

# ストレスと脳機能疾患における分子基盤研究

## —分子シャペロンタンパク質を中心として—

小島良二<sup>1</sup>、伊藤幹雄<sup>1, 2</sup>

名城大学薬学部薬効解析学研究室<sup>1</sup>、名城大学大学院総合学術研究科<sup>2</sup>

アルツハイマー病に代表される種々の神経変性疾患では、 $\beta$ -アミロイド(アルツハイマー病)、 $\alpha$ -シヌクレイン、パーキン (パーキンソン病)、ポリグルタミンタンパク質 (ハンチントン病)、プリオン (プリオン病)、SOD1 (筋萎縮性側索硬化症)などの異なる変性タンパク質が凝集・蓄積し、結果的に細胞を死に導くものと考えられてきている。通常、細胞内で生じた変性タンパク質は再生されるか、再生不良であればユビキチン-プロテアソーム系により分解除去されるため、タンパク質の不都合な凝集・蓄積が生じることはない。この過程において、変性タンパク質に結合しタンパク質の凝集を抑制し、必要なタンパク質の再生 (リフォールディング)や、また不必要なタンパク質のユビキチン-プロテアソーム系での分解介助を担うタンパク質群が分子シャペロンタンパク質である。

当研究室ではこれまでに、高浸透圧ストレス感受性遺伝子、Osp94 (Osmotic stress protein 94 kD)は変性タンパク質の凝集抑制とリフォールディング作用を有する分子シャペロンタンパク質 (ストレスタンパク質) であることを見出してきている。

そこで本研究では、変性タンパク質の凝集・蓄積という神経変性疾患に共通した分子メカニズムに着目し、Osp94の分子シャペロン機能による神経変性細胞死抑制を明らかにすることを目的とし、今回その第一歩として、神経細胞におけるOsp94を含む分子シャペロンタンパク質の発現解析ならびにOsp94発現を亢進させる化合物の探索を行った。

### 【方法】

ICRマウスの脳組織切片におけるOsp94の発現を、他の分子シャペロンの発現と共に免疫組織化学的に解析した。また、樹立培養神経細胞であるNeuro2A細胞におけるOsp94ならびに他の分子シャペロンであるHsp70、Hsc70、Hsp40およびBipのタンパク質発現をWestern blot解析した。さらに、内因性のOsp94タンパク質発現を亢進させる化合物を探索するため、Neuro2A細胞に、celastrol、carbenoxolone、geranyl geranyl acetone (GGA)またはresveratrolを24時間処置し、分子シャペロンタンパク質の発現を解析した。加えて、外来刺激に対するNeuro2A細胞のストレス応答性を検討するため、Neuro2A細胞を熱ショックストレス(42℃、3hr)または高浸透圧ストレス(200 mM mannitol、24 hr)に暴露した後、Osp94および他の分子シャペロンタンパク質の発現変化を、マウス腎髄質内層集合管細胞(mIMCD-3)細胞のそれと比較検討した。

## 【結果】

### 1. マウス脳組織における分子シャペロンタンパク質の発現解析：

正常マウスの脳組織において、Osp94 発現は脳全体に認められ、特に大脳皮質、海馬の神経細胞体並びに神経軸索に認められ、小脳では、プルキンエ細胞および顆粒細胞においてOSP94 の発現が観察された。加えて、脳室内脈絡叢にも Osp94 の強い発現が認められた。他方、Hsc70 並びに Hsp40 の発現は、Osp94 と同様な発現領域において神経細胞体に主に観察されたが、神経軸索部位にはほとんど認められなかった。尚、脳組織における Hsp70 の発現はほとんど観察されなかった。

### 2. Osp94 タンパク質発現を亢進させる化合物の探索：

mIMCD-3 および Neuro2a 細胞への celastrol (0.1-10  $\mu$ M) の 24 時間処置において、Hsp70 の高発現が認められた。しかしながら、Osp94 の発現増加は認められなかった。Carbenoxolone (0.2-4  $\mu$ M) の処置においても、Hsp70 の発現が認められたが、他の分子シャペロンの明らかに発現増加は観察されなかった。加えて、GGA (10-300  $\mu$ M) の処置では、Hsp70 のみの発現増加にとどまった。また、resveratrol (5-100  $\mu$ M) の処置では、Bip の発現増加が観察された。加えて、本実験では、ケミカルシャペロンである 4-phenyl butyric acid (4-PBA、3 mM) および trimethyl amine N-oxide (TMAO、10-300 mM) の分子シャペロンタンパク質の発現に対する効果を解析したが、mIMCD-3 および Neuro2a 細胞において、明らかな発現変化は認められなかった。

### 3. 外来刺激に対する Neuro2A 細胞のストレス応答における分子シャペロンタンパク質の発現変化：

mIMCD-3 細胞において、熱ショックストレス処置により、Osp94 および Hsp70 の発現増加が認められたが、Neuro2a 細胞におけるそれら分子の発現変化は観察されなかった。一方、Hsc70 および Bip タンパク質の熱ショックストレスによる発現変化は、両培養細胞においては認められなかった。他方、mIMCD-3 細胞においては、200 mM mannitol による高浸透圧ストレス処置により、Osp94 および Hsp70 の発現増加が認められた。しかしながら、Neuro2a 細胞におけるそれらタンパク質の発現増加は認められなかった。また、熱ショックストレス処置の場合と同様に、Hsc70 および Bip タンパク質の発現増加は、両培養細胞において観察されなかった。

以上、正常マウスの脳組織において、他の分子シャペロンとは異なり、Osp94 タンパク質の発現が神経細胞体に加え、神経軸索においても観察されたことから、今後この点についてさらに検討する予定である。また、今回の実験においては、Osp94 タンパク質の発現増加を亢進する化合物を見出すことはできなかったが、引き続き、他の化合物の探索を継続して行う計画である。加えて、mIMCD-3 細胞と比較し、Neuro2a 細胞における熱ショックストレスおよび高浸透圧ストレスに対する応答性が大きく異なることから、他の外的ストレス、細胞内情報伝達系、転写因子の観点において、さらに検討する必要があると考えられる。