

厚生労働科学研究費補助金  
(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)

プリオン蛋白及びその関連遺伝子の  
構造・機能に基づく治療法の開発

平成18年度 総括・分担研究報告書

平成19年3月

主任研究者 片峰 茂

はじめに

平成18年度の「プリオン蛋白及びその関連遺伝子の構造・機能に基づく  
治療法の開発」の研究報告を公表する。

平成19年3月

主任研究者 片峰 茂

## 研 究 班 構 成

区 分	氏 名	所属施設名	所属施設に おける職名	T E L F A X
主任研究者	片峰 茂	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座	教 授	T095-849-7057 F095-849-7060
分担研究者	堂浦 克美	東北大学大学院 医学系研究科 プリオン蛋白分子	教 授	T022-717-8232 F022-717-8148
分担研究者	堀内 基広	北海道大学大学院 獣医学研究科 プリオン病学講座	教 授	T011-706-5293 F011-706-5293
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	教 授	T058-230-6145 F058-230-6241
分担研究者	調 漸	長崎大学医学部・ 歯学部附属病院・ へき地病院再生 支援・教育機構	教 授	T095-849-7774 F095-849-7775

# 目 次

## I. 総括研究報告書

プリオン蛋白及びその関連遺伝子の構造・機能に基づく  
治療法の開発

長崎大・院医・感染免疫学 片峰 茂 1

## II. 分担研究報告書

1. PrP アミノ末端領域の抗 Dpl 作用領域の解析

長崎大・院医・感染免疫学 片峰 茂 9

2. 治療薬開発の標的となるプリオン増殖複製関連因子の探索

東北大・院医・プリオン蛋白分子 堂浦 克美 13

3. プリオン増殖に関する遺伝子の探索

北海道大・院獣医・プリオン病学 堀内 基広 18

4. NMR 構造に基づく抗プリオン薬の探索

岐阜大・人獣感染防御研究センター 桑田 一夫 24

5. プリオン病患者に対する治療戦略における診断マーカー及び  
治療評価マーカーの評価

長崎大・へき地病院再生支援 調 漸 28

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 39

IV. 研究成果の刊行物・別刷 43

# 総括研究報告

## プリオン蛋白及びその関連遺伝子の構造・機能に基づく治療法の開発

主任研究者：片峰 茂 (長崎大・大学院医歯薬学総合研究科・教授)

### 研究要旨

プリオン病関連遺伝子 (疾患感受性遺伝子とプリオン類似蛋白遺伝子) の構造・機能を解明し、診断治療法の開発に資することを目的として研究を行い、以下の成果を得た。(1) 論理的創薬の手法により見出した新規抗プリオン化合物 GN8 の作用メカニズムは、細胞型プリオンに結合し、その立体構造を安定化させるためであることが明らかとなった。(2) PrP の N 末領域は Dpl に対して *in trans* のみならず *in cis* にも抑制的に機能すること、PrP の N 末領域のうちオクタペプチドリピート(OR)領域 (aa51-90) と charged motif 領域 (aa25-50) のどちらか一方のみで抗 Dpl 作用には十分であることが判った。(3) プリオン感染細胞における遺伝子発現の shRNA を用いた網羅的解析によりプリオン複製に関与する宿主遺伝子候補 4 種類を見出した。(4) プリオン感受性サブクローン N2a-5 と非感受性サブクローン N2a-1 の比較解析を実施して、プリオンの増殖 (PrP<sup>Sc</sup> の産生) に関与すると考えられる宿主遺伝子として、Amcx2, Gplbb, Fxyd2, Wbp2, Hrh1 および Cln5 の 6 遺伝子を同定した。(5) CJD の補助診断法として髄液タウ蛋白測定の有用性を示した。

### 分担研究者

堂浦 克美 (東北大・大学院医学系研究科・教授)  
堀内 基広 (北海道大・大学院獣医学研究科・教授)  
桑田 一夫 (岐阜大・人獣感染防御研究センター・教授)  
調 漸 (長崎大・医学部歯学部付属病院・教授)

### A. 研究目的

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) をはじめとするプリオン病には有効な臨床治療手段がないのが現状である。世界における牛プリオン病 (狂牛病) のヒトへの伝播をめぐるパニックに加え、我が国では不幸にも硬膜移植後の CJD 患者が多発し感染性プリオン病の脅威にさらされている。プリオン病分子機構の解明に基づく診断・治療法の開発が急務である。プリオン病はプリオン蛋白 (PrP) の正常から異常への立体構造変換に起因することが明らかになっており、この構造変換の制御が治療法開発の眼目になる。しかし、プリオン増殖機構の全容は判明していない。従来よりその存在が推定されているプリオン増殖に関する宿主因子の同定や正常 PrP の機能、異常 PrP による神経変性機構の解明が重要課題である。最近、プリオン類似蛋白 (PrPLP/Dpl) をコードする遺伝子が同定された。当初より構造の類似性から PrP との機能的関連が予想されたが、PrPLP/Dpl が正常 PrP と競合的に機能し、神経細胞では毒性を発

揮することが明らかとなり、異常 PrP との機能的相性が示唆されている。本研究はプリオン蛋白 (PrP) の構造論的分子基盤に基づきプリオン病治療薬の開発を目指すとともに、プリオン関連宿主遺伝子・産物の同定と機能解明により治療のための新たな分子基盤を提案することを目的とする。具体的には以下の 3 研究プロジェクトを遂行する。

PrP の構造に係るハイオ・インフォマティクスに基づく新規抗プリオン物質の探索：近年、NMR 構造解析により正常 PrP<sup>C</sup> の C 末側の球状構造に 3 つの  $\alpha$ -helix 領域 (A, B, C) と 2 つの短い  $\beta$ -sheet 領域 (S1, S2) が存在することが明らかとなった。一方、異常 PrP<sup>Sc</sup> の構造は不明の点が多いが大部分  $\beta$ -sheet 構造を有する。最近、研究分担者の桑田らは高圧 NMR 解析により中間体 (PrP<sup>I</sup>) の存在を証明し、A, B の 2 つの  $\alpha$ -helix 構造が消失していることを明らかにした。もし、PrP<sup>C</sup> の球状構造のゆらぎを制御し、PrP<sup>I</sup> への変換を抑制することができれば、有力な治療方策となる。現時点では、PrP の構造解析は世界の少数のグループにより行われ、有用なデータもごく限られたものである。したがって、PrP 構造解析データにもとづく薬剤開発の試みは、世界で未だ例のない先端的試みであると考えられる。

プリオン増殖に関する宿主因子の同定：PrP 以外の宿主遺伝子産物がプリオンの複製やプリオン病の病態に関与することは明らかであり、そのような宿主遺伝子 (プ

リオン病関連遺伝子)の同定に向けて国内外の研究者がしのぎを削っている。本研究におけるプリオン病関連遺伝子の探索のための実験系の特色は、動物に比べて解析が容易なプリオン感染培養細胞モデルを使用することである。培養細胞のプリオン感受性の差に基づく網羅的遺伝子探索と、RNA 干渉法によるアプローチを併用し、世界初のプリオン複製に関与する宿主遺伝子の同定を目指す。

遺伝子改変マウスを用いた PrP, PrPLP/Dpl の機能とプリオン増殖機構の解明: PrPLP/Dpl およびその遺伝子はブルシナー博士のグループと我々が数年前ほぼ同時に発見した新規蛋白(遺伝子)である。PrP 類似の蛋白としては無論初のものであり、その機能には極めて興味もたれている。神経変性に関わる分子であることも申請者らが明らかにした。本研究では種々の PrP と PrPLP/Dpl 変異体の Tg マウスを作製し、その PrPLP/Dpl の神経毒性に及ぼす効果、抗プリオン効果を検討するが、先駆的な成果を挙げる事が十分に期待できる。

## B. 研究方法

PrP の構造に係るバイオ・インフォーマティクスに基づく新規抗プリオン物質の探索: *in silico* スクリーニングにより見出された抗プリオン薬 (GN8) の抗プリオンメカニズムを実際に調べるため、①Biacore を用い、GN8 とリコンビナント・プリオン蛋白質との相互作用を測定した。②GN8 の存在下、若しくは非存在下で、NMR の HSQC スペクトルを取り、結合サイトの同定を試みた。③GN8 の類似体を有機合成し、その活性を *ex vivo* で測定した。④GN8 の治療効果を確認するためプリオン感染動物を用いた *in vivo* 実験 (脳内投与) を行った。Dpl/PrPLP による神経変性死の分子機構の解析: PrP の aa25-50 を欠損させた PrPdelN と OR 領域を欠損させた PrPdelOR、PrP の aal-124 と Dpl の aa58-179 の融合蛋白 fuPrP-Dpl を発現する transgene を PCR 法で作製した。構築した transgene を syrian hamster promotor の下流に挿入して Tg マウスを作製した(fig1)。また、当教室で既に作製していた Dpl を過剰発現する Tg マウス (Tg(Dpl))を系統維持して使用した。

交配実験: PrP ノックアウトバックグラウンドとした Tg(変位型 PrP)PrP<sup>-/-</sup> と Tg(Dpl)PrP<sup>-/-</sup> を交配させて、変位型 PrP と Dpl を共発現するマウスを作製した (Tg(変異型 PrP/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>)。Dpl 発現による神経細胞変性死を変位型 PrP の導入で回復させることが出来るかどうかを発症日と病理をみることで判定した。

発症の評価: 動物性歩行を呈する日を発症日とし、

logrank test で有意差を検討した。

プルキンエ細胞の脱落の評価: ホルマリン固定した小脳を薄切し標本を作製した。抗 spot35 抗体を用いて切片を免疫染色し光学顕微鏡でプルキンエ細胞が脱落しているか否かを観察した。

shRNA を用いたプリオン増殖関連因子の探索: 細胞膜に発現する分子を主な標的とし、それぞれの遺伝子に特異的な 21 塩基を選択した。デザインした DNA をプラスミドベクターに組み込み、shRNA 発現用コンストラクトを得た。マウス神経芽細胞種 N2a 細胞を宿主とし、2種のプリオン病原株(それぞれ持続感染した培養細胞 (ScN2a 細胞および N167 細胞)、さらに非感染の N2a 細胞)に発現ベクターを導入した。遺伝子導入感染細胞の溶解液をプロテナーゼ K 処理後に精製し、ウエスタンブロット法により異常型プリオン蛋白産生量を検定した。バンドパターンは解析ソフトを用いて概ね数値化し、ベクターのみを導入した細胞 (mock) を対照とした。さらに、組換えマウス PrP(121-231)をビオチン標識しアビジン磁気ビーズに結合させ、PrP アフィニティカラムを作製した。非感染マウス神経芽細胞腫細胞 (N2a) と感染細胞で異常型 PrP が常時発現しているマウスの神経芽細胞腫細胞 (N2aSc) のタンパク質を生合成ラベルした後、細胞抽出液から密度勾配遠心法にて PrP を含むラフト画分を分離した。このラフト画分を PrP アフィニティカラムに結合させた。溶出は段階的に塩濃度を上昇させることによって行い (200、400、600、800 mM NaCl)、得られた溶出液を 10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって展開し、感染と非感染細胞間で比較した。

プリオン感受性・非感受性細胞を用いたプリオン増殖関連因子の探索: DNA マイクロアレイ法を用いて、プリオン感受性マウス神経芽細胞 Neuro2a(N2a)サブクローンとプリオン非感受性 N2a サブクローンの遺伝子発現比較解析を進め、プリオン感受性 N2a で高発現する遺伝子の同定を実施した。N2a サブクローン N2a-3 および N2a-5、プリオン非感受性サブクローンの N2a-1 を用いた。細胞から totalRNA を回収し、one-cycle IVT labeling kit (Affymetrix) にて biotin 化標識 cRNA を作製した。DNA マイクロアレイチップは mouse 430 2.0 (Affymetrix) を使用し、GeneChip system (Affymetrix) を使用してデータを取得した。データは、GCOS (Affymetrix) および Avadis (Standard genomics) を用いて解析した。遺伝子発現は Taq Man assay を用いて定量解析した。内在性マーカーとして GAPDH を使用した。siRNA は Damachom 社のライブラリーより購入し、トランスフェクションには Lipofectamine 2000 (Invitrogen)

を用いた。24 well プレートに細胞を播種後、24 時間後に siRNA (最終濃度 80 nM) をトランスフェクトした。60-72 時間後に細胞を回収して、PrP<sup>Sc</sup> および  $\alpha$ -tubulin をドットプロットにより半定量検出した。さらに、遺伝子発現ノックダウンによる PrP<sup>Sc</sup> 産生への影響を正確に評価するために、siRNA による遺伝子発現ノックダウンに伴う PrP<sup>Sc</sup> 量の変化を、細胞の total PrP (PrP<sup>C</sup> と PrP<sup>Sc</sup> の総和) と PrP<sup>Sc</sup> 量の変化、および細胞のバイアビリテイ等から、より厳密に判定することを試みた。また、選抜された遺伝子の PrP<sup>Sc</sup> 産生への関与が、使用した細胞にのみ特異的な現象であるかを調べるために、複数のプリオン持続感染 N2a サブクローンを使用して、複数のプリオン持続感染 N2a サブクローンを使用して、siRNA による遺伝子発現抑制の効果を評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験は動物実験委員会の指針の範囲内で行われた。遺伝子解析については「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて研究を行った。

### C. 研究結果

PrP の構造に係るバイオ・インフォーマティクスに基づく新規抗プリオン物質の探索: 抗プリオン物質 GN8 がリコンビナントプリオン蛋白に対して実際に結合するかどうかを、を BIAcoreT100 を用いて調べた。全長のマウス・リコンビナント・プリオンをセンサーチップ(CM5)に固定した。GN8(10, 20, 30, 40 and 50 nM) を running buffer(10% DMSO in PBS) に溶解し、1分間に 20 ml/min の流速で流した。これらの結果から、GN8 が実際にリコンビナントプリオン蛋白に対して結合し、その解離定数は、4  $\mu$ M 程度であることが分かった。

次に、全長のマウス・リコンビナント・プリオンの NMR スペクトル (HSQC) を GN8 の存在下及び非存在下で測定した。その結果、GN8 の特異的結合サイトが、N159 と E196 であることが明らかとなった。これらの部位は、ミリ秒からマイクロ秒の遅いタイムスケールの揺らぎを行っており、遺伝性のヤコブ病における変異部位とも関連していることが確認された。

また、GN8 の類似体を複数 (60 種類)、有機合成し、抗プリオン活性を測定した結果、そのいずれにおいても、ほぼ抗プリオン活性が認められた。このことより、GN8 の基本骨格を保ちつつ、抗プリオン作用が最大になるようにその化学構造を最適化することが可能であることが分かった。

プリオン感染マウスに対し、GN8 を脳内投与したと

ころ、特に副作用もなく、優位な寿命延長効果が認められた。このことから、GN8 は、抗プリオン薬のリード化合物として非常に有望である、と考えられる。現在では、末梢投与においても有効であることが分かっている。

以上により、GN8 の作用メカニズムは、細胞型プリオンに結合し、その立体構造を安定化させるためであることが明らかとなった。

Dpl/PrPLP による神経変性死の分子機構の解析: Tg(Dpl)PrP<sup>0</sup> がプルキンエ細胞変性死に伴う動揺性歩行を生後 99 $\pm$ 20 日で呈したのに対し、Tg(fuPrP-Dpl)PrP<sup>0</sup> は生後 730 日経過しても神経症状は出現しなかった。また、Tg(fuPrP-Dpl/Dpl)PrP<sup>0</sup> の潜伏期も 200 $\pm$ 52 日と有意に遅延した。

Tg(Dpl)PrP<sup>0</sup> に PrP<sup>delN</sup> を共発現させたマウス Tg(PrP<sup>delN/Dpl</sup>)PrP<sup>0</sup> ではプルキンエ細胞は回復し、500 日以上経過しても発症は認められず Tg(Dpl)PrP<sup>0</sup> と比較して有意に遅延した。同様に、Tg(PrP<sup>delN/Dpl</sup>)PrP<sup>0</sup> も発症までの潜伏期 385 $\pm$ 47 日とプルキンエ細胞は回復し、有意な回復が認められた。

RNA 干渉を用いたプリオン増殖関連因子の探索: 昨年度までに絞り込んだ 12 の候補について、shRNA の新たな配列を設計したり、化学合成 siRNA を用いたりするなどさらに検討を加えた。その結果、発現抑制により異常型プリオン蛋白の産生を阻害する 4 因子が同定された。その遺伝子産物の内訳は、受容体関連蛋白が 3、金属結合蛋白が 1 であった。

受容体関連蛋白の #58 では、shRNA、化学合成 siRNA の両方でターゲット遺伝子のノックダウンが確認され、異常型プリオン蛋白の産生が抑制された。

金属結合蛋白の #80 をターゲットとした shRNA では、正常型プリオン蛋白の発現が亢進されるにも関わらず、異常型プリオン蛋白の産生阻害が見られた。

受容体関連タンパク「B」では ScN2a および N167 のどちらにおいても異常型プリオン蛋白の産生抑制が見られたが、正常型プリオン蛋白の発現量への顕著な影響は見られなかった。

受容体関連タンパク「G」では、N2a において正常型プリオン蛋白の発現亢進が見られるにもかかわらず、ScN2a および N167 のどちらにおいても異常型プリオン蛋白の産生抑制が見られた。さらにこの分子に対する阻害剤でも検討したところ、異常型プリオン蛋白の産生抑制と全プリオン蛋白の増加が見られた。

プリオン感受性・非感受性細胞を用いたプリオン増殖



**関連因子の探索:** 一次スクリーニングとして DNA マイクロアレイ解析により、プリオン非感受性 N2a-1 に比べ、プリオン感受性 N2a-5 で 2 倍以上発現が高い遺伝子として、Fn1, Mst1, Fthfd, Armcx2, Gp1bb, Fxyd2, Wbp2, Clcn5, および Hrh1 の 9 遺伝子を、プリオンの増殖に関与する宿主因子の候補として絞り込んだ。これらの 9 遺伝子について、さらに詳細に検討するために、siRNA の導入によるバイアビリティの低下についても考慮して二次スクリーニングを行った。その結果、Armxc2, Gp1bb, Fxyd2, Wbp2, Hrh1 および Clcn5 の 6 遺伝子に対する siRNA が ScN2a5 における PrP<sup>Sc</sup> の産生を抑制することが明らかとなった。

Armxc2 に対する siRNA 処理は細胞のバイビリティには殆ど影響しないが、PrP<sup>Sc</sup> 量を約 60%程度まで減少させた。また、total PrP 量には殆ど影響しなかった。同様な傾向が Wbp2 に対する siRNA で認められた。Fxyd2 に対する siRNA 処理は細胞のバイビリティに影響しなかったが、PrP<sup>Sc</sup> 量は 40-50%程度まで減少させた。また、total PrP 量も減少傾向が認められた。同様な傾向が Gp1bb に対する siRNA で認められた。Clcn5 に対する siRNA 処理は細胞のバイビリティを約 30%程度低下させるが、PrP<sup>Sc</sup> 量および total PrP 量は大きく減少した。

この結果は siRNA の長期間処理によっても PrP<sup>Sc</sup> 量の減少が確認できた。ただし、Gp1bb に対する siRNA 処理では、単回処理の場合と異なり total PrP 量も大きく減少させた。

さらに、ScN2a5 とは異なるプリオン感受性サブクローンである ScN2a3 を用いて同様の実験を行った。その結果、ScN2a5 を用いた場合に PrP<sup>Sc</sup> 産生に対する抑制効果が認められた siRNA のうち、Armxc2, Fxyd2, Clcn5 および Gp1bb が、ScN2a3 においても PrP<sup>Sc</sup> の産生を抑制することが確認された。また、ScN2a3 を siRNA で長期間処理した場合でも、これら 4 つの siRNA は PrP<sup>Sc</sup> 産生を抑制した。また、ScN2a5 の長期処理の場合と同様に、ScN2a3 においても Gp1bb に対する siRNA の長期処理により total PrP 量も大きく減少した。

#### D. 考察

プリオン病に対する治療薬を開発するためには、プリオンの立体構造変換過程を制御するための論理的創薬基盤を整備することが重要である。本研究により、*in silico* ス

クリーニング、物理化学的測定、及びバイオアッセイを組み合わせることで、薬剤を論理的にデザインし、その構造を最適化することが、現実的に可能であることが明らかとなった。特に、プリオン病のようなタンパク質の立体構造変換が問題となるような場合に、タンパク質の立体構造を安定化させる低分子化合物が有効であることが、明らかとなった。このことは、今後のプリオン病治療薬開発において、大きな進歩である、と考えられる。

プリオン類似蛋白 Dpl の神経細胞死誘導作用と PrP<sup>C</sup> のそれに対する拮抗的防御作用の解析については、Tg(fuPrP-Dpl)PrP<sup>-/-</sup>と Tg(fuPrP-Dpl/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>の検討で、PrP の N 末領域または Dpl に対して *intrans* のみならず *in cis* にも抑制的に機能することが判った。当教室以外からの報告も合わせて考察すると、構造的に類似する PrP の C 末領域と Dpl の球状構造はプルキンエ細胞毒性作用があり、PrP N 末領域を球状構造部分と同居させることによって初めて細胞保護機能を呈する。つまり、PrP はそれ自体の蛋白構造に細胞保護領域と Dpl 類似の細胞毒性領域をもつと結論できる。また、PrP は N 末領域の aa25-50 と aa51-90 のどちらか一方があれば Dpl の細胞毒性に対して”拮抗”することが示唆された。すなわち、抗酸化作用や細胞保護作用があると報告されている OR 領域 (aa51-90) は抗酸化作用や細胞保護作用があると報告されているが、”拮抗”能力には必須ではなかった。また、PrP の細胞内移行に重要と報告された charged motif (aa23-28) 領域も Dpl の神経細胞毒性に対する拮抗作用領域のどちらかでないことを明らかとした。PrP の aa23 から aa90 に幅広く作用する因子が Dpl との相互作用を有している可能性が考えられる。ただ、PrPdel23-88 と Tg(PrPdelN/Dpl)PrP<sup>-/-</sup> 及び Tg(PrPdelOR/Dpl)PrP<sup>-/-</sup> では、前者が aa23-24 も欠失するのに対して後二者では保存されている点は考慮する必要がある。シグナルペプチドに続く 2 つのアミノ酸の有無が蛋白質の細胞内局在を変化させ、ひいては機能発現に影響を与える可能性を否定できないからである。

shRNA を用いたプリオン感染細胞における遺伝子発現の網羅的解析によりプリオン複製に関与する宿主遺伝子候補 4 種類を見出した。これらは、プリオン感染の成立や維持に関与している可能性が示唆される。4 個の内の 3 個は受容体関連蛋白であり、抗体や阻害物質を用いた細胞外からの処理による効果が期待できる。4 個の内の 2 個では、その因子のノックダウンによりプリオン蛋白質の発現亢進が見られるにも関わらず、異常型プリオン蛋白質産生を減少させる興味深い因子であった。更に解析を進め、治療薬開発のターゲット分

子となりうるか検討を進めていく。また、これまでの結果を踏まえ、異常型への構造変換が行われる微小環境を想定し遺伝子スクリーニングを進めていく。

一方、プリオン感受性の差に基づく網羅的遺伝子改析により *Amcx2*, *Gplbb*, *Fxyd2* および *Cln5* の4遺伝子の発現抑制は、*ScN2a5* とは異なるプリオン感受性サブクローンである *ScN2a3* においても、 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の産生を減少させたことから、これら4遺伝子の産物はプリオン持続感染 N2a 細胞において、 $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の産生に影響を及ぼす宿主因子である可能性が示唆された。これらの遺伝子産物が、 $\text{PrP}$  分子との直接作用を介して  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の産生に影響するのか、あるいは、これらの発現抑制が  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の産生に必要な細胞内の微小環境を変えることにより、間接的に  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の産生に影響するのかは、現時点では不明である。今後は、これらの遺伝子産物が、実際にどのように  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  産生に関与するかを検討する必要がある。現在、*Amcx2*, *Gplbb*, *Fxyd2* および *Cln5* に対する抗ペプチド抗体を作製中である。抗体が出来次第、遺伝子産物の定量解析を開始する予定である。同時に、これらの蛋白質のプリオン持続感染細胞における細胞内局在等を明らかにして、プリオン増殖との関連を調べる予定である。

ところで、治療法開発の臨床試験遂行には精度の高い早期診断法の開発が不可欠である。詳細は省略したが、本研究では、プリオン病患者における拡散強調画像・脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白・Tau 蛋白の診断の有効性の検討も行った。多数例での脳脊髄液 (t-tau 蛋白、14-3-3 蛋白)、MRI 拡散強調画像における検討を行い、脳脊髄液 t-tau 蛋白が最も陽性率が高いことを証明した。112 症例における病型分類での脳脊髄液 (t-tau 蛋白、14-3-3 蛋白)、MRI 拡散強調画像でのデータを示すことができた。

## E 結論

- (1) 論理的創薬の手法により見出した新規抗プリオン化合物 GN8 の作用メカニズムは、細胞型プリオンに結合し、その立体構造を安定化させるためであることが明らかとなった。
- (2)  $\text{PrP}$  のN末領域はDplに対して *intrans*のみならず *incis* にも抑制的に機能すること、 $\text{PrP}$  のN末領域のうちオクタペプチドリピート(OR)領域 (aa51-90) と charged motif 領域 (aa25-50) のどちらか一方のみで抗 Dpl 作用には十分であることが判った。
- (3) プリオン感染細胞における遺伝子発現の shRNA を用いた網羅的解析によりプリオン複製に関与する宿主遺伝子候補4種類を見出した。その内訳は、受容体関

連蛋白が3、金属結合蛋白が1であった。

(4) プリオン感受性サブクローン N2a-5 と非感受性サブクローン N2a-1 の比較解析を実施して、プリオンの増殖 ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  の産生) に関与すると考えられる宿主遺伝子として、*Amcx2*, *Gplbb*, *Fxyd2*, *Wbp2*, *Hih1* および *Cln5* の6遺伝子を同定した。

(5) CJD の補助診断法として髄液タウ蛋白測定の有用性を示した。

## F 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Arakawa T, Tsuji T, Katamine S, Sakaguchi S: Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Vaccine* 24(15), 2815-2823, 2006

Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Eguchi K, Satoh A, Tsujihata M, Niwa M, Katamine S, Kurihara S, Matsuo H: 14-3-3 protein, total tau and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease and neurodegenerative disease in Japan. *Cell Mol Neurobiol.* 26 (1), 45-52, 2006

Atarashi R, Sim VL, Nishida N, Caughey B, Katamine S: Prion strain-dependent differences in conversion of mutant prion proteins in cell culture. *J Virol* 80(16), 7854-7862, 2006

Yoshikawa D, Kopacek J, Yamaguchi N, Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi Y, Katamine S, Sakaguchi S: Newly established in vitro system with fluorescent proteins shows that 3 abnormal expression of downstream prion protein-like protein in mice is probably due to functional disconnection between splicing and 3' formation of prion protein pre-mRNA *Gene* 386, 139-146, 2007

Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Yamaguchi Y, Shigematsu K, Katamine S, Sakaguchi S: Immunization with recombinant bovine but not mouse prion protein delays the onset of disease in mice inoculated with a mouse-adapted prion. *Vaccine* 25 (6): 985-992, 2007

Miyazawa K, Kanaya T, Tanaka S, Takakura I, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Rose MT, Sakaguchi S, Katamine S, Yamaguchi T, Aso H: Immunohistochemical characterization of cell types expressing the cellular prion protein in the small intestine of cattle and mice. *Histochem Cell Biol.* 127 (3): 291-301, 2007

片峰茂: プリオン仮説 (タンパク質単独犯説) は本当

か。科学11月号 pp1122-1126、岩波書店、2006

Kiminori Kimura, Masahito Nagaki, Jun Nishihira, Kazuo Kuwata, Hisataka Moriwaki. Role of macrophage migration inhibitory factor for CTL-induced liver injury in hepatitis B transgenic mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 13(3):415-9, 2006.

Kiminori Kimura, Hisataka Moriwaki, Masahito Nagaki, Masanao Saio, Yasunori Nakamoto, Makoto Naito, Kazuo Kuwata, and Francis V Chisari. Pathogenic role of B cells in anti-CD40 caused necro inflammatory liver disease. *Am. J. Pathol.* 168(3):786-95, 2006

桑田一夫：プリオン。Drug Delivery System (DDS) 21, 156-157, 2006

桑田一夫：連載 “話題のウイルス” NO.12 プリオン Drug Delivery System (DDS) Vol.21 NO.2 MARCH 2006, 156-157

山口圭一, 松本友治, 児玉耕太, 岸直人, 桑田一夫：プリオン病の発症と伝播機構 —特集 アミロイドの謎は解けるか？：プリオン病・アルツハイマー病・透析アミロイドーシスなどの病態を紐解く— 細胞工学 Vol.26 No.2 2007 151-155 2007年1月22日

後藤祐児, 桑田一夫, 関島良樹, 田中元雅, 内木宏延, 永井義隆, 松崎勝巳, 樋口京一：アミロイドーシス発症の分子機構解明を目指して：現状と展望, 夢 —特集 アミロイドの謎は解けるか？：プリオン病・アルツハイマー病・透析アミロイドーシスなどの病態を紐解く— 細胞工学 Vol.26 No.2 2007 181-185 2007年1月22日

Doh-ura K, Tamura K, Karube Y, Naito M, Tsuruo T, Kataoka Y: Chelating compound, chrysoidine, is more effective in both anti-prion activity and brain endothelial permeability than quinacrine. *Cell. Mol. Neurobiol.* (in press)

Fukuuchi T, Doh-ura K, Yoshihara S, Ohta S: Metal complexes with superoxide dismutase-like activity as candidates for anti-prion drug. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16:5982-5987 2006

Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Suemoto T, Sawada T, Iwaki T, Doh-ura K: Styrylbenzazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J. Neurochem.*, 99:198-205 2006

Sasaki K, Doh-ura k, Ironside J, Mabbott N, Iwaki T: Clusterin expression in follicular dendritic cells associated with prion protein accumulation. *J. Pathol.*, 209(4):484-91 2006.

Wakisaka Y, Santa N, Doh-ura K, Kitamoto T, Ibayashi S, Iida M, Iwaki T: Increased asymmetric pulvinar magnetic resonance imaging signals in Creutzfeldt-Jakob disease with florid plaques following a cadaveric dura mater graft. *Neuropathol.*, 26:82-88 2006.

Shintaku M, Yutani C, Doh-ura K: Brain stem lesions in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: A histopathological and immunohistochemical study. *Neuropathol.*, 26:43-49 2006.

Kawatake S, Nishimura Y, Sakaguchi S, Iwaki T, Doh-ura K:

Surface plasmon resonance analysis for the screening of anti-prion compounds. *Biol Pharm Bull.*, 29(5):927-932 2006

逆瀬川裕二, 堂浦克美 プリオン病の治療 —その現状と展望— *Brain Medical*, 18(4):356-370, 2006

逆瀬川裕二, 堂浦克美 孤発性クロイツフェルトーヤコブ病と6種類のサブタイプ. *Medical Briefs in Brain & Nerve*, 15(4):5-6, 2006

石川謙介, 堂浦克美. プリオンイメージングの試み. *Clinical Neuroscience(臨床神経科学)*, 24(3):313-316, 2006

Nakamitsu S, Miyazawa T, Horiuchi M, Once S, Ohoba Y, Kitagawa H, and Ishiguro, N: Sequence variation of bovine prion protein gene in Japanese cattle (Holstein and Japanese Black). *J. Vet. Med. Sci.* 68: 27-33 (2006)

Horiuchi, M., Furuoka, H., Kitamura, N., and Shinagawa, M. A lymphoplasia mice are resistant to prion infection via oral route. *Jpn. J. Vet. Res.* 53: 150-159 (2006)

Yamaguchi S, Nishida Y, Sasaki K, Kambara M, Kim, C-L, Ishiguro N, Nagatsuka T, Uzawa H, and Horiuchi M: Inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation by synthetic O-sulfated glycopyranosides and their polymers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349: 485-491 (2006)

Watanabe Y, Inanami., Horiuchi M, Hiraoka W, Shimoyama Y, Inagaki F, and Kuwabara M: Identification of pH-sensitive regions in the mouse prion by the cysteine-scanning spin-labeling ESR technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350: 549-556 (2006)

Satoh K, Shirabe S, Eguchi K: Chronological changes in MRI and CSF biochemical markers in CJD patients. *Dementia and Geriatric Cogn. Dis.* 2007 in press

Satoh K, Shirabe S, Tsujino A, Eguchi H, Motomura M, Eguchi K, et al.: Total tau protein of cerebrospinal fluid as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. *未病と抗老化 (Pre Symptomatic Medicine and Anti Aging)* 15(1): 115-118, 2006

Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Eguchi K, Satoh A, Tsujihata M, Iwa M, Katamine S, Kurihara S, and Matsuno H: 14-3-3 protein, total tau and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease and neurodegenerative disease in Japan. *Cell Mol Neurobiol* 26(1):45-52, 2006

佐藤克也, 調範, 江口勝美: CJDの診断マーカー. *Clinical Neuroscience* 24(3):307-311, 2006

佐藤克也, 調範, 江口勝美: プリオン病における神経障害のメカニズム. *BRAIN MEDICAL* 18(4):21-24, 2006

## 2.学会発表

片峰茂：プリオン蛋白質及び関連遺伝子の構造・機能

に基づく治療法の開発平成 18 年度ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業研究成果発表会「先端医療実現のための基盤技術開発研究はここまで進んだか？」2007 年 2 月、東京

高倉由佳、西田教行、山口尚宏、吉良潤一、片峰茂：プリオン病病原体の初代培養骨髄間質細胞における感染と増殖第 5 4 回日本ウイルス学会ワークショップ「ウイルス同定・診断法の新規開発」2006 年 11 月、名古屋

Katamine S: An attenuated prion strain interferes superinfection by more virulent strains in murine neuronal cell cultures. Plenary lecture in 8<sup>th</sup> Nagasaki-Singapore medical symposium on infectious diseases: The challenge of emerging and tropical infectious diseases, May 2006, Singapore

Kuwata K: EMBO-FEBS Workshop on Amyloid Formation. Italy, Mar 25-28, 2006

Kuwata K: Dynamics Based Drug Design for Prion Diseases Fifth East Asia Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan. November 12-16, 2006

Doh-ura K: Therapeutic strategies for prion diseases. SFB-596 Meeting for Molecular Mechanisms of Neurodegeneration, Munich, October 16, 2006

Tsuboi Y, Doh-ura K, Yamada T: Experimental treatment with intraventricular pentosan polysulphate injection in prion disease. TheraPrion 2006, Paris, November 21, 2006

Doh-ura K, Rainov N, Ishikawa K, Kawasaki Y, Tsuboi Y: Pentosan polysulfate and amyloidophilic chemicals for prion diseases. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006

Sakasegawa Y, Doh-ura K: Aggregation and degradation of cellular prion protein by Novobiocin. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006

Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Iwaki T, Doh-ura K: Styrylbenzazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of prion diseases. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006

Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen C.J, Doh-ura K: Effectiveness of an orally administered anti-prion chemical. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006

Rainov N.G, Doh-ura K, Tsuboi Y, Krolak-Salmon P, Heidecke V: Experimental treatments for human prion diseases. NeuroPrion 2006, Torino, October 3-6, 2006

Sakasegawa Y, Doh-ura K: A coumarin antibiotic Novobiocin directly induces aggregation of the cellular prion protein. The 20th IUBMB Congress and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June 18-23, 2006

堂浦克美：プリオン病の治療戦略を展望する 一即戦力的方略一。第 28 回日本薬学会九州支部コロキウム、福岡、2006 年 10 月 21 日

堂浦克美：プリオン病の治療開発。第 64 回慶應神経病理カンファレンス、東京、2006 年 9 月 9 日

照屋健太、魚本幸、堂浦克美：プリオン感染細胞からの迅速かつ効率的な PrP<sup>Sc</sup> 回収法。2006 年プリオン研究会、安比高原、2006 年 9 月 2、3 日

川崎ゆり、川越敬一、陳忠正、堂浦克美：経口投与型プリオン病治療予防薬の開発に関する研究。2006 年プリオン研究会、安比高原、2006 年 9 月 2、3 日

堂浦克美、魚本幸、西澤桂子、川崎ゆり、伊波真彦：Prophylactic effect of dietary seaweed fucoidan against enteral prion infection. 2006 年プリオン研究会、安比高原、2006 年 9 月 2、3 日

坪井義夫、堂浦克美、山田達夫：プリオン病に対するペントサンポリサルフェート脳室内持続投与の試み(続報)。2006 年プリオン研究会、安比高原、2006 年 9 月 2、3 日

石川謙介、木村朋寛、工藤幸司、西田教行、岩城徹、堂浦克美：Styrylbenzazole 誘導体を用いたプリオンアミロイド斑のイメージングおよび云達性海綿状脳症の治療。2006 年プリオン研究会、安比高原、2006 年 9 月 2、3 日

Sakasegawa Y, Hachiya NS, Doh-ura K, Kaneko K: Heat shock protein 90 kDa unfolds the copper loaded full length recombinant prion protein in a nucleotide dependent manner. 2006 年プリオン研究会、安比高原、2006 年 9 月 2、3 日

照屋健太、堂浦克美：蛋白質ライゲーションを利用したカルボキシ末端選択的に修飾を施したプリオン蛋白質の調製。東北大学バイオサイエンスシンポジウム、仙台、2006 年 5 月 29 日

山口恭史、三浦隆史、照屋健太、堂浦克美、竹内英夫：銅イオンによるプリオンタンパク質のコンホメーション変化。東北大学バイオサイエンスシンポジウム、仙台、2006 年 5 月 29 日

Kaino, A., Furuoka, H., Kimura, K., Shinagawa, M., Horiuchi, M.: Generation of mAb that distinguishes PrP<sup>Sc</sup> from PrP<sup>C</sup> and neutralizes prion infectivity. NeuroPrion 2006 (4-6 Oct. 2006, Turin, Italy)

Yamaguchi, S., Nishida, Y., Sasaki, K., Kambara, M., Kim, C.-L., Nagatsuka, T., Uzawa, H., Horiuchi, M.: Inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation by synthetic O-sulfated glycopyranoside and their polymers. NeuroPrion 2006 (4-6 Oct. 2006, Turin, Italy)

Horiuchi, M.: Propagation and inhibition of PrP<sup>Sc</sup> formation in vitro and in vivo. The 9th Joint Symposium between Hokkaido University Graduate School of Veterinary Medicine & Seoul University College of Veterinary Medicine (7 Sept. 2006, Sapporo, Japan)

宋昌鉉、古岡秀文、金チャンラン、鈴木章夫、前田秋彦、堀内基広：抗 PrP 抗体の脳室内投与によるプリオン病治療効果の評価。2006年プリオン研究会(2-3 Sept. 2006, 岩手) 中満 智史、瓜生 匡秀、堀内 基広：プリオン感受性・非感受性 Neuro2a サブクローンを用いたプリオン増殖関連宿主因子の探索。第54回日本ウイルス学会(212-23 Nov. 2006, 名古屋)

瓜生匡秀 堀内基広：マウス神経芽腫細胞 Neuro2a(N2a)サブクローンで検出される異常型プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)の相違。第54回日本ウイルス学会(212-23 Nov. 2006, 名古屋)

佐藤克也、調瀬 辻野彰、西浦義博、本村政勝、江口勝美、松尾秀徳、佐藤聡、辻畑光宏：CJD患者におけるキナクリン投与の既存病態マーカーの検討と治療成績、その問題点。第47回日本神経学会総会、東京、2006.05.11-05.13

Sato K, Shirabe S, Eguchi K: Clinical, neuropathological analysis of administration of quinacrine in Creutzfeldt-Jakob disease. 第16回 Meeting of the European Neurological Society, Lausanne, Switzerland, 2006.05.27-05.31

佐藤克也、中桶了太、西浦義博、辻野彰、江口博人、白石裕一、福島直美、本村政勝、調瀬、江口勝美、吉村俊朗：脳ドックにて発見されたクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)患者の一例。第174回日本神経学会九州地方会、沖縄、2006.06.17

### 3. その他(著書)

20世紀の2大発見—量子力学と分子生物学、『論理的創薬入門—構造生物学に基づくアプローチ』桑田一夫 編著、共立出版(東京)、2006、9-24

フーリエ変換とタンパク質・核酸の基本立体構造、『論理的創薬入門—構造生物学に基づくアプローチ』桑田一夫 編著、共立出版(東京)、2006、25-49

タンパク質・核酸の構造ダイナミクス、『論理的創薬入門—構造生物学に基づくアプローチ』桑田一夫 編著、共立出版(東京)、2006、91-108

計算機実験の基礎、『論理的創薬入門—構造生物学に基づくアプローチ』桑田一夫 編著、共立出版(東京)、2006、137-145

分子構造と生理機能、『論理的創薬入門—構造生物学に基づくアプローチ』桑田一夫 編著、共立出版(東京)、2006、168-181

タンパク質の構造異常、『論理的創薬入門—構造生物学に基づくアプローチ』桑田一夫 編著、共立出版(東京)、2006、182-194

タンパク質のコンホメーション制御—分子手術法、『論理的創薬入門—構造生物学に基づくアプローチ』桑田一夫 編著、共立出版(東京)、2006、195-209

### H.知的所有権の出願・登録状況

#### 1.特許取得

堂浦克美：コンフォメーション病医薬組成物。特願2006-117294、2006年4月20日

堂浦克美、照屋健太、竹中繁織、大塚圭一：異常型プリオン蛋白質濃縮方法、および除去方法。特願2006-071881、2006年3月15日

竹中繁織、大塚圭一、堂浦克美、照屋健太：電気化学的抗原検出法とそのための装置並びに検出チップ。特願2006-65744、2006年3月10日

# 分 担 研 究 報 告

PrPアミノ末端領域の抗Dpl作用領域の解析

分担研究者 片峰 茂 長崎大学医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

PrP は Doppel(Dpl)の神経細胞毒性に拮抗的に作用する。我々は既に、PrP の抗神経毒性作用が N 末アミノ酸(a.a.23-88)の欠失により消失することを明らかにした。本研究では、Dpl の神経細胞毒性に対する PrP の N 末機能について、遺伝子改変マウスを用いてさらに詳細に検討した。その結果、PrP の N 末領域は Dpl に対して *in trans* のみならず *in cis* にも抑制的に機能することが判った。また銅 (Cu) と結合し抗酸化などに機能するといわれるオクタペプチドリピート(OR)領域 (a.a.51-90) と PrP の細胞内移行に重要と報告された charged motif 領域 (a.a.25-50) それぞれ単独の欠損変異 PrP は抗 Dpl 神経細胞毒性作用を保持するため、OR を含む N 末の長い領域に redundant に機能する 2 ヶ所以上の作用点が存在することが示唆された。

A 研究目的

Dpl はゲノム上 PrP 遺伝子の約 16kb 下流にマップされる遺伝子の産物であり、PrP と構造上の相同性を有する膜糖蛋白質であるが、PrP の N 末約 50%に相当するランダムコイル領域を欠く。これまでの解析で、PrP と異なり Dpl は中枢神経系での生理的発現はないが、異所性に発現すると神経毒性を発揮することが明らかとなっている。

一方、PrP の正常機能も未だ明らかにされていない。いくつかの PrP との結合分子は報告されているが、その結合分子を介した PrP の機能には一定の見解を得られていない。唯一、PrP が発揮する生物現象として認められるものは Dpl 神経

毒性に対する拮抗作用である。当研究室では、この PrP とその拮抗蛋白 Dpl を比較検討することで PrP の機能を解析している。

我々はこれまで、PrP の抗 Dpl 誘導神経毒性作用に重要な領域が N 末アミノ酸 (a.a.)23-88 にあることを同定した。本研究では、Dpl の神経細胞毒性に対する PrP N 末領域の機能について、さらに詳細な検討を行った。

B 研究方法

トランスジェニック(Tg)マウスの作製: PrP の a.a.25-50 を欠損させた PrPdelN と OR 領域を欠損させた PrPdelOR、PrP の a.a.1-124 と Dpl の a.a.58-179 の融合蛋

白 fuPrP-Dpl を発現する transgene を PCR 法で作製した。構築した transgene を syrian hamster promotor の下流に挿入して Tg マウスを作製した。また、当教室で既に作製していた Dpl を過剰発現する Tg マウス(Tg(Dpl))を系統維持して使用した。

交配実験：PrP ノックアウトバックグラウンドとした Tg(変位型 PrP)PrP<sup>-/-</sup>と Tg(Dpl)PrP<sup>-/-</sup>を交配させて、変位型 PrP と Dpl を共発現するマウスを作製した (Tg(変異型 PrP/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>)。Dpl 発現による神経細胞変性死を変位型 PrP の導入で回復させることが出来るかどうかを発症日と病理をみることで判定した。

発症の評価：動揺性歩行を呈する日を発症日とし、logrank test で有意差を検討した。

プルキンエ細胞の脱落の評価：ホルマリン固定した小脳を薄切し標本作製した。抗 spot35 抗体を用いて切片を免疫染色し光学顕微鏡でプルキンエ細胞が脱落しているか否かを観察した。

### C 研究結果

Tg(Dpl)PrP<sup>-/-</sup>がプルキンエ細胞変性死に伴う動揺性歩行を生後 99±20 日で呈したのに対し、Tg(fuPrP-Dpl)PrP<sup>-/-</sup>は生後 730 日経過しても神経症状は出現しなかった。また、Tg(fuPrP-Dpl/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>の潜伏期も 200±52 日と有意に遅延した。

Tg(Dpl)PrP<sup>-/-</sup>に PrPdelN を共発現させたマウス Tg(PrPdelN/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>ではプルキンエ細胞は回復し、500 日以上経過し

ても発症は認められず Tg(Dpl)PrP<sup>-/-</sup>と比較して有意に遅延した。同様に、Tg(PrPdelOR/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>も発症までの潜伏期 385±47 日とプルキンエ細胞は回復し、有意な回復が認められた。

### D 考察

Tg(fuPrP-Dpl)PrP<sup>-/-</sup> と Tg(fuPrP-Dpl/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>の検討で、PrP の N 末領域は Dpl に対して *in trans* のみならず *in cis* にも抑制的に機能することが判った。

当教室以外からの報告も合わせて考察すると、構造的に類似する PrP の C 末領域と Dpl の球状構造はプルキンエ細胞毒性作用があり、PrP N 末領域を球状構造部分と同居させることによって初めて細胞保護機能を呈する。つまり、PrP はそれ自体の蛋白構造に細胞保護領域と Dpl 類似の細胞毒性領域をもつと結論できる。

PrPdel23-88 が”拮抗”能力を欠損した過去の成績と今回の Tg(PrPdelN/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>及び Tg(PrPdelOR/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>の検討結果を合わせて考えると、PrP は a.a.25-50 と a.a.51-90 のどちらか一方があれば Dpl の細胞毒性に対して”拮抗”することが示唆された。すなわち、抗酸化作用や細胞保護作用があると報告されている OR 領域(a.a.51-90)は抗酸化作用や細胞保護作用があると報告されているが、”拮抗”能力には必須ではなかった。また、PrP の細胞内移行に重要と報告された charged motif (a.a.23-28) 領域も Dpl の神経細胞



毒性に対する拮抗作用領域のどちらかでないことを明らかとした。

今後は、PrP の a.a.23 から a.a.90 に幅広く作用する因子が Dpl との相互作用を有している可能性が考えられ、“拮抗”作用の機序について検討する必要がある。

ただ PrPdel23-88 と Tg(PrPdelN/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>及び Tg(PrPdelOR/Dpl)PrP<sup>-/-</sup>では、前者が a.a.23-24 も欠失するのに対して後二者では保存されている点は考慮する必要がある。シグナルペプチドに続く2つのアミノ酸の有無が蛋白質の細胞内局在を変化させ、ひいては機能発現に影響を与える可能性を否定できないからである。

## E 結論

(1) PrP の N 末領域は Dpl に対して *in trans* のみならず *in cis* にも抑制的に機能する。

(2) PrP の N 末領域のうちオクタペプチドリピート(OR)領域 (a.a.51-90) と charged motif 領域 (a.a.25-50) のどちらか一方のみで抗 Dpl 作用には十分である。

## F 健康危険情報

なし

## G 研究発表

### 1 論文発表

Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Arakawa T, Tsuji T, Katamine S, Sakaguchi S.: Enhanced mucosal

immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Vaccine* 24 (15), 2815-2823, 2006

Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Eguchi K, Satoh A, Tsujihata M, Niwa M, Katamine S, Kurihara S, Matsuo H: 14-3-3 protein, total tau and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease and neurodegenerative disease in Japan. *Cell Mol Neurobiol.* 26 (1), 45-52, 2006

Atarashi R, Sim VL, Nishida N, Caughey B, Katamine S: Prion strain-dependent differences in conversion of mutant prion proteins in cell culture. *J Virol* 80 (16), 7854-7862, 2006

Yoshikawa D, Kopacek J, Yamaguchi N, Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi Y, Katamine S, Sakaguchi S: Newly established *in vitro* system with fluorescent proteins shows that 3 abnormal expression of downstream prion protein-like protein in mice is probably due to functional disconnection between splicing and 3' formation of prion protein pre-mRNA *Gene* 386, 139-146, 2007

Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Yamaguchi Y, Shigematsu K, Katamine S, Sakaguchi S: Immunization with recombinant bovine but not mouse prion

protein delays the onset of disease in mice inoculated with a mouse-adapted prion. *Vaccine* 25 (6): 985-992, 2007

Miyazawa K, Kanaya T, Tanaka S, Takakura I, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Rose MT, Sakaguchi S, Katamine S, Yamaguchi T, Aso H: Immunohistochemical

characterization of cell types expressing the cellular prion protein in the small intestine of cattle and mice. *Histochem Cell Biol.* 127 (3): 291-301, 2007

片峰茂：プリオン仮説（タンパク質単独犯説）は本当か。科学 11月号 pp1122-1126、岩波書店、2006

## 2 学会発表

片峰茂：プリオン蛋白質及び関連遺伝子の構造・機能に基づく治療法の開発.平成18年度ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業研究成果発表会「先端医療実現のための基盤技術開発研究はどこまで進んだか？」2007年2月、東京

高倉由佳、西田教行、山口尚宏、吉良潤一、片峰茂：プリオン病病原体の初代培養骨髄間質細胞における感染と増殖.第54回日本ウイルス学会ワークショップ「ウイルス同定・診断法の新規開発」2006年11月、名古屋

Katamine S: An attenuated prion strain interferes superinfection by more virulent strains in murine neuronal cell cultures. Plenary lecture in 8<sup>th</sup> Nagasaki-Singapore

medical symposium on infectious diseases: The challenge of emerging and tropical infectious diseases, May 2006, Singapore

H 知的所有権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

治療薬開発の標的候補となるプリオン増殖複製関連因子の探索

分担研究者 堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科・教授  
研究協力者 木村朋寛, 石川謙介 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

新たな治療薬開発の標的となるプリオン複製・増殖に関連する宿主因子の同定を目指して、プリオン持続感染細胞において RNA 干渉技術を用いた遺伝子スクリーニングを行った。264 遺伝子の解析を終了し、4 候補を同定した。

A. 目的

プリオン病の病原因子とされる異常型プリオン蛋白の複製・増殖機構は未だ解明されておらず、治療法の開発が遅れている。昨年度に引き続き、RNA 干渉による遺伝子発現抑制スクリーニング法を用いてプリオン蛋白の異常化に関連する宿主因子の探索を行った。

B. 材料と方法

shRNA 発現ベクターの作製

細胞膜に発現する分子を主な標的とし、それぞれの遺伝子に特異的な配列 21 塩基を選択した。デザインした DNA をプラスミドベクターに組み込み、shRNA 発現用コンストラクトを得た。

培養細胞への遺伝子導入

マウス神経芽腫細胞 N2a 細胞を宿主とし、2 種のプリオン病原株にそれぞれ持続感染した培養細胞（ScN2a 細胞および N167 細胞）、さらに非感染の N2a 細胞を使用した。6 穴プレートに細胞を

継代した翌日にプラスミドベクターを細胞に導入した。必要に応じ培地交換や血清添加を行い、3 日間培養した。

異常型プリオン蛋白の検出

遺伝子を導入した感染細胞の溶解液をプロテナーゼ K 処理後に精製し、ウエスタンブロット法により異常型プリオン蛋白産生量を検定した。バンドパターンは解析ソフトを用いて概ね数値化し、ベクターのみを導入した細胞 (mock) を対照とした。

総プリオン蛋白および正常型プリオン蛋白の検出

遺伝子を導入した培養細胞の溶解液に含まれる総プリオン蛋白量をウエスタンブロット法により検討し、mock と比較した。さらに N2a 細胞膜表面上の正常型プリオン蛋白の発現をフローサイトメトリーにより検討した。

標的遺伝子およびプリオン蛋白遺伝子の発現解析

遺伝子を導入した細胞の全 RNA を抽

出し、ランダムヘキサマーにより cDNA を合成してリアルタイム PCR を用いた mRNA の発現解析を行った。内部標準に  $\beta$ -actin を用いて相対的な定量を行った。

#### [倫理面への配慮]

倫理面に配慮する実験を含んでいない。

### C. 研究結果

プリオン持続感染細胞 2 種において RNA 干渉を用いて任意の分子をノックダウンした。標的遺伝子の発現抑制を確認しながら、プロテナーゼ K 抵抗性である異常型プリオン蛋白の産生量への影響を検討した。昨年度に引き続き、プリオン蛋白を直接の標的とした塩基配列を陽性対照とした。

昨年度候補として挙げられた 12 の候補について、shRNA の新たな配列を設計したり、化学合成 siRNA を用いたりするなどさらに検討を加えた。その結果、発現抑制により異常型プリオン蛋白の産生を阻害する 4 因子が同定された。その遺伝子産物の内訳は、受容体関連蛋白が 3、金属結合蛋白が 1 であった。

受容体関連蛋白の # 58 では、shRNA、化学合成 siRNA の両方でターゲット遺伝子のノックダウンが確認され、異常型プリオン蛋白の産生が抑制された。

金属結合蛋白の # 80 をターゲットとした shRNA では、正常型プリオン蛋白の発現が亢進されるにも関わらず、

異常型プリオン蛋白の産生阻害が見られた。

受容体関連タンパク「B」では ScN2a および N167 のどちらにおいても異常型プリオン蛋白の産生抑制が見られたが、正常型プリオン蛋白の発現量への顕著な影響は見られなかった。

受容体関連タンパク「G」では、N2a において正常型プリオン蛋白の発現亢進が見られるにもかかわらず、ScN2a および N167 のどちらにおいても異常型プリオン蛋白の産生抑制が見られた。さらにこの分子に対する阻害剤でも検討したところ、異常型プリオン蛋白の産生抑制と全プリオン蛋白の増加が見られた。

### D. 考察

プリオン病の病原因子プリオンが感染するには、異常型と正常型のプリオン蛋白の接触が必要だと考えられている。本研究の標的であるプリオン増殖に関与する宿主因子としては、ラフトを含む細胞膜上に存在する細胞接着や脂質代謝に関連する分子、糖鎖関連因子などが候補となる。さらに異常型への高次構造変換により、細胞内へ何らかのシグナルが伝達される可能性も予想される。

異常型プリオン蛋白の産生阻害を示した 4 個の因子は、プリオン感染の成立や維持に関与している可能性が示唆される。4 個の内の 3 個は受容体関連蛋白であり、抗体や阻害物質を用いた細胞外からの処理による効果が期待で