

2013年9月

分子シャペロンスモールヒートショックプロテインのアミロイドβ蛋白質凝集への影響

物質系専攻 47-116055 吉田知識

指導教員：前田瑞夫（教授）

キーワード：アミロイドβ、分子シャペロン、スモールヒートショックプロテイン

【諸言】

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) は重篤な痴呆を主症状とする神経変性疾患であり、アミロイドβタンパク質 (Aβ) が主な病因と考えられている。Aβは高い自己会合能をもち、線維状凝集体を形成する。Aβの線維状凝集体はAD患者の脳内に共通して発見され、細胞毒性を有することからADの原因物質であると考えられている。

分子シャペロンタンパク質はタンパク質の凝集を防ぎフォールディングを助ける働きをもつ。分子シャペロンのひとつであるスモールヒートショックプロテイン (sHsp) は低分子量 (12~40kDa) のモノマーが二量体(dimer)と多量体(multimer)のふたつの会合状態をとる。様々な分子量のsHspが存在し、共通してαクリスタリン配列を有する。sHspは通常 multimer で存在し、ストレス条件下で dimer に解離する。この dimer 解離が凝集抑制活性に重要だと考えられている。

sHsp のひとつである HSP27 は心臓や骨格筋など人体の様々な器官から見つかっており、アルツハイマー病の患者の脳内にも存在している[1]。近年 HSP27 は通常 multimer 状態をとるが、リン酸化されることで dimer 状態になることが報告された[2]。これまでに非リン酸化 HSP27 (multimer)が試験管内で Aβ の凝集を防ぐことが知られている[3]。しかし、リン酸化 HSP27 (dimer)が Aβ 凝集に与える影響は未だ調べられていない。そこで本研究では Aβ モノマーとリン酸化 HSP27 (dimer)をインキュベートしたサンプルの細胞毒性、凝集体の量や構造を評価した。

【実験】

HSP27 を MAPKAP キナーゼでリン酸化した。HSP27 のリン酸化は phos-tag SDS PAGE で、dimer 化は HPLC で確認した(data not shown)。リン酸化された HSP27(p-HSP27)及びリン酸化されていない HSP27 存在下において Aβ42 モノマー (25 μM) を 37°C で 24 時間インキュベートした。得られた Aβ 凝集体の量や構造を、チオフラビン T (ThT) assay と Native PAGE/western blot (WB), TEM を用いて評価した。ThT は線維状凝集体存在下で強い蛍光を示すことが知られている。Native PAGE/WB によりアクリルアミドゲルで泳動可能な可溶性画分の分子量を評価できる。また、得られた Aβ サンプルをラット副腎由来 PC12 細胞に加えて 24 時間インキュベートし、MTT assay により細胞毒性を評価した。

【結果・考察】

HSP27 と Aβ モノマー (25 μM) をインキュベートしたサンプルの線維状凝集体の量が、HSP27 の会合状態(dimer, multimer)や濃度によって変化するかどうかを ThT assay で調べた (図1)。リン酸化 HSP27 (dimer)は濃度依存的に Aβ 凝集を抑制し、0.2 μM 以上では Aβ 線維状凝集形成をほぼ完全に抑制することがわかった。また、非リン酸化 HSP27 (multimer) を用いた場合も同様に 0.2 μM 以上で Aβ 線維状凝集形成をほぼ完全に抑制することがわかった。

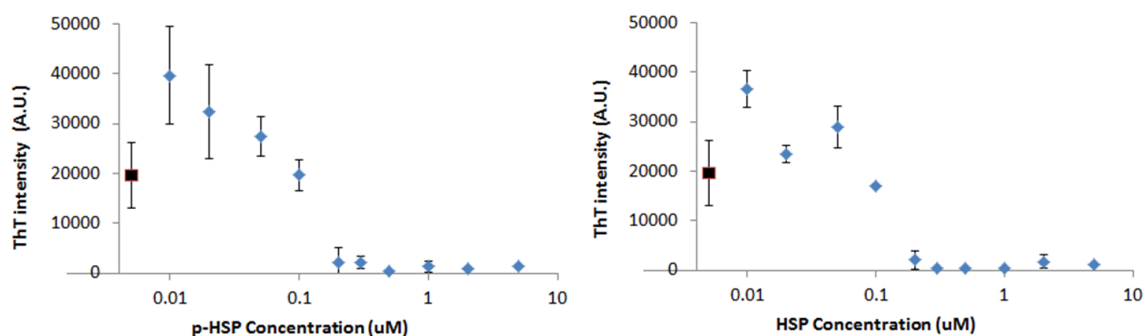


図1 ThT assay による様々な濃度の p-HSP27 (dimer) (左)、 HSP27 (multimer) (右) 存在下での線維状 A β 凝集形成評価 (■:Fibril)

次に、HSP27 と A β モノマーをインキュベートしたサンプル中にある可溶性画分の A β の分子量を Native-PAGE/WB で評価した (図2)。リン酸化 HSP27 (dimer) を用いた場合、0.5 μ M 以上の HSP27 濃度では、モノマーやプロトフィブリルが観察された。一方、0.2 μ M 以下では可溶性画分は観察されなかったため、A β は不溶性の大きな凝集体を作っていることが示唆された。同じサンプルを HSP27 抗体で染色した結果を右に示す。0.5 μ M 以上の HSP27 とインキュベートしたサンプルに関して、枠で示すように高分子量のプロトフィブリルと思われるバンドに HSP27 が観察されたことから、A β と HSP27 の複合体形成が示唆された。また、非リン酸化 HSP27 (multimer) を用いた場合も同様の結果が得られた。すなわち非リン酸化 HSP27 (multimer) が 0.5 μ M 以上のときにモノマーやプロトフィブリルと思われるバンドが観察され、さらに A β と HSP27 の複合体形成が示唆された。

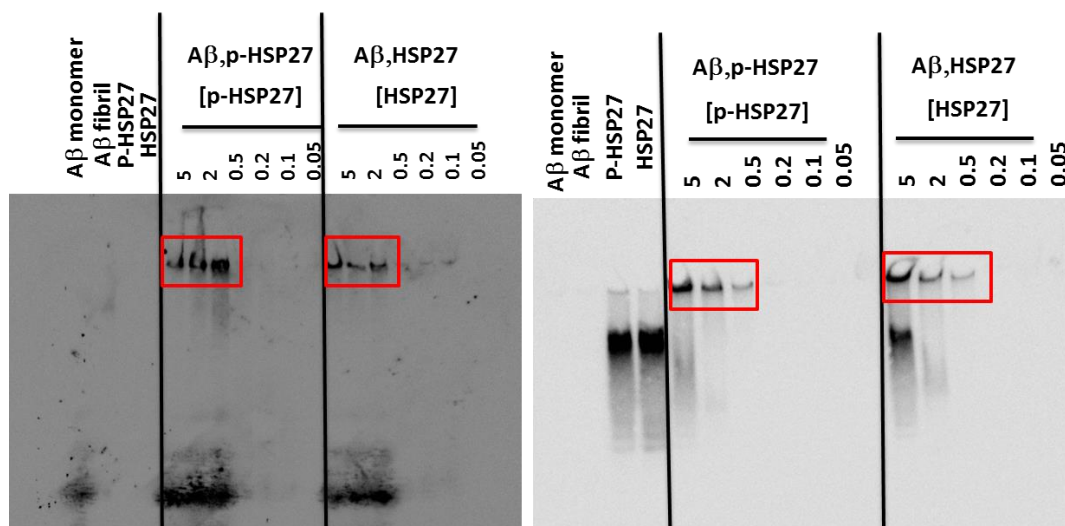


図2 様々な濃度の HSP27 とインキュベートした A β サンプルの可溶性画分の分子量評価 (枠: プロトフィブリル)
左: A β 抗体で染色 右: HSP27 抗体で染色

HSP27 と A β モノマーをインキュベートしたサンプルを PC12 細胞に加えた時の細胞毒性を MTT assay により評価した (図 3)。HSP27 非存在下で形成した A β 凝集体(Fibril)を加えたときの細胞生存率は約 50%であった。それに対し 0.2 μ M 以上のリン酸化 HSP27(dimer)存在下では A β サンプルの毒性は低下していた。一方、HSP27 濃度が 0.1 μ M 以下の時は A β 線維状凝集体と同程度の毒性を示した。また、非リン酸化 HSP27 (multimer) を用いた場合も同様に、0.2 μ M 以上の HSP27 存在下では A β サンプルの毒性は低下していた。

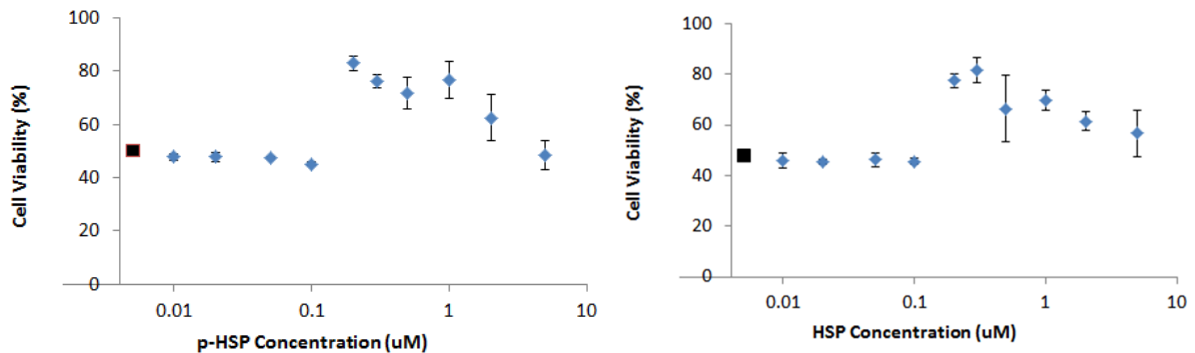


図 3 MTT assay による様々な濃度の p-HSP27 (dimer) (左)、 HSP27 (multimer) (右) 存在下での A β サンプルの細胞毒性評価 (■:Fibril)

【総括】

HSP27 が A β の凝集形成や細胞毒性に与える影響を調べた。ヒト以外の sHsp が dimer 状態と multimer 状態で A β 凝集に異なる影響を与えるという報告があるため、リン酸化された HSP27(dimer)が凝集形成に与える影響と非リン酸化 HSP27 (multimer)の違いに特に着目した。その結果、リン酸化した HSP27(dimer)は非リン酸化 HSP27 (multimer)同様の影響を A β に与え、濃度依存的に A β の線維状凝集体形成及び毒性を抑制することがわかった。

【参考文献】

1. Wilhelmus *et al.* *Mol. Neurobiol* (2007) **35**, 203-16
2. Hayes *et al.* *JBC* (2009) **284** 18801-7
3. Kudva *et al.* *FEBS Lett.* (1997) **416**, 117-21

【学会発表】

第 85 回 日本生化学会 (2012.12 福岡)

「分子シャペロン sHsp の会合状態のアミロイド β 凝集への影響」

第 13 回日本蛋白質科学会 (2013.6 鳥取)

「分子シャペロン sHsp (small heat shock protein) の会合状態のアミロイド β 凝集への影響」