

小胞体マイクロフラグメントを標的とした神経変性疾患の 診断・治療戦略構築

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



(1) 細胞内における小胞体マイクロフラグメントの産生

小胞体ストレスセンサー BBF2H7は小胞体ストレスに応答してsite-1 protease (S1P) およびS2Pによって切断を受けて活性化する。しかし切断後に産生されると想定できるS1P、S2P切断部位に挟まれた部分に相当する小ペプチド（小胞体マイクロフラグメント）の機能は不明である。このフラグメントの機能と生理的意義を解明するため、まず小胞体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HEK293T細胞に小胞体ストレス誘導剤である $1\mu\text{M}$ タプシガルギン (Tg) および $0.5\mu\text{M}$ 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。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 ($1\mu\text{M}$ 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。以上より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、S2Pによる切断を介して産生されることが分かった。

(2) BBF2H7小胞体マイクロフラグメントの凝集性

LC-MS/MS解析およびエドマン分解法によって、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1A)。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1B)。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°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 (図1C)。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。以上の研究成果を発表するための学術論文を現在作成中である。

小胞体マイクロフラグメントはS1P、S2Pによる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必要がある。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予定である。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。

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から、小胞体ストレスが関連する指定難病の病態形成と小胞体マイクロフラグメントの病巣における蓄積との関連が疑われる。そこで、小胞体ストレスが発生していることがわかっているパーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症などの病態モデルマウスや患者組織における小胞体マイクロフラグメントの発現・蓄積および組織内分布を確認する予定である。それと同時に上記指定難病で認められる凝集性タンパク質と小胞体マイクロフラグメントの凝集および蓄積における相互作用や病態形成との関連を今後明らかにする。将来的には血中へと分泌される小胞体マイクロフラグメントを高感度に検出可能なELISAシステムを開発することで新たな診断法の確立へと繋げていく。また、小胞体マイクロフラグメントに対する凝集抑制剤を開発することで治療法への応用を試みる。

謝 辞

研究助成金を賜り、研究遂行にご協力頂きました公益財団法人難病医学研究財団には改めて厚く御礼申し上げます。

