

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18395

研究課題名(和文)小胞体ストレス依存的に産生される小ペプチドの細胞毒性解析と病態形成との関連性解明

研究課題名(英文) Analysis of relationship between pathogenesis and ER stress sensor-derived small peptides produced in response to ER stress

研究代表者

松久 幸司 (Matsuhisa, Koji)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・寄附講座助教

研究者番号：60735299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体の機能異常(小胞体ストレス)が神経変性疾患などの発症や病態形成と密接に関わっている。しかしながら両者を繋ぐ分子機構は未だ不明である。本研究課題では小胞体ストレスセンサーであるATF6やOASISファミリー分子が小胞体ストレス依存的に切断を受ける際に産生される小ペプチド断片(小胞体マイクロフラグメント)を見出した。この小胞体マイクロフラグメントは高い疎水性を有し凝集して線維構造を形成する。またアルツハイマー病の原因分子であるアミロイドの線維形成を加速することが分かった。以上、小胞体マイクロフラグメントが小胞体ストレスと神経変性疾患の発症および病態形成を繋ぐ分子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have shown the robust involvement of endoplasmic reticulum (ER) dysfunctions and ER stress in the development of various diseases such as neurodegenerative disorders. However, the molecular entities linking ER stress with the pathogenesis of these diseases have been unexplored. We identified the small peptide fragments generated from ER stress sensors ATF6 and OASIS family members in an ER stress-dependent manner. The fragments are hydrophobic, highly aggregable and form fibrils. The small peptides also promote the fibrilization of amyloid. These data indicate that the small peptides might be key molecules linking between ER stress and the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

研究分野：生化学、薬学

キーワード：小胞体ストレス 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

細胞が感染、虚血、酸化ストレスなどの異常環境に曝されて小胞体の働きが破綻すると、不完全なタンパク質が大量に小胞体内に生み出され危機的状況に陥る。このような状態を小胞体ストレスと呼ぶ。小胞体ストレスはアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患や糖尿病などの代謝性疾患をはじめとする様々な疾患の発症および病態形成に重要な役割を果たしていることが強く示唆されている。そのため、小胞体ストレス及びその応答機構は疾患治療の戦略構築における有用なターゲットとして注目されている。しかしながら小胞体ストレスと小胞体ストレス関連疾患の病態形成を繋ぐ分子の実体は未だ不明であり、小胞体ストレスを標的とした疾患治療法の開発には至っていない。

小胞体には小胞体ストレスを感知するセンサー分子が存在する。これら小胞体ストレスセンサーは、タンパク質の翻訳抑制や折り畳み不全タンパク質の修復および分解、シャペロン分子の転写誘導を制御するシステムを駆動させて小胞体ストレスを緩和し、細胞死の回避を試みる。このシステムを小胞体ストレス応答と呼ぶ。小胞体に局在するセンサー分子である 2 型の 1 回膜貫通型タンパク質 ATF6 および OASIS ファミリー分子 (BBF2H7, OASIS, AlBZIP, Luman, CREBH) は、小胞体ストレスを感知すると小胞体からゴルジ装置へと移行する。これらセンサー分子はゴルジ装置に局在する site-1 protease (S1P) および site-2 protease (S2P) により膜内 2 段階切断を受ける。細胞質側ドメインに当たる N 末端断片は転写活性化領域を有しており、核内へと移行して分子シャペロンである BiP をはじめとする標的遺伝子の転写を誘導する。この膜内 2 段階切断の際に、ATF6 や OASIS ファミリー分子における S1P と S2P 認識部位の間からアミノ酸約 40 残基の小ペプチド断片 (小胞体マイクロフラグメント) が産生される。小胞体マイクロフラグメントは疎水性の高い膜貫通領域を有しており、高い凝集性を有する可能性が考えられる。このような小胞体マイクロフラグメントの生成機構や高い凝集性は、アルツハイマー病患者脳に沈着し、疾患発症の原因物質の一つとされるアミロイドベータタンパクと類似しており病態との関連が注目される。しかしながらこれまで小胞体マイクロフラグメントに着目した研究は行われておらず、その構造や物性、生物学的活性は一切不明である。

2. 研究の目的

本研究課題では小胞体マイクロフラグメントの詳細な生成機構、凝集性、細胞毒性を明らかにすることで、小胞体マイクロフラグメントと小胞体ストレス関連疾患である神経変性疾患の発症および病態形成との関連性を検証するとともに、その研究成果に基づいて新規の疾患治療法の開発へとつながる

研究を試みた。

3. 研究の方法

小胞体ストレスセンサーである ATF6、OASIS、BBF2H7 について想定される小胞体マイクロフラグメントの小胞体内腔領域を認識するウサギポリクローナル抗体を作製し、小胞体マイクロフラグメントの検出を行った。また BBF2H7 由来小胞体マイクロフラグメントについてその産生機構、代謝、局在、詳細なアミノ酸配列および物性、生化学的性質について解析した。

4. 研究成果

(1) 小胞体マイクロフラグメントの産生

小胞体マイクロフラグメントの検出 ; ヒト胎児腎細胞株である HEK293T 細胞に BBF2H7 や OASIS を遺伝子導入した細胞にタブシガルギンなどの小胞体ストレス誘導剤の処理を行った。その後作成した細胞溶解液を免疫沈降法およびウエスタンブロットで解析したところ、BBF2H7 や OASIS 由来の小胞体マイクロフラグメントが小胞体ストレス依存的に産生されることが分かった。ATF6 については小胞体マイクロフラグメントを認識する抗体を作製できなかったものの、ATF6 の小胞体内腔側切断部位を V5 タグに置き換えたコンストラクトを用いて V5 タグ認識抗体により同様に解析を行ったところこの実験系では ATF6 由来の小胞体マイクロフラグメントが小胞体ストレス依存的に産生されていた。以上のことから 2 段階の膜内切断を受けて活性化する ATF6、OASIS、BBF2H7 から小胞体ストレス依存的にアミノ酸約 40~50 残基の小ペプチドが産生されることが分かった。

BBF2H7 由来小胞体マイクロフラグメントの産生機構 ; 上記の 3 種類のストレスセンサーの内、BBF2H7 が最も安定的に小胞体マイクロフラグメントの産生が確認できたため、BBF2H7 をモデルとして以降の解析を行った。BBF2H7 由来の小胞体マイクロフラグメントが S1P および S2P による 2 段階切断を介して産生されるのか、BBF2H7 の S1P 切断部位変異体や S2P 欠損細胞を用いて解析した。その結果、いずれでも小胞体マイクロフラグメントは検出されなかった。したがって、BBF2H7 由来小胞体マイクロフラグメントは S1P および S2P の 2 種類の酵素による切断を介して産生されることが明らかとなった。

BBF2H7 由来小胞体マイクロフラグメントの配列同定 ; BBF2H7 の S1P 切断部位は、S1P により切断される他の基質タンパク質の配列から推定されている。しかしながら S2P 切断部位については不明であった。そこで小胞体マイクロフラグメントの詳細なアミノ酸配列を決定するために BBF2H7 の S1P、S2P 切断部位を解析した。BBF2H7 の N 末端または C 末端にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を融合したコンストラクトを HEK293T 細胞に遺伝子導入して小胞体ストレスを負荷した細胞からグルタチオンビーズを用いて BBF2H7 の N 末端断片または C 末端断片を

回収した。回収した各断片をトリプシン消化後、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法を行いそれぞれの末端配列を解析した。BBF2H7 の C 末端断片を解析した結果、その N 末端側配列は従来言われている S1P 切断部位の直後 (431 番目のイソロイソイン) と一致していた。一方、BBF2H7 の N 末端断片を解析すると、その C 末端のアミノ酸として 380 番目のロイシンと 381 番目のメチオニンの 2 種類が検出された。以上から、BBF2H7 の小胞体内腔側はこれまで推定されていた 430 番目のロイシンと 431 番目のイソロイソインの間で切断を受けていることが分かった。一方、BBF2H7 の膜貫通領域は 380 番目のロイシン、または 381 番目のイソロイソインの直後の 2 か所のいずれかで切断を受けていることが明らかとなった。さらに小胞体マイクロフラグメントの配列を決定するために、BBF2H7 発現 HEK293T 細胞から小胞体マイクロフラグメントを回収してエドマン分解を行い、その N 末端配列を解析した。その結果、小胞体マイクロフラグメントの N 末端アミノ酸は 386 番目のシステインであった。この結果は、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析による解析から得られた N 末端断片の C 末端から 5 或いは 6 アミノ酸離れていることから、BBF2H7 は膜内で 2 段階以上の切断を受けていることが明らかになった。また、BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントの主要な分子種は 386 番目のシステインから 430 番目のロイシンまでの 45 残基のアミノ酸からなるペプチドであることが分かった。

BBF2H7 由来小胞体マイクロフラグメントの代謝経路；細胞内で不要になったタンパク質は主にユビキチン-プロテアソーム経路とライソゾーム経路で分解される。そこでプロテアソーム阻害剤である MG132 とライソゾーム阻害剤であるパフィロマイシン A1 を用いて BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントの分解経路を調べた。MG132 を細胞に処理したところ、BBF2H7 の全長型、N 末端断片、小胞体マイクロフラグメントが全て増加した。BBF2H7 は通常状態ではプロテアソームで分解されていることが報告されている。したがってプロテアソーム分解を阻害することで全長型の BBF2H7 が増加した結果、その切断産物である N 末端断片と小胞体マイクロフラグメントが増加したと考えられる。一方、ライソゾーム阻害剤を処理した細胞では BBF2H7 の全長型、N 末端断片は増加していないにも関わらず小胞体マイクロフラグメント量が増加していたことからマイクロフラグメントはライソゾームで分解を受けていることが示唆された。また免疫染色法によりマイクロフラグメントのライソゾーム局在を解析した結果、小胞体ストレスを負荷したのみではライソゾームマーカー Lamp2 と小胞体マイクロフラグメントのシグナルはオーバーラップしなかったが、パフィロマイシン A1 を併用すると両者が共局在していたこと

から、小胞体マイクロフラグメントはライソゾームで分解を受けていることが明らかになった。

BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントの凝集性と線維形成；BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントは 12 残基の膜貫通領域を有しており疎水性の高い配列になっている。また細胞内で産生された小胞体マイクロフラグメントを検出した際、2 量体や 3 量体に位置する分子量にも単量体と同様にバンドが認められた。そこで同定したアミノ酸配列を基に BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントの合成ペプチドを作成してその凝集性を解析した。その結果、マイクロフラグメントを 37 でインキュベートすることで 100 で加熱しても崩壊しない強固な凝集体を形成することが分かった。マイクロフラグメントの高い疎水性や凝集性、膜内 2 段階切断により産生される機構および分子量はアルツハイマー病の原因物質であるアミロイド とよく似ている。アミロイド は凝集してアミロイド線維と呼ばれる線維状の構造を形成することが知られている。そこで BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントが線維構造を形成するか、透過型電子顕微鏡で観察を行った。その結果、BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントを PBS に希釈して 37 でインキュベートすることで幅 10 μm の線維状構造を形成していた。この際見られた線維はそれぞれが接触して束状の構造を形成しているものの絡み合っておらず、線維が絡まって形成されるアミロイド 由来線維とは異なる構造を有していた。以上のことから、BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントは疎水性が高く凝集し、線維構造を形成することが分かった。

BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントのアミロイド 線維形成促進作用；神経変性疾患の原因物質であるアミロイド などの凝集タンパク質について、アミロイド₁₋₄₂ などの凝集性の高い分子種が凝集して核となることでアミロイド₁₋₄₀ などの低凝集性の分子種の線維形成を促進することが報告されている。そこで BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントがアミロイド₁₋₄₀ の凝集を促進するか検討した。単独では線維を形成しない 5 μM のアミロイド₁₋₄₀ に 0.15 μM の BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントを添加して 37 でインキュベートするとアミロイド線維を形成していることから、BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントがアミロイド₁₋₄₀ の線維形成を促進することが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Matsuhisa K, Saito A*, Asada R, Kanemoto S, Kaneko M, Imaizumi K*: The physiological roles of ER stress transducer BBF2H7/CREB3L2 and its

potential as a target of disease therapy.
Medical Research Archives, 4(4), 2016.(査
読有)

〔学会発表〕(計2件)

1. 松久幸司, 齋藤敦, 今泉和則: 小胞体
ストレス依存的に産生される小胞体スト
レスセンサーBBF2H7 由来小ペプチドの物性
と動態解析. 第18回 ORIGIN 神経科学研究
会 2017, 2017年.

2. Koji Matsuhisa, Atsushi Saito, Yosuke
Ohtake, Kanta Yanagida, Masayasu Okochi,
Masaki Matsumoto, Keiichi Nakayama,
Kazunori Imaizumi: ER stress-dependent
production of small peptides derived
from ER stress sensors in neuronal cells.
第60回神経化学会大会, 2017年.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: ペプチド、それを含む小胞体ストレス
マーカー及びそれを用いた小胞体ストレ
スの測定方法

発明者: 今泉和則, 齋藤敦, 松久幸司

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2017-150714

出願年月日: 平成 29 年 8 月 3 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松久 幸司 (MATSUHISA, Koji)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・寄
附講座助教

研究者番号: 60735299