

200500882A

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金子 清俊

平成18(2006)年 3月

目 次

I.	統括研究報告	
	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	
	-----	1
	金子清俊	
II.	分担研究報告	
	1. アンフォルジンによる高感度診断法の開発-----	8
	八谷如美	
	2. プリオン分子のダイナミクスの検討と In Silico での創薬スクリーニング-----	14
	桑田一夫	
	3. 対立遺伝子特異的 RNAi 活性を評価するシステムの確立-----	17
	北條浩彦	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	----- 21
IV.	研究成果の別刷	----- 25

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 東京医科大学生理学第二講座

研究要旨 本年度の研究総括として、以下の成果を挙げることが出来た。1. 異常凝集された凝集体に対するその比類のない解きほぐし活性を利用して、異常凝集蛋白質の検出感度を飛躍的に向上させることに成功した。2. プリオン分子のダイナミクスの情報に基づいて、ACDSC データベースを用いた *In Silico* スクリーニングを行い、プリオンの構造変換を阻止する化合物を発見した。3. 家族性プリオン病の発症予防法開発に向けて、対立遺伝子特異的 RNAi 活性を評価するシステムを確立した。今後は、これらの成果をプリオン病の早期診断・治療法開発の臨床応用に結びつけていく予定である。

分担研究者

八谷如美・東京医科大学生理学第二講座講師

桑田一夫・岐阜大学人獣感染防御研究センター長

北條浩彦・国立精神・神経センター神経研究所遺伝子工学研究部室長

たアンフォルジンに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新規補助因子(プロテイン X)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、その新規性並びに獨創性は極めて高い。

分担研究者の八谷は、異常凝集された凝集体に対するその比類のない解きほぐし活性を利用して、アンフォルジンによるプリオン病の診断手法開発への応用を試みた。その結果、BSEプリオンの検出感度を飛躍的に向上させることに成功した。

分担研究者の桑田は、プリオン複製機構の解明に向けて、プリオン分子のダイナミクスを検討した。また、これらの情報に基づいて、*In Silico*での創薬スクリーニングのシステムを確立し、効果的なプリオン病治療薬の開発を目指している。

分担研究者の北條は、RNAiの手法に基づいたプリオン病治療法開発の可能性を検討している。プリオン病の治療には、100%に近い治療・プリオン増殖抑制効果が必要である。なぜならば、残存プリオンが指数関数的に増加してしまうからである。これらの点を考えると、現在のRNAiの効率からは、感染型のプリオン増殖を治療対象とすることは困難であるため、我々は家族性プリオン病に着目した。家族性プリオン病は、遺伝子変異によるため、そのアレル特異的に発現を抑制すれば、プリオン

A. 研究目的

本研究の目的は、ヒトプリオン病に対する発症前早期診断を可能とするような効率的なプリオン検出法並びに根本的な治療法・予防法の開発である。申請者は、既にプリオン生成に対してドミナントネガティブ効果を有する防御型プリオン蛋白質の同定と治療・予防法への応用、抗プリオン抗体の開発をカリフォルニア大学(UCSF)との共同研究により行ってきた。それらに加えて、東京大学脳神経外科学教室並びに国立感染症研究所細胞化学部と共に、乾燥硬膜移植後プリオン病のマウスモデルの開発と治療法開発の検討を行ってきた。

このような背景に加え、最近我々は新規クラスの分子シャペロン (oligomeric Aip2p; アンフォルジン)を同定した。アンフォルジンは、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、異常に折りたたまれた(misfold)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

病の発症を遅延させることができる可能性が高い。これには、プリオン感染抑制ほどの効率は要求されない。また、人ではPrP^Cの機能は完全に解明されていないため、正常アリルは抑制せずに、遺伝子変異のあるアリルのみをsiRNAを用いて抑制する手法の開発を目指している。

B. 研究方法

1. アンフォルジンによる高感度診断法の開発 (八谷)

2 検体、3 領域の孤発性ピック 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ピック小体を同定し、レーザーマイクロダイセクション法を用いてピック小体を単離・回収した。ピック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、回収したピック小体を SDS-PAGE にて分離した後、抗リン酸化 tau 抗体 (AT8 及び AT100) を用いたイムノブロッティングを行った。脳組織切片からの Sarkosyl 不溶性分画は、定法により回収した。BSE 感染脳は、国立感染症研究所細胞化学部山河芳夫博士の協力の元、処理を行った。

アンフォルジンによる回収したピック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。

2. プリオン分子のダイナミクスの検討と In Silico での創薬スクリーニング (桑田)

プリオン分子における様々のダイナミクスを、溶液中の自然な状態において、CPMG 緩和分散法により調べた。また粗視化した MD シミュレーション法を用い、その薬物がプリオンの立体構造変換を阻止できるメカニズムを検討した。また、これらの手法により判明した揺らぎの多い部位を、三次元立体構造上にマッピングすることで、創薬のターゲットを決定に役立てるとともに、これらの情報に基づいて、ACDSC データベースを用いて、In Silico スクリーニングを行った。

3. 対立遺伝子特異的 RNAi 活性を評価するシステムの確立 (北條)

RNAi (RNA interference) は、配列特異的な遺伝子発現転写後抑制機構であり、二本鎖RNA(siRNA)を用いて簡単に誘導することができる。先に述べたように、このRNAiの高い配列特異性は、ヘテロ状態における、対立遺伝子 (アリル) 特異的な発現抑制を誘導する有力な手法になると考えられる。今年度我々は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いてヘテロ状態でアリル特異的RNAi活性を簡便に評価するためのアッセイ系の確立を行った。二種類のルシフェラーゼレポーター遺伝子 (ホタル・ルシフェラーゼとウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子) を使って、それぞれの3'UTR内に正常型と変異型のアリル配列を挿入したレポーターアリルを構築した。そして変異型アリルをターゲットとする合成siRNAと共にレポーターアリルを細胞内に導入し、それぞれのアリルに対するRNAi効果をルシフェラーゼ活性比により判定した。今年度は、すでによく知られている家族性アルツハイマー病のAPP遺伝子のSwedish型変異とLondon型変異をモデル変異対立遺伝子として本アッセイシステムを用いた解析を行った。

(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、各研究者の勤務する施設並びに関連する施設の倫理規定に従った。

C. 研究結果

1. アンフォルジンによる高感度診断法の開発 (八谷)

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。そのために、疾患由来の細胞内封入体を、レーザーマイクロカッターと光学顕微鏡を組み合わせた独自のシステムにより周辺組織の混入なく高純度に単離・回収する系を構築した。

アンフォルジン、試験管内でβ型プリオン蛋白質、アルツハイマー病に関わるアミロイドβペプチド(1-42)、パーキンソン病に関わるα-シヌクレインなどの異常凝集蛋白質をATP依存性に効果的に解きほぐし、これらのトリプシン感受性を上昇させた

次にピック病の脳内に蓄積するピック小体をアンフォルジン処理後にウエスタンブロット法により検討した結果、古典的な処理では単離した500個のピック小体を用いても異常リン酸化タウシグナルの検出が困難であったが、アンフォルジン処理後には、わずかに数個若しくは1個のピック小体によって単一のタウシグナルを鮮明に検出できた。すなわち、アンフォルジン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。大変興味深いことに、BSE感染脳を用いたpreliminaryな検討においても、同様の著明な感度の改善を認めることが出来た。

2. プリオン分子のダイナミクスの検討と In Silico での創薬スクリーニング (桑田)

プリオン分子における様々のダイナミクスを、溶液中の自然な状態において、CPMG緩和分散法により調べた結果、ミリ秒からマイクロ秒の遅いタイムスケールの揺らぎが存在する部位が、遺伝性のヤコブ病における変異部位と微妙に関連している、という事実が確認された。

また粗視化したMDシミュレーション法を用い、その薬物がプリオンの立体構造変換を阻止できるメカニズムに関し、興味深い知見を得ることが出来た。それは、この構造変換を阻止する物質を発見するときに、どこをターゲットとするか、ということである。この揺らぎの多い部位を、三次元立体構造上にマッピングすると、そのような残基はプリオンの特定の部位に集中していることが分かった。

これらの情報に基づいて、我々は、ACDSCデータベースを用いて、In Silico ス

クリーニングを行い、同部位に特異的に結合し、プリオンの構造変換を阻止する化合物を発見することが出来た。

3. 対立遺伝子特異的 RNAi 活性を評価するシステムの確立 (北條)

今年度は、すでによく知られている家族性アルツハイマー病のAPP遺伝子のSwedish型変異とLondon型変異をモデル変異対立遺伝子として本アッセイシステムを用いた解析を行い、アリル特異性を示すsiRNAを同定することができた。

D. 考 察

1. アンフォルジンによる高感度診断法の開発 (八谷)

アンフォルジン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、BSE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、アンフォルジン処理により大幅に改善できる可能性が示唆される。

また、プロテオーム解析の主役は、液体クロマトグラフィー(LC)と質量分析計(MS/MS)の組み合わせであるが、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。従って、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、この問題の改善につながるかもしれない。

2. プリオン分子のダイナミクスの検討と In Silico での創薬スクリーニング (桑田)

プリオンは主にタンパク質からなる感染性粒子であり、その病原性は、正常型から異常型への立体構造変換にある。またその際、プリオンの共有結合は変化せず、主に非共有結合のみが変化するとされる。

正常型における初期の構造変換が、どこで起きるかは、静的な立体構造を眺めていてもまずわからない。そこで、ダイナミクスを直接測定するか、あるいはシミュレーションする必要が出て来る。

一般に、蛋白質の立体構造に基づいて、低分子化合物の *In Silico* スクリーニングを行う場合 (SBDD)、ターゲットとなる部位を限定する必要がある (範囲を限定しない方法もある)。酵素の場合は主に活性部位、分子間相互作用の場合は相互作用部位ということになるだろう。しかしプリオンは、明らかに酵素ではなく、例えば、正常型と異常型との相互作用部位がどこにあるのかも、分かっていない。

プリオンでは、正常型から異常型への立体構造変換が病原性発現のスイッチになるので、立体構造変換の初期に起きる構造変化を食い止め、正常型を安定化することにより、このスイッチが入らないようにすることが出来る可能性がある。

現在、人獣感染防御研究センターでは、構造生物学的方法 (NMR、X線結晶解析、電子顕微鏡、コヒーレント分光) に基づいて、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を行っている。平成16年9月に人獣感染防御研究センターを立ち上げ、測定装置の設置と、15種類のリコンビナント・プリオンの大量発現系を作成した。現在、¹⁵Nラベルしたマウス・プリオンの大量精製を行っている。

3. 対立遺伝子特異的 RNAi 活性を評価するシステムの確立 (北條)

RNAi (RNA interference) は、配列特異的な遺伝子発現転写後抑制機構であり、二本鎖RNA (siRNA) を用いて簡単に誘導することができる。このRNAiの高い配列特異性は、ヘテロ状態における、対立遺伝子 (アリル) 特異的な発現抑制を誘導する有力な手法になると考えられる。そして、その技術は疾患治療に大きく貢献すると考えられる。しかしながら、従来の方法を用いて、RNAiによるアリル特異的発現抑制効果を正常/変異型のヘテロ条件下で定量的に評

価することは非常に困難である。そこで我々は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いてヘテロ状態でアリル特異的RNAi活性を簡便に評価するためのアッセイ系の確立を行った。来年度は、このシステムを用いてすでに知られているプリオン遺伝子の変異について解析を行う予定である。

E. 結論

1. アンフォルジンによる高感度診断法の開発 (八谷)、2. プリオン分子のダイナミクスの検討と *In Silico* での創薬スクリーニング (桑田)、3. 対立遺伝子特異的 RNAi 活性を評価するシステムの確立 (北條) を通じ、プリオン病の早期診断・治療法の確立に向けて、着実な成果を得ることが出来た。次年度は、これらの成果を更に発展させ、一刻も早い臨床応用を目指していく。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 2005;374:98-103.
- 2) Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Ohkubo T, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K. Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327:894-899.
- 3) Tamura Y, Sakasegawa Y, Omi K, Kishida H, Asada T, Kimura H, Tokunaga K, Hachiya NS, Kaneko K, Hohjoh H. Association study of the chemokine, CXC motif, ligand 1 (CXCL1) gene with sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. *Neurosci Lett* 2005;379:149-151.
- 4) Noma T, Ikebukuro K, Sode K, Ohkubo T,

- Sakasegawa Y, Hachiya NS, Kaneko K. Screening of DNA aptamers against multiple proteins in tissue. *Nucleic Acids Symposium Series* 2005;49:357-358.
- 5) Hachiya NS, Ohkubo T, Kozuka Y, Yamazaki M, Mori O, Mizusawa H, Sakasegawa Y, Kaneko K. More than a 100-fold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric actin interacting protein 2/d-lactate dehydrogenase protein 2. *Anal Biochem* 2005;347:106-111.
 - 6) Omi K, Hachiya NS, Tokunaga K, Kaneko K. siRNA-mediated inhibition of endogenous Huntington disease gene expression induces an aberrant configuration of the ER network *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:1229-1235.
 - 7) Kaneko K, Hachiya NS. Hypothesis: Gut as source of motor neuron toxin in the development of ALS. *Med Hypotheses* 2006;66:438-9.
 - 8) Ohkubo T, Sakasegawa Y, Toda H, Kishida H, Arima K, Yamada M, Takahashi H, Mizusawa H, Hachiya NS, Kaneko K. Three-repeat tau 69 is a major tau isoform in laser-microdissected pick bodies. *Amyloid* in press
 - 9) Kaneko K, Hachiya NS. The alternative role of 14-3-3 zeta as a sweeper of misfolded proteins in disease conditions. *Med Hypotheses* in press
 - 10) Hachiya NS, Kaneko K. Investigation of laser microdissected inclusion bodies. *Method in Cell Biology* vol. XX: Laser Scissors, Laser Capture, and Related Technologies (Berns M and Greulich KO ed.), Academic Press (New York), 2006 in press
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 八谷如美, 金子清俊. プリオン研究の進展. *VIRUS REPORT*. 2:14-19, 2005.
 - 14) 金子清俊. vCJD (変異型クロイツフェルト・ヤコブ病). 日本評論社「からだの科学」. 244:95, 2005.
 - 15) 金子清俊. BSEと食の安全. *日本薬剤師会雑誌*. 57:81-84, 2005.
 - 16) 金子清俊. 科学と行政 - 科学者とBSE対策 -. *現代化学*. 416:60-63, 2005.
 - 17) 八谷如美, 金子清俊. プリオン病の現状- 牛海綿状脳症と変異型CJDを中心に -. *LABIO* 21. 22:5-10. 2005.
 - 18) 金子清俊. プリオン病に挑むアンフォルジン. *東京医科大学雑誌*. 63:443-449, 2005.
 - 19) 八谷如美, 金子清俊. 牛海綿状脳症 (BSE) と変異型CJD. *Bios*. 10:7-8, 2005.
 - 20) 金子清俊. 特集「プリオン病」. はじめに. *医学のあゆみ*. 215:875, 2005.
 - 21) 金子清俊. 理系の説明責任. BSE問題をめぐって. *科学*. 76:52-55, 2006.
 - 22) 八谷如美, 金子清俊. プリオン蛋白質異常化の分子機構. *化学療法の領域*. 22:63-68, 2006.
 - 23) 金子清俊. 食品リスク - BSEとモダニティ - (神里達博著) 書評. *蛋白質・核酸・酵素*. 印刷中
 - 24) 金子清俊. 牛海綿状脳症と変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. *TMDC MATE*. 印刷中
 - 25) 金子清俊. プリオン病□牛海綿状脳症 (BSE)と変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. *BRAIN*. 印刷中
 - 26) 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.
 - 27) 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.
 - 28) 金子清俊. プリオン病. 日常診療に活かす老年病ガイドブック- 認知症・うつ・睡眠障害の診療の実際 -. 三木哲郎編, *Medical View* (東京), 4:173-179, 2005.
 - 29) 金子清俊. BSE - 米国産牛肉輸入再開問題 -. *日本農業の動き*. 農政ジャーナリストの会編, 農林統計協会 (東京), 153: 58-79, 2005.

- 30) 金子清俊. プリオンタンパク, プリオン遺伝子. 医学大辞典. 南山堂 (東京), 印刷中
2. 学会発表
- 1) Hachiya NS, Yamada M, Jozuka A, Sakasegawa Y, Kaneko K. Prion disease and Unfoldase chaperone: an ATP-dependent novel protein-unfolding chaperone. 30th FEBS & 9th IUBMB Conference: The Protein World. Budapest, July 2-7, 2005.
 - 2) Noma T, Ikebukuro K, Sode K, Ohkubo T, Sakasegawa Y, Hachiya NS, Kaneko K. *In vitro* selection of DNA aptamers against proteins in tissue. Second World Congress on Synthetic Receptors. Zalzburg, Sept 7-9, 2005.
 - 3) Noma T, Ikebukuro K, Sode K, Ohkubo T, Sakasegawa Y, Hachiya NS, Kaneko K. Screening of DNA aptamers against multiple proteins in tissue. The 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (SNAC2005). Fukuoka, Sept 20-22, 2005.
 - 4) Kiyotoshi Kaneko. Diagnostic application of a novel protein unfolding chaperone (Unfoldin) in protein aggregation disorders. The 1st International Symposium on Geriatrics and Gerontology. Nagoya, Nov 3, 2005.
 - 5) Hachiya NS, Ohkubo T, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K. Over a hundredfold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric Aip2p/Dld2p. 45th American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Francisco, Dec 10-14, 2005.
 - 6) 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 59 回日本栄養・食料学会大会. 東京, 5.16, 2005.
 - 7) 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. 日本労働組合連合会. 東京, 6.28, 2005.
 - 8) 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. 滋賀血液・免疫研究会. 滋賀, 7.30, 2005.
 - 9) 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. 夏期学校給食学習会. 横浜, 8.4, 2005.
 - 10) 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. 第二回柏崎認知症フォーラム. 新潟, 10.7, 2005.
 - 11) 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 12 回徳島神経難病治療薬研究会. 徳島, 10.28, 2005.
 - 12) 金子清俊. プリオンと蛋白質凝集. 平成 17 年度新潟大学脳研究所神経内科同窓会懇話会 40 周年記念講演会. 新潟, 11.19, 2005.
 - 13) 金子清俊. 変異型クロイツフェルト・ヤコブ病と牛海綿状脳症. プリオン病のサーベイランスと対策に関する全国担当者会議. 東京, 2.24, 2006.
 - 14) 渡邊光太, 金子清俊, 八谷如美. 正常型プリオン蛋白質の分化誘導下における輸送機構. 2005 年プリオン研究会. 山形, 8.26-27, 2005.
 - 15) 小塚芳道, 金子清俊, 渡邊光太, 八谷如美. Possible evidence of a missing link between prokaryotes and eukaryotes; Presence of subcellular membrane system in newly discovered marine microorganisms. 第 78 回日本生化学会大会. 神戸, 10.19-22, 2005.
 - 16) 小見和也, 八谷如美, 徳永勝士, 金子清俊. Requirement of huntingtin in the maintenance of endoplasmic reticulum morphology. 第 78 回日本生化学会大会. 神戸, 10.19-22, 2005.
 - 17) 八谷如美, 渡邊光太, 逆瀬川裕二, 金子清俊. Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro. 第 78 回日本生化学会大会. 神戸, 10.19-22, 2005.
 - 18) 八谷如美, 大久保卓哉, 小塚芳道, 逆瀬川裕二, 金子清俊. Over a hundredfold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by アンフォルジン/oligomeric Aip2p. 第 78 回日本

生化学会大会. 神戸, 10.19-22, 2005.

- 19) 大久保卓哉, 逆瀬川裕二, 有馬邦正, 山田光則, 水澤英洋, 八谷如美, 金子清俊. ピック小体の主要構成蛋白は異常リン酸化タウ 69kDa である. 第 28 回日本分子生物学会年会. 福岡, 12.7-10, 2005.
- 20) 野間崇央, 池袋一典, 早出広司, 大久保卓哉, 逆瀬川裕二, 八谷如美, 金子清俊. Aptamer blotting による細胞中の蛋

白質に対する DNA アプタマーの探索 (1). 第 86 回日本化学会春季年会. 千葉, 3.27-30, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

プリオン病早期検出法の確立に関する研究

分担研究者 八谷如美 東京医科大学生理学第二講座

研究要旨 アンフォルジンは、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新規分子シャペロンである。この高度の解きほぐし活性を検討するために、我々は生体材料を用いた検討を行った。モデル系として、生体内での高度蛋白質凝集産物であるピック病脳に蓄積するピック小体（構成成分として異常リン酸化タウが同定されている）を用いて検討した。具体的な方法として、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、回収したピック小体をウエスタンブロット法によりタウ抗体との反応性を検討した。その結果、アンフォルジン処理をしないピック小体は、500個でもほとんどシグナルが得られなかったのに対し、アンフォルジン処理によりタウ抗体による検出感度を1,000倍以上改善した。また、BSE脳を用いた preliminary な検討を行った所、BSEプリオン検出感度の大幅な向上が認められた。

A. 研究目的

プリオン病に関わるプリオン蛋白質には、正常型 (PrP^{C}) と感染型 (PrP^{Sc}) の2つのアイソフォームが存在し、 PrP^{C} の高次構造変換による PrP^{Sc} 複製がその発症機構とされる。

PrP^{C} から PrP^{Sc} への変換に際しては、未同定の因子 (factor X) の関与により PrP^{C} が一旦 unfold されると考えている。このことは、正常に folding された分子 (e.g. PrP^{C}) を標的とするアンフォルジン g factor の存在を暗示する。既知の一般的な分子シャペロンは misfold された分子を標的とするのに対し、この分子は正常に folding を受けた分子を標的とする新しいクラスの分子シャペロン (アンフォルジン g chaperone) の可能性が示唆される。我々はこのような機能を有する分子を出芽酵母から同定し、その性質を解析してきた。

出芽酵母 *S.cerevisiae* から我々が見出したアンフォルジンは、単量体での分子量が58キロダルトン、多量体での分子量約700キロダルトンのリング状シャペロンであり、酵母細胞内の極性決定、出芽、およびアクチンの高次構造修飾に働いていると考えられている。アンフォルジンを高発現させた酵母では multibud を形成し出芽軸の異常が観察され増殖時間が通常の約30%に低下、

一方ノックアウトした酵母では出芽後分裂環の形成を行うことができず異常な形態を示し、通常の増殖温度 30°C においては増殖速度の低下が観察された。ところが面白いことに、このアンフォルジンノックアウト酵母を低温状態にさらすと、野生型の酵母ではほぼ増殖を停止するのに対して、逆に増殖が加速する現象が観察された。このことから、蛋白質を安定して立体構造を保持しつつ発現させうるホスト株としての応用性が示唆された

試験管内の実験系においては、F-アクチンを基質としてアンフォルジンを作用させた場合、線状の F-アクチンはサークル状の構造を示し、アンフォルジンが Dot 様に結合していることを見出し、この様子を蛍光顕微鏡下で可視化することができた。このとき、F-アクチンのトリプシン感受性が上昇していることから、サークル状 F-アクチンは線状 F-アクチンに比較して柔軟な構造をとっていることがわかった。また、電子顕微鏡観察の結果から、アンフォルジンの特徴的なリング状構造は ATP 存在下において開口しており基質がリング内の cavity に容易に接触できるが、ATP 非存在下では開口部が閉鎖され基質とは相互作用ができ

ない構造をとっていることが明らかになった

アンフォルジンが基質と結合するには、この open リング状の構造が必須であることから ATP を要求することが判明した。さらにアンフォルジンの試験管内 ATP 依存性基質蛋白質アンフォルジン g 活性には基質特異性がないことを見出し、この結果を応用して所謂蛋白質凝集病の病因となる3種類の基質（パーキンソン病：アルファシヌクレイン、アルツハイマー病：アミロイドベータペプチド 1-42、プリオン病：ベータリッチ組み換えプリオン蛋白質）についてアンフォルジンがこれらの凝集体を unfold できるか否かの検討をおこない、すべての基質について ATP 存在下で高次構造を unfold し、各基質のトリプシン感受性を上昇させることが明らかになった。

そこで、生体内での高度蛋白質凝集産物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後に、BSE 感染脳からの BSE プリオンの検出を試みた。

B. 研究方法

2 検体、3 領域の孤発性ピック病剖検脳から厚さ 5 μm の凍結切片を作製し、抗リン酸化タウ抗体 AT8 にて免疫組織染色後、スライドガラス上でレーザーマイクロカッターにてピック小体を単離、回収した。

次に、ピック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、回収したピック小体を SDS-PAGE にて分離した後、抗リン酸化 tau 抗体 (AT8 及び AT100) を用いたイムノブロッティングを行った。脳組織切片からの Sarkosyl 不溶性分画は、定法により回収した。BSE 感染脳は、国立感染症研究所細胞化学部山河芳夫博士の協力の元、処理を行った。

アンフォルジンによる回収したピック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。

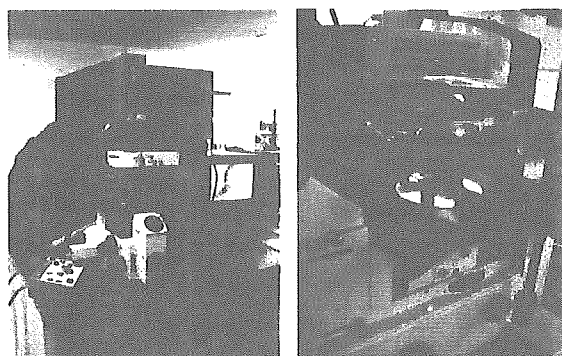
(倫理面への配慮)

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・神経センター及び東京医科大学の倫理規定に従った。また、BSE 脳の取扱に関しては、国立感染症研究所の取扱規定に従い、当該研究所内ですべての実験を施行した。

C. 研究結果

1. 疾患由来の細胞内封入体を、レーザーマイクロカッターと光学顕微鏡を組み合わせた独自のシステムにより周辺組織の混入なく高純度に単離・回収する系を構築した。

レーザーマイクロダイセクション



2. 出芽酵母から同定した強力な蛋白質解きほぐし作用を有するシャペロン様蛋白質; アンフォルジンの構造を示す。

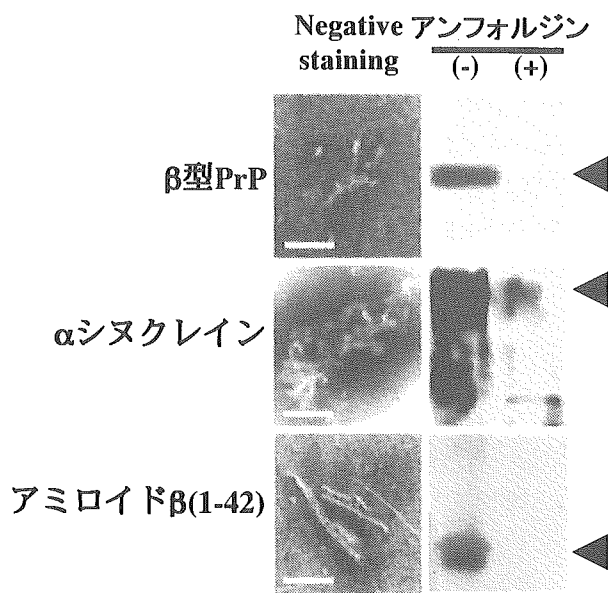
開口状態 (+ATP)

閉口状態 (-ATP)

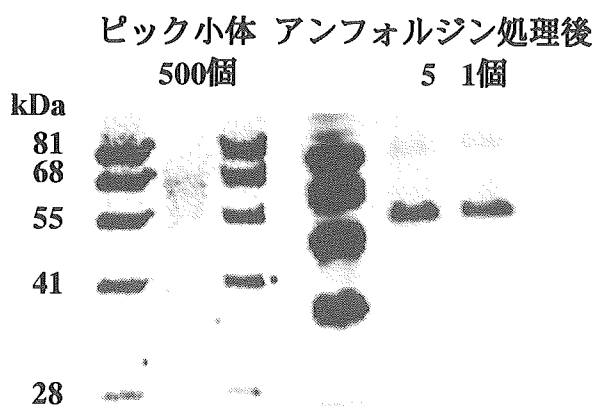


3. アンフォルジンは、試験管内で β 型プリオン蛋白質、アルツハイマー病に関わるアミロイド β ペプチド(1-42)、パーキンソン病に関わる α -シヌクレインなどの極めて難溶性である異常凝集蛋白

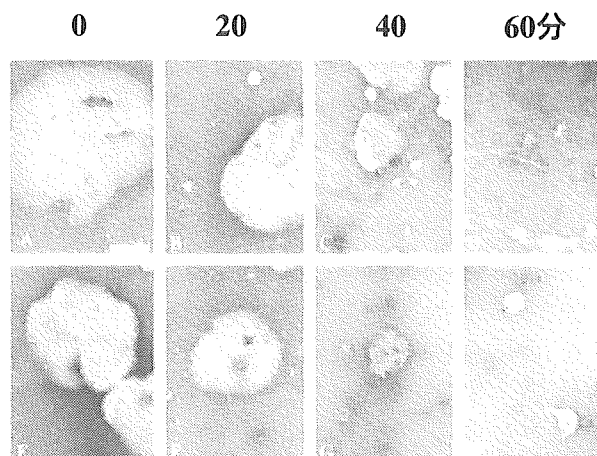
質を効果的に解きほぐし、これらのトリプシン感受性を飛躍的に上昇させることができる。



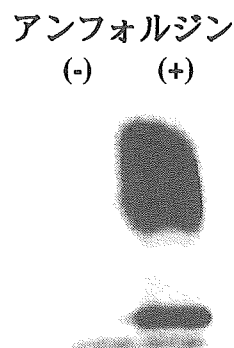
4. ピック小体をアンフォルジン処理後にウエスタンブロット法により検討した結果、通常処理では単離した 500 個のピック小体を用いても異常リン酸化タウシグナルの検出が困難であったが、アンフォルジン処理後には、わずか 1 個のピック小体からタウを鮮明に検出できた。



5. 電子顕微鏡により、時間経過と主にピック小体の解きほぐし像が観察された。次図において、アンフォルジンとの反応後 1 時間までの解きほぐしの様子を示す。



6. BSE 脳を用いた検討結果を示す。アンフォルジン処理により、わずか 5μg の BSE 感染脳より、BSE プリオンが検出される。



D. 考 察

現在の PrP^{Sc} 検出法は、そのほとんどすべてが抗原抗体反応に依存している。これまで、抗体の改良に着目した研究は多く認められるが、抗原提示能の改善に関わる検討はほとんどされていない。しかしながらこの点は、PrP^{Sc} を含む高凝集性蛋白質を研究の対象とする場合、とりわけ重要なポイントであるため、我々はアンフォルジンの高感度診断法への応用の可能性を検討した。すなわち、アンフォルジンの極めて高度の解きほぐし活性は、高凝集性蛋白質の抗原提示能を大幅に改善できる可能性を有すると考えたからである。

実際、アンフォルジン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、今回の検討により、アンフォルジンの解きほぐし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。

今後の応用例として、ウエスタンブロットのみならず、ELISA法その他の抗原抗体反応に基づく診断法への応用が期待されるため、今後 PrP^{Sc} の高感度検出法の検討を通じ、プリオン病の早期診断法確立を目指していく。

また、プロテオーム解析の主役は、液体クロマトグラフィー (LC) と質量分析計 (MS/MS) の組み合わせであるが、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。従って、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、この問題の改善につながるかもしれない。

E. 結論

アンフォルジンは BSE プリオンを含む異常凝集蛋白質の抗原抗体反応による検出感を大幅に改善する可能性が示唆された。これらのことから、BSE を含むプリオン病の早期診断への貢献が期待される。

参考文献

- 1) Ohkubo T, Sakasegawa Y, Toda H, Kishida H, Arima K, Yamada M, Takahashi H, Mizusawa H, Hachiya NS, Kaneko K: Three-repeat tau 69 is a major tau isoform in laser-microdissected Pick bodies. *Amyloid*. in press,
- 2) Hachiya NS, Ohkubo T, Kozuka Y, Yamazaki M, Mori O, Mizusawa H, Sakasegawa Y, Kaneko K: More than a 100-fold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric actin interacting protein 2/d-lactate dehydrogenase protein 2. *Anal Biochem*. 347: 106-111,2005

- 3) 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
- 4) Hachiya NS, Sakasegawa Y, H. S, 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
- 5) Hachiya NS, Sakasegawa Y, H. S, 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

F. 健康危険情報
とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表
- 1) 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* 2005;374:98-103.
- 2) Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Ohkubo T, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K. Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327:894-899.
- 3) Tamura Y, Sakasegawa Y, Omi K, Kishida H, Asada T, Kimura H, Tokunaga K, Hachiya NS, Kaneko K, Hohjoh H. Association study of the chemokine, CXC motif, ligand 1 (CXCL1) gene with sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. *Neurosci Lett* 2005;379:149-151.
- 4) Noma T, Ikebukuro K, Sode K, Ohkubo T, Sakasegawa Y, Hachiya NS, Kaneko K. Screening of DNA aptamers against

- multiple proteins in tissue. *Nucleic Acids Symposium Series* 2005;49:357-358.
- 5) Hachiya NS, Ohkubo T, Kozuka Y, Yamazaki M, Mori O, Mizusawa H, Sakasegawa Y, Kaneko K. More than a 100-fold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric actin interacting protein 2/d-lactate dehydrogenase protein 2. *Anal Biochem* 2005;347:106-111.
 - 6) Omi K, Hachiya NS, Tokunaga K, Kaneko K. siRNA-mediated inhibition of endogenous Huntington disease gene expression induces an aberrant configuration of the ER network *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:1229-1235.
 - 7) Kaneko K, Hachiya NS. Hypothesis: Gut as source of motor neuron toxin in the development of ALS. *Med Hypotheses* 2006;66:438-9.
 - 8) Ohkubo T, Sakasegawa Y, Toda H, Kishida H, Arima K, Yamada M, Takahashi H, Mizusawa H, Hachiya NS, Kaneko K. Three-repeat tau 69 is a major tau isoform in laser-microdissected pick bodies. *Amyloid* in press
 - 9) 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.
 - 10) 八谷如美, 金子清俊. プリオン研究の進展. *VIRUS REPORT*. 2:14-19, 2005.
 - 11) 八谷如美, 金子清俊. プリオン病の現状-牛海綿状脳症と変異型CJDを中心に-. *LABIO* 21. 22:5-10, 2005.
 - 12) 八谷如美, 金子清俊. 牛海綿状脳症 (BSE) と変異型CJD. *Bios*. 10:7-8, 2005.
 - 13) 八谷如美, 金子清俊. プリオン蛋白質異常化の分子機構. *化学療法の領域*. 22:63-68, 2006.
 - 14) 八谷如美, 金子清俊. プリオン病の治療-現状と将来展望-. *Annual Review*2005 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.
 - 1) Hachiya NS, Yamada M, Jozuka A, Sakasegawa Y, Kaneko K. Prion disease and Unfoldase chaperone:an ATP-dependent novel protein-アンフォルジグ chaperone. 30th FEBS & 9th IUBMB Conference:The Protein World. Budapest, July 2-7, 2005.
 - 2) Noma T, Ikebukuro K, Sode K, Ohkubo T, Sakasegawa Y, Hachiya NS, Kaneko K. *In vitro* selection of DNA aptamers against proteins in tissue. Second World Congress on Synthetic Receptors. Zalzburg, Sept 7-9, 2005.
 - 3) Noma T, Ikebukuro K, Sode K, Ohkubo T, Sakasegawa Y, Hachiya NS, Kaneko K. Screening of DNA aptamers against multiple proteins in tissue. The 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (SNAC2005). Fukuoka, Sept 20-22, 2005.
 - 4) Hachiya NS, Ohkubo T, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K. Over a hundredfold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric Aip2p/Dld2p. 45th American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Francisco, Dec 10-14, 2005.
 - 5) 渡邊光太, 金子清俊, 八谷如美. 正常型プリオン蛋白質の分化誘導下における輸送機構. 2005年プリオン研究会. 山形, 8.26-27, 2005.
 - 6) 小塚芳道, 金子清俊, 渡邊光太, 八谷如美. Possible evidence of a missing link between prokaryotes and eukaryotes; Prosenence of subcellular membrane system in newly discovered marine microorganisms. 第78回日本生化学会大会. 神戸, 10.19-22, 2005.
 - 7) 小見和也, 八谷如美, 徳永勝士, 金子清俊. Requirement of huntingtin in the maintenance of endoplasmic reticulum morphology. 第78回日本生化学会大会. 神戸, 10.19-22, 2005.
 - 8) 八谷如美, 渡邊光太, 逆瀬川裕二, 金子清俊. Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondris-mediated apoptosis and PrP-containing deposits *in vitro*. 第78回日本生化学会大会. 神戸, 10.19-22, 2005.

2. 学会発表

- 9) 八谷如美, 大久保卓哉, 小塚芳道, 逆瀬川裕二, 金子清俊. Over a hundredfold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by アンフォルジン/oligomeric Aip2p. 第78回日本生化学会大会. 神戸, 10.19-22, 2005.
- 10) 大久保卓哉, 逆瀬川裕二, 有馬邦正, 山田光則, 水澤英洋, 八谷如美, 金子清俊. ピック小体の主要構成蛋白は異常リン酸

化タウ69kDaである. 第28回日本分子生物学会年会. 福岡, 12.7-10, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

3. 特許取得
なし
4. 実用新案登録
なし

プリオン分子のダイナミクスの検討と In Silico での創薬スクリーニング

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 構造生物学的測定法（NMR, 赤外分光法, 蛍光）等により, プリオン分子の構造, ダイナミクス, 熱安定性が明らかになった。また, 粗視化した分子動力学シミュレーションにより, 正常型から異常型への立体構造変換過程をシミュレーションすることが可能となった。これにより, 抗プリオン作用を有する薬剤の作用メカニズムを構造生物学的に明らかにするとともに, それに基づく治療薬開発に向けた理論的根拠を確立することが出来た。

A. 研究目的

BSE（狂牛病）やクロイツフェルト・ヤコブ病等に代表されるプリオン病は, 社会に大きな不安を与えている。しかしプリオン複製のメカニズムは, 未だ解明されたとはいえない状況にある。正常型プリオンの立体構造は, NMR により決定されたが, 異常型プリオンの立体構造は, 電顕によるモデルは提出されているものの, 未だ決定されていない。Stanley B. Prusiner 博士（1997 年ノーベル賞受賞）によれば, プリオンは核酸を含まず, 主にタンパク質からなる感染性粒子であり, その病原性は, 正常型から異常型への立体構造変換にある。またその際, プリオンの共有結合は変化せず, 主に非共有結合のみが変化するとされる。しかし, その実体は未だ不明である。

本研究は, 正常型プリオンの構造, ダイナミクス, 安定性を実験的に調べるとともに, 構造変換過程をシミュレーションすることにより, 未だ解き明かされていない立体構造変換過程に対する理解を深め, プリオン病治療薬開発に資することを目的とする。

B. 研究方法

正常型における初期の構造変換が, どこで起きるかは, 静的な立体構造を眺めていてもまずわからない。そこで, ダイナミクスを直接測定するか, あるいはシミュレーションする必要がある。我々は, 本研究において構造生物学的な計測方法（NMR, 蛍光, 赤外）を用いて, 正常型

プリオンの揺らぎ, ダイナミクス, 熱安定性を実験的に調べた。プリオンを構成する原子のダイナミクスを溶液中の自然な状態において, CPMG 緩和分散法により調べた。

また粗視化した分子動力学法を用い, プリオンの正常型から異常型への立体構造変換過程を, 原子レベルの詳細にわたってシミュレーションした。またこの構造変換を阻止する物質を発見する際に, どこをターゲットとすればよいか, という点を考察した。

（倫理面への配慮）

特に該当なし

C. 研究結果

CPMG 分散法により, ミリ秒からマイクロ秒の遅いタイムスケールの揺らぎが, ヘリックス B と C に分布していることが明らかになり, これらの部位が, 遺伝性のヤコブ病における変異部位と関連していることが確認された。

また, ATR を用いた赤外分光法により, 水溶液中でのプリオンの二次構造変化を凝集状態も含めて, リアルタイムで測定することが可能となった。

また, 蛍光測定により, プリオン蛋白全体のフォールディング状態に関する知見を得られることも分かった。

郷モデルを用いた粗視化シミュレーションにより, 正常型（NMR 構造）から異常型（電顕構造）への構造変換過程をシミュレーションすることが可能となった。現在は, 単分子によるシミュレーションを行っ

ているが、N末のβヘリックスが早期に形成され、その後C末のαヘリックスが再配置することが分かった。また、この反応の途中にN末とC末部分が独立に運動するような中間的な構造（中間体）が存在することが分かった。

一般に、このような蛋白質のダイナミクス情報、或いは熱安定性情報に基づいて、低分子化合物の*in silico*スクリーニングを行う場合（SBDD）、ターゲットとなる部位を限定する必要がある（範囲を限定しない方法もある）。酵素の場合は主に活性部位、分子間相互作用の場合は相互作用部位ということになるだろう。しかしプリオンは、明らかに酵素ではなく、例えば、正常型と異常型との相互作用部位がどこにあるのかも、分かっていない。

プリオンでは、正常型から異常型への立体構造変換が病原性発現のスイッチになるので、立体構造変換の初期に起きる構造変化を食い止め、正常型を安定化することにより、このスイッチが入らないようにすることが出来る可能性がある。MRで明らかになったような揺らぎの多い部位を、三次元立体構造上にマッピングすると、そのような残基はプリオンの特定の部位に集中していることが分かった。

これらの情報に基づいて、我々は、ACDSCデータベースを用いて、*in silico*スクリーニングを行い、同部位に特異的に結合し、プリオンの構造変換を阻止する化合物を発見することが出来た。

このような抗プリオン作用のメカニズムを、上述のシミュレーション結果と比較した結果、正常型において近接しているが、異常型において遠く離れているようなアミノ酸残基に水素結合を架けるような薬剤が、有効であるらしいという示唆が得られた。

D. 考察

プリオンの立体構造変換過程を、様々な物理化学的方法により測定することは、現在の技術で可能である。また、粗視化したモデルを用いて、実験結果と組み合わせることにより、原子レベルで構造変換の全容

を理解することが可能であると考えられる。またこのような厳密な情報を得ることより、より有効な論理的治療薬開発が可能になるであろう。

E. 結論

構造生物学的測定と分子動力学シミュレーションにより、プリオンのダイナミクス及び熱安定性が原子レベルで明らかとなった。また、抗プリオン薬の作用機構に関する構造生物学的な手掛かりが得られた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Soeda A, Nakashima T, Okumura A, Kuwata K, Shinoda J, Iwama T: Cognitive impairment after traumatic brain injury-a functional magnetic resonance imaging study using the Stroop task. *Neuroradiology*. 47: 501-506, 2005
- 2) Hashimoto K, Kato Z, Nagase T, Shimozawa N, Kuwata K, Omoya K, Li A, Matsukuma E, Yamamoto Y, Ohnishi H, Tochio H, Shirakawa M, Suzuki Y, Wanders RJ, Kondo N: Molecular Mechanism of a Temperature-Sensitive Phenotype in Peroxisomal Biogenesis Disorder. *Pediatric Research*. 58: 263-269, 2005
- 3) 桑田一夫：バイオインフォーマティクスによるプリオン病治療薬の開発。化学療法の領域。22巻：87-93。2006年

2. 学会発表

- 1) Kazuo Kuwata: Drug discovery based on the structural dynamics of prion. Chem-Bio Informatics Society YEAR 2005. August 24-26, 2005 RIKEN Yokohama Institute.
- 2) 桑田一夫, 中村寛則, 鎌足雄司, 松本友治: PrionはDownhill Folderか? 生物物理日本生物物理学会第43回年会。平成17年11月

3. その他

- 1) 桑田一夫：国立感染症研究所平成 17 年度学友会シンポジウム（平成 17 年 2 月，東京，「テクノロジーの進化と感染症研究の展望」演者）
- 2) 桑田一夫：プロテイン・クロストークサロン'05（平成 17 年 3 月，茨城，「プリオンの構造ダイナミクスと治療薬開発」演者）
- 3) 桑田一夫：理研シンポジウム「Pressure and protein dynamics」（平成 17 年 3 月，兵庫，「Slow conformational dynamics, Prion protein」演者）
- 4) 桑田一夫：医薬基盤研究所シンポジウム「in silico 創薬の現状と展望」（平成 17 年 11 月，東京，「プリオンの立体構造解析と抗プリオン薬の in silico デザイン」演者）
- 5) K.Kuwata: "Semi-classical quantization of protein dynamics:Novel NMR relaxation formalism and its application to prion."T.Kitamono(Ed.)PRIONS; Food and Drug Safety. Springer-Verlag Tokyo. 2005
- 6) 桑田一夫：プリオンタンパク質，「タンパク質科学」，化学同人，315-330，2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

対立遺伝子特異的 RNAi 活性を評価するシステムの確立

分担研究者 北條浩彦 国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨：遺伝性プリオン病の原因遺伝子である変異プリオン (*PrP*) 遺伝子の発現を特異的に抑制する対立遺伝子 (アリル) 特異的 RNAi 誘導の実現を目指し、アリル特異的 RNAi 効果を簡便に評価するシステムの確立を行った。確立したシステムは、レポーターアリルを利用し、従来の方法では解析が不可能であった正常型/変異型アリルのヘテロの状態、変異型アリルに対する RNAi ノックダウン効果と正常型アリルに対する RNAi の影響を同時に解析することを可能にした。

A. 研究の目的

ヒトプリオン遺伝子には多くの遺伝子変異が知られている。しかも、その多くは、アミノ酸変化を伴う塩基置換であり、さらに遺伝性のプリオン病との有意な関連も報告されている。この遺伝性プリオン病に関連する変異プリオン遺伝子の発現を特異的に抑制することができれば、遺伝性プリオン病の治療・予防に大きく貢献することができると考えられる。そこで、今日遺伝子機能阻害方法として幅広く利用されている RNA interference (RNAi) 技術を用いて、遺伝子変異を持った対立遺伝子 (変異対立遺伝子) だけを特異的にノックダウンする対立遺伝子 (アリル) 特異的 RNAi 誘導法の確立とその評価方法の確立を試みた。

アリル特異的 RNAi 誘導を実現させるためには、まず、その評価方法を確立しなければならない。そこで、レポーター遺伝子を用いてレポーター対立遺伝子 (レポーターアリル) 構築し、それらを用いてアリル特異的 RNAi 活性を簡便に評価するシステムの確立を行った。

B. 研究方法

1. ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子とウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子をそれぞれコードした発現プラスミドを利用してレポーターアリルを構築した。まず、変異アリル、正常アリルに相当するオリゴ DNA を合成し、それらをそれぞれのレポーター遺伝子の 3' 非翻訳領域に挿入して変異レポーターアリルそして正常レポーターアリルを構築した。

2. 変異アリルをターゲットとする合成 siRNA を作製し、正常、変異レポーターアリルをそれぞれ含んだプラスミド DNA とベクター・ガラクトシダーゼ遺伝子を含んだ発現プラスミド DNA (コントロールとして用いた) をリポフェクタミン 2000 試薬 (Invitrogen 社) を用いたりポフェクションによってヒト HeLa 細胞に導入し、24 時間後、細胞抽出液を調製した。
3. 得られた細胞抽出液を用いて、発現した両ルシフェラーゼ活性そしてコントロールのベクター・ガラクトシダーゼ活性を測定した。そして、ベクター・ガラクトシダーゼの活性値を基に両ルシフェラーゼの活性量 (発現量) を正常化し、テストした siRNA の変異アリルに対するノックダウン効果と正常アリルに対する影響を評価した。
4. 今回、本研究は評価システムの確立を第一の目標とした。そこで、様々な検討を容易に行うために、すでに十分研究されている amyloid precursor protein (APP) 遺伝子の Swedish 型変異 (アミノ酸変化を伴う 2 塩基変異) と London 型変異 (アミノ酸変化を伴う 1 塩基変異) をモデル変異アリルとしてシステムの確立を試みた。

C. 研究結果

1. Swedish 型変異に対する siRNA の効果を検討した結果 (図 1)、設計した一つの siRNA [siAPP(T12/C13)] を除いて変異アリルに対する発現抑制が観察された。一方、それらの siRNA の正常型アリルに対する

影響は、ほとんど影響を与えないものから中程度(40%程)の発現抑制を誘導するものと様々な影響が観察された。

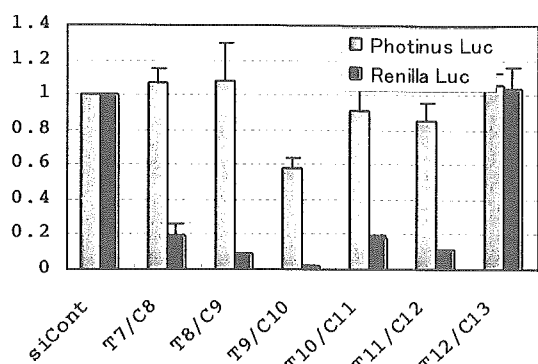


図1 (正常型:P.Luc; 変異型:R.Luc)

London型変異をモデル変異アリルとして解析した結果、V717I, V717FタイプのLondon型変異をターゲットとするsiRNAでは、変異型アリルを60~70%ノックダウンするsiRNAが観察されたが、V717GタイプのLondon型変異をターゲットとするsiRNAでは、極わずかしか発現抑制が誘導されなかった。Swedish型変異の結果と比べて、全体的に変異アリルと正常アリルとの間に大きな発現量の差を生じさせる、すなわち、アリル特異的な発現抑制効果は観察されなかった。

我々はさらに、改良型siRNAを用いて、アリル特異的RNAi誘導が改善されるか否かについても検討した。今回テストした改良型siRNAは、Fork-siRNAで、センス鎖の3'末端にミスマッチを導入しアンチセンス鎖とのアニーリングを阻害したsiRNA二量体である。このFork型siRNAは従来型のsiRNAと比べてRNAiを強く誘導することが知られている。このFork-siRNAを用いてSwedish型、London型変異アリルに対する発現抑制効果の亢進、そして、正常型アリルに対するオフターゲット効果の減少が誘導されるか否かを調べた。その結果、Swedish型変異アリルでは全体的にアリル特異的RNAi活性が高まり、さらに、従来型のsiRNAではRNAi活性を誘導することができなかったsiAPP(T12/C13)においても、

Fork型にすることでアリル特異的RNAi活性が誘導された。

London型変異アリルに対しても、Fork型siRNAを用いることで、アリル特異的RNAi活性の改善が観察されたが、その程度はSwedish型変異と比べて小さく、また、変異のタイプによって異なっていた。

2. 正常型そしてSwedish型の完全長cDNAを持ったAPP発現プラスミドと、上記で解析したSwedish型変異に対するsiRNAをCos-7細胞に導入し同様の解析を行った。ウエスタンブロット法、ELISA法を用いて解析した結果、レポーターアリルを用いて評価した結果とほぼ同様の結果が得られた。さらに、正常型、Swedish型の両方が発現するヘテロの条件下で、アリル特異性を示すsiRNAは、APPタンパク質の発現量に変化を与えずにベータ・アミロイドの産生を減少させることが観察された。

D. 考察

1. 本研究で行ったアリル特異的RNAi活性を評価する新システムの開発とその評価の結果、ルシフェラーゼレポーター遺伝子をレポーター対立遺伝子として利用することでアリル特異的RNAi活性を評価できることが示された。しかも今回開発した新システムは、簡便かつ短時間で結果の得られるシステムであり、さらに、従来の方法では解析不可能であった正常型/変異型アリルがヘテロで存在する条件下でもそれぞれのアリルに対するRNAi効果を検討することが可能であることも分かった。
2. 新しいシステムを用いたアリル特異的RNAi活性の評価の結果、二塩基置換と比べて一塩基置換による変異アリルを正常アリルと識別することが困難であることが分かった。さらに、塩基置換のタイプによってもアリル特異的RNAi効果が異なることも明らかになった。
3. 改良型siRNAによるアリル特異的RNAi活性の改善効果を検討した結果、程度の差はあるもののアリル特異的RNAi活性が