41　小胞体マイクロフラグメント制御による疾患治療法開発	齋藤　敦

【目的】変異タンパク質の発現やカルシウムイオンの恒常性破綻によって小胞体の機能に異常をきたすと小胞体内腔に折りたたみ不全タンパク質が大量に蓄積する（小胞体ストレス）。小胞体ストレスは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密接に関わることが報告されている。小胞体ストレスが発生すると、小胞体ストレスセンサーとして機能するATF6やOASISファミリー（BBF2H7、OASIS、AIbZIP、Luman、CREBH）はsite-1 protease（S1P）およびS2Pによる2段階の膜内切断を受けて活性化し、小胞体ストレスを回避するためのシグナルを発信する。本研究課題では、BBF2H7が小胞体ストレス依存的な2段階の切断を受ける際に産生されると予想される小ペプチド断片（小胞体マイクロフラグメント）の物性ならびに生理的意義を明らかにすることを目的とした。

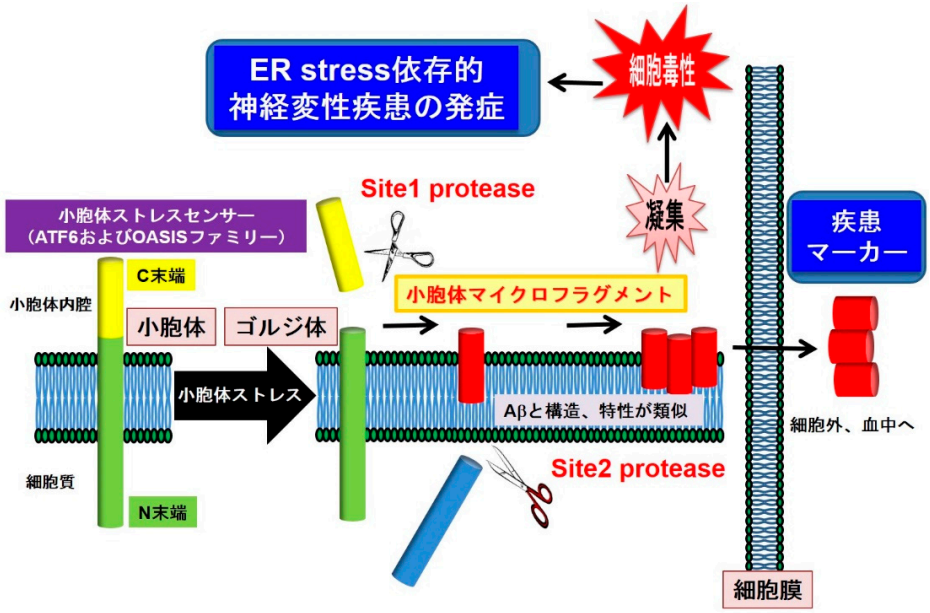
【方法】BBF2H7 もしくは BBF2H7 の S1P 認識配列に変異を加えたコンストラクトを挿入した発現プラスミドを遺伝子導入したヒト胎児腎がん由来細胞 HEK293T 細胞もしくは S2P 欠損 CHO 細胞（M19 細胞）の細胞破砕液を用いて western blotting を行った。

小胞体マイクロフラグメントのアミノ酸配列を決定するために、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。また、小胞体マイクロフラグメントを特異的に認識する抗体を用いて免疫沈降を行ってマイクロフラグメントを回収し、エドマン分解法によるアミノ酸配列の解読を行った。

BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントの凝集性を検討するために、人工的に合成した小胞体マイクロフラグメントを 37℃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。

【結果】BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントは小胞体ストレス依存的に S1P および S2P による段階的な膜内切断を受けて産生されることを見出した。BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントは 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ることと、主要な BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントは 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。このフラグメント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。

小胞体ストレスセンサーの切断と小胞体マイクロフラグメントの産生



41. 小胞体マイクロフラグメント制御による疾患治療法開発

齋藤　敦

広島大学 大学院医歯薬保健学研究院 ストレス分子動態学

Key words：小胞体ストレス，BBF2H7，膜内切断，凝集タンパク質

緒　言

小胞体の働きが破綻すると、折りたたみが不完全なタンパク質が大量に小胞体内に生み出される（小胞体ストレス）［1，2］。小胞体ストレスはアルツハイマー病をはじめとする神経変性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［3，4］。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的実体は未だ不明である。

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。小胞体ストレスが発生すると、小胞体ストレスセンサーはシグナルを発信して小胞体ストレスの緩和と細胞死の回避を試みる［1，2］。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、AIbZIP、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 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 DNA 結合領域を有しており、核内へと移行して標的遺伝子の転写を誘導する［5］。この膜内 2 段階切断の際に、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）が産生されることが予想される。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。実際に小胞体ストレス依存的に産生される BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントを精製して LC-MS/MS 解析ならびにエドマン分解法によってそのアミノ酸配列を確認すると、S1P および S2P 切断部位に挟まれた 45 残基の小ペプチドであることがわかった。同定したアミノ酸配列を元にペプチドを合成すると、高い凝集性を示し、fibril 様構造を形成した。本研究課題で見出した小胞体マイクロフラグメントは、小胞体ストレスと凝集性タンパク質が関連する疾患の病態形成の全貌を解明する糸口となる可能性がある。

方　法

ヒト胎児腎がん由来細胞 HEK293T 細胞に、BBF2H7 もしくは 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（pcDNA3.1）を遺伝子導入した細胞の破砕液を用いて western blotting を行った。小胞体ストレスを付加するために、タプシガルギン（Tg）もしくは A23187 を細胞に添加した。S2P と小胞体マイクロフラグメントの産生との関連を調べるために、S2P 欠損 CHO 細胞（M19 細胞）を用いた。

小胞体マイクロフラグメントのアミノ酸配列を決定するために、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。また、小胞体マイクロフラグメントを特異的に認識する抗体を用いて免疫沈降を行ってマイクロフラグメントを回収し、エドマン分解法によるアミノ酸配列の解読を行った。

BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントの凝集性を検討するために、人工的に合成した小胞体マイクロフラグメントを 37℃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。

結　果

1. 細胞内における小胞体マイクロフラグメントの産生

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 小胞体マイクロフラグメント抗体を作製した。BBF2H7 を発現させた細胞に小胞体ストレス誘導剤である 1 μM Tg および 0.5 μM A23187 を添加し、24 時間後に BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントの発現量を検討した（図 1A)。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胞体マイクロフラグメントの産生量も増大していることから、BBF2H7 小胞体マイクロフラグメント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（BBF2H7 S1P mut）を発現させた細胞では小胞体ストレスを負荷しても小胞体マイクロフラグメント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 μM Tg）すると、S2P を発現させた時のみ小胞体マイクロフラグメントが検出された（図 1B)。以上の結果から BBF2H7 小胞体マイクロフラグメント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。

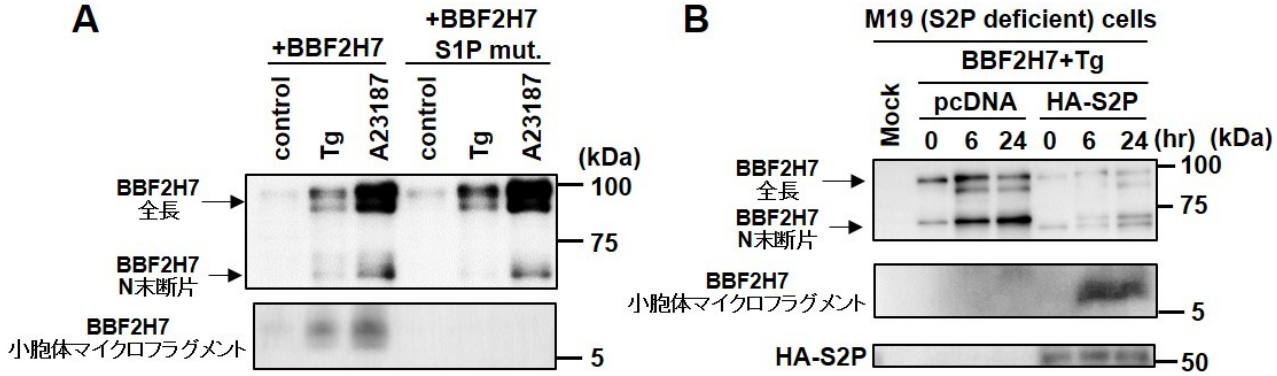


図 1. BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントの産生

（A）HEK293T 細胞に BBF2H7 を発現させた後、1 μM タプシガルギン（Tg）もしくは 0.5 μM A23187 処理により細胞に小胞体ストレスを負荷した。24 時間後に抗 BBF2H7 小胞体マイクロフラグメント抗体で免疫沈降を行った後、抗 BBF2H7 小胞体マイクロフラグメント抗体でブロットして細胞内の BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントを検出した。小胞体マイクロフラグメントは小胞体ストレスに応答して増加していた。野生型 BBF2H7 発現細胞で検出されるバンドが BBF2H7 S1P 認識配列変異体を発現させた細胞では検出されないことから小胞体マイクロフラグメントは S1P による切断依存的に産生されることが分かる。(B) S2P 遺伝子欠損細胞である CHO-M19 細胞に BBF2H7 単独または HA-S2P を同時に発現させた後、1 μM Tg により小胞体ストレスを負荷し、経時的に小胞体マイクロフラグメントを検出した。HA-S2P を発現させた細胞のみバンドが検出されることから、小胞体マイクロフラグメントは S2P による切断依存的に産生されることが分かる。

2. BBF2H7 小胞体マイクロフラグメント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［6]。しかしながら 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 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、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 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（図 2A)。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）（図 2B)。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 小胞体マイクロフラグメント抗体で免疫沈降して回収・精製した BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントの N 末端部位の配列をエドマン分解法で解析すると（図 2C)、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 小胞体マイクロフラグメントは 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 小胞体マイクロフラグメントは 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（図 2D）。

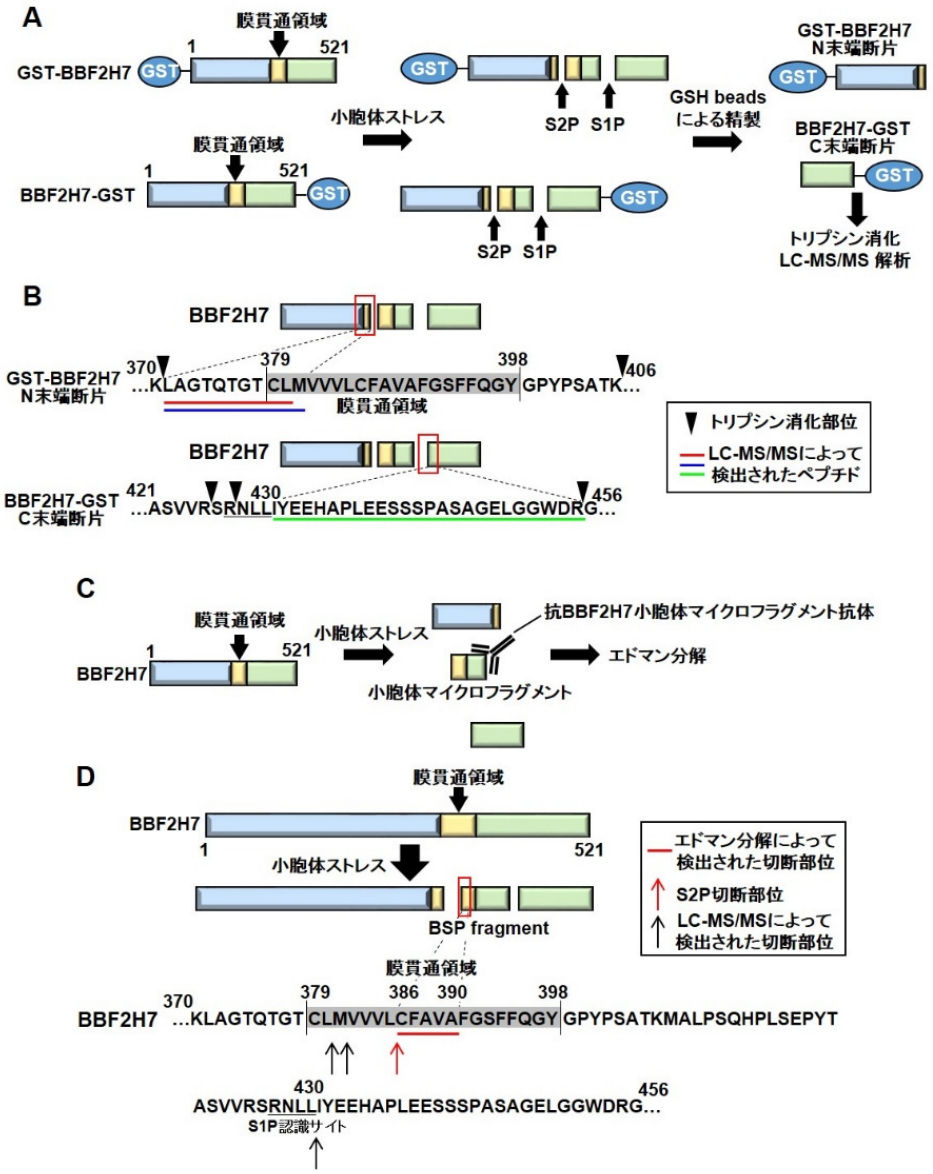


図 2. BBF2H7 の膜内切断部位および小胞体マイクロフラグメントのアミノ酸配列
（A） GST-BBF2H7 もしくは BBF2H7-GST の切断によって産生される各断片の構造と解析法。（B） GST-BBF2H7（上）もしくは BBF2H7-GST（下）がトリプシン切断を受けることで産生すると予想されるペプチドおよび質量分析により検出されたペプチドの配列。（C）エドマン分解による解析法。BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントは抗 BBF2H7 小胞体マイクロフラグメント抗体を用いて免疫沈降法によって回収した。（D）エドマン分解および質量分析から明らかになった BBF2H7 の S1P および S2P 切断部位。BBF2H7 から少なくとも S2P による 3 カ所以上の膜内切断を経て小胞体マイクロフラグメントが産生される。

3. BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントの凝集性

同定した BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントの配列を基に Kyte-Doolittle plot による疎水性予測を行った結果、BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントの N 末端側は非常に高い疎水性を持つことが分かった（図 3A）。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胞体マイクロフラグメントが検出されたことから、小胞体マイクロフラグメントは高い凝集性を持つことが推察された（図 3B）。さらに人工的に合成した BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントを 37℃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（図 3C）。その結果、時間経過にしたがって小胞体マイクロフラグメントは fibril 様構造を形成した。以上の結果から、BBF2H7 小胞体マイクロフラグメント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。

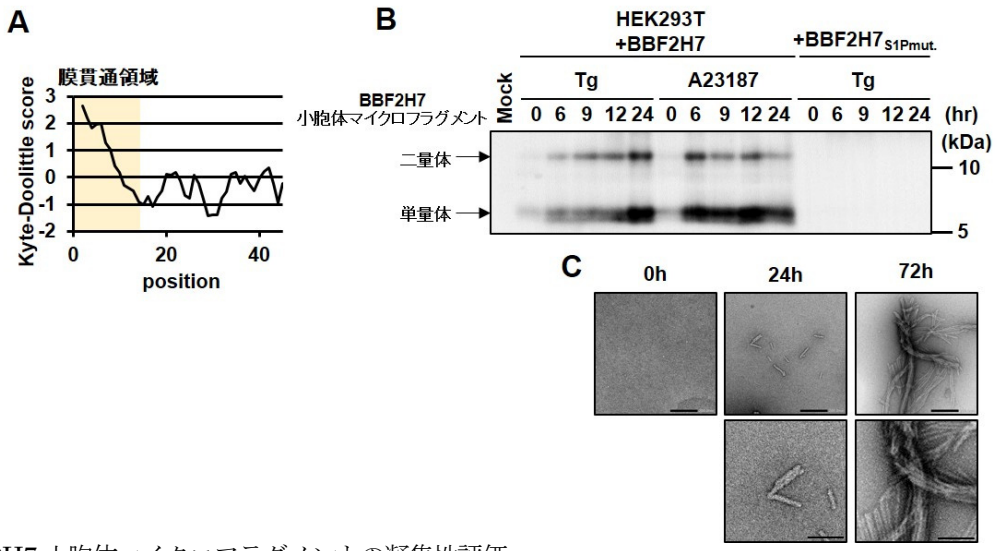


図 3. BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントの凝集性評価

（A）BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントの Kyte-Doolittle plot による疎水性予測結果。（B）HEK293T 細胞に BBF2H7 を発現させた後、1 μM Tg もしくは 0.5 μM A23187 処理により細胞に小胞体ストレスを負荷して BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントを検出した。5.5 kDa の単量体と 11 kDa の二量体が小胞体ストレスに応答して増加している。これらのバンドは BBF2H7 S1P 認識配列変異体を発現させた細胞では検出されなかった。（C）人工的に合成した小胞体マイクロフラグメントを 37℃でインキュベートした後、透過型電子顕微鏡で観察した。時間が経過するにしたがって、複数のマイクロフラグメントが束状になった fibril 構造を形成していることが分かった。スケールバー：200 nm。

考　察

小胞体マイクロフラグメントは小胞体ストレスセンサー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。このフラグメントは高い凝集性を有する可能性が示唆された。決定した BBF2H7 小胞体マイクロフラグメント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傷害性をさらに詳細に調べる予定である。

小胞体マイクロフラグメントは 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。このことから小胞体マイクロフラグメントの細胞外分泌、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。今後は小胞体マイクロフラグメントの細胞外分泌の有無を明確にする必要がある。また、小胞体マイクロフラグメント分解機構の破綻は小胞体マイクロフラグメントの細胞内外における蓄積を促進する可能性がある。したがって、小胞体マイクロフラグメントの局在・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。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、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の松久幸司寄附講座助教である。

文　献

1） Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. J. Clin. Invest. 2002 110(10):1389-1398. PMID: 12438434 DOI: 10.1172/JCI16886

2） Ron D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. J. Clin. Invest. 2002 110(10):1383-1388. PMID: 12438433 DOI: 10.1172/JCI16784

3） Yoshida H. ER stress and disease. FEBS J. 2007 274(3):630-658. PMID: 17288551 DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05639.x

4） Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. J. Cell Biol. 2012

197(7):857-867. PMID: 22733998 DOI: 10.1083/jcb.201110131

5) Bailey D, O'Hare P. Transmembrane bZIP transcription factors in ER stress signaling and the unfolded protein response. Antioxid. Redox Signal. 2007 9(12):2305-2321. PMID: 17887918 DOI: 10.1089/ars.2007.1796

6) Kondo S, Saito A, Hino S, Murakami T, Ogata M, Kanemoto S, Nara S, Yamashita A, Yoshinaga K, Hara H, Imaizumi K. BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. Mol. Cell. Biol. 2007 27(5):1716-1729. PMID: 17178827 DOI: 10.1128/MCB.01552-06