

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07359

研究課題名（和文）小胞体ストレスセンサーPERKの活性化によるリン酸化を介したHMGB1の分泌機構

研究課題名（英文）Mechanism of HMGB1 secretion via phosphorylation by the endoplasmic reticulum stress sensor PERK

研究代表者

谷内 秀輔（Taniuchi, Shusuke）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：80747014

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：我々は小胞体ストレスセンサーPERKの新たなリン酸化基質として敗血症の重要な炎症性メディエーターであるHMGB1を同定し、LPS投与したRAW264.7細胞でPERKHMB1の分泌を制御することを見出している。しかし、生体内でもPERKがHMGB1分泌を制御するか、およびPERKのHMGB1分泌制御機構は不明である。本研究では、LPSを投与したPerk KOマウスでHMGB1血中濃度が野生型と比べて増加することを見出し、PERKが生体内でもHMGB1分泌を制御することを示した。また、HMGB1リン酸化で相互作用が変化するタンパク質を同定し、PERKによるHMGB1分泌の分子機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HMGB1は敗血症ショック死において過剰なサイトカインの産生、分泌を促進する「死のメディエーター」として機能する。そのため、HMGB1の分泌機構を解明することは敗血症の病態をより詳しく理解し、新たな治療方法を開発するために重要である。本研究で得られたPERKによるHMGB1のリン酸化を介した分泌制御機構の解明は、新たにPERKが敗血症の治療標的と成り得ることを示した。細胞毒性の低いPERK活性化剤が見つければ、敗血症の治療戦略に新たな選択肢を提供可能である。

研究成果の概要（英文）：We have already identified HMGB1, an important inflammatory mediator of sepsis, as a novel phosphorylation substrate of the endoplasmic reticulum stress sensor PERK and found that HMGB1 secretion is regulated by PERK in LPS-treated RAW264.7 cells. However, whether PERK regulates HMGB1 secretion in vivo and the molecular mechanism of regulation of HMGB1 secretion by PERK are still unknown. In this study, we found that blood levels of HMGB1 were increased in the LPS-treated Perk KO mice compared to wild-type mice, indicating that PERK also regulates HMGB1 secretion in vivo. We also identified proteins whose interactions are altered by HMGB1 phosphorylation as the molecular mechanism for the regulation of HMGB1 secretion by PERK.

研究分野：病態医科学

キーワード：PERK HMGB1 HMGB2 小胞体ストレス 小胞体ストレス応答 敗血症 リン酸化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 小胞体ストレスとは小胞体内に折り畳み不全タンパク質が蓄積された状態である。小胞体ストレスを解消するために全ての細胞には小胞体ストレス応答と呼ばれる折り畳み不全タンパク質除去機構が存在する。小胞体ストレスセンサーPERKは翻訳開始因子eIF2 α をリン酸化し、包括的な翻訳抑制と転写因子ATF4の翻訳促進を介した小胞体シャペロンの転写誘導などの小胞体内の折り畳み不全タンパク質を除去するストレス応答を担う。PERKは創薬標的にもなっており、今までにPERK阻害剤(GSK2606414)やPERK活性化剤(CCT020312)などが報告されている。

(2) HMGB1は核内に存在するタンパクであり、ヒストンの安定化や転写調節に関与する。その一方で、敗血症において、マクロファージなどの免疫細胞で、HMGB1はLPSなどの内毒素の刺激によって核外に移行し、分泌性リソソームを介して分泌される。分泌されたHMGB1はアラミンとして全身性の炎症反応を誘導する。このHMGB1による炎症反応の誘導が過剰になると敗血症性ショックで死亡することから、HMGB1は「死のメディエーター」として知られ、その分泌抑制は治療に結びつくと考えられている。

(3) 研究代表者らは、PERKにeIF2 α 以外のリン酸化基質が存在する可能性を検討した結果、PERKがHMGB1の35番目のセリン残基を直接リン酸化することを明らかにした。LPS刺激がHMGB1の分泌を促進することと、LPS刺激がサイトカインの産生誘導などで小胞体ストレスを起こすことから、PERKによるHMGB1のリン酸化で分泌が調節される可能性を検討した。LPS刺激によるHMGB1分泌モデルとしてよく使われるマウスマクロファージ由来のRAW264.7細胞にLPSとPERK阻害剤を同時投与した。その結果、PERK阻害剤投与時のHMGB1の分泌量が増加した。同様に、ゲノム編集でPerk遺伝子を破壊した細胞でもHMGB1分泌量が増加した。一方、細胞に傷害を与えずにPERK経路を活性化可能なPERKキナーゼドメイン融合タンパク質であるFv2E-PERK発現細胞でPERKの活性化と同時にLPS投与をすると、LPS単独処理よりもHMGB1の分泌量が減少した。さらに、Ser35をアスパラギン酸やグルタミン酸に置換したリン酸化ミミック(S35D、S35E)とアラニンに置換した非リン酸化ミミック(S35A)変異体を過剰発現させたRAW264.7細胞を樹立して分泌を調べた。その結果、非リン酸化ミミック変異体では分泌量が増加した一方、リン酸化ミミック変異体では分泌量が減少した。これらの結果より、PERKがHMGB1のSer35のリン酸化状態を制御することでHMGB1の分泌を調節することを見出している。

2. 研究の目的

本研究では、敗血症の病態でPERKがHMGB1のリン酸化を行う生理的意義を明らかにすることを目的とし、①PERKによるHMGB1のリン酸化を介した分泌調節が生体内でも観察されるかを検証すると共に、②HMGB1のリン酸化に依存して相互作用が変化する因子を同定することでPERKによるHMGB1分泌調節の分子機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) PERK KO マウスにおける血中 HMGB1 濃度の測定

Perk^{-/-}新生仔マウスの皮下に100 mg/kg LPSを投与し、7時間後に断頭によって血液を採取後、血中HMGB1濃度をELISAで測定した。

(2) RAW264.7 細胞の PERK 活性化剤処理

RAW264.7細胞にPERK活性化剤(CCT020312)を投与し、内在性PERKの活性化条件をウエスタンブロットで解析した。条件を決定後、LPSとCCT020312の同時投与を24時間行った。

(3) HMGB1 のリン酸化で相互作用が変化するタンパク質の同定と分泌への関与の解析

① HEK293T細胞にHMGB1のC末端側にmEGFPを融合した発現ベクターを一過性に遺伝子導入した。細胞から総タンパク質を回収し、GFP-Trap agaroseで免疫沈降後、LC-MS/MS解析を行うことでHMGB1のリン酸化ミミック変異体と非リン酸化ミミック変異体との間で結合能が変化したタンパク質を同定した。

② 同定したタンパク質をコードする遺伝子をRAW264.7細胞でCRISPR/Cas9システムを用いて破壊したクローン細胞を樹立した。樹立した細胞に5 μ g/ml LPSを24時間投与した後に、回収した上清をTCA沈殿法で濃縮してウエスタンブロット解析を行った。

4. 研究成果

(1) 培養細胞における敗血症モデルと同様に、生体内で PERK による HMGB1 分泌制御の可能性を検証するため、*Perk*^{-/-}新生仔マウスに LPS を投与後、血中 HMGB1 濃度の測定を行った。その結果、*Perk*^{-/-}マウスで LPS 投与後の血中 HMGB1 濃度が、野生型マウスと比較して有意に増加した (図 1)。

(2) *Perk*^{-/-}マウスの解析から生体内でも HMGB1 の分泌が PERK によって制御されることが示されたため、敗血症の新たな治療方法として PERK 活性化剤の投与が有効である可能性がある。そこで、既存の PERK 活性化剤である CCT020312 を RAW264.7 細胞に投与した。PERK と eIF2 α のリン酸化が観察された薬剤濃度では、長時間処理によって明らかに細胞死が増加した。この結果は PERK 活性化剤単独および LPS との同時投与のいずれにおいても観察され、PERK 活性化剤自体が強い細胞毒性をもつことが示唆された。そのため、本来予定していた敗血症モデルマウスへの PERK 活性化剤の投与は中止した。今後、より毒性の少ない PERK 活性化剤の探索が必要である。

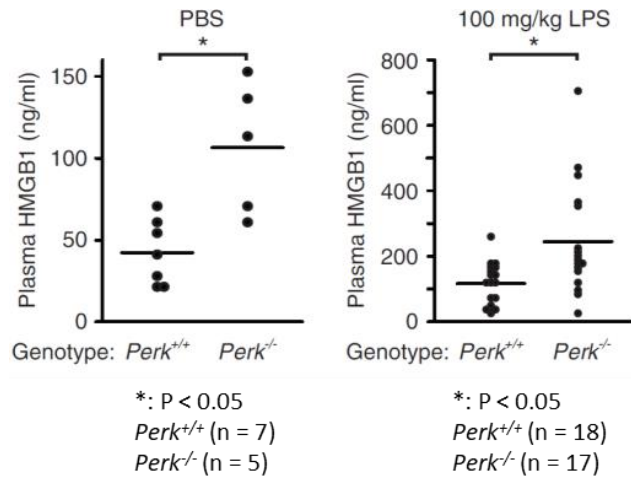


図 1. *Perk*^{-/-}新生仔マウスの血中 HMGB1 濃度

(3) PERK によるリン酸化がどのような分子機構で HMGB1 の分泌を制御するかを明らかにするため、HMGB1 の Ser35 リン酸化ミミック変異体と非リン酸化ミミック変異体との間で相互作用が変化するタンパク質を網羅的に探索した結果、3 種類のタンパク質 A、B、C を同定した (図 2)。これらのタンパク質は複合体を形成し、タンパク質 B と C については HMGB1 と同様に核から細胞質への移行をすることが知られる。

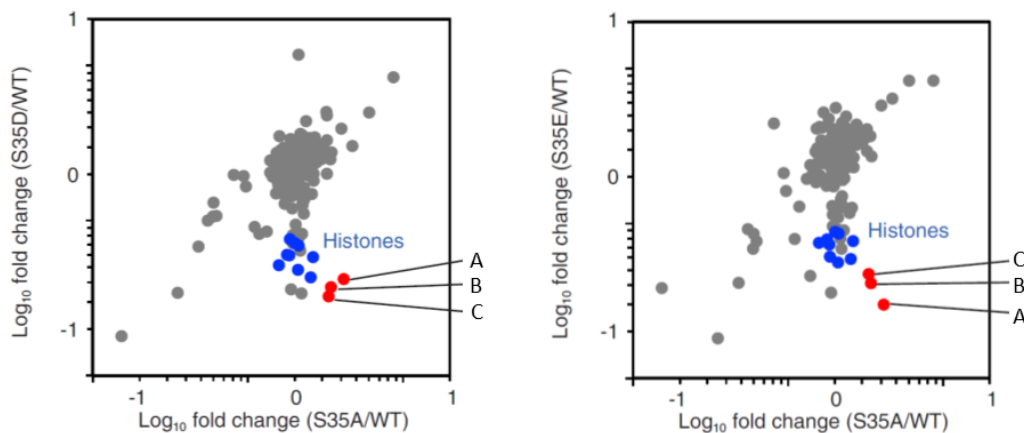


図 2. HMGB1 の Ser35 リン酸化ミミックと非リン酸化ミミックで結合が変化するタンパク質

RAW264.7 細胞において、これら 3 種類のタンパク質をコードする遺伝子の破壊を試みたが、細胞の生存に必須の遺伝子と考えられるため、完全な破壊はできなかった。しかし、タンパク質 B をコードする遺伝子 B においてフレームシフト変異とインフレーム変異を含む細胞クローンを得ることができたので、ノックダウン細胞株として解析を進めた。これらの細胞クローンは、タンパク質 B の発現低下に加えて、タンパク質 A および C の発現低下も観察された (図 3)。

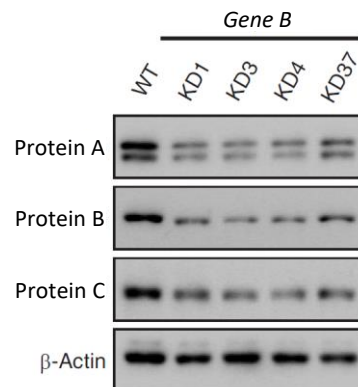


図 3. RAW264.7 細胞における遺伝子 B のゲノム編集

樹立した遺伝子 B のノックダウン細胞に LPS を投与した結果、HMGB1 の分泌量が減少していた。HMGB1 のパラログであり、HMGB1 と同様に PERK で Ser35 がリン酸化される HMGB2 についても同様の結果が得られた (図 4)。

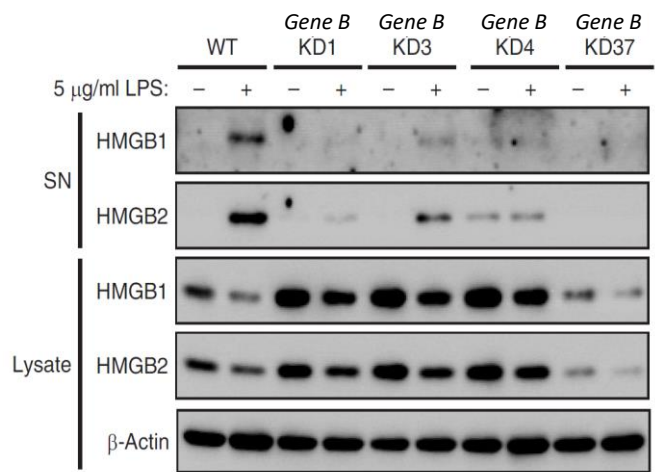


図 4. 遺伝子 B をゲノム編集で破壊した RAW264.7 細胞における HMGB1 と HMGB2 の分泌

以上の結果より、培養細胞と同様に生体内でも HMGB1 の分泌に PERK が関与することと、新規に同定した HMGB1 のリン酸化で相互作用が変化する 3 種類のタンパク質が HMGB1 分泌に関わる新たな因子であることを明らかにした。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 谷内秀輔、小迫英尊、津川和江、親泊美帆、中山 恒、親泊政一
2 . 発表標題 小胞体ストレスセンサーPERKの活性化によるリン酸化を介したHMGB1の分泌機構
3 . 学会等名 第16日本臨床ストレス応答学会大会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 谷内秀輔、中山 恒
2 . 発表標題 低酸素環境で誘導される小胞体ストレス応答のタンパク質分解 による制御機構
3 . 学会等名 第95回日本生化学会大会
4 . 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------