成分であり、ドパミン神経における細胞死へも関与していることが報告されている。しかし、いかなる機序でレビー小体形成やドパミン神経細胞死を誘発するのか、その機序については未だ不明な点が多い。本研究ではテトラサイクリン調節発現系(Tet-Off system)を用い、条件特異的に $\alpha$ シヌクレインの過剰発現を誘導できる細胞系を構築し、パーキンソン病モデルとして解析を行った。

## 方 法

実験にはラット褐色細胞腫由来のPC12細胞を用いた。PC12細胞は神経成長因子により神経細胞様に分化することが可能である。また、チロシン水酸化酵素を有するため、その阻害剤である $\alpha$ メチルチロシンを用いてカテコラミン代謝系の調節が可能である。そこで、ヒト剖検脳からサブクローニングした $\alpha$ シヌクレインのcDNAをTet-Off system用のpTRE2ベクターへ挿入し、作製したベクターを、Hygromycin耐性をコードするpTK-hygromycinベクターとTet-Off system用PC12細胞へトランスフェクションした。Hygromycin投与下にて細胞を選別し、単離した細胞系はドキシサイクリン除去刺激によって $\alpha$ シヌクレインの発現を誘導しウェスタンブロットにて $\alpha$ シヌクレイン発現を確認した。確立した細胞系を用い、Hoechst33342染色によるアポトーシス細胞の顕微鏡下での観察や、ウェスタンブロット、免疫沈降法、蛍光免疫染色などにより分子動態の解析を行った。

## 結 果

1) ヒト $\alpha$ シヌクレインの過剰発現はドパミン細胞の細胞死を誘導する

ヒト $\alpha$ シヌクレイン発現細胞ではドキシサイクリン除去から3日で十分量の $\alpha$ シヌクレイン発現が確認され、7日間の長期培養後には非発現時と比較し有意に細胞死を誘導した。ま

た、この細胞死へのカテコラミン代謝の関与を検討するため、100  $\mu\text{M}$   $\alpha$ メチルチロシンを共投与した系では $\alpha$ シヌクレイン発現によって誘導された細胞死が減少した。

2) ヒト $\alpha$ シヌクレイン過剰発現は内因性カテコラミン依存的にドパミン細胞の細胞脆弱性を増強する

パーキンソン病の発病前の状態を想定し、3日間の短期培養の条件において $\alpha$ シヌクレインの過剰発現によって惹起される細胞脆弱性についての検討を行った。 $\alpha$ シヌクレイン発現誘導3日目において、各種ストレッサー(300 nM タプシガルギン、1  $\mu\text{g/ml}$  ツニカマイシン、750  $\mu\text{M}$  1-methyl-4-phenyl-pyrisinium (MPP+)、1  $\mu\text{M}$  ロテノン、25  $\mu\text{M}$  エトポシド)に暴露したところ、ミトコンドリア毒性、小胞体ストレスにおいて $\alpha$ シヌクレイン発現時のアポトーシス細胞数が増加した。また、 $\alpha$ メチルチロシン投与によって内因性カテコラミン代謝を抑制した状態ではこれらの細胞死が回避された。

3) タプシガルギンはドパミン細胞でのヒト $\alpha$ シヌクレイン重合化を促進させる

本検討では、ミトコンドリア毒性に比較して小胞体ストレスへの暴露でより顕著にカテコラミン関連の細胞死が誘導されたため、タプシガルギン投与下での $\alpha$ シヌクレインオリゴマーについてウェスタンブロットで検証したところ、300 nM タプシガルギン投与下では投与後10時間の時点で $\alpha$ シヌクレインのSDS可溶性オリゴマーの増加が認められた。このオリゴマー形成は、 $\alpha$ メチルチロシンやキノンスカベンジャーであるL-システインの投与によって回避された。

4) ヒト $\alpha$ シヌクレインの過剰発現は内因性カテコラミン依存的に小胞体ストレス応答を低下させる

タプシガルギン暴露によって誘導される小胞体ストレスセンサーの主な3経路について $\alpha$ シヌクレインの発現/非発現の各条件でウェスタンブロットによる検討を行った。 $\alpha$ シヌクレイン過剰発現下では、小胞体ストレスセンサーであるATF6 $\alpha$ のp90からp50への解離が抑制され、リン酸化IRE I  $\alpha$ の低下が認められた。一方で、リン酸化eIF2  $\alpha$ と、その下流のアポトーシスシグナルである核内CHOPは増加していた。また、 $\alpha$ メチルチロシンによってカテコラミン代謝を抑制した条件ではATF6 $\alpha$ シグナリングの回復が認められた。さらに、蛍光免疫染色によってATF6 $\alpha$ の局在を検討したところ、 $\alpha$ シヌクレイン過剰発現下では、タプシガルギン暴露によって誘導されるATF6 $\alpha$ の小胞体-ゴルジ輸送が抑制されていた。また、 $\alpha$ メチルチロシンによってカテコラミン代謝を抑制した条件では、 $\alpha$ シヌクレイン過剰発現

による小胞体-ゴルジ輸送の障害が軽減された。

## 考 察

カテコラミン細胞における $\alpha$ シヌクレイン過剰発現は、ATF6 $\alpha$ 、IRE I  $\alpha$ の2経路の小胞体ストレス応答を低下させた。そのため、 $\alpha$ シヌクレイン過剰発現下では、残存するeIF2 $\alpha$ 経路が単独で対応することになり、より早期に小胞体ストレス応答機構が崩壊してアポトーシスが誘導されるものと推察された。また、内因性カテコラミン依存的に小胞体ストレスセンサーの機能低下が誘導されたため、カテコラミンが $\alpha$ シヌクレインによる小胞体機能低下を増悪しているものと考えられた。さらには、キノン化カテコラミンによる $\alpha$ シヌクレイン重合化も確認されており、これらのカテコラミン関連病態がパーキンソン病における黒質ニューロンの選択的細胞死に関与していることが明らかになった。