

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21578

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特性解析と神経変性疾患への関与解明

研究課題名（英文）Characterization of small peptides produced by endoplasmic reticulum stress and their involvement in neurodegenerative disorder

研究代表者

今泉 和則（Imaizumi, Kazunori）

広島大学・医系科学研究科（医）・教授

研究者番号：90332767

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：小胞体ストレストランスデューサーBBF2H7から産生される小ペプチド断片（BSPフラグメント）が強固な凝集体を形成すること、BSPフラグメントがアルツハイマー病の原因物質であるアミロイド1-40タンパクの凝集を促進して神経細胞毒性を増強することを明らかにした。アルツハイマー病患者脳サンプルを使ってBSPの発現レベルの違いを検討したが、正常脳サンプルとの間に差がなく、病態形成への関与を裏付ける根拠は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体ストレスは神経変性疾患や糖尿病をはじめとする様々な疾患の発症、病態形成に関与していると信じられている。しかし小胞体ストレスがin vivoにおいて疾患発症に寄与していることを証明した研究は見当たらない。本研究課題からBSPフラグメントがin vivoでの小胞体ストレスのマーカーになり得る生化学特徴を有することが証明され、疾患発症と小胞体ストレスの関連性解明に向けて前進した。今後はBSP検出系をさらに充実させ、高感度にBSPをin vivoで検出するシステムを構築する必要がある。

研究成果の概要（英文）：We found that BBF2H7-derived small peptide fragments (BSP fragments) have a high aggregation propensity and forms heat-stable aggregates. Moreover, We have shown that BSP fragments promote forming amyloid fibrils and neurotoxicity of amyloid 1-40. The difference in the expression level of BSP was examined using brain samples of normal and Alzheimer's patients, but there was no difference in these samples, and there was no basis to support the involvement of BSP fragments in pathogenesis of Alzheimer's disease.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体ストレス 分子マーカー 神経変性疾患 ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

虚血、酸化ストレス、感染などの様々な異常環境に細胞が曝されると、小胞体機能が破綻し小胞体内に不完全なタンパク質が大量に生み出される(小胞体ストレス)。小胞体ストレスは神経変性疾患発症への関与が以前から指摘されてきたが、具体的な根拠に乏しい。それを解く鍵は、in vivo で小胞体ストレスを検出できるツールの開発と、病態形成における小胞体ストレスの重要性を明確にすることにある。

2. 研究の目的

申請者は小胞体ストレスセンサーの活性化時に産生される小ペプチド(小胞体マイクロフラグメント、BSPフラグメント)を発見した。この小ペプチドは疎水性に富み、構造的に凝集しやすい特徴を有する。そこで本研究課題では、BSPの凝集性や細胞毒性の詳細を調べ、神経変性疾患の病態形成への関連性を調べる。またBSPの生体における小胞体ストレスのマーカーとしての可能性を探る。

3. 研究の方法

(1)BSPフラグメント特異的抗体の作製;BSPフラグメントの一部配列を基に作成した合成ペプチド(小胞体ストレストランスデューサーBBF2H7の398番目から426番目のアミノ酸から成る)をウサギに免疫し、回収した血清から前記の合成ペプチドを固定したカラムを用いてBSPフラグメント特異的抗体を精製した。

(2)BSPフラグメントの凝集性解析;BSPフラグメントのアミノ酸配列を基に人工的に合成したペプチド(ペプチド研究所)を100 μ MとなるようにPBS中に溶解し、37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートした。その後サンプルに2-メルカプトエタノールを含まないあるいは添加したLaemmli SDSサンプルバッファーを混合し室温あるいは100 $^{\circ}$ Cで5分加熱して調製したものをウエスタンブロットにより解析し、バンドの分子量からBSPフラグメントの凝集性を調べた。

(3)BSPフラグメントのアミロイド $_{1-40}$ タンパク(A $_{1-40}$)凝集促進活性および神経細胞毒性促進活性の評価;A $_{1-40}$ (ペプチド研究所)単独またはA $_{1-40}$ とBSPフラグメントまたはアペリン-36(Cayman chemical company)を50mMリン酸カルシウム緩衝液(pH7.4)中で混合し37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートしたものを遠心し、得られた沈殿物を透過型電子顕微鏡により観察することでアミロイド線維の形成を解析した。また37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートした各種ペプチドの混合物をヒト神経芽細胞腫SK-N-SH細胞に添加し、48時間培養後の細胞を位相差顕微鏡により観察して細胞毒性を評価した。この時、細胞数を計数することで溶媒処理と比較した場合の細胞生存率を算出した。

(4)アルツハイマー病脳におけるBSPフラグメントの発現解析;アルツハイマー病患者(Braak stage V~VI)または非アルツハイマー病患者の死後脳の凍結組織50mg(日本ブレインバンクネットより提供)をRIPAバッファー中でホモジナイズし、タンパク質を抽出した。抽出したサンプルにBSPフラグメント認識抗体とProtein Gアガロースビーズを添加して4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベート後、遠心して回収したビーズをRIPAバッファーで3回洗浄することでBSPフラグメントの免疫沈降を行った。その後、免疫沈降物に含まれるBSPフラグメントをウエスタンブロットにより検出した。

(5)アルツハイマー病脳におけるBSPフラグメントの局在解析;アルツハイマー病患者または非アルツハイマー病患者の死後脳から作製したパラフィン切片(医療法人さわらび会福祉村病院・長寿医学研究所)を脱パラフィン処理後、1次抗体としてBSPフラグメント抗体、2次抗体としてHRP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体を用いて免疫染色を実施し、顕微鏡によりBSPフラグメントの組織内局在を観察した。

4. 研究成果

(1)BSPフラグメントの凝集性解析;溶解したBSPフラグメントを非還元、非加熱条件でウエスタンブロットにより解析したところ、2量体や3量体を形成していた(図1)。37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートすると4量体やそれ以上の多量体が検出され、BSPフラグメントが凝集している様子が観察された。インキュベートしていないBSPフラグメントを還元条件あるいは還元・加熱条件で泳動すると非還元・非加熱条件で見られた3量体以上のバンドは消失し2量体についても大きく減少した。一方、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートしたものでは還元剤による還元処理や100 $^{\circ}$ Cの加熱を行っても2量体や3量体、4量体のバンドが残存した。これらの結果から、BSPフラグメントは37 $^{\circ}$ Cでインキュベートを行うことで強固な凝集体を形成すること

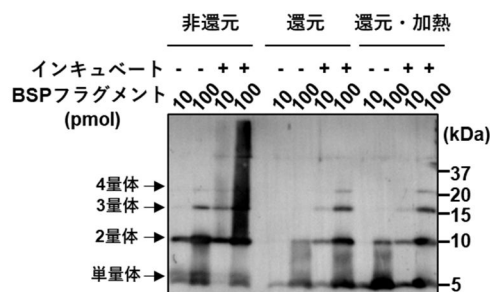


図1 BSPフラグメントの凝集性

が分かった。

(2) BSP フラグメントの A₁₋₄₀ 凝集促進活性の評価；A₁₋₄₀ の凝集について、凝集性の高い分子種である A₁₋₄₂ が核となって低凝集性の A₁₋₄₀ の凝集を促進すると言われている。これまでの研究で BSP フラグメントが単体で凝集してアミロイド線維様の線維構造を形成することが分かっている。そこで、BSP フラグメントが A₁₋₄₂ と同様に凝集核となって A₁₋₄₀ の凝集を促進する活性を有するか解析した。A₁₋₄₀ 5 μM、A₁₋₄₂ 0.3 μM、BSP フラグメント 0.3 μM をそれぞれ単独でインキュベートしてもアミロイド線維を形成しない(図2)。A₁₋₄₀ 5 μM に A₁₋₄₂ を 0.3 μM 添加すると他のグループの報告と同様に A₁₋₄₀ の凝集が促進されて線維状の構造を形成した。A₁₋₄₀ 5 μM に対して BSP フラグメントを 0.3 μM 添加すると同様に線維状の構造が観察された。親水性ペプチドであるアペリン-36

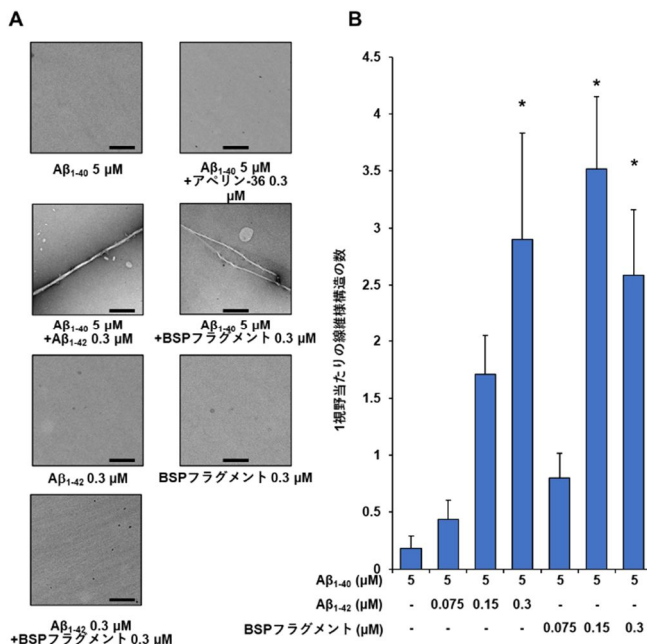


図2 BSP フラグメントの A₁₋₄₀ 凝集促進活性

ではこのような効果が見られなかったことから、BSP フラグメントが A₁₋₄₀ の凝集、アミロイド線維形成を促進することが明らかになった。

(3) BSP フラグメントの A₁₋₄₀ 細胞毒性促進活性の評価；A₁₋₄₂ は A₁₋₄₀ の凝集を促進するとともにその神経細胞毒性をも増強することが知られている。そこで、

BSP フラグメントが A₁₋₄₀ の凝集を促進することでその神経細胞毒性に与える影響をヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞を用いて予め 37 °C で 24 時間インキュベートした A₁₋₄₀、A₁₋₄₂、BSP フラグメントまたはアペリン-36 を添加して解析した。アミロイド A₁₋₄₀ 5 μM 単独処理では細胞の形態に変化は見られなかった(図3)。A₁₋₄₂ 0.15 μM 単独では細胞にわずかな毒性を示していたが、A₁₋₄₀ 5 μM と混合して処理することで細胞毒性が増強した。BSP フラグメント 0.15 μM の単独処理では溶媒処理と比較して細胞の形態や細胞数に変化は無く毒性が認められなかったのに対して、A₁₋₄₀ 5 μM に混合してインキュベートしたものを添加した細胞では細胞が強く萎縮するとともに細胞数が溶媒を処理した細胞の約 20% まで減少した。一方で親水性ペプチドであるアペリン-36 0.3 μM を A₁₋₄₀ に混合した場合は細胞毒性を示さなかった。以上の結果から、BSP フラグメントは A₁₋₄₀ の神経細胞毒性を増強することが明らかとなった。

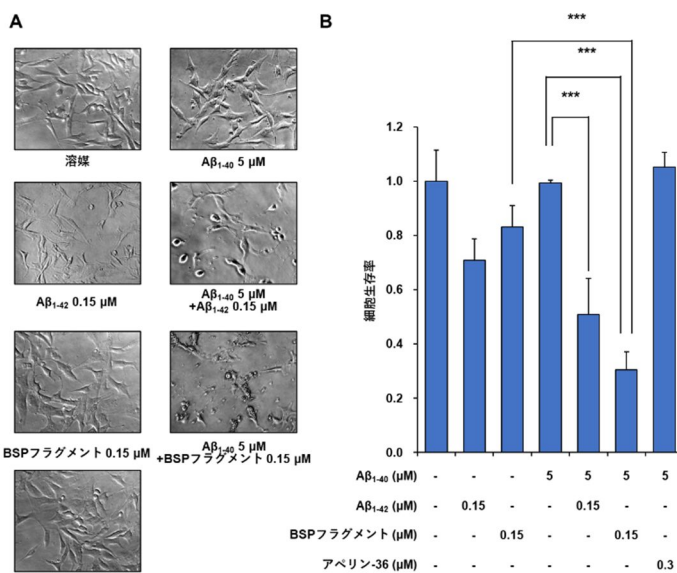


図3 BSP フラグメントの A₁₋₄₀ 神経細胞毒性促進活性

(4) アルツハイマー病脳における BSP フラグメントの産生・局在解析；アルツハイマー病では小胞体ストレスマーカーである BiP やリン酸化 PERK、リン酸化 IRE1、リン酸化 eIF2 が増加していることからアルツハイマー病の発症に小胞体ストレスが関係していることが示唆されている。また、BSP の前駆体タンパク質である BBF2H7 は脳の神経細胞に強く発現している。これらのことから、アルツハイマー病発症過程において脳内で小胞体ストレスが生じることで BBF2H7 が膜内切断を受けるとともに BSP フラグメントが産生されると考えられる。そこで、この際に生じた BSP フラグメントが神経毒性を発揮することでアルツハイマー病の発症に寄与しているのではないかと仮説を立て、当該疾患死後脳における BSP フラグメントの発現と組織内局在を解析した。死後脳における BSP フラグメントの発現を調べるために、BSP フラグメント特異的抗体による免疫沈降により死後脳凍結組織の組織溶解液から回収したタンパク質をウエスタン

プロットにより解析した。その結果、アルツハイマー病患者、非疾患患者の死後脳ともに BSP フラグメントは生化学的手法では検出されなかった。また死後脳における BSP フラグメントの局在を免疫組織染色により検討した結果、アルツハイマー病患者死後脳の組織切片において主に神経細胞の細胞質内に網状に広がったシグナルが認められた。しかしながら非患者死後脳組織においても同様の所見が見られ、両者の間に有意な差は認められなかった。以上の結果から、ヒト脳組織で BSP は発現しているが、病態形成への関与を指摘できる所見は得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kamikawa Yasunao, Imaizumi Kazunori	4. 巻 doi.org/10.1093/jb/mvac012
2. 論文標題 Advances in understanding the mechanisms of repairing damaged nuclear envelop	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvac012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsuhisa Koji, Imaizumi Kazunori	4. 巻 22
2. 論文標題 Loss of Function of Mutant IDS Due to Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation: New Therapeutic Opportunities for Mucopolysaccharidosis Type II	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12227 ~ 12227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222212227	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kamikawa Yasunao, Saito Atsushi, Matsuhisa Koji, Kaneko Masayuki, Asada Rie, Horikoshi Yasunori, Tashiro Satoshi, Imaizumi Kazunori	4. 巻 7
2. 論文標題 OASIS/CREB3L1 is a factor that responds to nuclear envelope stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41420-021-00540-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsuhisa Koji, Cai Longjie, Saito Atsushi, Sakaue Fumika, Kamikawa Yasunao, Fujiwara Sachiko, Asada Rie, Kudo Yukitsuka, Imaizumi Kazunori	4. 巻 1749
2. 論文標題 Toxic effects of endoplasmic reticulum stress transducer BBF2H7-derived small peptide fragments on neuronal cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 147139 ~ 147139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2020.147139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Okamoto Takumi, Imaizumi Kazunori, Kaneko Masayuki	4. 巻 21
2. 論文標題 The Role of Tissue-Specific Ubiquitin Ligases, RNF183, RNF186, RNF182 and RNF152, in Disease and Biological Function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3921 ~ 3921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21113921	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Ayaha, Morioki Hitomi, Nakae Takafumi, Miyake Yoshiaki, Harada Takeo, Noda Shunsuke, Mitsuoka Sayuri, Matsumoto Kotaro, Tomimatsu Masashi, Kanemoto Soshi, Tanaka Shota, Maeda Makiko, Conway Simon J., Imaizumi Kazunori, Fujio Yasushi, Obana Masanori	4. 巻 35
2. 論文標題 Transcription factor old astrocyte specifically induced substance is a novel regulator of kidney fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001820R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 齋藤敦, 山下真弘, 今泉和則
2. 発表標題 小胞体膜局在転写因子BBF2H7による褐色脂肪細胞の機能制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今泉和則
2. 発表標題 神経化学研究について
3. 学会等名 第14回神経化学の若手研究者育成セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今泉和則
2. 発表標題 小胞体および核膜のストレス応答機構と生理・病態制御
3. 学会等名 Cardiology Research & Clinical seminar (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤敦、上川泰直、今泉和則
2. 発表標題 小胞体膜貫通型転写因子OASISを介した核膜ストレス応答シグナルによる細胞老化と癌化制御
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今泉和則
2. 発表標題 細胞ストレスに対する小胞体機能変化の解析
3. 学会等名 第2回 放射線災害・医科学研究拠点 ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今泉和則
2. 発表標題 小胞体マイクロフラグメント解析による疾患病態の理解と臨床応用
3. 学会等名 公益財団法人 住友電工グループ社会貢献基金 2020年度大学講座寄付、学術・研究助成贈呈式 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松久幸司、齋藤敦、今泉和則
2. 発表標題 希少疾患原因遺伝子産物のERAD回避による機能回復と疾患治療薬の探索
3. 学会等名 オルガネラ疾患研究拠点第1回ミーティング
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今泉和則、齋藤敦、上川泰直、松久幸司、金子雅幸
2. 発表標題 核膜ストレスと細胞老化、癌化の制御
3. 学会等名 2020年度 新学術領域「オルガネラゾーン」Zoom班会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上川泰直、齋藤敦、松久幸司、金子雅幸、今泉和則
2. 発表標題 小胞体膜貫通型転写因子OASISによる核膜ストレス応答機構解明
3. 学会等名 新学術領域研究 第3回オルガネラ・ゾーン若手の会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾花理徳、三宅芳明、山本彩葉、田中翔大、前田真貴子、今泉和則、浅沼克彦、藤尾慈
2. 発表標題 ポドサイトにおける転写因子Old Astrocyte Specifically Induced Substance (OASIS) の欠損は、Protein Kinase C Iotaを介して LPSIによる尿細管傷害を抑制する
3. 学会等名 第30回日本循環薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金子雅幸、岡元拓海、今泉和則
2. 発表標題 高浸透圧により誘導されるユビキチンリガーゼRNF183はNKCC1をライソソームで分解する
3. 学会等名 第73回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiaki Miyake, Masanori Obana, Ayaha Yamamoto, Takeo Harada, Takafumi Nakae, Shunsuke Noda, Sayuri Mitsuoka, Koki Tanaka, Shota Tanaka, Makiko Maeda, Kazunori Imaizumi, Katsuhiko Asanuma, Yasushi Fujio
2. 発表標題 OASIS in podocytes promoted tubular injury by suppressing PRKCI expression
3. 学会等名 American Society of Nephrology (ASN) Kidney Week 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今泉和則
2. 発表標題 核膜ストレスに応答する小胞体膜貫通型転写因子OASISの細胞老化における役割
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤敦、今泉和則
2. 発表標題 小胞体膜貫通型転写因子OASISによる細胞老化と癌化制御
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上川泰直、松久幸司、齋藤敦、今泉和則
2. 発表標題 核膜ストレスに応答して活性化する小胞体膜貫通型転写因子OASISの機能解明
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡元拓海、呉艶、今泉和則、金子雅幸
2. 発表標題 腎特異的ユビキチンリガーゼRNF183はNKCC1をユビキチン化することで分解を促進する
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Saito, Sachiko Fujiwara, Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Toyomasa Katagiri, Kazunori Imaizumi
2. 発表標題 Regulations of senescence in glioblastoma and tumorigenesis mediated by ER-resident transcription factor OASIS
3. 学会等名 第63回日本神経化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 OASIS遺伝子の脱メチル化のための核酸及びそれを用いた脱メチル化方法	発明者 今泉和則、齋藤敦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/018886	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------