

235-239, 2010

- 5) 作道章一. プリオン病とプリオン不活化法の一般知識. 防菌防黴 38 : 149-153, 2010
- 6) Sakudo A, Onodera T. Tissue- and cell type-specific modification of prion protein (PrP)-like protein Doppel, which affects PrP endoproteolysis. Biochem Biophys Res Commun 404 : 523-527, 2011
- 7) Sakudo A, Ano Y, Onodera T, Nitta K, Shintani H, Ikuta K, Tanaka Y. Fundamentals of prions and their inactivation. Int J Mol Med (in press)

2. 学会発表

- 1) 作道章一. プリオン蛋白質遺伝子欠損細胞を用いた正常型プリオン蛋白質の機能解析. 第 146 回琉球医学会例会, 沖縄,

2010.4.20

- 2) 作道章一, 阿野泰久, 小野寺 節, 生田和良, 田中康春. プリオン感染時の脳内酸化ストレス動態解析. 第 150 回日本獣医学会学術集会, 帯広, 2010.9.16-18
- 3) 作道章一, 田中康春. プリオン感染に伴う脳内酸化ストレス動態変化. 第 148 回琉球医学会例会, 沖縄, 2010.10.19

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

3. その他

なし

図 1 MplZはマクロファージのマーカを発現している

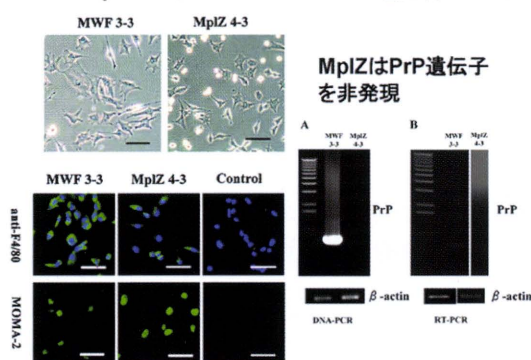


図 2 MplZは血清除去によりアポトーシスを示す

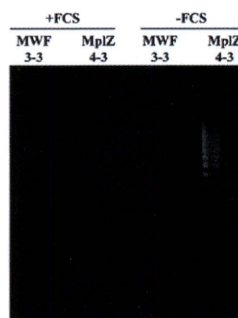


図 3 MplZは貪食能が低下している

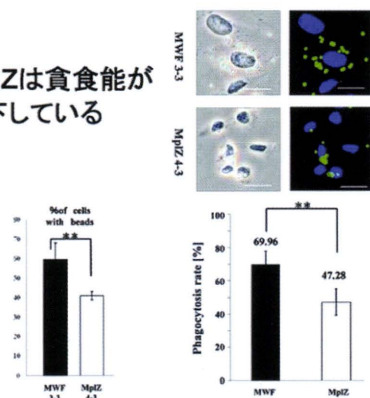
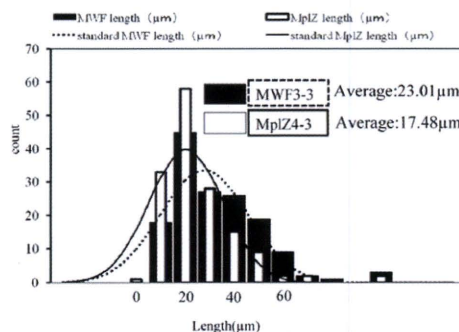


図 4 MplZはMWFに比べて仮足の長さが短い



プリオン蛋白の過剰発現と細胞死

研究分担者：坂口 末廣 徳島大学疾患酵素学研究センター神経変性疾患研究部門

研究協力者：森 剛志 徳島大学疾患酵素学研究センター神経変性疾患研究部門

研究要旨

我々は、正常プリオン蛋白(PrP^C)を過剰発現させると、培養細胞 HEK293T がアポトーシスによる著明な細胞死を引き起こすことを見出した。しかし、アポトーシスマーカーであるカスパーゼ 3 は活性化されていなかった。また、Bax, Bcl-2, Bcl-X_L の発現も変化せず、p53 のリン酸化状態にも変化は認められなかった。これらの結果は、PrP^C の過剰発現による細胞死がこれらのアポトーシス分子を介さない経路によってもたらされている可能性を示した。一方我々は、オートファジーのマーカーである LC3 II の発現が上昇することを見出した。このことは、PrP^C の過剰発現がオートファジーを活性化させ、細胞死に至らせる可能性を示した。

A. 研究目的

プリオン病は、正常プリオン蛋白(PrP^C)が異常プリオン蛋白(PrP^{Sc})へと構造変換をおこすことで起こる神経変性疾患である。実際我々は、PrP^C 欠損(PrP^{-/-})マウスがプリオンに感染せず、プリオン病を発症しないことを明らかにした¹⁾。しかし、PrP^C から PrP^{Sc} への構造変換がどのようにプリオン病に関与するのかはいまだ不明である。

今回我々は、培養細胞株に PrP^C を過剰発現させると、顕著な細胞死が誘導されるという興味深い現象を見出した。本研究では、この PrP^C の過剰発現による細胞死のメカニズムについて解析した。

B. 研究方法

1. 細胞死の検出方法

全長 PrP をコードする cDNA を pcDNA3.1(-) に挿入した発現ベクター pcDNA3.1(-) PrP を、HEK293T 細胞および CHO 細胞にリポフェクション法を用いて遺伝子導入し、48 時間後に生細胞数をカウントした。

2. ウェスタンブロット解析

トランスフェクション 48 時間後の細胞、またはマウス脳を、細胞溶解液(0.5% Triton X-100, 0.5% Sodium deoxycholic acid, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)にて乳剤化し、それぞれの抗体を用いてウェスタンブロットを行なった。

3. タイムラプスイメージング解析

HEK293T 細胞に pcDNA3.1(-) または pcDNA3.1(-) PrP を pEGFP-LC3 と共発現させ、タイムラプス蛍光顕微鏡(Nikon)を用いて経過観察を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験や動物実験については、徳島大学の遺伝子組み換え安全委員会や動物実験委員会の承認を得て行なった。

C. 研究結果

以前我々は、HEK293T 細胞に pcDNA3.1(-) PrP をトランスフェクションすると、24 時間後に顕著なアポトーシスによ

る細胞死が誘導されることを報告した。そこで本年度は、細胞死のメカニズムを解明するために、アポトーシス関連分子についてウェスタンブロットにて解析した。その結果、Bcl-2ファミリーであるBax、Bcl-2、Bcl-xLの発現量に違いは認められなかった(図1A)。また、Caspase-3の活性化型も検出できなかった(図1B)。さらに、p53の活性化を示すリン酸化も検出されなかった(図1C)。これらの結果は、PrP^Cの過剰発現による細胞死がCaspase 3やp53を介さないことを示唆した。

最近、アポトーシスの一つの経路として、オートファジーが注目されている。そこで我々は、オートファジーのマーカーであるLC3をウェスタンブロットにより解析した。その結果、オートファジーの活性化を示すLC3 IIの量が増加することを見出した(図2A)。また、GFPタグがついたLC3を細胞内に発現させると、オートファゴソームの形成が検出できた(図2B)。

さらに我々は、プリオン感染マウスの脳のリホジネートを用いてLC3を同様に解析した。二種類のプリオン株に感染した脳を調べたところ、正常脳のそれと比較し、全LC3の量が上昇していた(図3)。また、LC3 IIも増加していた(図3)。

D. 考 察

プリオン病は、PrP^CがPrP^{Sc}へと構造変換することにより起こる神経変性疾患である。我々は、HEK293T細胞にPrP^Cを過剰発現させると、顕著な細胞死が誘導されることを見出した。また、オートファジーの指標分子であるLC3-II発現が増加し、細胞内でのLC3の凝集も観察された。さらに、LC3-IIはプリオン感染脳内でも、正常脳のそれと比較して、約3倍も増強されていた。プリオン感染脳では、PrP^{Sc}が過剰に蓄積する。従って、これらの結果は、PrP^Cの過剰発現による細胞死とプリオン感染による神経細胞死が同

様な細胞死のシグナル経路を介している可能性を示唆していると考えられる。

E. 結 論

HEK293TおよびCHO細胞にPrP^Cを過剰発現させると、アポトーシスによる細胞死を誘導した。また同時に、オートファジーが誘導された。さらに、プリオン感染マウス脳内においてもオートファジーの活性が増強されていた。これらの結果は、PrP^Cの過剰発現による細胞死とプリオン感染による神経細胞死が同様なオートファジーの活性化経路を介している可能性を示唆している。

[参考文献]

- 1) Sakaguchi S, et al. Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *J Virol* 69 : 7586-7592, 1995

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表(2010/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) 森 剛志, 坂口末廣. プリオン病. *Clinical Neuroscience* 28(8) : 906-908, 2010
- 2) 坂口末廣. プリオン蛋白異常化と伝達・進行のメカニズム. In: 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班」・編. プリオン病と遅発性ウイルス感染症, 東京, 金原出版株式会社 37-43, 2010

2. 学会発表

- 1) 森 剛志, 村松直美, 山口仁孝, 犬伏祥子,

- 矢野雅司, 藤田浩司, 坂口末廣. プリオン蛋白過発現により誘導される細胞死の機序. 第 25 回中国四国ウイルス研究会, 岡山, 岡山大学創立 50 周年記念館, 2010.6.26-27
- 2) 森 剛志, 村松直美, 犬伏祥子, 山口仁孝, 坂口末廣. プリオン蛋白の過剰発現は細胞死を誘導する. 第 58 回ウイルス学会学術集会, 徳島, 徳島県郷土文化会館, 2010.11.7-9
- 3) 森 剛志, 村松直美, 犬伏祥子, 山口仁孝, 矢野雅司, 藤田浩司, 坂口末廣. プリオン蛋白過剰発現誘導性細胞死の分子機構. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB), 兵庫, 神戸ポートアイランド, 2010.12.7-10
- 4) 村松直美, 森 剛志, 山口仁孝, 坂口末廣. 培養細胞を用いたプリオンの細胞死誘導のメカニズム. 第 58 回ウイルス学会学術集会, 徳島, 徳島県郷土文化会館,

2010.11.7-9

- 5) 村松直美, 森 剛志, 山口仁孝, 藤田浩司, 坂口末廣. A prion protein with familial mutation, PrP-Y145Stop, induces cell death through G2 cell cycle arrest. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB), 兵庫, 神戸ポートアイランド, 2010.12.7-10

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

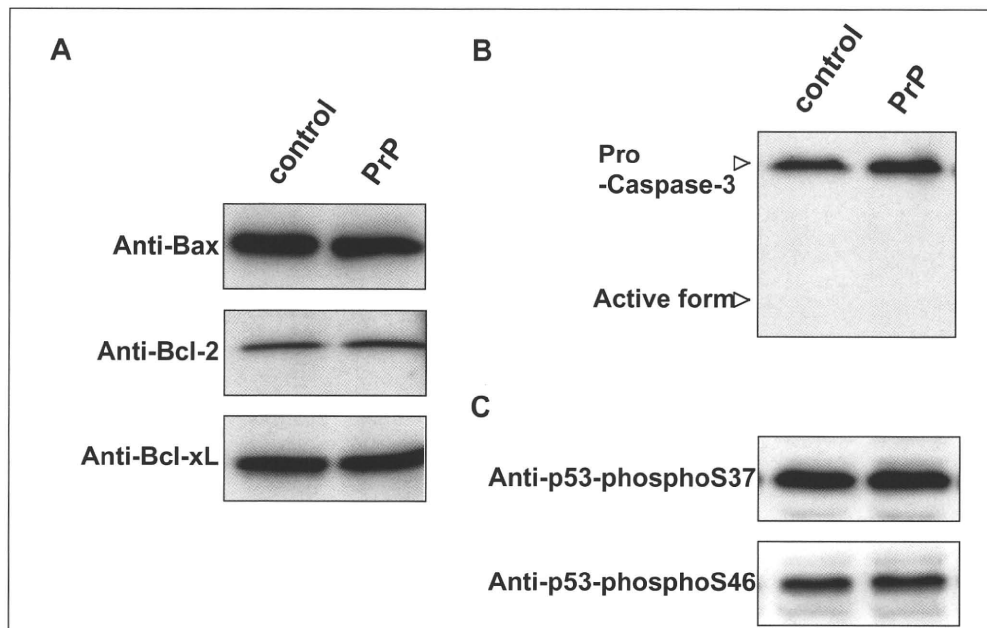


図 1 Prp 過剰発現による細胞死は caspase や p53 を介さない

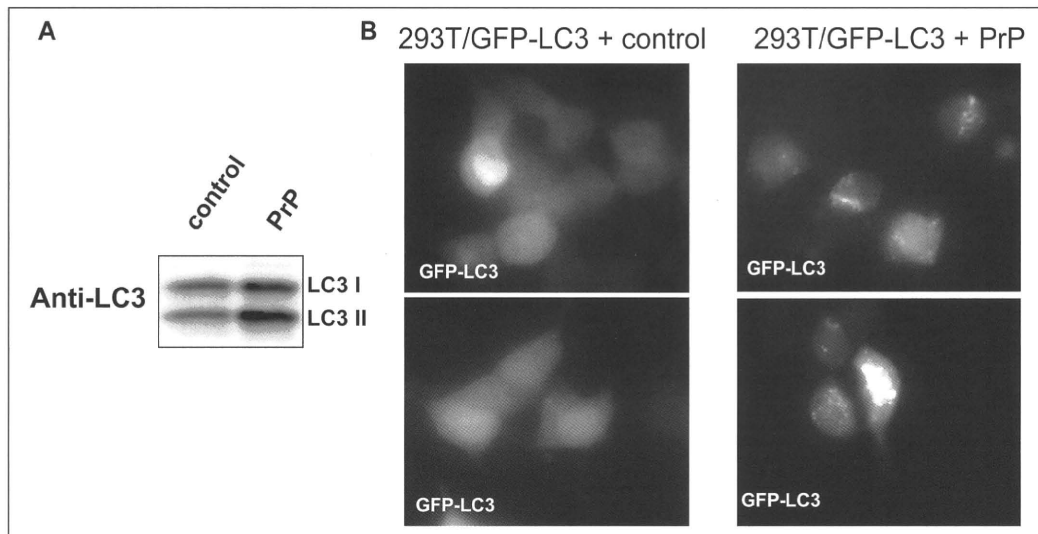


図2 Prp 過剰発現はオートファジーを活性化する

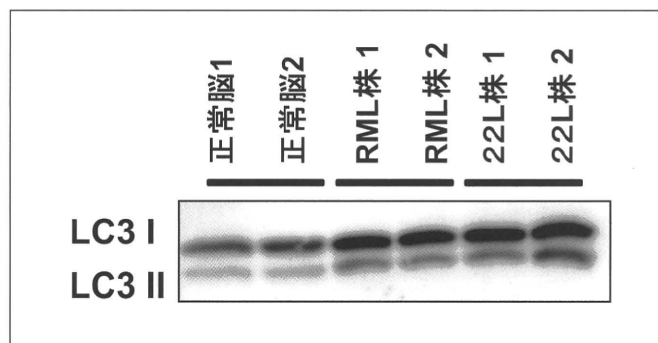


図3 プリオン感染マウス脳内でも LC3 IIは増強されている

ヒト化マウスに対する BSE の伝達試験

研究分担者：毛利 資郎 (独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所プリオン病研究センター

研究要旨

わが国ではこれまで 2 例の非定型 BSE が報告されている。そのうち黒毛和種で見つかった 24 例目の黒毛和種の L 型非定型 BSE (L-BSE) の感染性についてはウシ、ウシ型プリオン蛋白質遺伝子導入マウス(ウシ化 Tg マウス)および野生型マウスへの伝達試験が行われ、野生型マウスを除き、感染性が確認されている。われわれは 非定型 BSE のヒトに対する感染の可能性を調べることを目的に、ヒト型蛋白質遺伝子導入マウス(ヒト化マウス)に対する伝達性(=感染性)を調べた。その結果、わが国の L-BSE はヒト化マウスのコドン 129 がメチオニン型(129MM)のマウスに伝達が成立した。バリン型(129VV)のマウスへの伝達は認められなかった。伝達効率については従来型 BSE (C-BSE)と同様に 100%の伝達は認められなかったが、潜伏期間は C-BSE に比べ短いことが判明した。他方、カナダの H 型非定型 BSE のヒト化マウスへの伝達は成立しなかった。

以上の成績から、わが国の非定型 BSE は従来型 BSE と同様にヒトに対する感染の可能性のあることが示された。

A. 研究目的

プリオン病は伝達性の神経変性疾患であり、人獣共通感染症である。プリオン病が伝達(=感染)するか否かについては、実験動物への伝達試験が唯一の手段である。われわれは、ヒトプリオン蛋白質遺伝子導入マウスを作製し、プリオンの伝達性に関する研究を行っている。本年度は、非定型 BSE のヒトに対する伝達性について検討した。

B. 研究方法

ヒトのプリオン蛋白質遺伝子の多型に合わせてコドン 129 メチオニン(M)もしくはバリン(V)のヒト型プリオン蛋白質遺伝子ノックイン(Ki)マウスとトランスジェニック(Tg)マウスを用いた。Ki マウス と Tg マウスをそれぞれ交配し、ヒトプリオン蛋白質を過剰発現するヒト化マウス(Ki+TgHu129MM、

Ki+TgHu129VV)を樹立し、BSE の伝達試験を行った。接種材料はわが国 24 例目の BSE として報告され、非定型 BSE (L-BSE/JP24)と診断された BSE 感染牛、カナダから入手した H 型非定型 BSE (H-BSE)牛の 10%脳乳剤をそれぞれ作製し、20 μ l をマウスの脳内に接種した。伝達の有無を免疫組織染色とウェスタンブロッティング(WB)で確認し、接種から安楽死までの日数を潜伏期間とした。比較のために、従来型 BSE と非感染牛の脳を同様に接種した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関して「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に則り、動物衛生研究所の動物実験委員会により審査承認されている。(承認番号 第 07-10 号、第 08-043 号)

C. 研究結果

C-BSE、L-BSE、H-BSEのうちC-BSEとL-BSEのみがKi+TgHu129M#5に伝達出来た。潜伏期間はそれぞれC-BSEが平均897日、L-BSEが平均713日であった。しかしながら、コドン129がバリンタイプのマウス(Ki+TgHu129V#139)にはいずれのBSEも伝達出来なかった。このことから、C-BSEもL-BSEもコドン129がメチオニン型のヒトに伝達し易いことが示唆された(表1)。

WB陽性のマウスの泳動像は、それぞれ接種材料と同様のバンドパターンを示した。免疫組織染色の結果、C-BSEはプラークが融合したパッチプラーク状に、L-BSEは顆粒状の異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の脳幹への蓄積が認められた(図1)。

その組織像は、ウシ型遺伝子改変マウスへ伝達したC-BSE、L-BSEとそれぞれ類似していた。

D. 考察

BSEのヒトへの感染はC-BSE由来とされているvCJDが報告されているが、日本のL-BSEも人への感染が起こりうることが示された。vCJDの患者のほとんどが、ヒトプリオン蛋白質遺伝子のコドン129がメチオニン型であることから、このヒト化マウスの伝達試験は感染モデルとなり得ると考えた。この実験成績から、日本のL-BSEは、その潜伏期間からヒトに対する感受性に関してC-BSEと同等か、もしくはそれ以上に高いと考えられた。

E. 結論

1. C-BSEも日本のL-BSEもヒト型プリオン蛋白質遺伝子導入マウスへの伝達が成立した。しかし、H-BSEは伝達が成立しなかった。
2. 伝達が成立したのはコドン129がメチオニン多型のマウスのみであり、バリン型に

は伝達出来ていない。

3. 伝達されたマウスのプリオン沈着像はC-BSEとL-BSEで大きく異なることが判明した。

これらのことから、わが国で発生した非定型BSEは従来型BSEと同様にヒトに対する感染の可能性のあることが示された。

[参考文献]

- 1) Masujin K, Shu Y, Yamakawa Y, et al. Biological and biochemical characterization of L-type-like bovine spongiform encephalopathy (BSE) detected in Japanese black beef cattle. Prion 2 : 123-128, 2008
- 2) Vincent Béringue, Laëtitia Herzog, Fabienne Reine, Annick Le Dur, Cristina Casalone, Jean-Luc Vilotte, Hubert Laude. Transmission of Atypical Bovine Prions to Mice Transgenic for Human Prion Protein. Emerging Infectious Diseases 14 : 1898-1901, 2008
- 3) Kong Q, Zheng M, Casalone C. et al. Evaluation of the Human Transmission Risk of an Atypical Bovine Spongiform Encephalopathy Prion Strain. J.Virol 82 : 3697-3701, 2008

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2010/4/1~2011/3/31発表)

1. 論文発表

- 1) Kobayashi A, Sakuma N, Matsuura Y, Mohri S, Aguzzi A, Kitamoto T. Experimental verification of a traceback phenomenon in prion infection. J Virol 84(7) : 3230-3238, 2010

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 BSE のヒト化マウスへの伝達と潜伏期間

Hu-mice	inoculum	transmitted/ inoculated	incubation period (days)
Ki+Tg-Hu129M#5	C-BSE	3/11	833, 929, 931 : positive
Ki+Tg-Hu129M#5	L-BSE	2/5	699, 727: positive
Ki+Tg-Hu129M#5	H-BSE	0/6	545-720: negative 817: surviving
Ki+Tg-Hu129V#139	C-BSE	0/11	561-913: negative
Ki+Tg-Hu129V#139	L-BSE	0/5	570-841: negative
Ki+Tg-Hu129V#139	H-BSE	0/5	422-733: negative

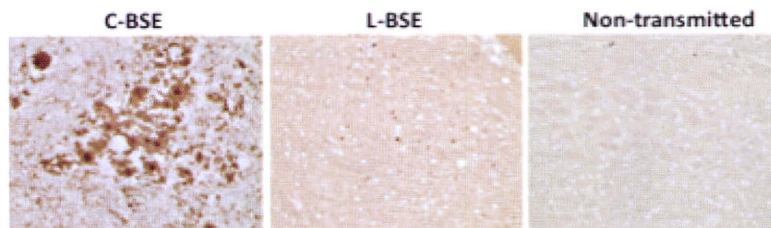


図 1 BSE を Ki+TgHu129M#5 マウスに接種後認められた PrP^{Sc}

リコンビナント PrP^C を用いたヒトプリオンの高効率な増幅

研究分担者：竹内 敦子 東北大学大学院医学系研究科 病態神経学分野

研究協力者：北本 哲之 東北大学大学院医学系研究科 病態神経学分野

研究要旨

本研究では、リコンビナント PrP^C を用いてヒトプリオンを効率良く増幅する方法について報告する。293F 細胞(ヒト胎児腎臓細胞由来) にヒト PrP^C (129M) を発現させた細胞破砕液を基質として用い、CJD 脳から Protein Misfolding Cyclic Amplification(以下 PMCA) 法によってヒトプリオンの高効率な増幅を試みた。変異型 CJD (vCJD) 脳由来プリオンはマルチラウンド PMCA 法により効率よく増幅され、感染脳ホモジネートの 10⁻⁹ないし 10⁻¹⁰ 希釈から PrP^{res} が検出可能であった。一方、孤発性 CJD (sCJD) 脳由来 PrP^{Sc} の増幅効率は、MM1 及び MM2 で非常に低く、MV2, VV2 では基質 PrP^C の遺伝子型が 129V の時のみプロテアーゼ抵抗性 PrP (PrP^{res}) の顕著な産生が認められた。sCJD プリオンは、遺伝子型やタイプの違いによって PMCA 法による増幅効率が大きく異なることが明らかとなった。

A. 研究目的

プリオン病は現時点で有効な治療法のない感染性の致死性神経疾患である。英国では輸血によって vCJD に感染した二次感染例がすでに数例報告されている。こうした CJD の二次感染を今後確実に防止するためには、輸血用血液や医薬品原料のスクリーニングが必須であり、一刻も早くヒトプリオンを高感度検出する技術を確立しなければならない。PrP^{Sc} の *in vitro* 増幅系である PMCA 法は、ハムスタースクレイピー 263K 株における PrP^{Sc} の高感度検出系として広く知られているが、ヒトプリオンの増幅に関しては高感度検出系に応用できるほどの増幅率が得られていない。その要因の一つに、ヒトプリオンの増幅に適した基質 PrP^C の選択が難しいことがあげられる。そこで本研究では、従来行われてきたヒト化トランスジェニックマウス脳を基質として用いる方法ではなく、リコンビナント PrP^C を基質として用いたことで、よ

り効率的にヒトプリオンを増幅することが可能となったので報告する。

B. 研究方法

ヒトプリオンの増幅に用いる基質として、293F 細胞(ヒト胎児腎臓細胞由来) にヒト PrP^C (129M または V) を一過性に発現させた細胞破砕液を基質として用い、CJD 由来プリオン (sCJD ; MM1, MM2, MV2, VV2, vCJD, 家族性 CJD (fCJD) ; S232R) から PMCA 法によって PrP^{Sc} を増幅させ、proteinase K 処理の後、ウエスタンブロット法により PrP^{res} を検出した。

(倫理面への配慮)

ヒトを対象とした研究に関しては、東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の規定に従い研究を行った。また動物実験に関しては動物衛生研究所動物実験に関する指針を遵守した。

C. 研究結果

vCJD 脳由来プリオンは 129MPrP^Cを基質とした PMCA により非常に効率良く増幅され、マルチラウンド PMCA により 10⁻⁹から 10⁻¹⁰ 希釈された脳ホモジネートから PrP^{res}を検出することが可能であった。一方、sCJD のうち MM1, MM2 は PMCA による増幅効率が非常に低く、fCJD (232R) に関してもほぼ増幅が認められなかった。しかしながら、sCJD の中でも MV2, VV2 は基質 PrP の遺伝子型が 129M では殆ど増幅されなかったのに対し、129V では非常に高い増幅率を示した。

D. 考 察

CJD の PMCA 法によるヒトプリオンの増幅では、タイプ別に増幅効率が大きく異なることが明らかとなったが、これは同時に、タイプ別に適切な PMCA 条件がそれぞれ異なることを示している。今回の PMCA 条件下においては、sCJD-MV2 は基質の遺伝子型が 129M では増幅されず、129V でのみ顕著に増幅された。この結果により、臨床診断の難しいとされる MV2 において、脳脊髄液や血液中から 129VPrP^Cを基質に用いた PMCA 法を行い PrP^{res}を検出することで、生前診断法として応用できる可能性が示唆された。

E. 結 論

ヒトプリオンはタイプにより PMCA 法に

よる増幅効率が大きく異なることが明らかとなった。増幅効率の低い MM1, MM2 に関しては、これらのプリオンを効率よく増幅するためには、さらなる条件検討(超音波処理、界面活性剤の選択など)が必須であると思われる。

[参考文献]

なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2010/4/1～2011/3/31 発表)

(予定を含む。)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

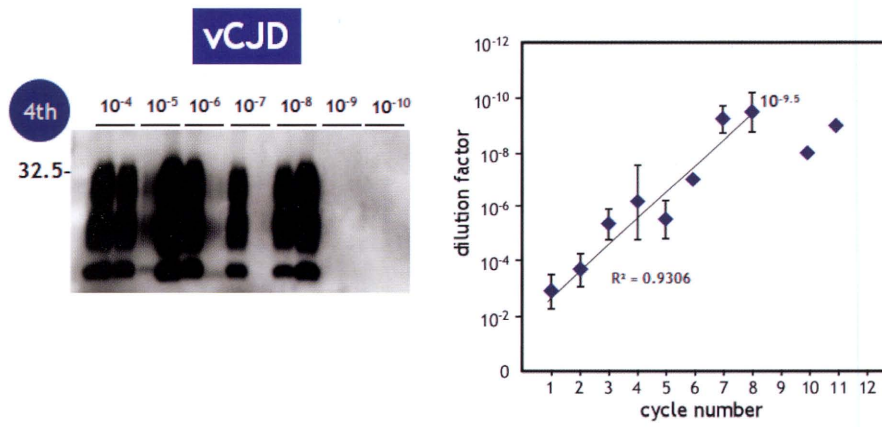


図1 vCJD プリオンの PMCA 法による増幅

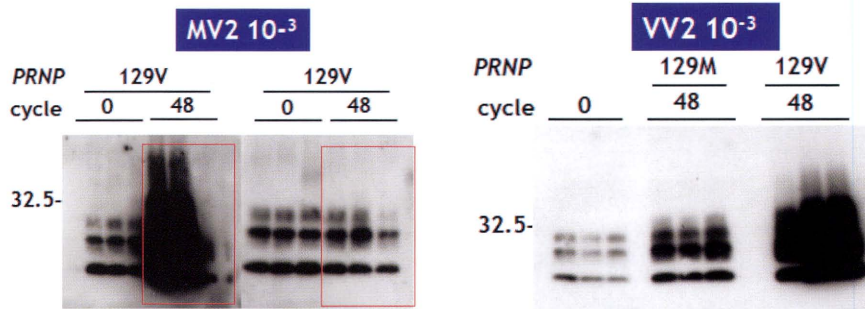


図2 MV2 プリオン及びVV2 プリオンは 129VPr^{PC} でのみ増幅される

培養細胞におけるプリオン感染に関する研究

研究分担者：横山 隆 動物衛生研究所 プリオン病研究センター

研究協力者：清水 善久 動物衛生研究所 プリオン病研究センター

研究協力者：河西 和雄 動物衛生研究所 プリオン病研究センター

研究要旨

スクレイピープリオン(Chandler 株)に対する持続感染の成立の有無を指標として、N2a 細胞をプリオン感受性および非感受性細胞に分類した。DNA マイクロアレイを用いて、2 種類の細胞で発現量に差のある遺伝子の検索を行った。Q-PCR での絞り込み、新たに作出した感受性細胞および非感受性細胞クローンでの再現性を確認したところ、非感受性細胞で高発現する 1 遺伝子を確認した。siRNA で、この遺伝子発現を抑制すると、非感受性細胞の一部(4/24)でプリオン感染が認められた。

A. 研究目的

一部の培養細胞でプリオンが増殖することが知られているが、その感受性を規定するメカニズムについては明らかではない。プリオンの細胞内における動態および挙動について解析し、プリオン感染の分子機構を解明する。スクレイピー感受性および抵抗性細胞の選別とその性状解析により、細胞内におけるプリオン増幅のメカニズムを明らかにする。プリオンが感染できる細胞または、プリオンが感染するに必須な細胞側の条件を明らかにすることは、BSE におけるプリオンの増幅部位(特定危険部位)の定義、範囲に科学的な論拠を加えることにつながる。

B. 研究方法

- (1) スクレイピーChandler 株に対して感受性および非感受性の N2a 細胞を分離する。
- (2) 分離した感受性細胞および非感受性細胞の他のプリオン株に対する感受性を評価する。
- (3) 両細胞にプリオンを感染させ、接種したプリオンの減衰、複製されたプリオンの

増加を解析する。

- (4) 両細胞の遺伝子発現についてマイクロアレイを用いた網羅的解析を行い、プリオン感受性に関わる因子を探索する。

(倫理面への配慮)

プリオン感染動物および材料の取り扱いには動物衛生研究所内のバイオセーフティレベル(BSL)2(スクレイピープリオン)または 3(その他のプリオン)実験施設にて行い、汚染物は 135°C、30 分間のオートクレーブ処理等により不活化した。すべての実験は動物衛生研究所バイオセーフティ委員会、実験動物委員会の許可を受けて実施した。

C. 研究結果

スクレイピーChandler 株の持続感染の成立の有無を指標として、N2a 細胞から感受性(N2aAT)および非感受性(N2a0719)を分離した。両細胞間には、PrP^Cの発現量に差は認められなかった。この両細胞について DNA マイクロアレイを用いて発現遺伝子の差異を比較し、Chandler プリオンの複製に関与す

る遺伝子の同定を試みた。解析の結果、43 遺伝子に発現量に差が認められた(感受性細胞において発現亢進: 28 遺伝子、発現低下: 15 遺伝子)。これらの遺伝子の発現変化の特異性を評価するため、Q-PCR 法を用いて発現量の定量し、11 遺伝子についてマイクロアレイの結果を確認することができた。さらに、感受性細胞(N2aAT)から新たに非感受性および感受性のサブクローン細胞を分離した。これらの細胞を用いて、候補遺伝子の発現変動の再現性を検討した。以上のスクリーニング法により、非感受性細胞において高発現する1 遺伝子を確認した。siRNA で遺伝子発現を抑制すると、非感受性細胞の一部(4/24)でプリオン感染が認められた。

D. 考 察

プリオンの感染および N2a 細胞内における PrP^{Sc} の変換に関連する候補遺伝子を見出した。同遺伝子産物は神経細胞の突起の伸長に関与することが知られていることから、神経細胞の分化とプリオンの感受性への影響に関する知見が得られるかもしれない。現在、得られた候補遺伝子産物の PrP^{Sc} 変換への関与について解析をすすめている。

E. 結 論

スクレイピープリオン Chandler 株に対する感受性の有無を指標として、分離した N2a 細胞における遺伝子の網羅的解析により、PrP^{Sc} の変換に関与する候補遺伝子を同定した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(2010/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

1) Yokoyama T, Masujin K, Schmerr MJ, Shu Y, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Murayama Y, Mohri S.

Intraspecies prion transmission results in selection of sheep scrapie strains. *PLoS One* 5(11) : e15450, 2010

2) Yokoyama T, Okada H, Murayama Y, Masujin K, Iwamaru Y, Mohri S. Examination of the Offspring of a Japanese Cow Affected with L-Type Bovine Spongiform Encephalopathy. *J Vet Med Sci* 73(1) : 121-123, 2011

3) Shimizu Y, Kaku-Ushiki Y, Iwamaru Y, Muramoto T, Kitamoto T, Yokoyama T, Mohri S, Tagawa Y. A novel anti-prion protein monoclonal antibody and its single-chain fragment variable derivative with ability to inhibit abnormal prion protein accumulation in cultured cells. *Microbiol Immunol* 54(2) : 112-121, 2010

4) Ushiki-Kaku Y, Endo R, Iwamaru Y, Shimizu Y, Imamura M, Masujin K, Yamamoto T, Hattori S, Itohara S, Irie S, Yokoyama T. Tracing conformational transition of abnormal prion proteins during interspecies transmission by using novel antibodies. *J Biol Chem* 285(16) : 11931-11936, 2010

5) Hasegawa K, Mohri S, Yokoyama T. Fragment molecular orbital calculations reveal that the E200K mutation markedly alters local structural stability in the human prion protein. *Prion* 4(1) : 38-44, 2010

6) An SS, Lim KT, Oh HJ, Lee BS, Zukic E, Ju YR, Yokoyama T, Kim SY, Welker E. Differentiating blood samples from scrapie infected and non-infected hamsters by detecting disease-associated prion proteins using Multimer Detection System. *Biochem Biophys Res Commun* 392(4) : 505-509, 2010

7) Gomi H, Yokoyama T, Itohara S. Role of GFAP in morphological retention and distribution of reactive astrocytes induced by scrapie encephalopathy in mice. *Brain Res* 1312 : 156-167, 2010

2. 学会発表

- 1) Yokoyama T, Ushiki-Kaku Y. Generation of conformation-specific anti-prion protein monoclonal antibodies by using prion protein-knockout mice. 2nd annual Congress of antibodies-2010, Beijing, China, 2010.3.24-26
- 2) Yokoyama T. Advance in TSE diagnosis and updated global situation on TSE. Fourth OIE/FAO-APHCA Regional Workshop and Working Group Meeting on BSE and Other Prion Diseases, in collaboration with NVRQS, MIFAFF, Seoul, Republic of Korea, 2010.2.24-26
- 3) Yokoyama T. Advance in prion distribution. Fourth OIE/FAO-APHCA Regional Workshop and Working Group Meeting on BSE and Other Prion Diseases, in collaboration with the Faculty of Veterinary Medicine of Chiang Mai University, MIFAFF, Cheng-mai, Thailand, 2010.8.30-9.3
- 4) Yokoyama T, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Matsuura Y, Mohri S. Limited neuroinvasion of CH1641-like prions in sheep. *Asia-*

Oceania Symposium on Prion Diseases, Sapporo, Hokkaido, 2010.7.24-25

- 5) Yokoyama T, Masujin K, Schmerr M.J, Yujing S, Okada H, Iwamaru Y, Imamura Y, Matsuura Y, Murayama Y, Mohri S. Intra- and inter-species prion transmission results in selection of sheep scrapie strains, *Prion2010*, Salzburg, Austria, , 2010.9.8-11
- 6) Yokoyama T, Masujin K, Yujing S, Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Mohri S. Species barrier of BSE in rodent model. *Prion Japan & Canada*, Tokyo, Japan, 2010.11.11-12
- 7) Yokoyama T. A challenge to elucidate the existing enigmas of prion diseases- bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *International research on epidemiology of zoonosis and training for young researcher*, Fujisawa, Japan, 2010.12.18

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

酵母を用いた異種間プリオン感染の分子機構解明

研究分担者：田中 元雅 独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター

研究要旨

プリオン病の病態解明のためのモデル生物として優れている出芽酵母プリオン[*PSI+*]の系を用い、酵母プリオン蛋白質 Sup35 のオリゴマー生成過程を NMR など で解析した。その結果、オリゴマーには構造多形が存在し、コア領域の外側のアミノ酸領域の構造の差異がアミロイド構造の多形をもたらすことが示唆された。

A. 研究目的

アミロイドの生成前に形成されるオリゴマーはアミロイド伸長反応の鋳型となるため、オリゴマーの構造を明らかにすることはプリオンの伝播機構を解明する上で非常に重要である。しかし、オリゴマーは不安定な分子種であるためにその構造には不明な点が多い。我々は酵母プリオンのフラグメントである Sup35NM 蛋白質のオリゴマー構造の解明、およびオリゴマーの構造とアミロイド構造やプリオン株の表現型との相関解明を目指した。

B. 研究方法

まず、様々なパルスシーケンスを超高磁場 NMR へ適用し、254 アミノ酸からなる Sup35NM の主鎖アミドプロトンの帰属を行った。次に、Sup35NM の二次元 NMR スペクトルを 37 度から 7 度まで順次下げて測定し、低温化によるオリゴマーの生成に伴うシグナル強度の減少をすべての主鎖アミドプロトンのシグナルで追跡した。また、Sup35NM アミロイドのコア領域を質量解析で同定する手法を確立した。これらの手法を野生型および様々な Sup35NM 変異体へ適用した。さらに、各アミロイドが導くプリオン株の表現型を、酵母へのアミロイド感染実験

から明らかにした。さらに様々な構造をもつアミロイドの異種間プリオン感染能を調べる実験系の構築を行った。

(倫理面への配慮)

なし

C. 研究結果

温度低下に伴う NMR シグナル強度の減少から、オリゴマーのコア領域を調べた。その結果、50 番目から 100 番目のアミノ酸の領域がコアになることが明らかになった。このオリゴマーのコア領域には野生型と変異体で大きな違いがなかった。一方、アミロイドのコア領域は、オリゴマーのコアとは異なる領域である 1-40, 90-140 番目のアミノ酸の 2 種類のタイプが存在することが明らかになった。また、プリオンドメインの前半コアのアミロイドは脆弱で、(白色の)強いプリオン株を導き、後半コアのアミロイドは強固で、(ピンク色の)弱いプリオン株を導くことが明らかになった。

一方、オリゴマーのコア領域の外側で揺らいでいる領域(1-40, 100-150 番目のアミノ酸)の構造は、野生型と変異体で異なっていることが NMR の解析から示唆された。

D. 考 察

オリゴマー形成はプリオンドメイン内部に存在する繰り返し配列領域の疎水性残基間の相互作用で誘導されることが示唆された。これは我々が以前に報告したX線小角散乱の結果とも一致する。また、オリゴマーのコア領域の外側の揺らいでいる部分の構造がモノマーの連続付加によるアミロイド伸長反応の足場になるためにアミロイドのコアとなること、そのオリゴマーのコアでない部分の構造多形が最終的にアミロイドの構造、およびプリオン株の表現型に大きな差異をもたらすことが示唆された。

E. 結 論

Sup35NM オリゴマーの生成をアミノ酸レベル、原子レベルで明らかにするための実験系を構築した。オリゴマーの構造多形がアミロイドやプリオン株の表現型を決定する要因になっている可能性を見出した。

[参考文献]

- 1) Ohhashi Y, Ito K, Toyama B, Weissman J, Tanaka M. Differences in prion strain conformations result from non-native interactions in a nucleus. *Nature Chem. Biol.* 6 : 225-230, 2010

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(2010/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

- 1) 田中元雅, 大橋祐美子. 酵母プリオン Sup35 のオリゴマー構造はプリオン株の表現型を決定する. 第48回生物物理学会年会, 仙台, 2010.9.21

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

プリオン立体構造変換初期過程の解析

研究分担者：桑田 一夫 岐阜大学人獣感染防御研究センター
研究協力者：鎌足 雄司 岐阜大学人獣感染防御研究センター
研究協力者：山本 典史 岐阜大学人獣感染防御研究センター
研究協力者：木村 力 岐阜大学人獣感染防御研究センター
研究協力者：武藤 淳二 岐阜大学人獣感染防御研究センター
研究協力者：山口 圭一 岐阜大学人獣感染防御研究センター
研究協力者：石川 岳志 岐阜大学人獣感染防御研究センター
研究協力者：石倉 孝一 岐阜大学人獣感染防御研究センター

研究要旨

プリオン立体構造変換の初期過程を、NMR を初めとする様々の実験及び計算機シミュレーションを用いて解明し、それに基づく治療薬の設計・開発を行った。TVTTTTKG(アミノ酸番号 189-195) 周辺(特に TTTT の連続配列)は哺乳類では存在するが、ニワトリなどの鳥類や、カメ、カエルなどの両生類では存在しない。分子動力学シミュレーションにより、同部位は尿素でも特に変性しやすいことが分かった。また、量子力学計算によれば、同部位には、van der Waals 相互作用が少ないことが不安定性の原因であることが明らかとなった。抗プリオンリード化合物、GN8 は同部位に特異的に結合することにより、異常型への変換を抑制する。これら実験及び計算結果を総合すれば、B-ヘリックス C 端の TTTT 配列は、プリオン立体構造変換初期過程に関わっている可能性が極めて高い、と考えられる。

A. 研究目的

プリオンタンパク質が細胞型 (PrP^C) からスクレイピー型 (PrP^{Sc}) に構造変換する過程を理解することは、プリオン病の発症機構の解明、及びプリオン病治療薬開発にとって、極めて重要である。プリオンの正常構造の崩壊を抑制するため、プリオン立体構造変換の初期過程を、計算機シミュレーションを用いて解明する。

B. 研究方法

分子動力学法、及びフラグメント分子軌道法により、プリオン分子の安定性を明らかにするとともに、構造変換初期過程を解明する。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

抗プリオン物質である GN8 の結合状態の詳細を解明するため、量子化学計算プログラムを開発しプリオンに適用した。その結果、プリオン天然構造の安定性は主に van der Waals 力、すなわち疎水相互作用に大きく依存することが分かった(図参照、文献 7)。

また GN8 及びその類縁体と PrP との相互作用も疎水結合による寄与が大きい。さらに疎水相互作用による結合自由エネルギーを強める方向で化学構造の最適化を行った結果、

より抗プリオン作用の大きい化合物を得ることができた。逆に親水性残基による修飾は、抗プリオン作用を弱めた。このことはGN8の抗プリオン作用が他の抗プリオン物質(ポリフェノールなどの親水性化合物)とは大きく異なり、部位特異的に作用することを示している。

D. 考察

これまでの実験結果、及び計算結果を総合すれば、B-ヘリックスC端のTTTT配列は、プリオン立体構造変換初期過程に関わっている可能性が極めて高い、と考えられる。

E. 結論

B-ヘリックスC端からB-Cループにかけての部位が局所的に破壊された構造は、細胞型からスクレイピー型への遷移状態(PrP*)である可能性が高い。これらの知見は、抗プリオン物質の一般的な設計原理、及びその最適化の方向を示している、と考えられる。

[参考文献]

- 1) 桑田一夫. 論理的創薬法による抗プリオン物質の設計と開発 (Rational design and development of anti-prion compounds). 月刊「化学工業」4月号 61(4) : 46-50
- 2) 桑田一夫. 正常および異常プリオン蛋白の構造 プリオン病と遅発性ウイルス感染症. 編集:厚生労働科学研究費保持金難治性疾患克服研究事業 「プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班」 29-36, 2010.7.28

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表(2010/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Ishikawa T, Kuwata K. Interaction Analysis of the Native Structure of Prion Protein with Quantum Chemical Calculations. *J. Chem. Theory Comput* 6 : 538-547, 2010
- 2) Endo S, Matsunaga T, Kuwata K, Zhao Hai-Tao, El-Kabbani O, Kitade Y, Hara A. Chromene-3-carboxamide derivatives discovered from virtual screening as potent inhibitors of the tumour maker, AKR1B10. *Bioorg. Med. Chem* 18 : 2485-2490, 2010
- 3) Ishikawa T, Kuwata K. Accerelation of monomer self-consistent charge process in fragment molecular orbital method. *Chem-Bio Inform. J.* 10 : 24-31, 2010
- 4) Yamamoto N, Kuwata K. Redox behaviors of the neurotoxic portion in human prion protein, HuPrP(106-126), *Chemical Physics Letters* 498(2010) 184-187, doi : 10.1016/j.cplett, 2010.08.041
- 5) Ishikawa T, Yamamoto N, Kuwata K : Partial energy gradient based on the fragment molecular orbital menthod : application to geometry optimization. *Chemical Physics Letters* 500 : 149-154, 2010

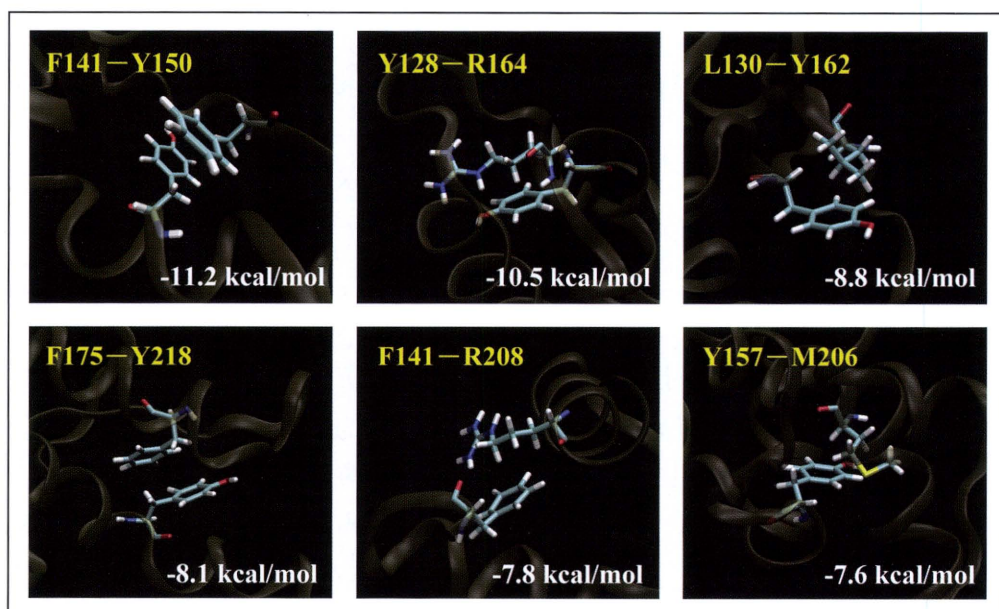
2. 学会発表

- 1) 桑田一夫. Asia-Oceania Symposium on Prion Diseases (AOSPD 2010) Chairmen, 北海道大学, 2010.7.24-25
- 2) 桑田一夫. 素数と生物その2「21世紀の新パラダイム」(オーガナイザー)数論, ダイナミクス, プリオン 生物物理第48回年会講演 予稿集(S17. S158), 東北大学, 川内北キャンパス, 2010.9.20-22

- 3) 石川岳志. Fragment molecular orbital method and number theory 生物物理第 48 回年会講演 予稿集 (S17), 東北大学, 川内北キャンパス, 2010.9.20-22
- 4) 鎌足雄司. プリオンタンパク質への結合様式による抗プリオン化合物の分類と作用機構の解明 生物物理第 48 回年会講演 予稿集 (S158), 東北大学, 川内北キャンパス, 2010.9.20-22

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
プリオンタンパク質構造変革抑制剤及びその利用 出願番号 PCT/JP2010/58129
出願日: 平成 22 年 5 月 13 日
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし



髄液 FABP 検査系の信頼性の再確認

研究分担者：松田 治男 広島大学大学院生物圏科学研究科
研究分担者：畠田 昌至 広島大学大学院生物圏科学研究科
研究協力者：佐藤 克也 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
研究協力者：西田 教行 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

研究要旨

本研究において作製した心臓型 FABP(H-FABP)特異的モノクローナル抗体(ニワトリ抗体およびマウス抗体)を活用して髄液中の H-FABP の検出のための ELISA 系を構築するとともに、その実用性についても実施した。マウスモノクローナル抗体(3E9)を固相化抗体、ニワトリモノクローナル抗体(HUFa10 あるいは HUFa26)を検出抗体にした組み合わせで、総計 120 例の髄液で全例の CJD を診断できた。

A. 研究目的

CJD の有用な髄液マーカーとしては、タウタンパク質、14-3-3 タンパク質などの他に H-FABP(1)の検出が注目されている。本研究では、ヒトプリオン病診断用の H-FABP 検出系を構築し、これを用いて計 150 例以上の髄液サンプルで H-FABP の検出を試みた。

B. 研究方法

1. FABP

用いる抗体の FABP 型特異性を調べるために、入手可能な L-FABP、H-FABP、A-FABP、E-FABP、B-FABP および M-FABP の 6 種のを FABP を使用した。

2. 抗体

マウスモノクローナル抗体 3E9 およびニワトリモノクローナル抗体 HRP 標識 HUFa26 によるサンドイッチ ELISA 系を構築した。

(倫理面への配慮)

ヒトプリオン病他の脳脊髄液を用いた H-FABP の検出は長崎大学で実施した。実

施に当たって、長崎大学倫理委員会の規定に従った。

C. 研究結果

1. 固相化抗体 3E9 の交差反応性の再検討

固相化抗体である 3E9 マウスモノクローナル抗体は H-FABP と反応し脳型 FABP(B-FABP)と反応しない抗体として選抜していたが、H-FABP と強く反応するものの、A-FABP および M-FABP と弱く交差する抗体であることが判明した。

2. 多数髄液検体を用いた検査系の再評価

組換えニワトリモノクローナル抗体 HUFa10 の生産系が少し劣ることから、多数ある抗 H-FABP ニワトリモノクローナル抗体の中から比較的反応性の優れた HUFa26 を選び、3E9-HUFa26 系を用いて 120 例の髄液検査を実施した。

3E9-HUFa26 系を用いた髄液検査の結果を図 1 にまとめた。120 例のうち、54 例は classical CJD で、有意に高値を示した。また possible CJD 25 例もまた、non-CJD 41 例と比較し有意であった。