

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金子 清俊

平成19（2007）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プリオン病高感度診断法の開発-----	10
	八谷如美	
	2. NMRによるプリオン蛋白質構造解析を通じたプリオン複製機構の解明と	
	創薬スクリーニングシステムの確立-----	15
	桑田一夫	
	3. RNA interference (RNAi)を用いた変異型プリオン遺伝子特異的ノックダ	
	ウン-----	19
	北條浩彦	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	----- 23
IV.	研究成果の別刷	----- 27

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 東京医科大学神経生理学講座

研究要旨 本年度の研究総括として、当該期間における研究成果は、以下の4点に集約される。1) BSEプリオンなどの高感度診断法開発への応用が期待されるアンフォルジンの大量培養生成システムを構築した。2) ヒトやマウスにおいて、アンフォルジンのホモログを同定し、酵母アンフォルジンと同様の解きほぐし活性を有することを確認した。3) プリオン分子のダイナミクス情報に基づいたin silicoでの創薬スクリーニングのシステムを世界に先駆けて確立し、さらにプリオン蛋白質の構造変換を阻止する化合物を発見した。4) 家族性プリオン病の発症予防に着目し、正常アリルは抑制せずに変異アリルのみを抑制するアリル特異的RNAi手法を確立した。

分担研究者

八谷如美・東京医科大学神経生理学講座助教授

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

みを認識するのに対し、アンフォルジンはそれらに加えて正常に折りたたまれた蛋白質をも認識するため、その新規性並びに独創性は極めて高い。

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。さらに、アンフォルジンのタンパク質解きほぐし活性を我々の研究室内だけでなく工業化も含め広く一般に利用することを視野にいれ、新しい大量培養システムの構築を目指すと同時に、ヒトやマウスなどにおけるホモログの発現について検討した。

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た。

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

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。

我々は、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や抗プリオン抗体の開発、それらの治療・予防法への応用に加えて、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。

さらに、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。従来定義されてきた分子シャペロンは、異常に折りたたまれた(misfold)蛋白質などの非正常状態の蛋白質の

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、そのアシル特異的に発現を抑制すれば、プリオン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、ヒトでは正常型プリオン蛋白質 (PrP^C)の機能は完全に解明されていないため、正常アシルは抑制せずに、遺伝子変異のあるアシルのみをsiRNAを用いて抑制する手法の開発を目指している。

アシル特異的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。昨年度において、レポーター対立遺伝子 (レポーターアシル) を用いた簡便な評価システムの確立を行った。本年度は、そのシステムを用いて、変異型プリオン遺伝子に対する特異的なRNAiノックダウンを誘導するsiRNAのスクリーニングを実施し、高いノックダウン・ポテンシャルを持ったsiRNAを選定した。

B. 研究方法

1. アンフォルジンによるプリオン病高感度診断法の開発 (八谷)

アンフォルジンの強いタンパク質解きほぐし活性は出芽酵母内において発現と局在が厳密に制御されているため、強度の過剰発現においては細胞の増殖停止が起こり大量精製には不向きであり、またPET等による大腸菌リコンビナントによる発現においても過剰発現下での細胞毒性により増殖が停止してしまう。そこで、これらの問題点を解決しより哺乳類に近い条件での回収を可能にするため、まず昆虫細胞によるバキュロウイルス発現システムをたちあげ発現系のベクター構築を行った。

次に、構築したベクターを用い少量の昆虫由来Sf9細胞にてアンフォルジン精製条件を検討し精製系を確立した。さらにこれらの系で得られた最終精製標品においてアンフォルジン多

量体と単量体の存在比を検討し、最終的に多量体を形成しているサンプルについて出芽酵母で検討したときと同様にピック小体を用いて抗原抗体反応による検出感度上昇が可能かどうかを確認した。

2. NMR によるプリオン蛋白質構造解析を通じたプリオン複製機構の解明と創薬スクリーニングシステムの確立 (桑田)

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か、あるいはシミュレーションする必要が出て来る。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。

3. RNA interference (RNAi)を用いた変異型プリオン遺伝子特異的ノックダウン (北條)

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シルを構築した。まず、変異アシル、正常アシ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シルそして正常レポーターアシルを構築した。

変異アシルをターゲットとする合成siRNAを作製し、正常、変異レポーターアシ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) を用いたリポフェクションによってヒトHeLaまたはHEK293細胞に導入し、24時間後、細胞抽出液を調製した。

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ーター・ガラクトシダーゼ活性を測定した。そして、ベーター・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の変異型アシルに対するノックダウン効果と正常型アシルに対する影響を評価した。

(倫理面への配慮)

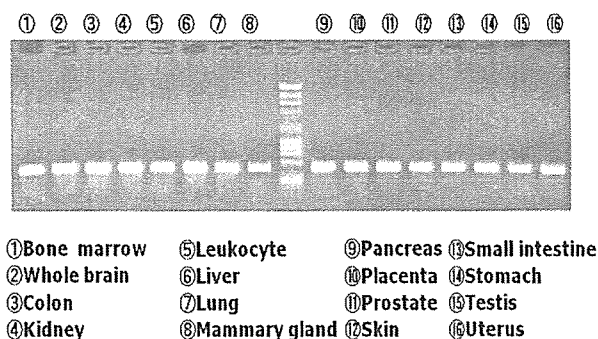
本実験において用いたヒト剖検試料の取り扱いに関しては、各研究者の勤務する施設並びに関連する施設の倫理規定に従った。

C. 研究結果

1. アンフォルジンによるプリオン病高感度診断法の開発 (八谷)

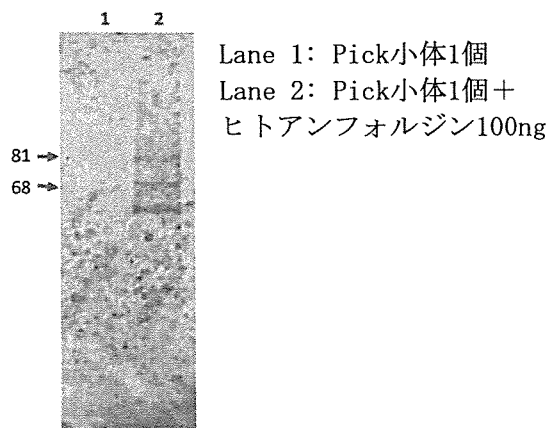
哺乳動物においても酵母と同様な分子シャペロンが存在するかどうかを検討した結果、マウス及びヒトにおいても酵母アンフォルジンのホモログを同定した。これらがヒトやマウスにおいて ubiquitous に発現していることを発見した。

ヒトアンフォルジンの組織発現



解きほぐし活性に関する機能解析の結果、ヒトアンフォルジンは酵母アンフォルジンと同様のオリゴマーを形成し、高度の解きほぐし活性を有していることを確認した。今回得られた最終精製標品においてアンフォルジン多量体と単量体の存在比を検討し、ピック小体を用いて抗原抗体反応による検出感度を確認した。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、ヒトアンフォルジン処理後には、わずか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、酵母アンフォルジンと同様、ヒト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1,000倍以上改善した。

ヒトアンフォルジンによる解きほぐし活性



2. NMR によるプリオン蛋白質構造解析を通じたプリオン複製機構の解明と創薬スクリーニングシステムの確立 (桑田)

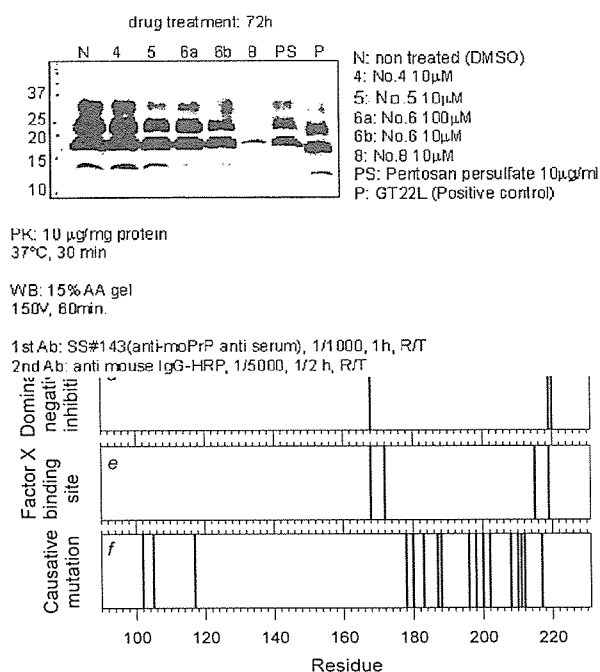
NMR緩和測定により、ピコ秒からナノ秒のダイナミクスとマイクロ秒からミリ秒のダイナミクスを測定した。その結果、後者の遅いダイナミクスで著明な揺らぎを示す残基群は、主にB及びCヘリックスに存在し、病原性変異を示す残基群の分布に類似していた。

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、比較的よく一致していた。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。

NMR緩和測定によるゆらぎの部位



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。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。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た。

さらに、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、プリオン蛋白質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末のベータヘリックスが早期に形成され、その後C末のアルファ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。

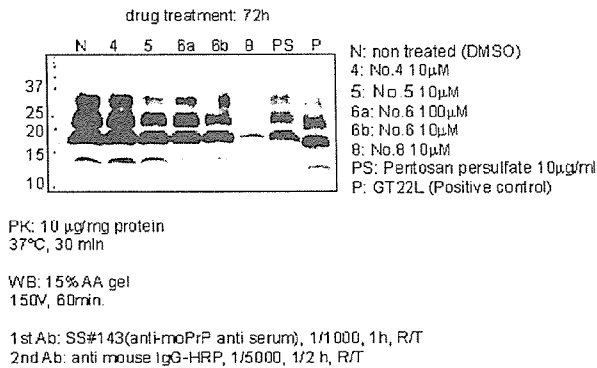
一般に、このような蛋白質のダイナミクス情報、或いは熱安定性情報に基づいて、低分子化合物のin silicoスクリーニングを行う場合(SBDD)、ターゲットとなる部位を限定する必要がある(範囲を限定しない方法もある)。酵素の場合は主に活性部位、分子間相互作用の場合は相互作用部位ということになるだろう。しかしプリオンは、明らかに酵素ではなく、例えば、正常型と異常型との相互作用部位がどこにあるのかも分かっていない。

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。NMR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た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。

プリオン構造変換阻止化合物の同定



3. RNA interference (RNAi)を用いた変異型プリオン遺伝子特異的ノックダウン (北條)

上記評価システムを用いて、プリオン遺伝子変異型アシルに対するアシル特異的ノックダウンを誘導するsiRNAをスクリーニングした。ターゲットとしたプリオン遺伝子変異型アシルは、Gerstmann-Straussler syndromと関連するP102LとP105L変異、そしてCreutzfeld-Jakob syndromと関連するD178N変異である。それぞれアミノ酸置換を伴う一塩基変異の対立遺伝子(アシル)である。これらの変異型アシルに対するsiRNAを設計・合成し、その効果を上記の簡易システムを用いて検討した。その結果、設計した一部のsiRNAは、変異型アシルと正常型アシルを識別し、変異型アシルに対する強いノックダウン効果を示すことが観察された。

我々は、さらにアシル特異的RNAiを増強させるために、変異型アシルと正常型アシルの識別を強めるsiRNAの設計を試みた。我々は、siRNA配列内にミスマッチを導入したsiRNAを設計し、そのアシル特異的RNAiノックダウン効果を検討した。その結果、一部のミスマッチ配列の導入は、アシル特異的ノックダウン効果を強める

ことが示唆された。

D. 考察

1. アンフォルジンによるプリオン病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おり、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ェ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を示してきた。

それらの点を踏まえ、今年度は工業化も含め広く一般に利用することを視野にいれ、新しいアンフォルジン大量培養システムの構築を行った。

プリオン病の高感度診断法に関しては、PrP^{Sc}抗体等の同定を目指す他の研究グループとは一線を画し、我々は凝集性蛋白質の抗原提示能を飛躍的に改善する手法を開発した。これらの手法の一般化に向けて、今回の大量培養システムの構築という成果は大きな前進と言える。日本にとどまらず、欧州、北米大陸において、既に牛海綿状脳症(BSE)や変異型CJDの問題は重大な社会問題となっている。今回の高感度検出法を診断に応用していくことは、大きな社会的意義を有する。

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。

また、今回の検討により、ヒトやマウスにおいても、ヒト、マウスアンフォルジンが同定され、その高度の解きほぐし活性が確認された。酵母アンフォルジンは正常に折りたたまれた

蛋白質をも認識するというユニークな活性を有しているが、ヒトアンフォルジンにおいても同様の解きほぐし活性の存在が推察される。これは、プリオン複製に関与するプロテインXの特徴と一致するため、今回我々が同定したヒトアンフォルジンが、プリオンの複製に関与する新たな因子である可能性も推測される。

2. NMR によるプリオン蛋白質構造解析を通じたプリオン複製機構の解明と創薬スクリーニングシステムの確立 (桑田)

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。

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。

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。

3. RNA interference (RNAi)を用いた変異型プリオン遺伝子特異的ノックダウン (北條)

プリオン遺伝子の3つの変異型対立遺伝子 (P102L, P105L, D178N) に対するsiRNAを設計し、アリル特異的RNAiノックダウン効果を調べた。その結果、それぞれのターゲット変異アリルによってノックダウン効果が異なっていた。ターゲットとなる変異型アリルの塩基置換の種類やその周りの配列によって、アリルの識別やノックダウンの効果が異なることが考えられる。

変異型アリルに対するsiRNAに、さらに mismatches 塩基配列を導入することで、アリルの識別やアリル特異的ノックダウン効果が変化することが示された。アリル特異的ノックダウン効果を増強する mismatches も観察されたことから、この様な、効果を持つ mismatches 配列の導入は有用であると考えられる。

本研究で用いたレポーター対立遺伝子を使ったRNAiの評価システムは、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できる。これによって、siRNAに mismatches 配列を導入した場合の効果の検討を容易に行うことができた。このシステムを用いることで、siRNAの化学修飾によるアリル特異的ノックダウン効果も容易に検討できると考えられる。よって、どの様な化学修飾が有効であるかは、このシステムを使っての今後の検討課題であると考えられる。

E. 結論

- 1) BSEプリオンなどの高感度診断法開発への応用が期待されるアンフォルジンの大量培養生成システムを構築した。
- 2) ヒトやマウスにおいて、アンフォルジンのホモログを同定し、酵母アンフォルジンと同様の解きほぐし活性を有することを確認した。

- 3) プリオン分子のダイナミクス情報に基づいたin silicoでの創薬スクリーニングのシステムを世界に先駆けて確立し、さらにプリオン蛋白質の構造変換を阻止する化合物を発見した。
- 4) 家族性プリオン病の発症予防に着目し、正常アリルは抑制せずに変異アリルのみを抑制するアリル特異的RNAi手法を確立した。
 今後は、これらの成果を更に発展させ、臨床応用を目指していく必要がある。
- F. 健康危険情報
 とくになし。
- G. 研究発表
1. 論文発表
- 1) Furuya K, Kawahara N, Yamakawa Y, Kishida H, Hachiya NS, Nishijima M, Kirino T, Kaneko K: Intracerebroventricular delivery of dominant negative prion protein in a mouse model of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after dura graft transplantation. *Neurosci Lett.* 402:222-226, 2006
- 2) 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.* 13:1-5, 2006
- 3) Ohnishi Y, Tokunaga K, Kaneko K, Hohjoh H: Assessment of allele-specific gene silencing by RNA interference with mutant and wild-type reporter alleles. *J RNAi Gene silencing.* 2:154-160, 2006
- 4) Kaneko K, Hachiya NS: Hypothesis: Gut as source of motor neuron toxin in the development of ALS. *Med Hypotheses.* 66:438-9, 2006
- 5) Kaneko K, Hachiya NS: The alternative role of 14-3-3 zeta as a sweeper of misfolded proteins in disease conditions. *Med Hypotheses.* 67:169-171, 2006
- 6) Sukegawa HK, Kato Z, Nakamura H, Tomatsu S, Fukao T, Kuwata K, Orii T, Kondo N: Effect of Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) mutations on molecular phenotypes of iduronate-2-sulfatase : Enzymatic activity, protein processing and structural analysis. *J Inherit Metab Dis,* 29:755-761, 2006
- 7) Ohnishi Y, Tokunaga K, Kaneko K, Hohjoh H: Assessment of allele-specific gene silencing by RNA interference with mutant and wild-type reporter alleles. *J RNAi Gene silencing,* 2: 154-160. 2006
- 8) Sakai T, Hohjoh H: Gene silencing analyses against amyloid precursor protein (APP) gene family by RNA interference. *Cell Biol Int,* 30: 952-956
- 9) Ohashi J, Naka I, Toyoda A, Takasu M, Tokunaga K, Ishida T, Sakaki Y, Hohjoh H: Estimation of the species-specific mutation rates of the DRB1 locus in human and chimpanzee. *Tissue Antigens,* 68: 427-431, 2006
- 10) Kawashima M, Tamiya G, Oka A, Hohjoh H, Juli T, Ebisawa T, Honda Y, Inoko H, Tokunaga K. Genome-wide association analysis of human narcolepsy and a new resistance gene. *Am J Hum Genet,* 79: 252-263, 2006
- 11) Hachiya NS, Imagawa M, Kaneko K: The possible role of protein X, a putative auxiliary factor in pathological prion replication, in regulating a physiological endoproteolytic cleavage of cellular prion protein. *Med Hypotheses,* in press
- 12) Hachiya NS, Kaneko K: Investigation of laser microdissected inclusion bodies. *Methods in Cell Biology vol 82: Laser manipulation of cells and tissues (Berns M and Greulich KO ed.),*

Academic Press (New York), in press

- 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) 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. 242:12-13, 2006
 - 15) 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. 83:4-5, 2006
 - 16) 八谷如美, 金子清俊: 正常型プリオンたんぱく質の正体は? - その推定される機能 -. 現代化学. 422:26-31, 2006
 - 17) 八谷如美, 金子清俊: プリオンたんぱく質は正常人では何をしているのか? 科学, 76:1138-1142, 2006
 - 18) 桑田一夫: 連載“話題のウイルス” NO.12 プリオン. Drug Delivery System (DDS). 21:156-157, 2006
 - 19) 桑田一夫: 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), 9-24, 2006
 - 20) 桑田一夫: フーリエ変換とタンパク室・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), 25-49, 2006
 - 21) 桑田一夫: タンパク室・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), 91-108, 2006
 - 22) 桑田一夫: 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), 137-145, 2006
 - 23) 桑田一夫: 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), 168-181, 2006
 - 24) 桑田一夫: 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), 182-194, 2006
 - 25) 桑田一夫: 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), 195-209, 2006
 - 26) 北條浩彦: 神経・筋疾患治療への RNAi 応用. 神経治療学, 23: 31-36. 2006
 - 27) 北條浩彦: RNAi 効果の評価法. バイオテクノロジージャーナル, 6: 51-57. 2006
 - 28) 八谷如美, 金子清俊: 正常 Prion 蛋白質の機能と異常化 (感染) のメカニズム. Brain Medical, 印刷中
- ## 2. 学会発表
- 1) Imagawa M, Kozuka Y, Omi K, Watanabe K, Hachiya NS, Kaneko K: Ultrastructural analysis of the aberrant endoplasmic reticulum network in Huntington protein-depleted neuro2a cells. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and the 11th FAOBMB Congress. Kyoto, June 18 - 23, 2006
 - 2) Iwanami N, Sankawa U, Yamakawa Y, Nishijima M, Kaneko K, Saido TC: Chlorophyll derivatives inhibit the conversion of prion protein. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and the 11th FAOBMB Congress. Kyoto, June 18 - 23, 2006
 - 3) Hachiya NS, Watanabe K, Imagawa M, Kaneko K: More than a thousand-fold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric Aip2p/D1d2p. 10th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. Prague, June 24-28, 2006
 - 4) Kaneko K: Bovine Spongiform Encephalopathy

- (BSE) and variant CJD. National Assembly Compound, Seoul, Nov 23, 2006
- 5) Hahciya NS, Kaneko K: Intracellular Trafficking of Fluorescent Cellular Prion Protein in Differentiated Cells: Selective but Constant Reduction of Anterograde Velocity in the Neurites. 46th American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Diego, Dec 9-14, 2006
 - 6) 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, Nov 12-16, 2006
 - 7) Ohnishi Y, Yoshida M, Tamura Y, Tokunaga K, Kimura H, Hohjoh H: Assessment of allele-specific gene silencing by siRNA duplexes and short hairpin RNAs with wild and mutant-type reporter alleles. 56th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, New Orleans, Louisiana, USA, 2006
 - 8) Ohnishi Y, Tokunaga K, Hohjoh H: Evaluation assay system for siRNA duplexes conferring allele-specific gene silencing. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, 2006
 - 9) 今川美登里, 八谷如美, 小見和也, 小塚芳道, 金子清俊: 培養細胞における正常型プリオン蛋白質の挙動 – GFP 融合蛋白質安定発現株での輸送速度及び siRNA による発現阻害効果の検討について -. 2006 年プリオン研究会. 盛岡, 9.2-3, 2006
 - 10) 池袋 一典, 小笠原 大輔, 金子 清俊, 早出 広司: マウスプリオンアプタマーの探索とそのセンシングへの応用 (Selection of the aptamer for prion and its application to sensor system). 日本化学会バイオテクノロジー部会. 京都, 9.28-30, 2006
 - 11) 金子清俊: あらためて BSE 問題を考える. 第 163 回情報懇話会 (連合通信社). 東京, 4.24, 2006
 - 12) 金子清俊: BSE に関する日本の実情. 健康権実現のための保健医療連合会公聴会. ソウル大学, 6.16, 2006
 - 13) 金子清俊: 米国産輸入再々開. 第 2 回食の安全学習会. 大宮, 7.11, 2006
 - 14) 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 21 二回上越臨床神経懇話会. 新潟, 8.4, 2006
 - 15) 金子清俊: アメリカ産牛肉輸入再開と BSE 問題. 岩手県消団連、いわて生協共催, 盛岡, 9.27, 2006
 - 16) 金子清俊: BSE に関するフォーラム -アメリカ産牛肉の輸入再開-. 全国食健連, 東京, 11.11, 2006
 - 17) 金子清俊: BSE と米国産牛肉の危険性について考える学習会. 全国農団労 ; 富山県農協労, 富山, 12.19, 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

研究要旨 昨年度に引き続き、プリオンをはじめとする異常凝集蛋白質に対して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アンフォルジンによる高感度診断法の開発に関する検討を行った。本年度の研究総括として、当該期間における研究成果は、以下の2点に集約される。1) BSEプリオンなどの高感度診断法開発への応用が期待されるアンフォルジンの大量培養生成システムを構築した。2) ヒトやマウスにおいて、アンフォルジンのホモログを同定し、酵母アンフォルジンと同様の解きほぐし活性を有することを確認した。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、ヒト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。

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unfolding 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のには、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依存性基質蛋白質の解きほぐし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。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。

アンフォルジンのタンパク質解きほぐし活性を我々の研究室内だけでなく工業化も含め広く一般に利用することを視野にいれ、今年度は新しい大量培養システムの構築を目指すと同時に、ヒトやマウスなどにおけるホモログの発現について検討した。

B. 研究方法

アンフォルジンの強いタンパク質解きほぐし活性は出芽酵母内において発現と局在が厳密に制御されているため、強度の過剰発現においては細胞の増殖停止が起こり大量精製には不向きであり、またPET等による大腸菌リコンビナントによる発現においても過剰発現下での細胞毒性により増殖が停止してしまう。そこで、これらの問題点を解決しより哺乳類に近い条件での回収を可能にするため、まず昆虫細胞によるバキュロウイルス発現システムをたちあげ発現系のベクター構築を行った。

次に、構築したベクターを用い少量の昆虫由来Sf9細胞にてアンフォルジン精製条件を検討し精製系を確立した。さらにこれらの系で得られた最終精製標品においてアンフォルジン多量体と単量体の存在比を検討し、最終的に多量体を形成しているサンプルについて出芽酵母で検討したときと同様にピック小体を用いて抗原抗体反応による検出感度上昇が可能かどうかを確認した。

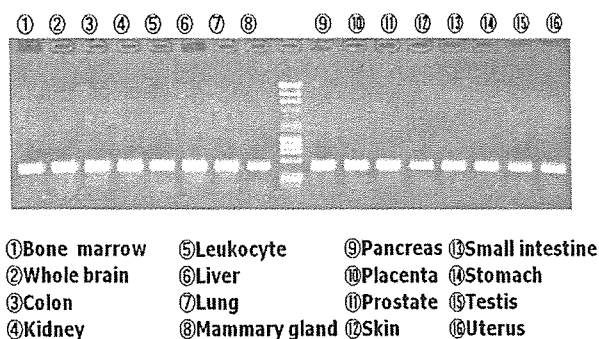
（倫理面への配慮）

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、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

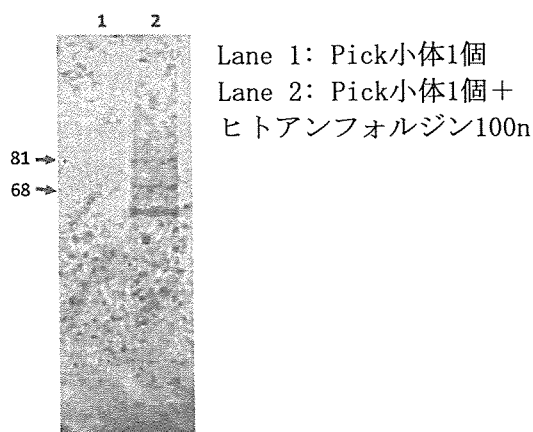
哺乳動物においても酵母と同様な分子シャペロンが存在するかどうかを検討した結果、マウス及びヒトにおいても酵母アンフォルジンのホモログを同定した。これらがヒトやマウスにおいてubiquitousに発現していることを発見した。

ヒトアンフォルジンの組織発現



解きほぐし活性に関する機能解析の結果、ヒトアンフォルジンは酵母アンフォルジンと同様のオリゴマーを形成し、高度の解きほぐし活性を有していることを確認した。今回得られた最終精製標品においてアンフォルジン多量体と単量体の存在比を検討し、ピック小体を用いて抗原抗体反応による検出感度を確認した。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、ヒトアンフォルジン処理後には、わずか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、酵母アンフォルジンと同様、ヒト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1,000倍以上改善した。

ヒトアンフォルジンによる解きほぐし活性



D. 考 察

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おり、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を示してきた。

それらの点を踏まえ、今年度は工業化も含め広く一般に利用することを視野にいれ、新しいアンフォルジン大量培養システムの構築を行った。

プリオン病の高感度診断法に関しては、PrP^{Sc}抗体等の同定を目指す他の研究グループとは一線を画し、我々は凝集性蛋白質の抗原提示能を飛躍的に改善する手法を開発した。これらの手法の一般化に向けて、今回の大量培養システムの構築という成果は大きな前進と言える。日本にとどまらず、欧州、北米大陸において、既に牛海綿状脳症(BSE)や変異型CJDの問題は重大な社会問題となっている。今回の高感度検出法を診断に応用していくことは、大きな社会的意義を有する。

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。

また、今回の検討により、ヒトやマウスにおいても、ヒト、マウスアンフォルジンが同定され、その高度の解きほぐし活性が確認された。酵母アンフォルジンは正常に折りたたまれた蛋白質をも認識するというユニークな活性を有しているが、ヒトアンフォルジンにおいても同様の解きほぐし活性の存在が推察される。これは、プリオン複製に関与するプロテイン X の特徴と一致するため、今回我々が同定したヒトアンフォルジンが、プリオンの複製に関与する新たな因子である可能性も推測される。

E. 結論

- 1) BSEプリオンなどの高感度診断法開発への応用が期待されるアンフォルジンの大量培養生成システムを構築した。
- 2) ヒトやマウスにおいて、アンフォルジンのホモログを同定し、酵母アンフォルジンと同様の解きほぐし活性を有することを確認した。

参考文献

- 1) Hachiya NS, Kaneko K: Investigation of laser microdissected inclusion bodies. *Methods in Cell Biology* vol 82: Laser manipulation of cells and tissues (Berns M and Greulich KO ed.), Academic Press (New York), in press
- 2) 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*. 13:1-5, 2006
- 3) 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

- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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) Furuya K, Kawahara N, Yamakawa Y, Kishida H, Hachiya NS, Nishijima M, Kirino T, Kaneko K: Intracerebroventricular delivery of dominant negative prion protein in a mouse model of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after dura graft transplantation. *Neurosci Lett*. 402:222-226, 2006
 - 2) 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*. 13:1-5, 2006
 - 3) Kaneko K, Hachiya NS: Hypothesis: Gut as source of motor neuron toxin in the

- development of ALS. Med Hypotheses. 66:438-9, 2006
- 4) Kaneko K, Hachiya NS: The alternative role of 14-3-3 zeta as a sweeper of misfolded proteins in disease conditions. Med Hypotheses. 67:169-171, 2006
 - 5) Hachiya NS, Imagawa M, Kaneko K: The possible role of protein X, a putative auxiliary factor in pathological prion replication, in regulating a physiological endoproteolytic cleavage of cellular prion protein. Med Hypotheses, in press
 - 6) Hachiya NS, Kaneko K: Investigation of laser microdissected inclusion bodies. Methods in Cell Biology vol 82: Laser manipulation of cells and tissues (Berns M and Greulich KO ed.), Academic Press (New York), in press
 - 7) 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.
 - 8) 八谷如美, 金子清俊: 正常型プリオンたんぱく質の正体は? - その推定される機能 -. 現代化学. 422:26-31, 2006.
 - 9) 八谷如美, 金子清俊: プリオンたんぱく質は正常人では何をしているのか? 科学, 76:1138-1142, 2006.
 - 10) 八谷如美, 金子清俊: 正常Prion蛋白質の機能と異常化(感染)のメカニズム. Brain Medical, 印刷中
- 2) Iwanami N, Sankawa U, Yamakawa Y, Nishijima M, Kaneko K, Saido TC: Chlorophyll derivatives inhibit the conversion of prion protein. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and the 11th FAOBMB Congress. Kyoto, June 18 - 23, 2006
 - 3) Hachiya NS, Watanabe K, Imagawa M, Kaneko K: More than a thousand-fold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric Aip2p/Dld2p. 10th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. Prague, June 24-28, 2006
 - 4) Hachiya NS, Kaneko K: Intracellular Trafficking of Fluorescent Cellular Prion Protein in Differentiated Cells: Selective but Constant Reduction of Anterograde Velocity in the Neurites. 46th American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Diego, Dec 9-14, 2006
 - 5) 今川美登里, 八谷如美, 小見和也, 小塚芳道, 金子清俊: 培養細胞における正常型プリオン蛋白質の挙動 - GFP 融合蛋白質安定発現株での輸送速度及び siRNA による発現阻害効果の検討について -. 2006 年プリオン研究会. 盛岡, 9.2-3, 2006
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 7) 特許取得
なし
 - 8) 実用新案登録
なし
2. 学会発表
 - 1) Imagawa M, Kozuka Y, Omi K, Watanabe K, Hachiya NS, Kaneko K: Ultrastructural analysis of the aberrant endoplasmic reticulum network in Huntington protein-depleted neuro2a cells. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and the 11th FAOBMB Congress. Kyoto, June 18 - 23, 2006

NMRによるプリオン蛋白質構造解析を通じたプリオン複製機構の解明と 創薬スクリーニングシステムの確立

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薬開発に関する研究を行った。2004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。更に¹⁵Nラベルしたマウス・プリオンの大量精製を行った。PrP^C (ラベル) の分子間のゆらぎを, NMRを用いて経時的に観測した。これにより, プリオン内で立体構造変換過程に関与する原子の情報を得た。また, PrP^C(ラベル)と新規抗プリオン物質との相互作用をNMRで観測することにより, 抗プリオン物質の作用機構を原子レベルで明らかにした。

A. 研究目的

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た。

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)

該当なし

C. 研究結果

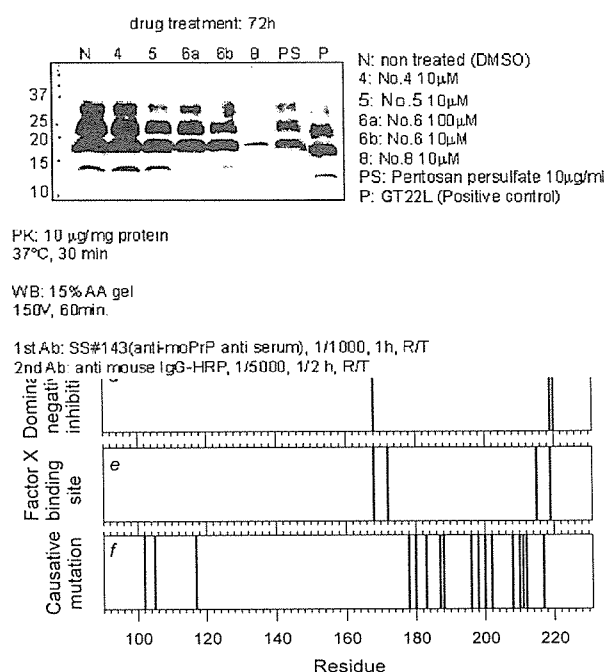
NMR緩和測定により, ピコ秒からナノ秒のダイナミクスとマイクロ秒からミリ秒のダイナミクスを測定した。その結果, 後者の遅いダイナミクスで著明な揺らぎを示す残基群は, 主にB及びCヘリックスに存在し, 病原性変異を示す残基群の分布に類似していた。

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, 比較的よく一致していた。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。

NMR緩和測定によるゆらぎの部位



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。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。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た。

また、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

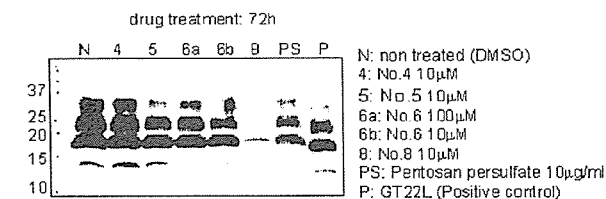
ることが可能となった。現在は、単分子によるシミュレーションを行っているが、N末のベータヘリックスが早期に形成され、その後C末のアルファヘリックスが再配置することが分かった。また、この反応の途中にN末とC末部分が独立に運動するような中間的な構造（中間体）が存在することが分かった。

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。NMR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た*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。

プリオン構造変換阻止化合物の同定



PK: 10 µg/mg protein
37°C, 30 min

WB: 15% AA gel
150V, 60min.

1st Ab: SS#143(anti-moPrP anti serum), 1/1000, 1h, R/T
2nd Ab: anti mouse IgG-HRP, 1/5000, 1/2 h, R/T

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。

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。

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

プリオン分子のダイナミクス情報に基づき、in silicoでの創薬スクリーニングのシステムを確立し、プリオン蛋白質の構造変換を阻止する化合物を発見した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kimura K, Nagaki M, Nishihira J, Kuwata K, Moriwaki H: Role of macrophage migration inhibitory factor for CTL-induced liver injury in hepatitis B transgenic mice. *Clin Vaccine Immunol.* 13(3):415-9, 2006
- 2) Kimura K, Moriwaki H, Nagaki M, Saio M, Nakamoto Y, Naito M, Kuwata K, Chisari FY: Pathogenic role of B cells in anti-CD40 caused necroinflammatory liver disease. *Am J Pathol.* 168(3):786-95, 2006
- 3) Sukegawa-Hayasaka K, Kato Z, Nakamura H, Tomatsu S, Fukao T, Kuwata K, Orii T, Kondo N: Effect of Hunter Disease (mucopolysaccharidosis type II) mutations on molecular phenotypes of iduronate-2-sulfatase: Enzymatic activity, protein processing and structural analysis. *J Inherit Metab Dis.* 29: 755-761, 2006
- 4) 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, 87-93, 2006
- 5) 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
- 6) 桑田一夫: 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), 9-24, 2006

- 7) 桑田一夫: フーリエ変換とタンパク質・核酸の基本立体構造, 『論理的創薬入門ー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), 25-49, 2006
- 8) 桑田一夫: タンパク質・核酸の構造ダイナミクス, 『論理的創薬入門ー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), 91-108, 2006
- 9) 桑田一夫: 計算機実験の基礎, 『論理的創薬入門ー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), 137-145, 2006
- 10) 桑田一夫: 分子構造と生理機能, 『論理的創薬入門ー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), 168-181, 2006
- 11) 桑田一夫: タンパク質の構造異常, 『論理的創薬入門ー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), 182-194, 2006
- 12) 桑田一夫: タンパク質のコンホメーション制御ー分子手術法, 『論理的創薬入門ー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), 195-209, 2006
- 13) 桑田一夫: プリオン病の発症と伝播機構ー特集 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ー 山口圭一, 松本友治, 児玉耕太, 岸直人, 桑田一夫 細胞工学, 26(2):151-155, 2007
- 14) 桑田一夫: 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, 夢ー特集 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ー 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 細胞工学, 26(2):181-185, 2007
- 1) Kuwata K: EMBO-FEBS Workshop on Amyloid Formation. Italy, Mar 25-28, 2006
- 2) 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, Nov 12-16, 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

2. 学会発表