

200400989A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

プリオン複製機構の解明とプリオン病の治療法開発
に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金子 清俊

平成17(2005)年 3月

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

プリオン複製機構の解明とプリオン病の治療法開発に関する研究

主任研究者 金子 清俊 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部
研究協力者 八谷 如美 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部
逆瀬川裕二 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部

研究要旨

本研究の目的は、ヒトプリオン病に対する根本的な治療法・予防法の開発である。最近我々は新規クラスの分子シャペロン (Unfoldin) を同定した。Unfoldin は、プリオンをはじめとする異常凝集蛋白質に対しても、類を見ないほどの高度の解きほぐし活性を発揮する。また、従来の分子シャペロンは、異常凝集蛋白質や折りたたみを解きほぐされた蛋白質といった非正常状態の蛋白質を認識するのに対し、我々が新たに発見した Unfoldin は正常に折りたたまれた蛋白質をも認識し、哺乳動物細胞に存在すると仮定される異常プリオン蛋白質の複製に関与する補助因子 (X 因子) と同じ範疇に属する新規クラスの分子シャペロンと位置づけられる。本研究においては、異常凝集体に対する高度の解きほぐし活性を利用し、コンフォメーション病治療・予防法開発における新局面を切り開くことを目指す。また、同様の手法を用いて X 因子を同定し、プリオン複製機構の詳細を明らかにすると共に、新たな治療戦略の標的とすることを目指している。本年度は、実際の生体内凝集体に対する解きほぐし能を検討するために、ピック病脳に蓄積する異常凝集体であるピック小体を用いた検討を行った。レーザーマイクロダイセクターでピック小体を単離回収し、ウエスタンブロット法における抗体との反応性を指標として検討した結果、Unfoldin はサンプルバッファー処理にすら極めて抵抗性の高いピック小体を容易に解きほぐし、抗体による検出能を 500 倍以上改善した。プリオン病におけるプリオン斑をはじめ、種々の疾患における難溶性異常凝集体の構成成分を、Unfoldin により解明することができれば、疾患の本体に迫る大きな手がかりとなる。またプリオン複製に関与する同様の解きほぐし因子の同定に向けて、現在哺乳動物細胞から Unfoldin アッセイ系を応用し、新規解きほぐし活性の同定を行っている。

A. 研究目的

ヒトのプリオン病である Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) は、進行性痴呆や運動機能障害が急速に悪化して数ヶ月で無動無言状態となる致死性の疾患である。我が国における硬膜移植が原因と考えられる

医原性 CJD の集積、国内初のウシ海綿状脳症 (BSE) の発見 (平成 13 年 9 月)、さらには国内初の変異型 CJD の確認 (平成 17 年 2 月) と、プリオン病に対する社会的関心は非常に高い。

プリオン病の原因であるプリオン蛋白

質 (PrP)には正常型 (PrP^C) と異常感染型 (PrP^{Sc}) とが存在し、両者のアミノ酸配列は相同だが立体構造は大きく異なる。PrP^C は、異常感染型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) を鋳型とした PrP^C から PrP^{Sc} への高次構造変換がその基盤にあると考えられている。生体内における PrP^C の分解経路において、PrP^C はその中心領域で最初の分解を受けることが知られている。この部分は、PrP^{Sc} への変換に際しても critical な領域、いわゆる β -シート領域に相当するため、分解を受けるか変換されるかという、互いに相補的な関係を有する。この部分は非常に疎水性に富んでいるため、分解酵素がアクセスするにはこの領域が解きほぐされる必要があると推察される。我々は、まずこの部分を解きほぐす分子の同定を目指している。これは、PrP^{Sc} への変換に関与する分子シャペロン様分子との相同性も注目される。

しかしながら、これらの解きほぐし活性は正常に巻かれた分子 (PrP^C) を標的とすると考えられるため、従来から知られている異常凝集蛋白質を標的とする一般的な分子シャペロンの範疇には該当しない。そこで我々は、このような正常分子に対し解きほぐし活性を発揮する新規分子シャペロンが実際に存在するかどうかを、まず出芽酵母の系において検討し、Unfoldin を同定した。

Unfoldin の分子量は 58 キロダルトンで、試験管内で蛋白質の高次構造をほぐす活性から Unfoldin と命名した。Unfoldin を高純度に精製し電子顕微鏡を用いて一分子の形態を低角度回転蒸着法により観察したところ、直径約 10nm、中央に約 2nm のホールを持つリング状構造が観察された。Unfoldin が基質を認識して解きほぐす活性は ATP 依存性であり、ADP 存在下では活性が認められない。また解きほぐし活性には基質特異性がなく、ATP 存在下では調べた限りすべての基質に結合しその高次構造を解きほぐすことができた。さらに Unfoldin は、プリオン蛋白質、アミロイドベータペプチド(1-42)、アルファシヌクレインなどの異常凝集体の高次構

造を試験管内で解きほぐした。

この高度の解きほぐし特性をさらに検討するために、本年度は実際の生体内凝集体に対する解きほぐし能を検討した。検討材料として、ピック病脳に蓄積する異常凝集体であるピック小体を用いた。

B. 研究方法

2 検体、3 領域の孤発性 Pick 病剖検脳組織の凍結切片 (5 ミクロン厚) から、まず抗リン酸化 tau 抗体 (AT8) による免疫染色にて Pick 小体を同定し、レーザーマイクロダイセクション法を用いて Pick 小体を単離・回収した (図 1)。Pick 小体を構成するリン酸化 tau の分子種の解析を行なうために、回収した Pick 小体を SDS-PAGE にて分離した後、抗リン酸化 tau 抗体 (AT100) を用いたイムノブロットングを行った。脳組織切片からの Sarkosyl 不溶性分画は、定法により回収した (図 2)。

Unfoldin による回収した Pick 小体の解きほぐし処理は、既に報告した方法により行った。

(倫理面への配慮)

本実験において用いたヒト剖検試料の取り扱いに関しては、国立精神・神経センターの倫理規定に従った。

C. 研究結果

実際の生体内凝集体に対する解きほぐし能を検討するために、ピック病脳に蓄積する異常凝集体であるピック小体を用いた検討を行った。レーザーマイクロダイセクターでピック小体を単離回収し、ウエスタンブロット法における抗体との反応性を指標として検討した結果、Unfoldin はサンプルバッファー処理にすら極めて抵抗性の高いピック小体を容易に解きほぐし、抗体による検出能を 500 倍以上改善した (図 3)。同様に、Unfoldin 処理前後のピック小体を電子顕微鏡下に観察した結果、凝集体構造の解きほぐし像が観察された (図 4)。

D. 考察

Unfoldin は試験管内での基質特異性が認められずに、高度の解きほぐし活性を有していることが従来の我々の研究で明らかとなっていたが、この活性が実際の脳内沈着物に対しても有効であることが実証された。

実際の応用例としては、例えばプリオンを含む高凝集性蛋白質のウエスタンブロットによる検出感度を、Unfoldin 処理により大幅に改善できる可能性が示唆され、診断法の開発に大きく貢献することが期待される。あるいは、タンパク質全体 (プロテオーム) を網羅的に解析するプロテオミクスは、主に液体クロマトグラフィー (LC) と質量分析計 (MS) の組み合わせにより行われているが、試料調整の段階において、対象となる生体細胞・組織の構成タンパク質群の難溶性、高凝集性が大きな課題となっている。異常凝集体に限らず、膜蛋白質を多く含む解析試料をアンフォルジンにより事前処理することで、この問題を大幅に改善できる可能性も考えられる。

さらにまた、Unfoldin の特徴を利用してプリオン病をはじめとする蛋白質凝集病への治療への応用が考えられる。今後は、この活性調節機構の同定が重要となるが、既に我々は、出芽酵母内における Unfoldin の細胞周期依存性活性調節機構の存在を確認している。

E. 結論

Unfoldin は異常凝集体の高次構造を試験管内で unfold するのみならず、実際に生体内凝集体に対する解きほぐし能を有することが確認された。Unfoldin に活性調節機構を付加する事によって、いわゆる蛋白質凝集病の治療法への可能性が示唆された。

図 1

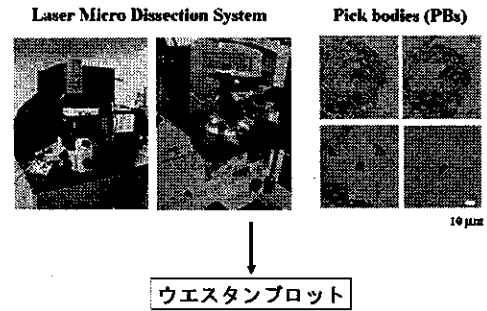


図 2

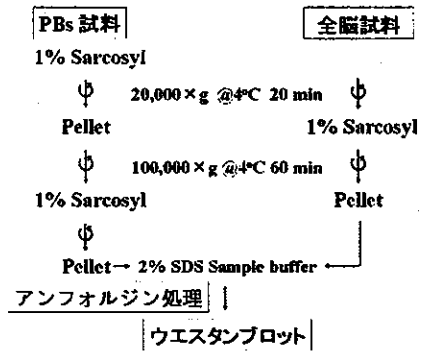


図 3

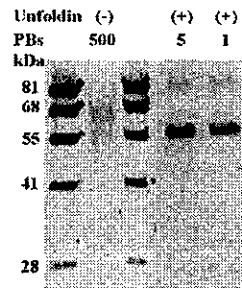
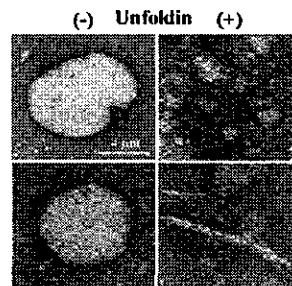


図 4



F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Hachiya NS, Watanabe K, Sakasegawa Y, Kaneko K:
Microtubules-associated intracellular localization of the NH₂-terminal cellular prion protein fragment.
Biochem Biophys Res Commun., 313: 818-823, 2004
- 2 Tremblay P, Ball HL, Kaneko K, Groth D, Hegde RS, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB, Safar SJ:
Mutant PrP^{Sc} Conformers Induced by a Synthetic Peptide and Several Prion Strains.
J Virol. 78: 2088–2099, 2004
- 3 Hachiya NS, Watanabe K, Yamada M, Sakasegawa Y, Kaneko K:
Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein.
Biochem Biophys Res Commun. 315: 802-807, 2004
- 4 Kishida H, Sakasegawa Y, Watanabe K, Yamakawa Y, Nishijima M, Kuroiwa Y, Hachiya NS, Kaneko K:
Non-glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored recombinant prion protein with dominant-negative mutation inhibits PrP^{Sc} replication *in vitro*.
Amyloid. 11: 14-20, 2004
- 5 Hachiya NS, Sakasegawa Y, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K:
Interaction of D-lactate dehydrogenase protein 2 (Dld2p) with F-actin: Implication for an alternative function of Dld2p.
Biochem Biophys Res Commun. 319: 78-82, 2004
- 6 Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K:
Oligomeric Aip2p/Dld2p forms a novel grapple-like structure and has an ATP-dependent F-actin conformation modifying activity *in vitro*.
Biochem Biophys Res Commun. 320: 1271-1276, 2004
- 7 Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K:
Oligomeric Aip2p/Dld2p modifies the protein conformation of both properly-folded and misfolded substrates *in vitro*.
Biochem Biophys Res Commun. 323:339-344, 2004
- 8 Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Sano K, Takeuchi Y, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K:
Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrP^C) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP^C.
Neurosci Lett. 374: 98-103, 2005
- 9 Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Ohkubo T, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K:
A disease isoform of fluorescent prion protein (PrP) with Y145STOP induces mitochondria-mediated apoptosis and

- forms PrP aggregates.
Biochem Biophys Res Commun.
327:894-899, 2005
- 10 大久保卓哉, 水澤英洋, 金子清俊:
変異型Creutzfeldt-Jakob病:
日本臨床 62巻 (増刊号1), 痴呆症学.
2: 252-256, 2004
- 11 Paul Brown, Rainer Seitz, 水澤英洋,
Henry Baron, 金子清俊:
プリオンに関する日本と欧米の現状
と今後-特に血漿分画製剤に関連して
-.
JAMA. 2: 120-121, 2004
- 12 金子清俊:
BSE-最新の知見.
日本医事新報 4165: 46-51, 2004
- 13 八谷如美, 金子清俊:
プリオン病の現況と将来.
Current Concepts in Infectious Disease.
23: 18-19, 2004
- 14 金子清俊:
BSE, SARS, 鳥インフルエンザ等の
感染症とつきあう方法.
環境会議 21: 214-217, 2004
- 15 八谷如美, 金子清俊:
プリオン病治療の新たな可能性.
バイオインダストリー. 21: 60-66,
2004
- 16 金子清俊:
BSE (牛海綿状脳症)とその食へのリ
スクについて.
日本食肉加工情報 647: 19-29, 2004
- 17 八谷如美, 金子清俊:
BSEとプリオンの増殖・感染機構.
蛋白質・核酸・酵素 49: 1005-1007,
2004
- 18 八谷如美, 金子清俊:
プリオン病とミトコンドリアの接点.
医学のあゆみ. 209: 1015-1017, 2004
- 19 金子清俊:
プリオン病.
小児内科. 36: 1166-1169, 2004
- 20 金子清俊:
プロテオミクスによる神経疾患の病
態解析.
神経研究の進歩 48: 700-706, 2004
- 21 金子清俊:
ウシ海綿状脳症 (BSE) .
現代化学. 404: 32-36, 2004
- 22 金子清俊:
プルシナー論文を読む コッホの四
原則を証明.
現代化学 404: 39, 2004
- 23 金子清俊:
BSE検査.
日本医事新報. 4200: 88-89, 2004
- 24 金子清俊:
クロイツフェルト・ヤコブ病.
臨床と微生物 32: 69-72, 2005
- 25 八谷如美, 金子清俊:
新しいシャペロンの発見 - 神経難
病の治療へ -.
科学 75: 283-285, 2005
- 26 金子清俊:
プリオンタンパク, プリオン遺伝子.
医学大辞典 印刷中
- 27 金子清俊:
プリオン病.
Medical View. 印刷中
- 28 金子清俊:
牛海綿状脳症/プリオン病.
日本内科学会誌 印刷中

- 29 金子清俊:
Prion病の治療法開発.
先端医療, 第10章. 印刷中
- 30 逆瀬川裕二, 八谷如美, 金子清俊:
プリオン病.
国立医療学誌「医療」. 印刷中
- 31 八谷如美, 金子清俊:
プリオン研究の進展.
VIRUS REPORT. 印刷中
- 1'. 書籍
- 32 金子清俊.
プリオン病の治療法開発.
先端医療シリーズ30 神経内科 「神経内科の最新医療」. 金澤一郎, 柴崎浩, 東儀英夫編, 先端医療技術研究所 (東京), 255-259, 2004
- 33 八谷如美, 金子清俊.
プリオン病の治療 - 現状と将来展望 -. Annual Review2005 神経. 柳沢信夫, 篠原幸人, 岩田誠, 清水輝夫, 寺本明編. 中外医学社 (東京), 4: 90-95, 2005
- 34 金子清俊.
不思議なプリオン病. 脳はどこまでわかったか.
朝日選書 771. 井原康夫編, 朝日新聞社 (東京), 2005
2. 学会発表
- 35 Sekijima M, Motono C, Noguchi T, Kaneko K, and Akiyama Y. Molecular Dynamics Simulation of Wild-Type and Mutant Human Prion Protein: Effect of Pro102Leu. 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science (PRICPS2004). Yokohama, 2004
- 36 Sekijima M, Motono C, Noguchi T, Kaneko K, and Akiyama Y. Structural Changes in flexible region of the Prion Protein induced by P102L Substitution: Investigation through Molecular Dynamics Simulations. 18th Annual Symposium of the The Protein Society. San Diego, 2004
- 37 Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Kozuka Y, Sakasegawa Y, and Kaneko K. Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrP^C) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP^C. International Symposium of Prion Diseases in Sendai JAPAN. Sendai, Oct 31-Nov. 2, 2004
- 38 Hachiya NS, Yamada M, Jozuka A, Kozuka Y, Sakasegawa Y, and Kaneko K. Prion disease and protein unfolding chaperone:Unfoldin/Oligomeric Aip2p. International Symposium of Prion Diseases in Sendai, JAPAN. Sendai, Oct 31-Nov. 2, 2004
- 39 Hachiya NS, Watanabe K, Sakasegawa Y, and Kaneko K. Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein. International Symposium of Prion Diseases in Sendai JAPAN. Sendai, Oct 31-Nov. 2, 2004
- 40 Sakasegawa Y, Kishida H, Watanabe K, Hachiya NS, and Kaneko K. A non-glycosylphosphatidylinositol

- (GPI)-anchored recombinant prion protein with dominant negative mutation inhibits PrP^{Sc} replication *in vitro*. International Symposium of Prion Diseases in Sendai JAPAN. Sendai, Oct 31-Nov. 2, 2004
- 41 Iwanami N, Sankawa U, Saido TC, Yamakawa Y, Nishijima M, and Kaneko K. Screening study of prion binding agents and their inhibitory effect on the conversion of prion protein. International Symposium of Prion Diseases in Sendai JAPAN. Sendai, Oct 31-Nov. 2, 2004
- 42 Hachiya NS, Yamada M, Jozuka A, Sakasegawa Y, and Kaneko K. Prion disease and Unfoldase: an ATP-dependent novel protein-unfolding chaperone. KEYSTONE SYMPOSIA: Molecular Mechanisms of Transmissible Spongiform Encephalopathies. Colorado, Jan. 11 -15, 2005
- 43 Kaneko K, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Sakasegawa Y, and Hachiya NS. Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrP^C) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP^C. KEYSTONE SYMPOSIA: Molecular Mechanisms of Transmissible Spongiform Encephalopathies. Colorado, Jan. 11 -15, 2005
- 44 金子清俊. 牛海綿状脳症 (BSE) と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. 第 10 回原子力安全シンポジウム(原子力安全委員会). 東京, 2.7, 2004
- 45 金子清俊. 欧州の食のリスクコミュニケーション. 食のリスクコミュニケーション意見交換会(内閣府). 東京, 2.16, 2004
- 46 金子清俊. 牛海綿状脳症 (BSE) と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. 食の安全安心フォーラム(内閣府). 大阪, 3.4, 2004
- 47 金子清俊. BSEとその食へのリスク. 食のリスクコミュニケーション講演会(内閣府). 東京, 3.13, 2004
- 48 金子清俊. プリオン蛋白質の複製に関与する因子. 産業総合研究所特別セミナー. 東京, 4.7, 2004
- 49 金子清俊. BSEとその食へのリスク. 食のリスクコミュニケーション講演会(内閣府). 東京, 4.20, 2004
- 50 金子清俊. BSEとその食へのリスク. 食のリスクコミュニケーション講演会(内閣府). 名古屋, 5.21, 2004
- 51 金子清俊. BSEとその食へのリスク. 食のリスクコミュニケーション講演会(内閣府). 仙台, 6.8, 2004
- 52 金子清俊. プリオンたんぱく質の細胞内輸送と細胞死のメカニズム. 第 8 回日本神経ウイルス研究会. 札幌, 6.12, 2004
- 53 金子清俊. BSE とクロイツフェルト・ヤコブ病. 第 13 回 PCR 感染症検査研究会. 東京, 6.25, 2004
- 54 金子清俊. BSEとその食へのリスク. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 東京, 8.4, 2004

- 55 金子清俊. BSEとその食へのリスク. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (厚生労働省). 東京, 8.18, 2004
- 56 金子清俊. BSEとその食へのリスク. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 大阪, 8.24, 2004
- 57 金子清俊. 牛海綿状脳症 (BSE)と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. 全国消費者団体連絡会. 東京, 8.27, 2004
- 58 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 東京, 9.16, 2004
- 59 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 大阪, 9.18, 2004
- 60 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (厚生労働省). 神戸, 9.22, 2004
- 61 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 岡山, 9.28, 2004
- 62 金子清俊. 牛海綿状脳症 (BSE)と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. 日本農芸化学会関東支部大会. 東京, 10.2, 2004
- 63 金子清俊. プリオン病. 福島県立医科大学脳神経外科学教室招待講演. 福島, 10.21, 2004
- 64 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. リスクコミュニケーション意見交換会 (農水省). 京都, 11.5, 2004
- 65 金子清俊. Unfoldin -治療法への応用-. 国際ヤコブデー. 東京, 11.12, 2004
- 66 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 鹿児島, 11.17, 2004
- 67 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 宮崎, 11.18, 2004
- 68 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 京都, 12.13, 2004
- 69 金子清俊. 日本における牛海綿状脳症 (BSE)対策について - 中間とりまとめ -. 食品に関するリスクコミュニケーション意見交換会 (内閣府). 名古屋, 12.13, 2004
- 70 池袋 一典, 小笠原大輔, 金子 清俊, 早出広司. 大腸菌組換え生産におけるプリオンの水溶性画分への発現. 日本生物工学会. 名古屋. 9.21, 2004.

- 71 八谷如美, 定塚昌子, 逆瀬川裕二, 金子清俊. プリオン病と蛋白質アンフォールディング因子; Unfoldin. 第27回神経科学会・第47回日本神経化学会大会. 大阪. 9.21-23, 2004
- 72 渡邊光太, 八谷如美, 定塚昌子, 逆瀬川裕二, 金子清俊. 正常型プリオン蛋白質の細胞内輸送機構の解析. 第27回神経科学会・第47回日本神経化学会大会. 大阪. 9.21-23, 2004
- 73 逆瀬川裕二, 八谷如美, 金子清俊. HSP90 α による正常型プリオン蛋白質高次構造変換機構の解析. 第27回神経科学会・第47回日本神経化学会大会. 大阪. 9.21-23, 2004
- 74 金子清俊, 山田真紀子, 定塚昌子, 大久保卓也, 逆瀬川裕二, 八谷如美. プリオン蛋白質過剰発現老齡トランスジェニックマウスに於けるミトコンドリア由来アポトーシス機構. 第27回神経科学会・第47回日本神経化学会大会. 大阪. 9.21-23, 2004
- 75 八谷如美, 山田真紀子, 渡邊光太, 定塚昌子, 逆瀬川裕二, 金子清俊. プリオン蛋白質過剰発現によるミトコンドリア由来神経細胞死機構. 第77回日本生化学会大会. 横浜. 10.13-16, 2004
- 76 金子清俊, 山田真紀子, 定塚昌子, 大久保卓也, 逆瀬川裕二, 八谷如美. プリオン蛋白質過剰発現老齡トランスジェニックマウスにおけるミトコンドリア由来神経細胞死. 第77回日本生化学会大会. 横浜. 10.13-16, 2004
- 77 逆瀬川裕二, 岸田日帯, 渡邊光太, 八谷如美, 金子清俊. リコンビナントプリオン蛋白質のドミナントネガティブ効果による異常感染型プリオン感染機構の解析. 第77回日本生化学会大会. 横浜. 10.13-16, 2004
- 78 岩浪直子, 三川潮, 西道隆臣, 金子清俊. プリオン結合物質によるプリオン蛋白質構造変換阻害効果. 第77回日本生化学会大会. 横浜. 10.13-16, 2004
- 79 池袋一典, 野間崇央, 早出広司, 大久保卓哉, 逆瀬川裕二, 八谷如美, 金子清俊. 組織切片中の標的タンパク質に結合するアプタマーの探索法の開発. 第27回日本分子生物学会年会. 神戸. 12.8-11, 2004

H. 知的所有権の取得状況

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

プリオン複製機構の解明とプリオン病の治療法開発に関する研究

分担研究者 北條 浩彦 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部

研究要旨

RNA interference (RNAi)による遺伝子ノックダウン技術を用いて、プリオン病の原因遺伝子であるプリオン (*PrP*) 遺伝子の発現抑制を試みた。マウス *PrP* 遺伝子に対する short-hairpin 型の RNA (shRNA) を発現するプラスミドを構築し、マウス培養細胞内に導入し、*PrP* 遺伝子の発現抑制効果を調べた。その結果、マウス内在性プリオン遺伝子に対して 70～75%発現抑制を誘導する shRNA 発現プラスミドを得ることができた。

A. 研究の目的

プリオン (*PrP*) 遺伝子ノックアウトマウスにプリオン病原体を摂取してもプリオン病を発病しないことが既に知られている。これは、異常型プリオン蛋白質の増幅に必要な正常型プリオン蛋白質が存在しない（発現していない）ために、発病に至る量の異常型プリオン蛋白質が細胞内に蓄積しないためと考えられている。したがって、*PrP* 遺伝子の発現をノックアウトまたはノックダウンすることができれば、プリオン病の進行を抑え、さらにはその発病自身も予防することができると考えられる。そこで、内在性の *PrP* 遺伝子の発現を簡便に抑制するために、新技術である RNA interference (RNAi) を用いてマウス内在性 *PrP* 遺伝子の発現をノックダウンする実験を試みた。

B. 研究方法

- 1) マウス *PrP* 遺伝子 (cDNA) の塩基配列データを基に、そのアミノ酸コーディング領域内に3箇所の small interfering RNA (siRNA) ターゲット部位を選定し、

short-hairpin 型の RNA (shRNA) を発現させるための合成オリゴDNAを設計した。そのDNA断片を発現プラスミドDNA内 (U6プロモーター下流) に挿入し、shRNA 発現プラスミド (4つ) を構築した。

- 2) 得られた shRNA 発現プラスミドをリポフェクタミン2000試薬 (Invitrogen社) によるリポフェクションによってマウス Neuro2a 細胞内に導入し、48時間後、全RNAを抽出した。
- 3) 得られた RNA を鋳型にオリゴdTプライマーと逆転写酵素を用いて cDNA を合成し、PCR法によって *PrP* 遺伝子発現量を調べた (RT-PCR)。正確な発現量を調べるために、ABI Prism 7000を用いたリアルタイムPCR法による解析を行った。

C. 研究結果

マウス *PrP* 遺伝子に対する short-hairpin 型 RNA (shRNA) を発現する4つの shRNA 発現プラスミドを構築した。そして、プリオン遺

伝子が発現しているマウス Neuro2a 細胞内に構築した shRNA 発現プラスミドを導入し、shRNA による RNAi 誘導を行った。shRNA 発現プラスミド導入 48 時間後に全 RNA を抽出し、その RNA を鋳型に用いて cDNA を合成した。そして、リアルタイム PCR 法を用いて *PrP* 遺伝子のノックダウン効果を解析した。その結果、二つの発現プラスミドにおいて、約 70% ~ 75% の *PrP* 遺伝子発現抑制効果があることが示された。残りの 2 つの発現プラスミドについては、約 50% ~ 60% の発現抑制が観察された。

D. 考察

1) マウス内在性 *PrP* 遺伝子をターゲットとする shRNA 発現プラスミドを構築し RNAi を誘導したところ、その活性に違いが観察された。この活性の違いは、哺乳動物 RNAi の特徴の一つであり、RISC 複合体 (RNAi の活性複合体) 形成過程における siRNA (RNAi のメディエーター) の取込み方が影響していると考えられる。

2) 合成 siRNA を用いた哺乳動物 RNAi 誘導の場合、その RNAi 活性は長続きしない。一般的に、強い RNAi 活性は siRNA 誘導後 2 ~ 3 日間続き、その後徐々に RNAi 活性は失われていく。その原因の一つは、細胞内に導入した siRNA そして形成された活性型 RISC 複合体の数が細胞分裂によって減少するためと考えられている。このような RNAi 活性の低下を回避する方法として shRNA 発現プラスミドによる RNAi 誘導法がある。今回、その shRNA 発現プラスミドを構築できたことから、RNAi を用いたプリオン遺伝子長期発現抑制が可能になると考えられる。

E. 結論

マウス内在性プリオン遺伝子の発現を RNAi によって長期ノックダウンするための

short-hairpin 型 RNA (shRNA) 発現プラスミドを構築することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohnishi Y., Tokunaga K., and Hohjoh H. (2005) Influence of assembly of siRNA elements into RNA-induced silencing complex (RISC) by fork-siRNA duplex carrying nucleotide mismatches at the 3' or 5'-end of the sense-stranded siRNA element. *BBRC*, (in press).
- 2) Tamura Y., Sakasegawa Y., Omi K., Kishida H., Asada T., Kimura H., Tokunaga K., Hachiya N.S., Kaneko K., and Hohjoh H. (2005) Association study of the chemokine, CXC motif, ligand 1 (CXCL1) gene with sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. *Neurosci. Letters*, (in press).
- 3) Sago N., Omi K., Tamura Y., Kunugi H., Toyoka T., Tokunaga K., and Hohjoh H. (2004) RNAi induction and activation in mammalian muscle cells where Dicer and eIF2C translation initiation factors are barely expressed. *BBRC*, 319: 50-57.

3. 学会発表

- 1) Ohnishi Y., Omi K., Tamura Y., Tokunaga K., Kaneko K., and Hohjoh H. (2005) "Evaluation system for siRNA duplexes conferring allele-specific gene silencing." Diverse role RNA in gene regulation, Keystone Symposia, Breckenridge, Colorado, USA.
- 2) Omi K., Tokunaga K., and Hohjoh H.

- (2004) "RNAi induction in mammalian neurons and muscle cells." 54th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Toronto, Ontario, CANADA
- 3) Tamura Y., Kunugi H., Kanako K., and Hohjoh H. (2004) "Analyses of epigenetic DNA methylation in the human genome" 54th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Toronto, Ontario, CANADA.
- 4) Kawashima M., Ikuta T., Tamiya G., Hohjoh H., Juji T., Honda Y., Inoko H, and Tokunaga K. (2004) "Fine mapping of candidate regions for human narcolepsy with high density markers." 54th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Toronto, Ontario, CANADA.
- 5) 田村美子、功刀浩、金子清俊、北條浩彦. (2004) 「メチル化によるエピジェネティックなヒトゲノム修飾に関する研究」 第27回日本分子生物学会、神戸.
- 6) 小見和也、徳永勝士、北條浩彦. (2004) 「RNAi による遺伝子発現ノックダウンを用いた神経疾患関連遺伝子の機能解析」 第27回日本分子生物学会、神戸.
- 7) 大西悠亮、小見和也、田村美子、徳永勝士、金子清俊、北條浩彦. (2004) 「対立遺伝子特異的RNAi効果の簡易評価システム」 第27回日本分子生物学会、神戸.

正常プリオン立体構造の遅い揺らぎに関する研究

分担研究者 桑田 一夫 岐阜大学・人獣感染防御研究センター

研究要旨

NMRを用い、ハムスター・プリオンの正常構造におけるグローバルな揺らぎと熱力学的安定性とを、原子分解能で特徴づけた。その結果、構造が大きく揺らぐ部位はB及びCヘリックスに存在し、その分布は、遺伝性ヤコブ病を引き起こす変異部位とよく似ていた。このことは、プリオンの立体構造安定性と病原性とがリンクしていることを示している。これらの部位が原子分解能で明らかになった事は、今後の治療薬開発に向けての大きな手がかりになる、と考えられる。

A. 研究目的

本研究は、プリオン蛋白の正常型から感染型への構造変換に関わる、プリオン蛋白の立体構造変化のダイナミックな過程及び中間体構造を、構造生物学的手法を用い原子分解能で特徴付けることを目的とする。このような情報は、今後のプリオン病治療薬開発につながるものである。

B. 研究方法

^{15}N ラベルしたリコンビナント・ハムスター・プリオン蛋白 (rPrP90-231) を用い、CPMG緩和時間分散法により、マイクロ秒からミリ秒のタイムスケールにおける、各アミノ酸残基のグローバルな揺らぎの大きさを計測する。また、同じ試料を用い、高圧 NMR 法により、各アミノ酸残基の熱安定性を明らかにする。さらに遺伝性ヤコブ病との関連を明らかにする。これにより、プリオンにおけるグローバルな揺らぎ、熱安定性、異常プリオン形成傾向との間の相関が明らかとなる。従って、正常から異常構造に到るプリオンの立体構造変換に関わる原子レベルでの詳細を明らかにすることが可能となる。

(倫理面への配慮)

正常プリオンを対象とするため、危険性はなく、又、実験動物を用いないため、特に倫理面の問題はない。

C. 研究結果

磁気緩和測定により、ピコ秒からナノ秒のダイナミクスと、マイクロ秒からミリ秒のダイナミクスを測定した。その結果、後者の遅いダイナミクスで著明な揺らぎを示す残基群は、主にB及びCヘリックスに存在し、病原性変異を示す残基群の分布に類似していた。

一方、高圧NMRを用い、残基毎の熱力学的安定性を調べた。その結果、安定性の低い残基群は、やはりB及びCヘリックスに存在していた。

遅い揺らぎを示す残基群と低い熱安定性を示す残基群とは、比較的良好一致していた。これは、B及びCヘリックス部分に特に不安定な残基が存在し、これらの変異により、プリオン蛋白質全体が一層不安定になることを示している。

また、遺伝性ヤコブ病における病原性変異部位が、同様にこれらの部分に集中して存在して

いることは、プリオン立体構造の不安定性が、感染型構造への変換反応の引き金になる可能性を示唆している。

さらに、この熱力学的に不安定な部分が、ファクターXの結合サイト周辺に分布していることが分かった (Kuwata et al., 2005)。このことは、ファクターXの周辺が、分子間相互作用により、特に構造変化を起こしやすい部位であることを示している、と考えられる。

さらに、このような立体構造変換を包含するような蛋白質のダイナミクスを理解するために、新たに数論を用いた理論体系を構築している (桑田一夫, 数理科学, 2005)。

D. 考察

NMRにより正常型プリオンの立体構造が決定されてからおよそ 10 年経過したが、病原性を形成する立体構造変換に関わるメカニズムは未だ理解されていない。本研究は、正常プリオンの立体構造安定性が、異常プリオンへの構造変換と深い関わりがあることを世界で始めて実証したものである。グローバルな揺らぎ及び熱安定性に関わる情報が、原子分解能で得られたことは、今後のプリオン病治療薬開発に向けての大きな手がかりになる、と考えられる。

E. 結論

正常プリオンの立体構造不安定性が、異常プリオンへの構造変換と深い関わりがあることが分かった。今後、さらに正常構造の不安定性に関わる情報を収集するとともに、その応用としての治療薬開発に取り組むことが、日本社会の安全・安心を確立する上で重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kazuo Kuwata, Yuji O Kamatari, Kazuyuki Akasaka and Thomas L. James :
Slow Conformational Dynamics in the Hamster Prion Protein. *Biochemistry*. 43, 4439-4446,

2004

KAZUYUKI HASHIMOTO, ZENICHIRO KATO, TOMOKO NAGASE, NOBUYUKI SHIMOZAWA, KAZUO KUWATA, KENTARO OMOYA, AILIAN LI, EIJI MATSUKUMA, YUTAKA YAMAMOTO, HIDENORI OHNISHI, HIDEHITO TOCHIO, MASAHIRO SHIRAKAWA, YASUYUKI YUZUKI, RONALD J. A. WANDERS, AND NAOMI KONDO :
Molecular Mechanism of a Temperature-Sensitive Phenotype in Peroxisomal Biogenesis Disorder. *Pediatric Research*, in press

桑田一夫：プリオン中間体と治療薬開発--分子感染機構と創薬制御. 蛋白質 核酸 酵素. 49 (7), 1110-1112, 2004

桑田一夫, 副田明男, 岩間亨, 桑田弘美, 中島年彦：fMRI による高次脳機能障害の診断法及び各種治療法の開発. 岐阜脳医学研究会報告集. 1, 2004

桑田一夫：素数とプリオン-21 世紀における生命科学の新表現理論への挑戦. 数理科学. 499, 45-53, 2005

2. 学会発表

Kazuo Kuwata, Noriyuki Nishida, Susumu Shirabe and Shigeru Katamine : The-35 discovery of a new drug capable of inhibiting PrP* and PrP^{Res} formation. First International Conference of the European Network of Excellence NeuroPrion. Paris, France, 2004

Kazuo Kuwata : Slow conformational dynamics of prion protein revealed through NMR measurement. The Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji Island, Hyogo, Japan, 2004

Kazuo Kuwata, Noriyuki Nishida, Shigeru Katamine : Drug discovery for prion diseases based on the structural dynamics of prion protein. Neuro 2004-Joint Meeting of the 27th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and the 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry. Osaka, Japan, 2004

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

Kazuo Kuwata : Slow dynamics of prion protein. INTERNATIONAL SYMPOSIUM PRION DISEASES FOOD AND DRUG SAFETY. OCTOBER 31-NOVEMBER 2, 2004 Sendai Excel Hotel Tokyu SENDAI JAPAN

Kazuo Kuwata : Pressure-induced conformational change of mouse prion. Dialysis-related amyloidosis: from molecular mechanisms to therapies. 1st Italian-Japanese Workshop, December 9-13, 2004, University of Pavia, Italy

桑田 一夫 : 『プリオン病の基本メカニズムの解明と治療薬開発』～21世紀における新創薬パラダイス～. 社団法人 岐阜県獣医師会 平成16年11月12日 美濃加茂シティホール

桑田 一夫 : 「感染する異常たんぱく質－プリオン複製の謎－」 独立行政法人 科学技術振興機構 平成16年11月18日 岐阜県健康科学センター

桑田 一夫 : 「蛋白質の立体構造とダイナミクスに基づく論理的創薬法及びそれによる抗プリオン薬の開発」 国立感染症研究所学友会 平成17年2月14日 国立感染症研究所戸山庁舎

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
金子清俊	プリオン病の治療法開発	金澤一郎, 柴崎浩, 東儀英夫	先端医療シリーズ30 神経内科「神経内科の最新医療」	先端医療技術研究所	東京	2004	255-259
八谷如美, 金子清俊	プリオン病の治療 - 現状と将来展望	柳沢信夫, 篠原幸人, 岩田誠, 清水輝夫, 寺本明	Annual Review2005 神経	中外医学社	東京	2005	90-95
金子清俊	不思議なプリオン病. 脳はどこまでわかったか	井原康夫	朝日選書771.	朝日新聞社	東京	2005	
桑田一夫	21世紀は“蛋白質”の時代—BSEの感染因子“プリオン”の衝撃—		長寿社会を支える健康食「食の安全性」その現状と将来展望	東京教育情報センター		2004	31-44

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hachiya NS, Watanabe K, Sakasegawa Y, Kaneko K	Microtubules-associated intracellular localization of the NH2-terminal cellular prion protein fragment.	Biochem Biophys Res Commun	313	818-823	2004
Tremblay P, Ball HL, Kaneko K, Groth D, Hegde RS, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB, Safar SJ	Mutant PrP ^{Sc} Conformers Induced by a Synthetic Peptide and Several Prion Strains.	J Virol	78	2088-2099	2004

Hachiya NS, Watanabe K, Yamada M, Sakasegawa Y, Kaneko K	Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein.	Biochem Biophys Res Commun.	315	802-807	2004
Kishida H, Sakasegawa Y, Watanabe K, Yamakawa Y, Nishijima M, Kuroiwa Y, Hachiya NS, Kaneko K	Non-glycosylphosphatidyl inositol (GPI)-anchored recombinant prion protein with dominant-negative mutation inhibits PrP ^{Sc} replication <i>in vitro</i> .	Amyloid	11	14-20	2004
Hachiya NS, Sakasegawa Y, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K	Interaction of D-lactate dehydrogenase protein 2 (Dld2p) with F-actin: Implication for an alternative function of Dld2p.	Biochem Biophys Res Commun.	319	78-82	2004
Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K	Oligomeric Aip2p/Dld2p forms a novel grapple-like structure and has an ATP-dependent F-actin conformation modifying activity <i>in vitro</i> .	Biochem Biophys Res Commun.	320: 2004	1271-1276,	2004
Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K	Oligomeric Aip2p/Dld2p modifies the protein conformation of both properly-folded and misfolded substrates <i>in vitro</i> .	Biochem Biophys Res Commun.	323:	339-344,	2004
Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Sano K, Takeuchi Y, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K	Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrP ^C) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP ^C .	Neurosci Lett.	374	98-103	2005

Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Ohkubo T, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K	A disease isoform of fluorescent prion protein (PrP) with Y145STOP induces mitochondria-mediated apoptosis and forms PrP aggregates.	Biochem Biophys Res Commun.	327	894-899	2005
Sago N., Omi K., Tamura Y., Kunugi H., Toyo-ka T., Tokunaga K., and Hohjoh H	RNAi induction and activation in mammalian muscle cells where Dicer and eIF2C translation initiation factors are barely expressed.	Biochem Biophys Res Commun.	319	50-57	2004
Ohnishi Y., Tokunaga K., and Hohjoh H	Influence of assembly of siRNA elements into RNA-induced silencing complex (RISC) by fork-siRNA duplex carrying nucleotide mismatches at the 3'- or 5'-end of the sense-stranded siRNA element	Biochem Biophys Res Commun.			in press
Tamura Y., Sakasegawa Y., Omi K., Kishida H., Asada T., Kimura H., Tokunaga K., Hachiya N.S., Kaneko K., and Hohjoh H	Association study of the chemokine, CXC motif, ligand 1 (CXCL1) gene with sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population.	Neurosci Lett.			in press
Kazuo Kuwata, Yuji O. Kamatari Kazuyuki Akasaka Thomas L. James	Slow Conformational Dynamics in the Hamster Prion Protein	Biochemistry	43	4439-4446	2004