

研究結果報告書

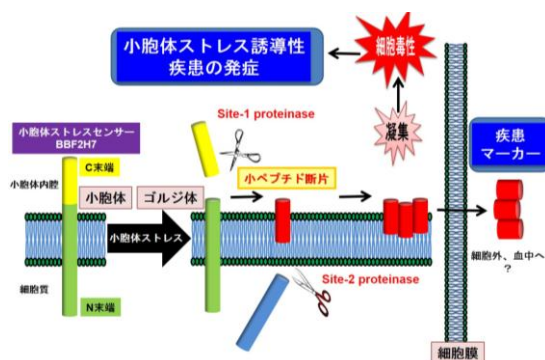
<研究課題> 小胞体ストレス依存的に産生される小ペプチド断片の 制御による包括的疾患治療法開発

代表研究者 広島大学大学院 医歯薬保健学研究科
ストレス分子動態学・寄附講座准教授
齋藤 敦

<まとめ>

小胞体ストレスセンサーBBF2H7 は 1. 研究の目的
小胞体ストレスに応答して site-1 proteinase(S1P) および site-2 proteinase(S2P)による 2 段階切断を受ける。その際に 2 カ所の切断部位に挟まれた部位に相当する小ペプチドが産生される(図)。この小ペプチド断片は S2P による少なくとも 3 カ所以上の膜内切断を受けて産生され、主要なものは 45 個のアミノ酸が切り出されたものだった。この小ペプチドは高い凝集性を示し、fibril 様構造を形成することがわかった。

1-1:BBF2H7 由来小ペプチド断片の段階的な切断部位を特定し、小ペプチド断片のアミノ酸配列を決定する。1-2:産生された小ペプチド断片の物性ならびに生理的意義を明らかにする。以上二点を踏まえ、小胞体ストレス依存的に産生される小ペプチド断片と、小胞体ストレスが関わる神経変性疾患をはじめとする様々な疾患の発症や病態形成との関連を明らかにすることを目指す。



2. 研究方法と経過

2-1: 研究方法

[細胞培養]

ヒト胎児腎がん由来細胞 HEK293T 細胞もしくは S2P 欠損 CHO 細胞(M19 細胞)を培養して使用した。小胞体ストレスを負荷するために、細胞を thapsigargin(Tg)もしくは A23187 で処

理した。

[遺伝子導入]

BBF2H7、BBF2H7 の N もしくは C 末端に GST を融合したコンストラクト、および BBF2H7 の S1P 認識配列に変異を加えたコンストラクトを挿入した発現プラスミドを、リポ試薬を用いて遺伝子導入した。

[Western blotting]

各種細胞からタンパク質を回収した後、遠心して可溶性画分を採取し、各抗体を用いてタンパク質を検出した。

[LC-MS/MS 解析]

N もしくは C 末端側に GST を融合させた BBF2H7 を HEK293T 細胞に発現させて小胞体ストレスを負荷し、産生された GST 融合 BBF2H7 の N もしくは C 末端断片を回収・精製した後、トリプシン消化して末端配列を LC-MS/MS 解析によって調べた。

[エドマン分解法によるアミノ酸配列解析]

BBF2H7 由来小ペプチド断片を特異的に認識する抗体を用いて免疫沈降を行って小ペプチド断片を回収し、エドマン分解法によるアミノ酸配列の解読を行った。

[電子顕微鏡解析]

BBF2H7 由来小ペプチド断片の凝集性を確認するために、人工的に合成した小ペプチド断片を 37°C でインキュベート後、透過型電子顕微鏡によってその形態を観察した。

2-2 : 経過

BBF2H7 由来小ペプチド断片のアミノ酸配列を同定し、高い凝集性をはじめ

とする物性の一端を明らかにすることが出来た。しかし小ペプチド断片の細胞毒性や疾患発症および病態形成との関連を明確にすることは出来なかった。

3. 研究の成果

3-1 : 細胞内における小ペプチド断片の産生

BBF2H7 の膜貫通領域の直後から S1P 認識サイトの直前までの配列を抗原として抗 BBF2H7 由来小ペプチド断片抗体を作製した。BBF2H7 を発現させた細胞に小胞体ストレス誘導剤である 1 μ M Tg および 0.5 μ M A23187 を添加し、24 時間後に BBF2H7 由来小ペプチド断片の発現量を検討した。小胞体ストレスに応答して BBF2H7 の N 末端断片が増加するとともに小ペプチド断片の産生量も増大していることから、BBF2H7 由来小ペプチド断片は小胞体ストレス依存的に産生されることが示唆された。また、BBF2H7 の S1P 認識配列に変異を加えた変異体コンストラクトを発現させた細胞では小胞体ストレスを負荷しても小ペプチド断片は検出されなかった。S2P 欠損 CHO 細胞 (M19 細胞) に BBF2H7 を発現させて小胞体ストレスを負荷 (1 μ M Tg) すると、S2P を発現させた時のみ小ペプチド断片が検出された。以上の結果から BBF2H7 由来小ペプチド断片は小胞体ストレス依存的に S1P および S2P による切断を介して産生されることが分かった。

3-2 : BBF2H7 由来小ペプチド断片のアミノ酸配列解析

BBFH7 の S1P による切断部位は変異体を用いた解析などから推定されている。しかし S2P による膜内切断部位については未だ解析されていない。そこで BBF2H7 由来小ペプチド断片の詳細なアミノ酸配列を決定するために、S1P による切断部位と S2P による膜内切断部位を明らかにすることを試みた。N 末もしくは C 末端側に GST を融合させた BBF2H7 を HEK293T 細胞に発現させて小胞体ストレスを負荷し、産生された GST 融合 BBF2H7 の N 末もしくは C 末端断片を回収・精製した後、トリプシン消化して末端配列を LC-MS/MS 解析によって調べた。その結果、BBF2H7-GST の C 末端断片における N 末端側は S1P 認識配列の部位で切断されていた (431 番目のイソロイシンの N 末端側)。一方で GST-BBF2H7 の N 末端断片を回収したサンプルでは、C 末端側がトリプシン認識部位とは異なる部位 (380 番目のロイシンおよび 381 番目のメチオニンの C 末端側) で切断されたペプチド断片が検出された。さらに抗 BBF2H7 由来小ペプチド断片抗体で免疫沈降して回収・精製した小ペプチド断片の N 末端部位の配列をエドマン分解法で解析すると、CFAVA というアミノ酸配列が検出された。この配列は BBF2H7 の 386 番目のシステインから 390 番目のアラニンまでの配列と一致する。まとめると、BBF2H7 由来小ペプチド断片は S2P による少なくとも 3 カ所以上の切断を受けて産生されることと、主要な BBF2H7 由来小ペプチド断片は BBF2H7 の 386 番目から 430 番目に存在する 45 個のアミノ酸が切り出されたペプチド断片であることが分かった。

3-3: BBF2H7 由来小ペプチド断片の凝集性解析

同定した BBF2H7 由来小ペプチド断片の配列を基に Kyte-Doolittle plot による疎水性予測を行った結果、BBF2H7 由来小ペプチド断片の N 末端側は非常に高い疎水性を持つことが分かった。また、BBF2H7 を強制発現させた HEK293T 細胞に小胞体ストレスを負荷すると二量体化した小ペプチド断片が検出されたことから、小ペプチド断片は高い凝集性を持つことが推察された。さらに人工的に合成した BBF2H7 由来小ペプチド断片を 37°C でインキュベート後、透過型電子顕微鏡によってその形態を観察した。その結果、時間経過にしたがって小ペプチド断片は fibril 様構造を形成した。以上の結果から、BBF2H7 由来小ペプチド断片は高い凝集性を有しており fibril 状の凝集体を形成することが明らかになった。

4. 今後の課題

BBF2H7 由来小ペプチド断片は小胞体ストレスセンサー BBF2H7 が小胞体ストレス依存的に S1P および S2P によって切断されることで産生されることを見出した。この小ペプチド断片は高い凝集性を有する可能性が示唆された。決定した BBF2H7 由来小ペプチド断片のアミノ酸配列を元に作成した合成ペプチドを用いて、その凝集性および細胞毒性、疾患発症との関連性をさらに詳細に調べる予定である。

小ペプチド断片は 2 段階の膜内切断を経て産生されるが、生成後の細胞内動態や分解経路などは未だ不明な点が多い。既知の凝集性タンパク質は細胞のみならず細胞外にも凝集・蓄積するものが複数知られている。このことから小ペプチド断片の細胞外分泌あるいはその動態について検証することは重要な課題である。今後は小ペプチド断片の細胞外分泌の有無を明確にする必要がある。また、小ペプチド断片の分解機構が破綻することで、小ペプチド断片が細胞内外に蓄積することが促進される可能性がある。したがって、小ペプチド断片の局在・分解経路をはじめとする細胞内動態および代謝経路を明らかにすることも必須の課題である。

5. 研究成果の公表方法

本研究成果をまとめ、現在学術雑誌に投稿中である。また、国内外の学会および研究会などにおいて、本研究成果をすでに報告している。