

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 26 日現在

機関番号 : 11501

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2011

課題番号 : 21790832

研究課題名 (和文)

パーキンソン病におけるリン酸化 α シヌクレインとドパミン代謝異常に関する解析

研究課題名 (英文)

The effect of phosphorylation of alpha-synuclein on dopamine metabolism

研究代表者

小山信吾 (KOYAMA SHINGO)

山形大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 30436208

研究成果の概要 (和文) :

α S は細胞毒性ドパミントランスポーター (DAT) によるドパミン取り込みを促進し、細胞死を引き起こすことが報告されている (Lee FJS et al. FASEB J 2001)。そこで α S の有無によりドパミンあるいは DAT を介して細胞内に取り込まれる 6-OHDA による細胞死を検討した。培養細胞は野生型 α S inducible DAT 恒常発現 PC12 細胞、 α S、DAT を恒常発現する SH-SY5Y 細胞を用いた。

野生型 α S inducible DAT 恒常発現 PC12 細胞を用いて α S の発現の有無でドパミンによる細胞死に差があるかどうかを比較検討した。培養にあたって NGF により PC12 を分化・誘導させた。 α S の誘導はドキシサイクリンを添加しない培養液を用いた。 α S 非誘導細胞はドキシサイクリンを培養液に添加した。5 日間の培養後、500mM ドパミンを 24 時間添加しトリパンブルー染色で細胞死を比較した。ドパミン添加により 20% 程度の細胞死が確認されたが、 α S の発現の有無で差は見出せなかった。

次に SH-SY5Y 細胞を用いて DAT を介した 6-OHDA の細胞死の比較検討を行った。 α S 恒常発現 SH-SY5Y 細胞、GFP/DAT 恒常発現 SH-SY5Y 細胞、 α S/DAT 恒常発現 SH-SY5Y 細胞を使用した。細胞播種後 48 時間後に 6-OHDA (200 μ M) を 4 時間添加しトリパンブルー染色で細胞死を評価した。 α S 恒常発現 SH-SY5Y 細胞では優位な細胞死は生じなかったが、DAT を恒常発現する GFP/DAT 恒常発現 SH-SY5Y 細胞、 α S/DAT 恒常発現 SH-SY5Y 細胞では 40~50% 程度の細胞死が確認された。しかし、 α S の有無によって細胞死に優位な差は見出せなかった。

研究成果の概要 (英文) :

We studied the effect of alpha-synuclein (aS) on dopamine transporter (DAT)-mediated dopamine or 6-hydroxydopamine (6-OHDA) toxicity using aS-inducible, DAT stably expressing PC12 cells or aS and DAT stably expressing SH-SY5Y cells. To induce expression of aS, differentiated PC12 cells were incubated with or without doxycycline for 5 days. Thereafter, PC12 cells were incubated with 500 mM dopamine for 24 h and we assessed cell viability by trypan blue staining. No difference in cell viability was detected between doxycycline-induced and non-induced cells. Secondary, we studied the DAT-mediated 6-hydroxydopamine toxicity, DAT/aS or GFP/aS expressing SH-SY5Y cells

were incubated with 200 μ M 6-OHDA for 4 hours. No difference in cell viability was detected between DAT-aS and GFP-aS expressing SH-SY5Y cells. Therefore, we could not detect the effect of aS on DAT-mediated cell toxicity mechanism in our experimental system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：神経分子病態学

1. 研究開始当初の背景

α シヌクレイン (α S) は、パーキンソン病 (PD) 患者脳で観察されるレビー小体の主要構成成分であり、Ser129- α S が高度にリン酸化されていることが知られている。近年、 α S がドパミン代謝に関係することが報告され、PD 発症とドパミン代謝の異常との関連が注目されているが、Ser129- α S のリン酸化が α S の生理機能あるいは PD 発症においてどのような意義をもつのかについてはほとんど検証されていない。

また、 α S はドパミントランスポーター (DAT) によるドパミン取り込みを促進し、細胞死を引き起こすことが報告されていた (Lee FJS et al. FASEB J 2001)。

そこで α S の有無によりドパミンあるいは DAT を介して細胞内に取り込まれる 6-OHDA による

細胞死を検討した。培養細胞は野生型 α S inducible DAT 恒常発現 PC12 細胞、 α S、DAT を恒常発現する SH-SY5Y 細胞を用いた。

2. 研究の目的

本研究では α S による DAT を介する細胞毒性の影響、さらには Ser129- α S のリン酸化とドパミン代謝に焦点をあてて研究をすすめ、孤発性 PD の病態メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

本研究は既に利用可能な野生型および S129A 変異型 α S 安定発現 SH-SY5Y 細胞、野生型および S129A 変異型 α S inducible PC12 細胞を用いて実験を行う。DAT を介するドパミンの取り込み実験を確立

することで解析を行った。

山形大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30436208

4. 研究成果

野生型 α S inducible DAT 恒常発現 PC12 細胞を用いて α S の発現の有無でドパミンによる細胞死に差があるかどうかを比較検討した。培養にあたって NGF により PC12 を分化・誘導させた。 α S の誘導はドキシサイクリンを添加しない培養液を用いた。 α S 非誘導細胞はドキシサイクリンを培養液に添加した。5 日間の培養後、500mM ドパミンを 24 時間添加しトリパンブルー染色で細胞死を比較した。ドパミン添加により 20% 程度の細胞死が確認されたが、 α S の発現の有無で差は見出せなかった。

次に SH-SY5Y 細胞を用いて DAT を介した 6-OHDA の細胞死の比較検討を行った。 α S 恒常発現 SH-SY5Y 細胞、GF P/DAT 恒常発現 SH-SY5Y 細胞、 α S/DAT 恒常発現 SH-SY5Y 細胞を使用した。細胞播種後 48 時間後に 6-OHDA (200 μ M) を 4 時間添加してトリパンブルー染色で細胞死を評価した。 α S 恒常発現 SH-SY5Y 細胞では優位な細胞死は生じなかったが、DAT を恒常発現する GF P/DAT 恒常発現 SH-SY5Y 細胞、 α S/DAT 恒常発現 SH-SY5Y 細胞では 40~50% 程度の細胞死が確認された。しかし、 α S の有無によって細胞死に優位な差は見出せなかった。これらの結果からは、この実験系における DAT を介した 6-OHDA による細胞毒性において、 α S の有無による差は見出せなかった。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 信吾 (KOYAMA SHINGO)