The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in in vivo canine hearts |
| Author(s) | 浅井, 光俊 |
| Citation | 大阪大学, 2009, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/49858 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【35】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 浅　井　光　俊（あさ い みつ とし） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（医　学） |
| 学　位　記　番　号 | 第　２２７４４　号 |
| 学位授与年月日 | 平成21年３月24日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第４条第１項該当<br>医学系研究科内科系臨床医学専攻 |
| 学　位　論　文　名 | PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in in vivo canine hearts<br>（虚血心臓での PKA によるプロテアソーム活性調節および蛋白品質管理） |
| 論　文　審　査　委　員 | （主査）<br>教　授　金倉　　譲<br>（副査）<br>教　授　澤　　芳樹　　教　授　武田　　裕 |

## 論　文　内　容　の　要　旨

［目的］

ユビキチン-プロテアソーム系は、選択的に蛋白質を分解する働きを担い、生体の恒常性の維持に必須である。プロテアソームは2500kDaの巨大分子であり、プロテアーゼ活性を有し、多数のサブユニットで構成される集合体である。近年、心疾患におけるユビキチン－プロテアソーム系の関与が報告されつつある。以前、我々はヒト重症心不全の心筋サンプルを免疫染色したところユビキチン化蛋白の蓄積を見いだし、心不全におけるユビキチンプロテアソーム系の関与を報告した。しかし、プロテアソームの活性調節はPKA等によるリン酸化に影響を受けると報告もあるが、生体内では不明な点も多く、病態への関与も完全には明らかになっていない。そこで、我々はプロテアソームの活性調節ならびに病態への関与を正常心ならびに虚血心にて検討した。

［方法ならびに成績］

①　実験的検討(1)

精製プロテアソームを用い、in vitroで検討を行った。精製プロテアソームにPKA刺激を行うと、濃度依存性（0.25-1U/μg）にプロテアソーム活性の上昇が認められた。次に、PKA刺激によるプロテアソーム活性上昇のメカニズムをNative PAGEを行った後、western blotting法を用い検討した。PKA刺激によりプロテアソームのリン酸化が認められ、また同時に、サブユニットの集合の増加が認められた。従って、in vitroの系では、PKA刺激によりそのリン酸化を介しサブユニットの集合が増加しプロテアソームの活性が上昇することが示唆された。

②　実験的検討(2)

麻酔開胸犬モデルを用い検討を行った。これは、冠動脈前下行枝(LAD)を頚動脈からの体外バイパスチュ

ーブにて選択的に灌流させるモデルである。本モデルは、このバイパスチューブを遮断することで虚血モデルを作成することもでき、また、LADに選択的に薬剤を投与することが可能であり、LAD領域、回旋枝領域を比較することで各薬剤投与に対する効果を検討した。

外因性PKA刺激として、イソプロテレノール(10μmol/L)、ホルスコリン(0.3μg/kg/min)のLAD内への選択的投与を、内因性PKA刺激として、以前我々のグループより報告していた虚血プレコンディショニング(IP)を用いた。精製プロテアソームを用いた検討と同様に、外因性PKA刺激によりプロテアソームの活性上昇が認められた。さらに、その活性上昇のメカニズムについてグリセロールグラディエント法で、26Sプロテアソームを分画し、western blotting法を用い検討した。外因性PKA刺激によりプロテアソームサブユニットの集合増加、活性上昇を認めた。内因性PKA刺激においても同様に、プロテアソームサブユニットの集合増加、活性上昇が認められた。次に、IPによるプロテアソーム活性上昇効果の時間的経過について検討した。コントロール、IP直後、長時間虚血後、再灌流後の各時点でbiopsyを施行し同一個体内でプロテアソーム活性を検討した。長期間虚血後、プロテアソーム活性は低下するが、虚血前にIPを施すと、IP後上昇したプロテアソーム活性は、長時間虚血後もコントロールレベルで維持されていた。

③ 実験的検討(3)

麻酔開胸犬モデルを用い、IPによるプロテアソーム活性上昇の虚血再灌流に対する関与を検討した。shamと比し虚血再灌流後、心筋にユビキチン化蛋白の蓄積が認められた。虚血再灌流前にIPを施すと、そのユビキチン化蛋白の蓄積は軽減された。しかし、プロテアソーム阻害薬投与で、IPによるユビキチン化蛋白蓄積の軽減効果は相殺された。従って、IPによるプロテアソーム活性上昇で、虚血再灌流後のユビキチン化蛋白の蓄積を軽減させることが示唆された。次に梗塞サイズで検討を行った。IPを施すと梗塞サイズは有意に縮小したが、プロテアソーム阻害薬を用いても梗塞サイズに影響は及ぼさなかった。従って、この系ではプロテアソーム活性は急性期の梗塞サイズには影響を及ぼさないことが示唆された。

[総括]

以上から、in vitro、in vivoモデルの両方において、PKA刺激により心臓プロテアソームのサブユニットの集合増加、活性上昇が証明された。また、虚血プレコンディショニングによるプロテアソームの活性上昇が梗塞後心筋における蛋白質品質管理および心室リモデリングに関与することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

プロテアソームは細胞内の選択的蛋白質分解を担い、細胞の恒常性の維持に必須である。心疾患においても心不全でプロテアソーム活性が低下し、ユビキチン化蛋白が蓄積するとの報告がある。しかしながら、虚血心におけるプロテアソームの活性調節、病態への関与は不明である。

申請者らは、PKA刺激によりプロテアソームの集合が増加し、活性が上昇することをin vitroおよびin vivoの両方の系で証明した。また、麻酔開胸犬を用いた検討では、内因性PKA刺激によりプロテアソーム活性が上昇し、虚血再灌流後のユビキチン化蛋白蓄積軽減に寄与することを証明した。

申請者らが証明したPKA刺激によるプロテアソームの集合増強および活性上昇は、虚血心における蛋白品質管理の可能性を示したという点で、重要な知見を提供しており、学位に値するものと認める