

# 13. プリオン蛋白構造変換機序の解析

研究分担者 堂浦克美 東北大学大学院 医学系研究科

研究協力者 木村朋寛 (東北大学大学院・医学系研究科)

研究要旨 異常型プリオン蛋白 (プリオン) の産生に影響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い、GABAA 受容体サブユニット  $\beta 1$  “Gabrb1” を発見した。RNA 干渉実験の特異性を確認するとともに、 $\beta 1$  以外の他のサブユニットの関与に関する検討や各種 GABAA 受容体作用化合物の影響を検討した。その結果、Gabrb1 の GABAA 受容体と関係しない別の機能がプリオンの産生に関与していることが示唆された。

## A. 研究目的

プリオン病の病原因子とされる異常型プリオン蛋白 (プリオン) 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。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与する宿主因子の探索を行い、3 候補を同定した。その中の一つについて、結果の特異性を確認するとともに、その関連因子の関与等に関して調査した。

## B. 研究方法

### 1) 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。

### 2) 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、RML プリオン株に持続感染した培養細胞 (ScN2a)、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もしくは化学合成型 siRNA を細胞に導入した。培地交換を行い、3 日間培養した。

### 3) 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 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、ベクター型 siRNA の場合は空ベクターを導入した細胞 (mock)、化学合成型 siRNA の場合は導入試薬のみを添加した細胞 (mock) を対照とした。

### 4) 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 (ScN2a および N2a) の溶解液に含まれる総プリオン蛋白量 (N2a の場合は正常型プリオン蛋白) をウエスタンブロット法により検討し、mock と比較した。

### 5) 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 もしくは GAPDH を用いて相対的な定量を行った。

### 6) Gabrb1 蛋白の検出

N2a 細胞の膜画分を調製し、免疫沈降によって精製・濃縮を行った。免疫沈降に用いた抗体は、プロテイン G ビーズに結合させて BS3 で架橋させた。免疫沈降のポジティブコントロールには小麦胚芽抽出物による無細胞発現系で発現させた Gabrb1 を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では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 (ScN2a) において遺伝子ノックダウンスクリーニングにより異常型プリオン蛋白の産生を阻害する因子として *Gabrb1* を同定した。

*Gabrb1* の遺伝子ノックダウンでは、N2a において正常型プリオン蛋白の発現亢進が mRNA レベルおよび蛋白質レベルで見られるにもかかわらず、ScN2a において異常型プリオン蛋白の産生抑制が見られた。レスキュー実験として siRNA が標的とする配列に変異を加えた変異 *Gabrb1* 発現ベクターと siRNA を同時に導入したところ、変異 *Gabrb1* 導入細胞では異常型プリオン蛋白産生抑制効果が中和された。この結果は siRNA による効果がオフターゲットによるものでなく *Gabrb1* 遺伝子発現抑制によることを支持した。さらにこの分子に対する特異的阻害剤 SCS でも検討したところ、異常型プリオン蛋白の産生抑制が見られた。

しかし、GABAA 受容体の  $\beta 1$  以外のサブユニットである  $\alpha 5$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 2$ ,  $\delta$  のノックダウンでは異常型プリオン蛋白の産生抑制は見られなかった。また、GABAA 受容体のアゴニストやチャンネルブロッカーの添加によっても異常型プリオン蛋白産生に目立った変化は見られなかった。

*Gabrb1* 蛋白の検出は、小麦胚芽抽出物による無細胞発現系での発現産物をポジティブコントロールとした実験では、免疫沈降とウエスタンブロッティングで検出が可能であったが、細胞抽出液からは免疫沈降、ウエスタンブロッティング共に検出がうまくいかなかった。

#### 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受容体に関連する分子、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。今回の遺伝子ノックダウン研究で異常型プリオン蛋白の産生阻害を示した *Gabrb1* は、抑制性神経伝達物質である GABA の受容体である GABAA 受容体の構成蛋白である。GABA 受容

体は GABAA, GABAB, GABAC に分類され、A と C は 4 回膜貫通型のサブユニットで構成されるイオンチャンネル型受容体であり、B は G 蛋白共役型の 7 回膜貫通型蛋白で構成される代謝型受容体である。GABAA 受容体は 5 量体からなり、構成するサブユニットは  $\alpha 1 \sim 6$ ,  $\beta 1 \sim 3$ ,  $\gamma 1 \sim 3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$  などに分類されており、16 種類が見つかっている。

この  $\beta 1$  サブユニットのノックダウンにより、異常型プリオン蛋白産生を減少させるにもかかわらず正常型プリオン蛋白の発現が亢進するという興味深い結果が得られた。ノックダウン実験の結果が、siRNA のオフターゲットによるアーチファクトでないことは今回のレスキュー実験や特異的阻害剤 SCS の結果から支持されたが、 $\beta 1$  サブユニットがプリオン蛋白とどのように関係しているかを解明することについては、今後の課題である。

$\beta 1$  サブユニット以外の GABAA 受容体サブユニットのノックダウンで異常型プリオン蛋白産生抑制が見られないことや、GABAA 受容体チャンネルブロッカーやアゴニストでも効果が見られないことから、GABAA 受容体そのものが異常型プリオン蛋白産生に関与しているというよりは、 $\beta 1$  サブユニットが単独で関与している可能性が考えられる。

プリオン病患者では臨床早期より周期性同期性放電といった脳波異常やミオクローヌスといった痙攣症状が出現することより、GABA 系ニューロンの機能が臨床早期から障害されることが指摘されている。また、アンカーレスプリオン蛋白発現動物を用いた研究 (Trifilo MJ, et al. *Journal of Virology*, 20:9890-9899, 2008) では、RML プリオン株に感染させると GABAA 受容体サブユニット群の発現亢進が認められ、プリオン病と GABAA 受容体との関連が示唆されている。これらのことは、GABAA 受容体と異常型プリオン蛋白との間に何らかの関係があることを想像させる。今回の発見は、異常型プリオン蛋白とプリオン病の病態を結び付ける新たな手がかりとなる可能性があり、*Gabrb1* 蛋白がプリオン蛋白に直接作用する可能性をはじめ、どのように相互作用するかについて今後検討を進めたい。

F. 健康危険情報  
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nguyen TH, Lee CY, Teruya K, Ong WY, Doh-ura K, Go ML.: Antiprion activity of functionalized 9-aminoacridines related to quinacrine. *Bioorg Med Chem.*

2. 学会発表

- 1) Sakasegawa Y, Hachiya NS, Kaneko K, Doh-ura K: Heat shock protein 90 (Hsp90) stimulates polymerization of a copper-loaded prion protein. *Prion2008, Madrid, October 8-10, 2008*
- 2) Teruya K, Wakao T, Nishimura T, Kimura Y, Sakasegawa Y, Suda Y, Doh-ura K: Binding of mouse prion protein to heparin. *Meeting of 17th Methods in Protein Structure Analysis (MPSA2008), Sapporo, August 26-29, 2008*
- 3) 堂浦克美: ヤコブ病克服プロジェクトの成果と課題—治療・発症機序研究。食と医療の安全に関する市民講座「プリオンから見た食と医療の安全: プリオンはもう怖くないの? ウシ海綿状脳症(BSE)とヤコブ病(CJD)」, 札幌, 2008年9月14日
- 4) 木村朋寛, 西村有起, 堂浦克美: プロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白産生に関与する内因性因子。2008年プリオン研究会、新得(北海道)、2008年8月29日、30日
- 5) 逆瀬川裕二, 堂浦克美: 持続性プリオン感染細胞における PrPres の産生を抑制する新規ヒートショック蛋白質 90 阻害剤。2008年プリオン研究会、新得(北海道)、2008年8月29日、30日
- 6) 濱中大一, 川越敬一, 陳忠正, 照屋健太, 堂浦克美: 抗プリオン活性を有するアミロイド親和性化合物の構造的特徴。2008年プリオン研究会、新得(北海道)、2008年8月29日、30日
- 7) 坪井義夫, 田中美紀, 岡村信行, 志賀裕正, 堂浦克美, 本田裕之, 佐々木健介, 山田達夫: BF-227 を用いたプリオンアミロイドイメーjingー Gerstmann-Straussler-Scheinker 病における

画像と病理の対比—。2008年プリオン研究会、新得(北海道)、2008年8月29日、30日

- 8) 戸邊美智子, 宮庄拓, 野村幸子, 伊藤暁史, 松田一哉, 川崎ゆり, 堂浦克美, 毛利資郎, 横田博: スクレイピーマウス血清中における疾患特異的蛋白質の検出。2008年プリオン研究会、新得(北海道)、2008年8月29日、30日
- 9) 高山昂一郎, 海野昌喜, 篠原正将, 酒井隆一, 照屋健太, 堂浦克美, 佐々木誠, 齋藤正男: ヒト由来のグルタミン酸受容体 (GluR5) リガンド結合部位とダイシハーペイン構造類縁体の X 線結晶構造解析。第21回生物無機化学夏季セミナー、京都、2008年8月2-4日
- 10) 海野昌喜, 篠原正将, 高山昂一郎, 照屋健太, 堂浦克美, 酒井隆一, 佐々木誠, 齋藤正男: ダイシハーペイン構造類縁体を結合したイオンチャンネル型グルタミン酸受容体 GluR5 の結晶構造解析。第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウムおよび第12回学際ライフサイエンスシンポジウム、仙台、2008年5月19日

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 堂浦克美: コンフォメーション病医薬組成物。PCT/JP2007/058566 国内移行 カナダ(2008年10月14日)、米国(2008年10月20日)、豪州(2008年11月4日)、欧州(2008年11月14日)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

### III. 研究成果に関する刊行一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Song CH, Furuoka H, Kim CL, Ogino M, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M	Effect of intraventricular infusion of anti-prion protein monoclonal antibodies on disease progression in prion-infected mice.	J Gen Virol	89	1533-44	2008
Ishiguro N, Inoshima Y, Sassa Y, Takahashi T	Molecular characterization of chicken prion proteins by C-terminal-specific monoclonal antibodies.	Vet Immunol Immunopathol		(in press)	
Okemoto-Nakamura Y, Yamakawa Y, Hanada K, Tanaka K, Miura M, Tanida I, Nishijima M, Hagiwara K	Synthetic fibril peptide promotes clearance of scrapie prion protein by lysosomal degradation.	Microbiol Immunol	52	357-365	2008
Masujin K, Shu Y, Yamakawa Y, Hagiwara K, Sata T, Matsuura Y, Iwamaru Y, Imamura M, Okada H, Mohri S, Yokoyama T	Biological and biochemical characterization of L-type-like bovine spongiform encephalopathy (BSE) detected in Japanese black beef cattle.	Prion	2	123-128	2008
Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M, Hashizume Y, Kitamoto T, Sobue G	Clinicopathologic characteristics of five autopsied cases of dura mater-associated Creutzfeldt-Jakob disease.	Neuropathology	28	51-61	2008
Hoshino A, Iwasaki Y, Izumi M, Kimura S, Ibi T, Kitamoto T, Yoshida M, Hashizume Y, Sahashi K	MM1-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with unusually prolonged disease duration presenting with panencephalopathic-type pathology.	Neuropathology	28	326-32	2008
Ikeda S, Kobayashi A, Kitamoto T	Thr but Asn of the N-glycosylation sites of PrP is indispensable for its misfolding.	Biochem Biophys Res Commun	369	1195-8	2008
Niimi Y, Iwasaki Y, Umemura T, Tanaka F, Yoshida M, Hashizume Y, Kitamoto T, Hirayama M, Sobue G	MM2-cortical-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with early stage cerebral cortical pathology presenting with a rapidly progressive clinical course.	Neuropathology	28	645-51	2008

Haraguchi T, Terada S, Ishizu H, Sakai K, Tanabe Y, Nagai T, Takata H, Nobukuni K, Ihara Y, Kitamoto T, Kuroda S	Coexistence of Creutzfeldt-Jakob disease, Lewy body disease, and Alzheimer's disease pathology: An autopsy case showing typical clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease.	Neuropathology		(in press)	
Kobayashi A, Arima K, Ogawa M, Murata M, Fukuda T, Kitamoto T	Plaque-type deposition of prion protein in the damaged white matter of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease MM1 patients.	Acta Neuropathol	116	561-566	2008
Hizume M, Kobayashi A, Teruya K, Ohashi H, Ironside JW, Mohri S, Kitamoto T	Human Prion Protein (PrP) 219K Is Converted to PrPSc but Shows Heterozygous Inhibition in Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Infection.	J Biol Chem	284	3603-09	2009
Yokoyama T, Masujin K, Iwamaru Y, Imamura M, Mohri S	Alteration of the biological and biochemical characteristics of bovine spongiform encephalopathy prions during interspecies transmission in transgenic mice models.	J Gen Virol	90	261-268	2009
Yokoyama T, Mohri S	Prion diseases and emerging prion diseases.	Curr Med Chem	15	912-916	2008
Yamamoto T, Ushiki Y, Hara S, Hall WW, Tsukagoshi-Nagai H, Yokoyama T, Tagawa Y, Sata T, Yamakawa Y, Kinoshita N, Tamura F, Hattori S, Irie S	An advantageous method utilizing new homogenizing device BioMasher and a sensitive ELISA to detect bovine spongiform encephalopathy accurately in brain tissue.	J Virol Methods	149	316-325	2008
Iwamaru Y, Shimizu Y, Imamura M, Murayama Y, Endo R, Tagawa Y, Ushiki-Kaku Y, Takenouchi T, Kitani H, Mohri S, Yokoyama T, Okada H	Lactoferrin induces cell surface retention of prion protein and inhibits prion accumulation.	J Neurochem	107	636-646	2008
Takenouchi T, Iwamaru Y, Sato M, Yokoyama T, Kitani H	Establishment of an SV40 large T antigen-immortalized bovine brain cell line and its neuronal differentiation by dibutyryl-cyclic AMP.	Cell Biol Int	33	187-191	2009
Murakami K, Nishikawa F, Noda K, Yokoyama T, Nishikawa S	Anti-bovine prion protein RNA aptamer containing tandem GGA repeat interacts both with recombinant bovine prion protein and its beta isoform with high affinity.	Prion	2	73-80	2008

Suzuki SY, Takata M, Teruya K, Shinagawa M, Mohri S, Yokoyama T	Conformational change in hamster scrapie prion protein (PrP <sup>27-30</sup> ) associated with proteinase K resistance and prion infectivity.	J Vet Med Sci	70	159-165	2008
Atarashi R, Wilham JM, Christensen L, Hughson AG, Moore RA, Johnson LM, Onwubiko HA, Priola SA, Caughey B	Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking.	Nat Methods	5	211-212	2008
Hosokawa T, Tsuchiya K, Sato I, Takeyama N, Ueda S, Tagawa Y, Kimura KM, Nakamura I, Wu G, Sakudo A, Casalone C, Mazza M, Caramelli M, Takahashi H, Sata T, Sugiura K, Baj A, Toniolo A, Onodera T	A monoclonal antibody (1D12) defines novel distribution patterns of prion protein (PrP) as granules in nucleus.	Biochem Biophys Res Commun	15	657-63	2008
Hosokawa T, Ono F, Tsuchiya K, Sato I, Takeyama N, Ueda S, Zanusso G, Takahashi H, Sata T, Sakudo A, Sugiura K, Baj A, Toniolo A, Yoshikawa Y, Onodera T	Distinct immunohistochemical localization in Kuru plaques using novel anti-prion protein antibodies.	Microbiol Immunol	52	25-29	2008
Takada N, Horiuchi M, Sata T, Sawada Y	Evaluation of methods for removing central nervous system tissue contamination from the surface of beef carcasses after splitting.	J Vet Med Sci	70	1225-30	2008
Kato K, Sawada Y	Distribution of the lingual tonsils of cattle designated as specified risk materials.	J Vet Med Sci	70	251-254	2008
Muramatsu Y, Sakemi Y, Horiuchi M, Ogawa T, Suzuki K, Kanameda M, Hanh TT, Tamura Y	Frequencies of PRNP gene polymorphisms in Vietnamese dairy cattle for potential association with BSE.	Zoonoses Public Health	55	267-73	2008
Watanabe K, Tachibana M, Tanaka S, Furuoka H, Horiuchi M, Suzuki H, Watarai M	Heat shock cognate protein 70 contributes to Brucella invasion into trophoblast giant cells that cause infectious abortion.	BMC Microbiol	8	212	2008

堀内 基広	プリオンの増殖とその抑制	ウイルス感染症セミナー	10	13-25	2008
Nguyen TH, Lee CY, Teruya K, Ong WY, Doh-ura K, Go ML	Antiprion activity of functionalized 9-aminoacridines related to quinacrine.	Bioorg Med Chem	16	6737-46	2008