

D. 考察

本報告書に記載した結果および sucrose 遠心、CsCl 密度勾配遠心法から得られた結果から JC ウイルス粒子形成過程において後期タンパク質である agnoprotein は粒子形成の効率を促進させることが明らかとなった。

E. 結論

同族のポリオーマウイルスである SV40 と同様に⁴⁾、JC ウイルスにおいても後期タンパク質である agnoprotein がウイルス粒子形成に寄与することが示唆された。

[参考文献]

- 1) Hunt D, Giovannoni G. Natalizumab-associated progressive multifocal leucoencephalopathy: a practical approach to risk profiling and monitoring. *Pract Neurol* 12:25-35, 2012.
- 2) Hellwig K, Gold R. Progressive multifocal leucoencephalopathy and natalizumab. *J Neurol* 258:1920-1928, 2011.
- 3) Nukuzuma S, Yogo Y, Guo J, Nukuzuma C, Itoh S, Shinohara T, Nagashima K. Establishment and characterization of a carrier cell culture producing high titres of polyoma JC virus. *J Med Virol* 47:370-377, 1995.
- 4) Ng SC, Mertz JE, Sanden-Will S, Bina M. Simian virus 40 maturation in cells harboring mutants deleted in the agnogene. *J Biol Chem* 260:1127-1132, 1985.

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 水澤英洋, 岸田修二, 西條政幸, 雪竹基弘,

宍戸-原由紀子, 澤 洋文, 長嶋和郎, 奴久妻聡一, 山田正仁. <シンポジウム 20—4> 難治性神経感染症 update 進行性多巣性白質脳症. *臨床神経学* 51:1051-1057, 2011.

2. 学会発表

- 1) Kobayashi S, Suzuki T, Igarashi M, Ohtake N, Nakagawa K, Niikura K, Kimura T, Kasamatsu H, Sawa H. Cys80 of JC virus capsid protein, VP1 is essential for pentamer formation. The Unlimited World of Microbes, XV International Congress of Virology, Sapporo, September 11-16, 2011.
- 2) 高橋健太, 王 磊, 高阪真路, 木村太一, 白井沙矢, 工藤伸一, 奴久妻聡一, 谷野美智枝, 西原広史, 澤 洋文, 長嶋和郎, 田中伸哉. JC ウイルスとメチル化遺伝子結合蛋白 MeCP2 との関連に関する検討, 52 回日本神経病理学会総会, 京都, 6.2-4, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

- 1) 発明の名称: JC ウイルス agno を対象とした PML の治療
現権利者-出願人: 独立行政法人科学技術振興機構
発明者: 長嶋和郎、澤 洋文、岡田由紀
出願番号(出願日): 特願 2001-356836 (2001/11/22)
公開番号(公開日): 特開 2003-160510 (2003/ 6/ 3)
特許番号(登録日): 特許 4840792 号 (2011/10/14)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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 分担研究報告書

メチル化遺伝子結合蛋白 MeCP2 の JC ウイルス関連蛋白による転写制御の解析

研究分担者：長嶋和郎 北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野
札幌東徳州会病院・病理部

研究協力者：高橋健太 北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野

研究協力者：王 磊 北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野

研究協力者：木村太一 北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野

研究協力者：工藤伸一 北海道立研究所・疫学部ウイルス科

研究分担者：奴久妻聡一 神戸市環境保健研究所微生物部

研究分担者：澤 洋文 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 分子病態・診断部門

研究協力者：田中伸哉 北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野

研究要旨 進行性多巣性白質脳症(progressive multifocal leukoencephalopathy: PML)の原因ウイルスである JC ウイルス(JCV)は、持続感染している JCV の調節領域に再編成が生じ、脳への感染性が成立すると考えられている。一方 methyl CpG binding protein 2 (MeCP2)は DNA メチル化遺伝子プロモーター領域の転写を制御する分子で、神経細胞の機能や個体の発生に必須である。近年 MeCP2 遺伝子異常が、子供の発達異常や異常行動を呈する疾患として知られる Rett 症候群の原因であることが報告された。PML 脳では JCV 感染細胞に高頻度で MeCP2 が過剰発現していることが判明し、MeCP2 による JCV 関連蛋白の転写制御解析を行ったところ、JCT 抗原存在下では MeCP2 により JC early および late 蛋白いずれもプロモーター活性の亢進が認められた。そこで本年度の研究では JCV 関連蛋白による MeCP2 の転写制御について解析を行った。その結果、MeCP2 のプロモーターは JCT 抗原の発現により活性が亢進することが判明した。この所見から MeCP2 と JCT 抗原の発現は相互に関与していることが明らかとなり、MeCP2 と JCT 抗原の発現には positive feedback loop 状の転写制御機構が存在する可能性が考えられ、MeCP2 が JCV の感染と増殖に重要な働きを示すことが示唆された。

A. 研究目的

CV は PML の原因ウイルスであるが、ヒト脳への親和性や脳での増殖機構に未だ不明な点が多い。我々は、JCV 感染細胞ではメチル化関連遺伝子 MeCP2 が高発現していることを示し、JCT 抗原存在下では MeCP2 により JC early および late 蛋白のプロモーター活性が亢進することを明らかにした。今回、この発現機序を解明するため JCV 関連蛋白による MeCP2 のプロモーター活性を検討した。

B. 研究方法

JCV 関連蛋白による MeCP2 の転写制御解析：ヒト胎児腎細胞株 293T の full genome より MeCP2 の full、core、short プロモーター領域(各々 MeCP2 より上流 1071、309、179 塩基上流から MeCP2 開始 9 塩基)をクローニングし、luciferase を指標とした MeCP2 各プロモーター領域の遺伝子発現ベクター pGL3-MeCP2-full/core/short-promoter を作製した。

ヒト神経芽細胞腫細胞株 IMR-32 に JCV 初期蛋白である JCT 抗原の発現ベクター pCXN2-Flag-JCT と、作製した MeCP2 各プロモ-

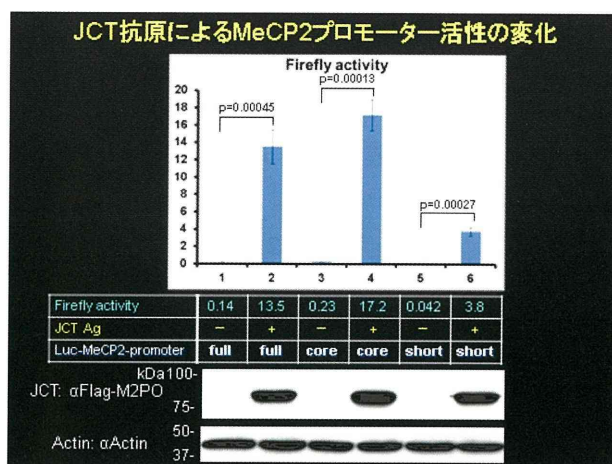
ター領域の遺伝子発現ベクター、pGL3-MeCP2-full/core/short-promoter をそれぞれ transfection させた。続いて luciferase reporter 法にて pGL3-MeCP2-full/core/short-promoter の luciferase 活性を測定した。

(倫理面への配慮)

本実験で使用している JCV は P2 対応のウイルスであり、本研究は北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野の P2 指定実験室にて安全性に留意して行われた。

C. 研究結果

IMR-32 細胞株において、JCT 抗原存在下では MeCP2 のプロモーター活性は、プロモーターの full、core、short 領域いずれも増強された。また MeCP2-short-promoter ベクターでは、core-promoter ベクターと比較し、JCT 抗原発現によるプロモーター活性上昇は軽度であった。



D. 考察

JCV 感染細胞においては MeCP2 が過剰発現し、JCT 抗原存在下では MeCP2 により JC early および late 蛋白のプロモーター活性が亢進するが、今回の実験では JCT 抗原による MeCP2 のプロモーター活性の亢進が認められた。MeCP2 と JCT 抗原の発現は相互に関与し、両者の発現の間には positive feedback loop 状の転写制御機構が存在する可能性が示唆され、MeCP2 が JCV の感染と増

殖に直接関与する可能性が考えられた。また MeCP2-short-promoter 活性は core-promoter 活性と比較し JCT 抗原発現によるプロモーター活性上昇が軽度であったことから、JCT 抗原発現による MeCP2 の転写活性には MeCP2 code 領域より 309-179 塩基上流の配列が最も重要と考えられた。今後は MeCP2 プロモーター領域での JCT 抗原の影響を受ける core 領域の確定や、MeCP2 プロモーター領域と JCT 抗原の結合の有無などにつき、検討を進める予定である。

E. 結論

JCV 感染と MeCP2 の関連に関して promoter assay を行ったところ、JCT 抗原は MeCP2 プロモーターを活性化し、JCT 抗原と MeCP2 の発現には相互作用を認めることが判明した。この結果、MeCP2 は JCV の感染と増殖に重要な働きを示していることが示唆された。

[参考文献]

- 1) Shirai S, Takahashi K, Kohsaka S, Tsukamoto T, Isogai H, Kudo S, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S. High expression of MeCP2 in JC virus-infected cells of progressive multifocal leukoencephalopathy brains. *Neuropathology* 31:38-41, 2011.
- 2) Sunden Y, Suzuki T, Orba Y, Umemura T, Asamoto M, Nagashima K, Tanaka S, Sawa H. Characterization and application of polyclonal antibodies that specifically recognize JC virus large T antigen. *Acta Neuropathol* 111: 379-387, 2006.
- 3) Kudo S. Methyl-CpG-binding protein MeCP2 represses Sp1-activated transcription of the human leukosialin gene when the promoter is methylated. *Mol Cell Biol* 18:5492-5499, 1998.
- 4) Liu J, Francke U. Identification of cis-regulatory elements for MeCP2 expression. *Hum Mol Genet* 15:1769-1782, 2006.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 高橋健太, 王 磊, 高阪真路, 木村太一, 白井紗矢, 工藤伸一, 奴久妻聡一, 谷野美智枝, 西原広史, 澤 洋文, 長嶋和郎, 田中伸哉. JC ウイルスとメチル化遺伝子結合蛋白 MeCP2 との相関に関する検討. 第 52 回日本神経病理学会総会学術研究会, 京都, 6.4, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

1) 発明の名称: JC ウイルス agno を対象とした PML の治療

現権利者-出願人: 独立行政法人科学技術振興機構

発明者: 長嶋和郎、澤 洋文、岡田由紀

出願番号(出願日): 特願 2001-356836 (2001/11/22)

公開番号(公開日): 特開 2003-160510 (2003/ 6/ 3)

特許番号(登録日): 特許 4840792 号 (2011/10/14)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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 分担研究報告書

HIV-1 Tat タンパクによるヒト神経芽細胞腫での JCV 複製促進について

研究分担者：奴久妻聡一 神戸市環境保健研究所 微生物部
 研究協力者：亀岡正典 大阪大学微生物病研究所 日本・タイ感染症共同研究センター
 研究協力者：杉浦重樹 奈良県立医科大学 組換えDNA実験施設
 研究協力者：奴久妻智代子 神戸市環境保健研究所 微生物部
 研究協力者：三好勇夫 元高知大学医学部 内科
 研究協力者：竹上 勉 金沢医科大学総合医学研究所 分子腫瘍学研究部門

研究要旨 エイズ患者で進行性多巣性白質脳症（PML）が増加しているのは、HIV-1 Tat タンパクが JC ウイルス（JCV）の後期プロモーターの転写を促進するためである。我々は過去に Tat タンパクを恒常的に発現させた COS-tat 細胞を用いて、Tat タンパクが JCV の増殖を促進することを明らかにした。しかし、JCV は神経系細胞で増殖するウイルスであることから、本研究では JCV が増殖可能なヒト神経芽細胞腫である IMR-32 細胞を用いて、組換え Tat タンパクが JCV の複製を促進することを明らかにした。さらに、JCV 複製促進機構を解明するために、Tat タンパク添加による Purine-Rich Element Binding Protein α (Pur α) の発現と細胞増殖への影響を調べたところ、Pur α の発現、細胞増殖ともに低下していた。これらのことから、JCV の増殖は Tat、Pur α および JCV T 抗原の複雑な相互作用で促進されていることが示唆された。

A. 研究目的

ヒトの中樞神経の脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症（PML）は免疫不全等の基礎疾患の上に発症するが、亜急性に症状が進行し1年以内に死に至る致死的な疾患で有効な治療薬がない。近年、エイズ流行に伴い PML 患者数は増加しているが、その原因のひとつとして HIV-1 の調節タンパクである Tat がグリア細胞で JC ウイルス（JCV）の後期プロモーターを活性化することが報告されている。一方、我々は過去の報告において、腎臓で持続感染している非病原性の Archetype JCV と脳で脱髄を引き起こす病原性の PML 型 JCV の増殖が HIV-1 Tat タンパクで促進されることを恒常的に Tat タンパクを発現させた COS-tat 細胞を用いて明らかにした。しかし、用いた COS-tat 細胞がサル腎臓由来の細胞で、しかも SV40 T 抗原を発現している COS-7 細胞が親細胞であることから、神経系細胞で増殖する JCV の生体内での病態を反映していないという問題点があった。そこ

で、本研究では、JCV が増殖可能である IMR-32 細胞と JCV を持続産生する JCI 細胞を用いて、組換え Tat タンパクの JCV 複製促進について検討した。さらに、JCV 複製促進機構を解明するために、Tat タンパク添加による Pur α の発現と細胞増殖への影響を調べた。

B. 研究方法

1) 組換えTatタンパクのJCV増殖促進の解析

IMR-32細胞にM1-IMRb DNA（IMR-32細胞で最も良く増殖するJCV）を1 μ gトランスフェクトし、組換えTatタンパク（HIV-1 TAT Clade-B）を10⁻⁸Mの濃度で添加した群（Tat添加群）と添加しない群（コントロール群）から48、72時間後に低分子DNAを抽出し、Dpn I消化により複製したDNAのみをDNA replication assayにより検出し、複製DNAのバンドをNIH Image Jを用いて数値化した。さらに、JCV持続産生細胞であるJCI細胞にTatタンパクを10⁻⁸Mの濃度で長期間添加培養し、経日的に

ウイルス量を赤血球凝集反応で測定した。

2) 組換えTatタンパク添加によるPuraの発現と細胞増殖への影響

Tatタンパクと宿主細胞因子であるPurine-Rich Element Binding Protein α (Pura) は複合体を形成してJCVの複製を促進することが過去に報告されている。JCV複製促進機構を解明するために、 10^{-8} Mの濃度のTatタンパクをIMR-32細胞に添加し、3日後のPuraの発現をPura-probe (TaqMan probe)、Pura-F,R (primers) を用いたreal-time RT-PCRで定量した。

Tat タンパクは宿主細胞の遺伝子発現に影響を及ぼすことから、 10^{-8} Mの濃度のTatタンパクをIMR-32細胞に添加し、3日後のIMR-32細胞の増殖をCell Proliferation Kit I (MTT法) で無添加群と比較した。

3) 統計学的解析

データの統計学的解析はStudent's t-testで行った。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床検体や実験動物を使用していないことから倫理面の問題がないと判断した。また、本実験で使用しているJCVはP2対応のウイルスであり、本研究は神戸市環境保健研究所のP2指定実験室にて安全性に留意して行われた。

C. 研究結果

1) 組換えTatタンパクのJCV増殖促進

DNA replication assayによりTat添加48時間後ではTat添加群でコントロール群よりわずかながらJCVのDNA複製の促進がみられた。一方、72時間後ではDNA複製量はコントロール群よりも約3.5倍多く、TatタンパクのJCV DNA複製促進は顕著であった。また、JCI細胞を用いたTatタンパク添加長期間培養では19日後からTat添加群でJCVの増殖促進がみられ、22日後にはコントロール群に比して有意な増殖促進を示した (図1)。

2) 組換えTatタンパクの宿主細胞に及ぼす影響 Tatタンパク添加によるIMR-32細胞のPuraはTat

添加群でコントロール群に比べて、60.6%の発現低下がみられた。同濃度のTatタンパクをIMR-32細胞に添加し、MTT法で細胞増殖への影響を調べたところ、有意に細胞の増殖が低下していた ($p < 0.05$)。

D. 考察

近年、先進国でエイズが増えているのは日本だけで、それに伴ってPMLも増加している。免疫不全等の基礎疾患の上に発症するが、亜急性に症状が進行し1年以内に死に至る致死的な疾患で有効な治療薬がない。しかし、エイズ感染に関連して発症したPMLについてはHAART療法が有効であることが臨床的に明らかになっている。その理由としては、TatタンパクがJCVの増殖を促進しているため、HAART療法でHIV-1の増殖が抑制され、Tatタンパクの供給が絶たれるとJCVが増殖できなくなるからだと推測される。

我々は過去の報告において、非病原性のArchetype JCVと病原性のPML型 JCVの増殖がTatタンパクで促進されることを恒常的にTatタンパクを発現させたCOS-tat細胞を用いて明らかにした。しかし、用いたCOS-tat細胞がサル腎臓由来の細胞で、しかもSV40 T抗原を発現しているCOS-7細胞が親細胞であることから、神経系細胞で増殖するJCVの生体内での病態を反映していないという問題点があった。

そこで、本研究ではJCVが増殖可能なヒト神経芽細胞腫であるIMR-32細胞とJCVを持続産生するJCI細胞を用いて、Tatタンパクの短期添加によるDNA replication assayとJCI細胞の長期間添加実験を行ったが、TaタンパクによりJCVの複製および増殖が促進されたことは明らかである。PuraはTatと結合して後期プロモーターの転写を促進するという報告とJCVのT抗原と競合してoriginの共通配列に結合するために逆に複製を抑制するという報告がある。本研究でTatタンパクの添加によりIMR-32細胞内のPuraの発現が低下したことから後者の報告を支持する結果と思われる。また、Tatタンパクによる細胞増殖の低下はJCVのDNA複製に有利に働いている可能性があり、JCVの増殖はTat、PuraおよびJCV T抗原の複雑な相互

作用で促進されていることが示唆された。

E. 結論

本研究ではTatタンパクの短期添加によるDNA replication assayとJCI細胞への長期間添加実験を行ったが、TatタンパクによりJCVの複製および増殖が促進されることは明らかである。さらに、IMR-32細胞にTatタンパクを添加することで細胞因子であるPur α の発現を定量したところ、Pur α の発現を抑制されており、同時に細胞増殖も低下していた。これらのことからJCVの増殖はTat、Pur α およびJCV T抗原の複雑な相互作用で促進されていることが示唆され、SV40 T抗原の関与のない培養系でTatタンパクによるJCVの直接的な促進効果を証明できた。

[参考文献]

- 1) Tada H, Rappaport J, Lashgari M, Amini S, Wong-Staal F, Khalili K. Trans-activation of the JC virus late promoter by the tat protein of type 1 human immunodeficiency virus in glial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3479-3483, 1990.
- 2) Chang CF, Gallia GL, Muralidharan V, Chen NN, Zoltick P, Johnson E, Khalili K. Evidence that replication of human neurotropic JC virus DNA in glial cells is regulated by sequence-specific single-stranded DNA-binding protein Pura. *J Virol* 70:4150-4156, 1996.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nukuzuma S, Kameoka M, Sugiura S, Nakamichi K, Nukuzuma C, Miyoshi I, Takegami T. Exogenous human immunodeficiency virus-1 protein, Tat, enhances replication of JC virus efficiently in neuroblastoma cell lines. *J Med Virol* 84:555-561, 2012.

2. 学会発表

- 1) 奴久妻聡一, 竹上 勉. HIV-1 Tat は JC ウイルスの増殖を促進する. 第 15 回日本神経ウイルス研究会, 金沢, 5.19, 2011.
- 2) 奴久妻聡一, 竹上 勉. 5HT_{2A} レセプター阻害剤は JC ウイルスの増殖を抑制する. 第 21 回抗ウイルス療法研究会, 金沢, 5.29, 2011.

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

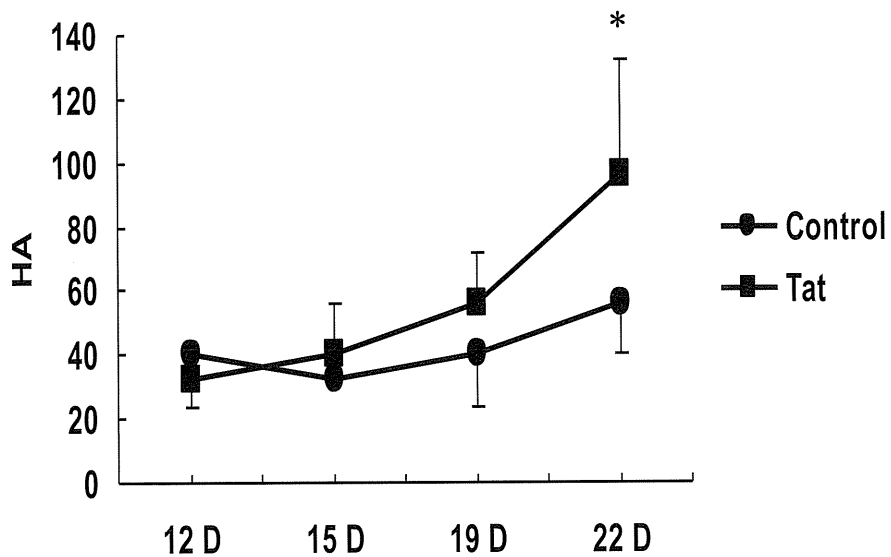
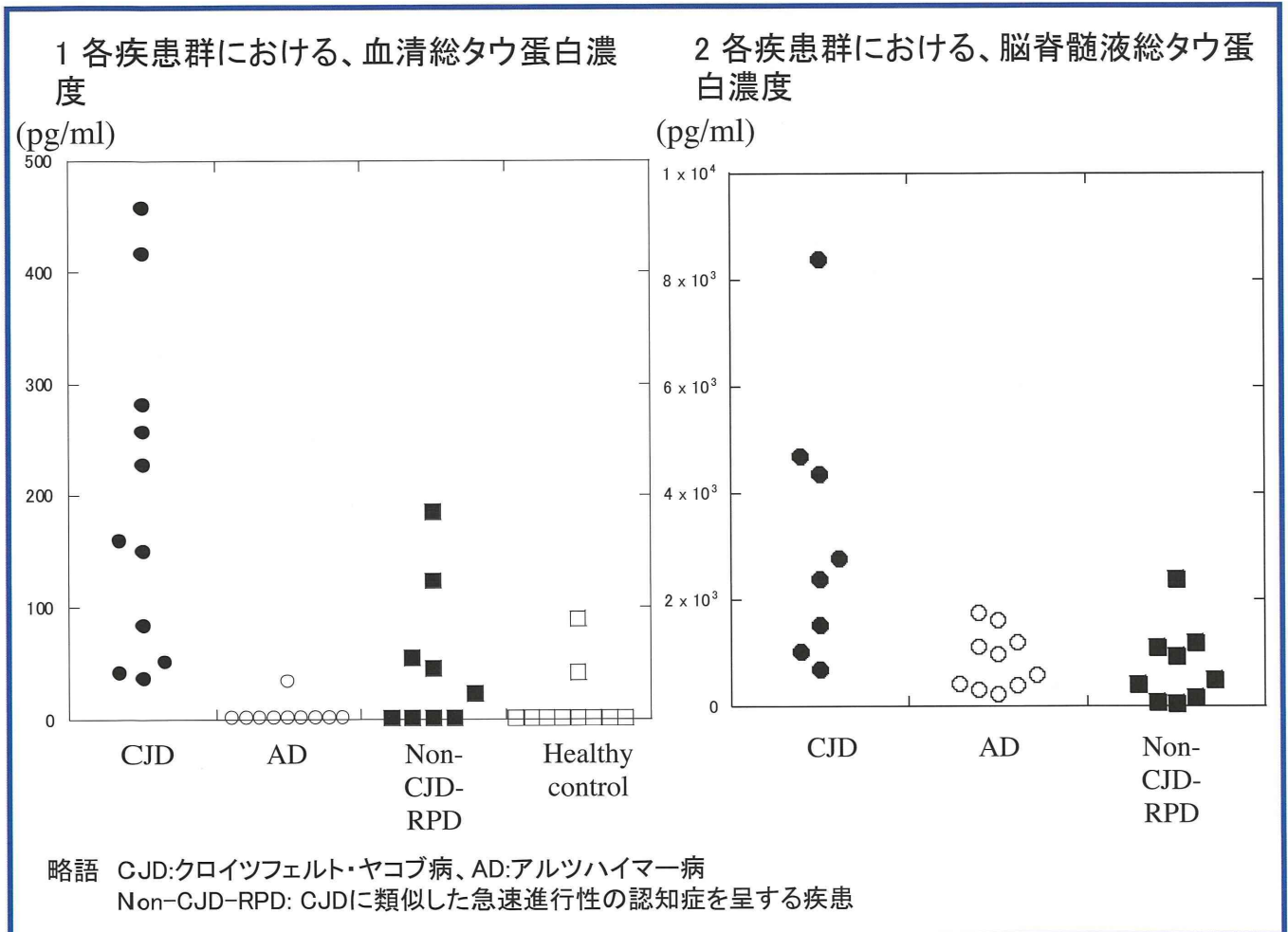


図 1 JCI細胞を用いたTatのJCV増殖促進
 JCI細胞にTatタンパクを 10^{-8} Mの濃度で培養
 したところ、22日後に有意差が見られた。 * P<0.05

[Ⅲ] 研究成果

血清タウ蛋白はクロイツフェルト・ヤコブ病の簡便な診断マーカーである

研究分担者：金沢大学大学院医学系研究科 脳老化・神経病態学(神経内科) 山田正仁



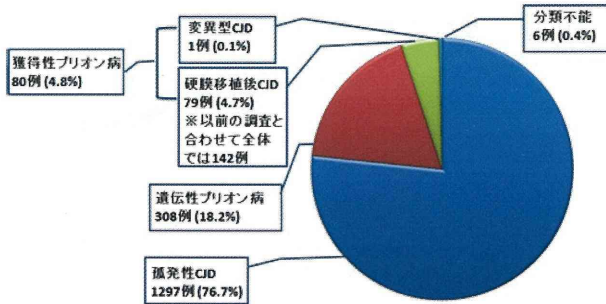
解説

1. クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)の血清および脳脊髄液中の総タウ蛋白濃度を測定し、アルツハイマー病(AD)およびCJDに類似した急速進行性の認知症(RPD)を呈する疾患(non-CJD-RPD)と比較検討を行った。
2. CJDの血清および脳脊髄液中の総タウ蛋白濃度はAD、non-CJD-RPDに比較して高値となり、血清総タウ蛋白はCJDとAD、non-CJD-RPDの鑑別に有用な非侵襲的かつ簡便なマーカーである可能性がある。

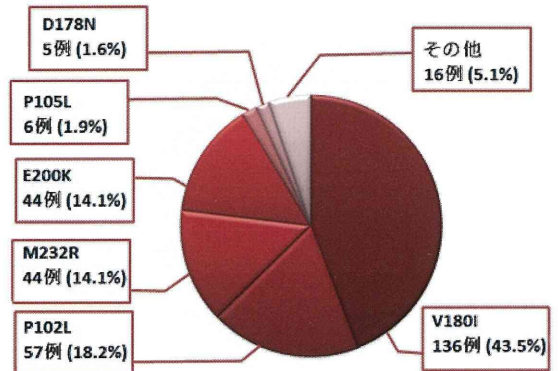
本邦におけるプリオン病のサーベイランス結果 (2011年9月まで)

研究分担者: 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科) 水澤英洋

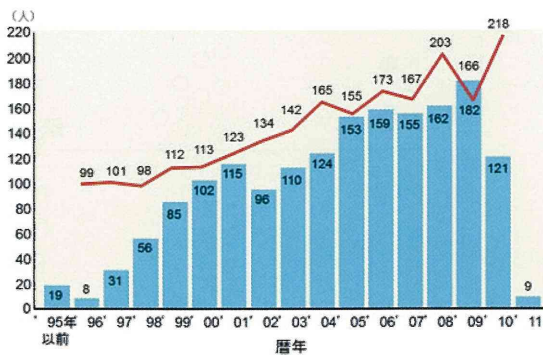
プリオン病患者1691例の内訳



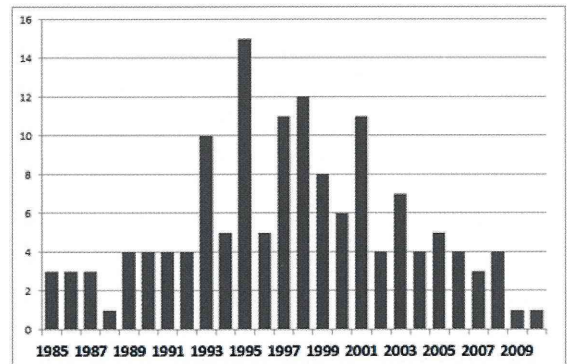
遺伝性プリオン病の遺伝子変異の種類と頻度



発病年別プリオン病患者数(死亡者数)



硬膜移植後CJDの発症年ごとの頻度



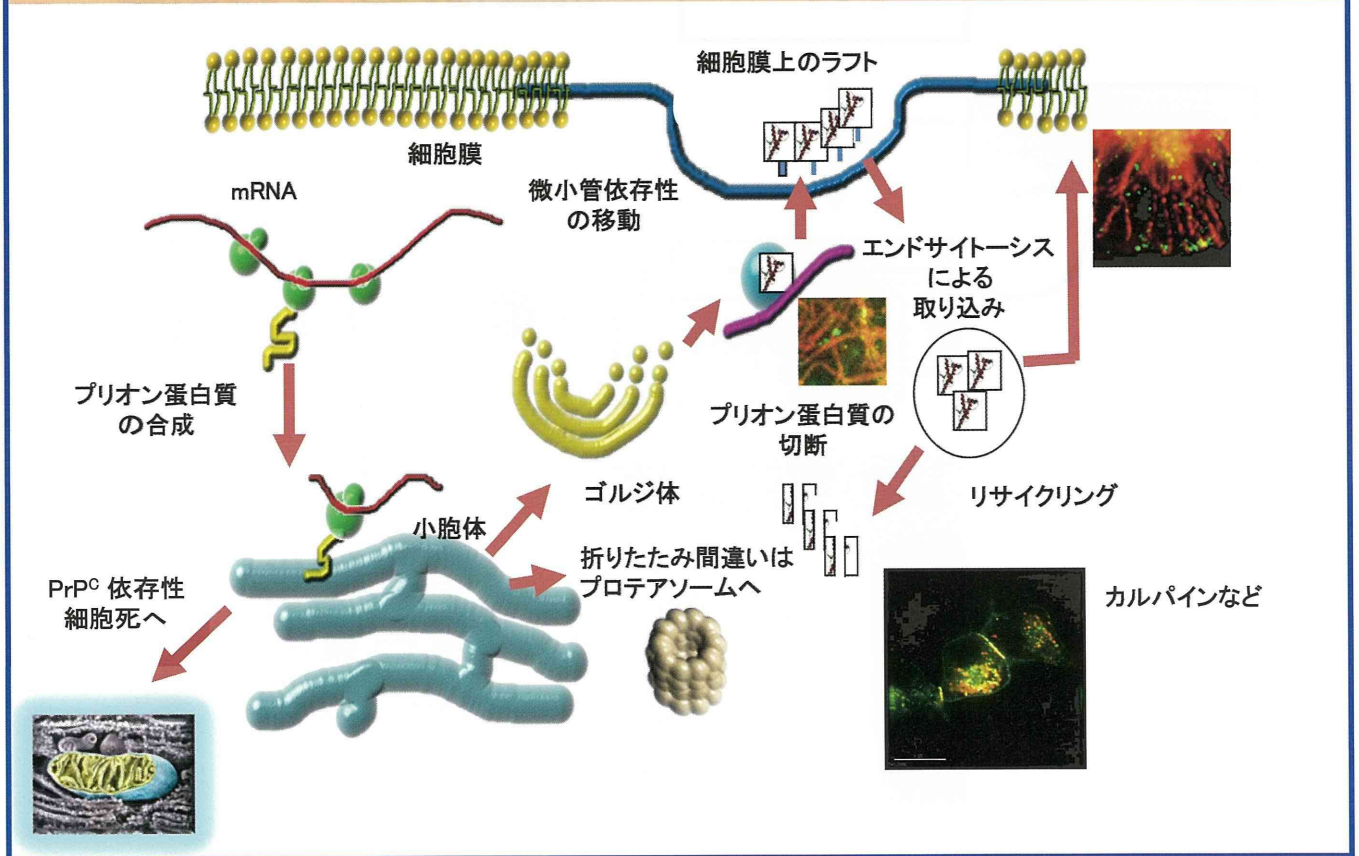
解説

1. サーベイランス委員会は1999年4月から2011年9月までに、1,691例のプリオン病を同定した。病型および変異遺伝子ごとの頻度を図示した。新たな変異型CJDの発症はなかった。硬膜移植例は昨年から1例増えて142例となった。
2. 病型別の割合は孤発性CJDが1,297例(76.7%)、遺伝性プリオン病が308例(18.2%)、硬膜移植後CJDが79例(4.7%)であった。遺伝性プリオン病の遺伝子変異ごとの頻度はV180Iが最多で43.5%、続いてP102Lが多く、M232RとE200Kが同数であった。死亡者数から推定したわが国のプリオン病の年間の発症者数は200前後と思われる、さらなるサーベイランスの充実が望まれる(2010-2011年は調査が未完了)。
3. 獲得性プリオン病の新規発症例は減少傾向にある。

正常型プリオン蛋白質の生理機能解明

研究分担者: 東京医科大学神経生理学 金子清俊

プリオンタンパク質の一生を全可視化することで、リアルタイムにその制御をおこない、異常化への道を閉ざすことを最終目標とする

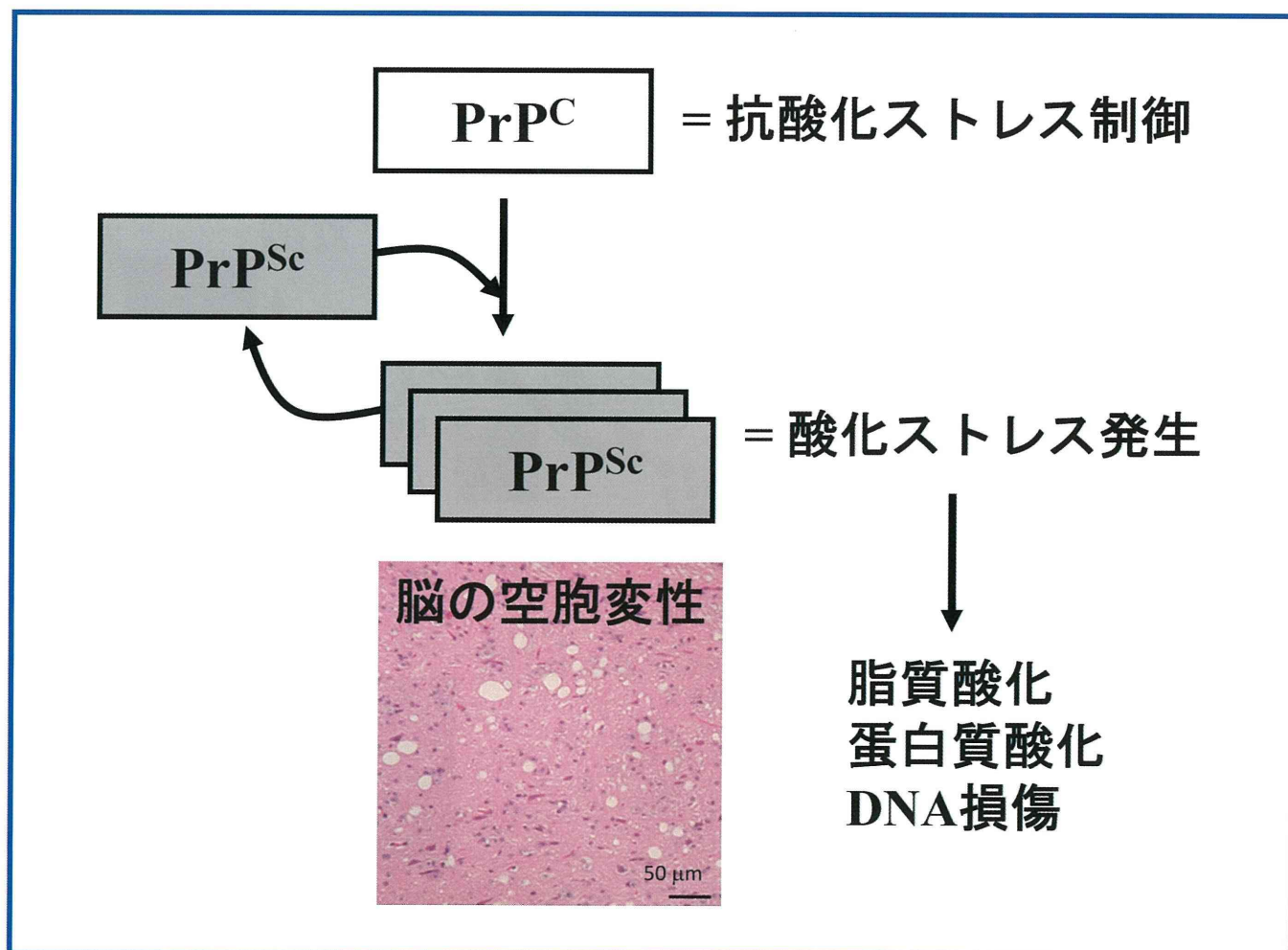


解説

1. 「プリオン蛋白質の一生」をライブセルイメージングで全可視化する。
2. これらの過程を把握することで、代謝過程が制御可能になる。
3. プリオン蛋白質の一生を制御し、プリオン化防止効果のある薬剤を得るための基盤をつくる。

プリオン病発症メカニズムの解析:酸化ストレスの関与

研究分担者:琉球大学医学部 作道章一

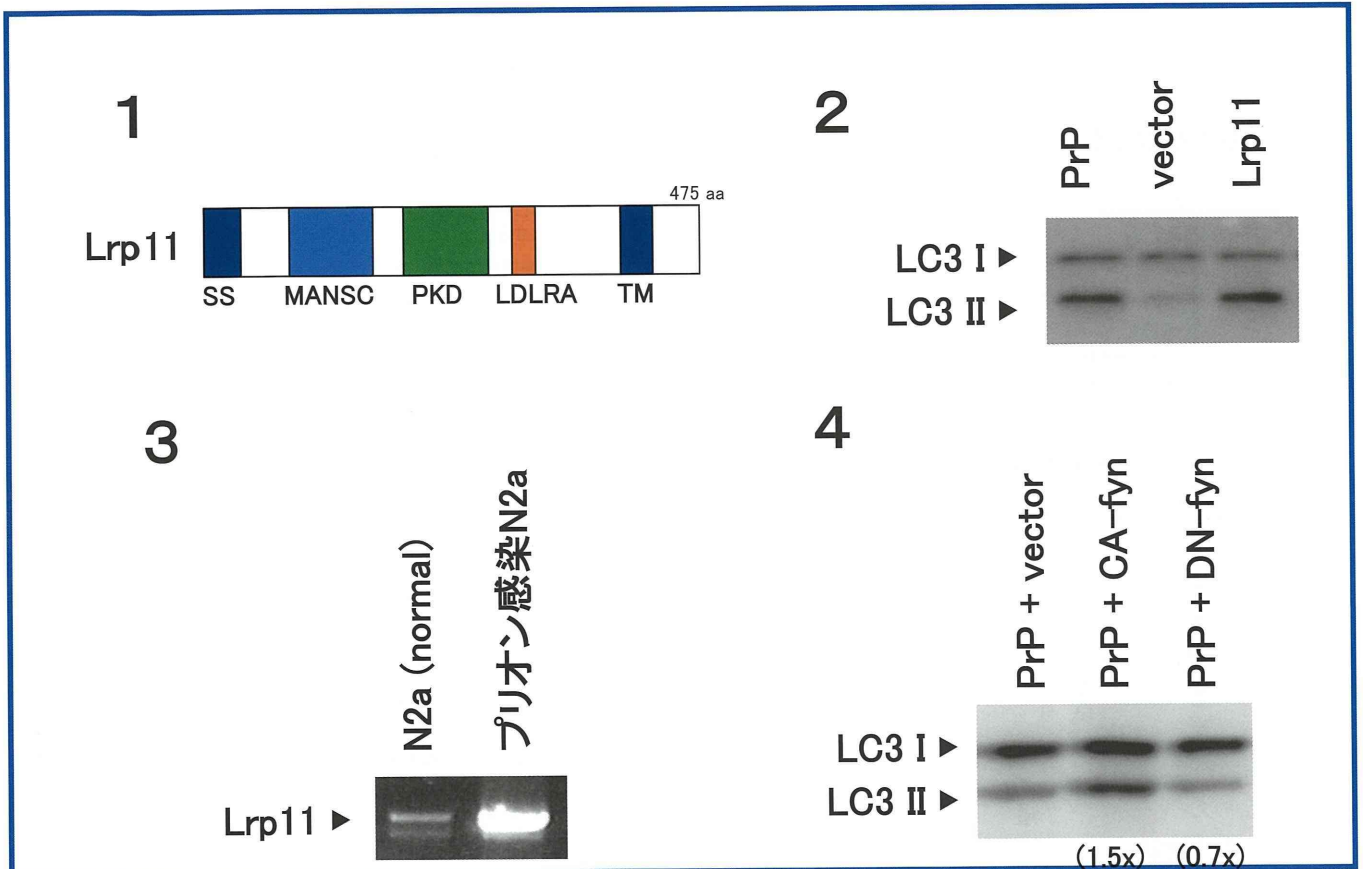


解説

1. 正常型プリオン蛋白質(PrP^C)は神経細胞やグリア細胞など広範な種類の細胞において、抗酸化ストレス制御に関与している。
2. プリオンに感染すると、早期に脂質酸化(ヘキサノイルリジン、4-ヒドロキシ-2-ノネナール)、糖酸化(メチルグリオキザール)、蛋白質酸化(ジチロシン、ニトロ化チロシン)、DNA損傷(8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン)が増加する。また、異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})も蓄積する。

プリオン感染によるオートファジー活性化のメカニズム

研究分担者: 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 坂口末廣



解説

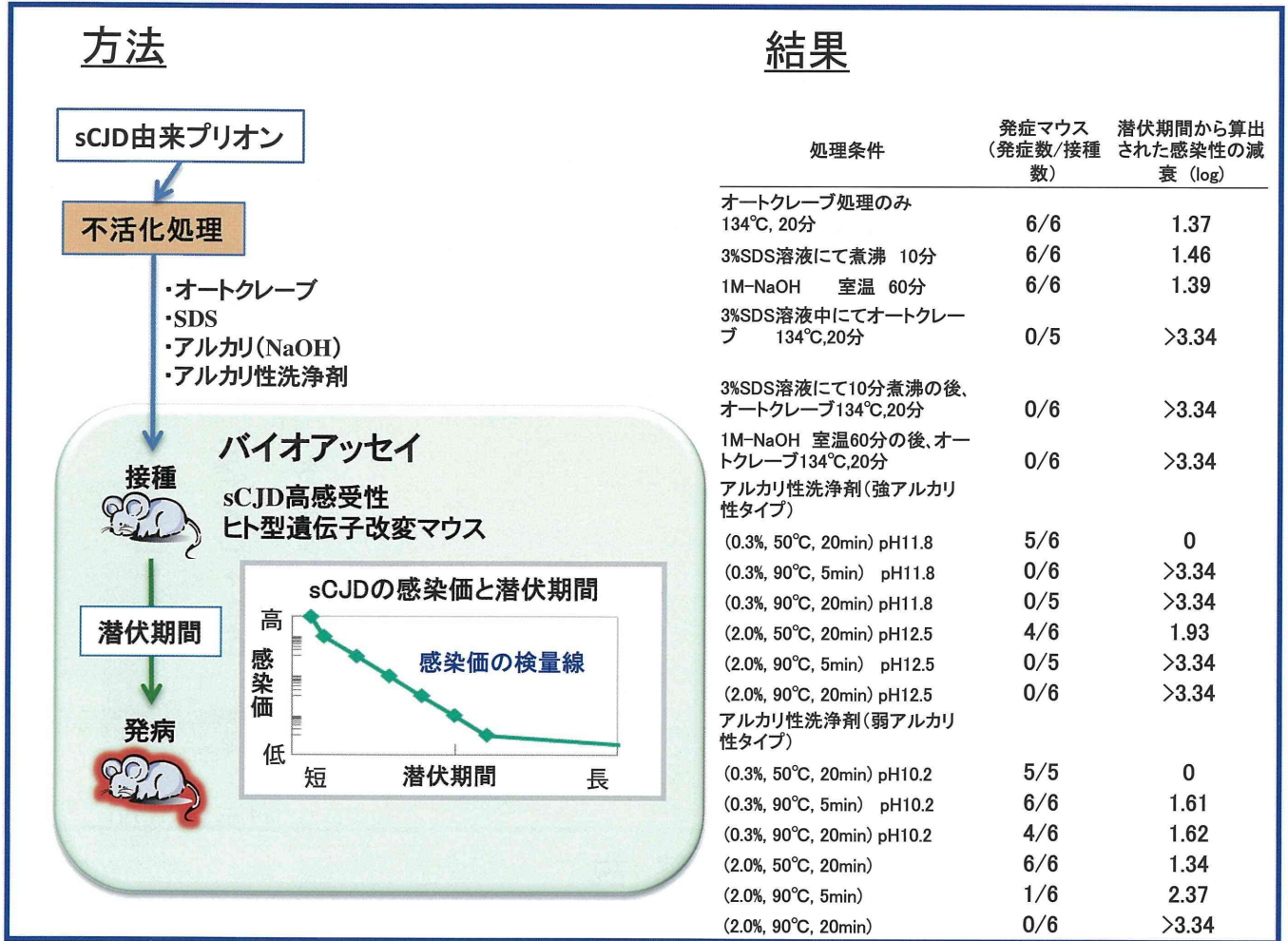
1. Yeast two-hybrid法を用いて、PrP結合分子としてLow density lipoprotein-related protein 11 (Lrp11)を同定した。SS, signal sequence; MANSC, motif at N terminus with seven cysteines; PKD, polycystic kidney disease domain; LDLRA, LDL receptor class A; TM, transmembrane domain.
2. HEK293T細胞にPrPをトランスフェクションすると、オートファジーの活性マーカーであるLC3 IIのシグナルが増強していた。Lrp11をトランスフェクションすると、同様なLC3 IIの活性化が認められた。
3. プリオン感染により、Lrp11の遺伝子発現が上昇した。
4. PrPにより活性化されたオートファジーは、ドミナントネガティブ型のFyn (DN-Fyn)により抑制された(~0.7倍)。逆に、活性型Fyn (CA-fyn)はオートファジーをさらに活性化した(~1.5倍)。

まとめ

PrPはLrp11と結合し、Fynの活性化を介して、オートファジーを活性化させる。プリオンが感染するとこの経路を活性化し、オートファジーを誘導する可能性が示唆された。

遺伝子改変マウスを用いた医療現場におけるプリオンの2次感染予防対策の評価

研究分担者: 動物衛生研究所プリオン病研究センター 毛利資郎



解 説

1. ヒト孤発性CJD(sCJD)由来プリオンをステンレスワイヤーに塗布し不活化処理を行い、ヒト型遺伝子改変マウスを用いて処理後のプリオン感染性を評価した。
2. 不活化処理は医療の現場で行われるオートクレーブ、SDS溶液で煮沸、アルカリ溶液、アルカリ性洗剤の単独およびそれらを組み合わせた処理を行った。
3. その結果、オートクレーブ、SDS煮沸処理、アルカリ溶液(室温)による処理をそれぞれ単独で行っても感染性を失わせることができなかった。しかしながら、それらの処理を組み合わせることにより、感染性を検出レベル以下まで不活化させることが明らかとなった。
4. アルカリ性洗剤も濃度、温度、時間の設定により、感染性を検出レベル以下に不活化できることが明らかとなった。

リコンビナントPrP^Cを用いたヒトプリオンの*in vitro*増幅

研究分担者: 東北大学大学院医学系研究科病態神経分野 竹内敦子

1. 材料と方法

Seed : 10% (w/v) sCJD, vCJD, dCJD脳ホモジネート
Substrate; HuPrP^C (129M または129V)過発現20% 293F細胞ライセート



FreeStyle™
293-F Cells (Invitrogen)
(ヒト胎児腎臓細胞)

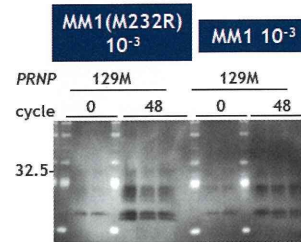
細胞を回収
PMCAバッファー中で
超音波ホモナイザーにて破砕

PMCA・PK処理

・交差超音波破砕器&反応装置使用
(エレコン株式会社)を用い、
37°Cで振とう培養
・全量 100 μ l で反応
・超音波条件:
(5sec.ON + 1sec.OFF) x
5 / 1 hr を1サイクルとし、48hrで1ラウンド
→PK処理 (50 μ g/ml, 37°C, 1hr)
→ウェスタンブロッティング法にて検出

2. sCJD-MM1プリオンの増幅効率

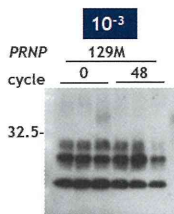
sCJD



sCJD-MM1プリオンは、基質の遺伝子型が129Mまたは129Vかに関わらず、PMCAによる増幅効率が非常に低かった

3. sCJD-MV2及びsCJD-VV2プリオンの増幅効率

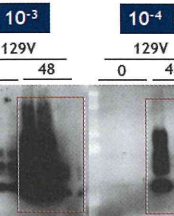
MV2



VV2

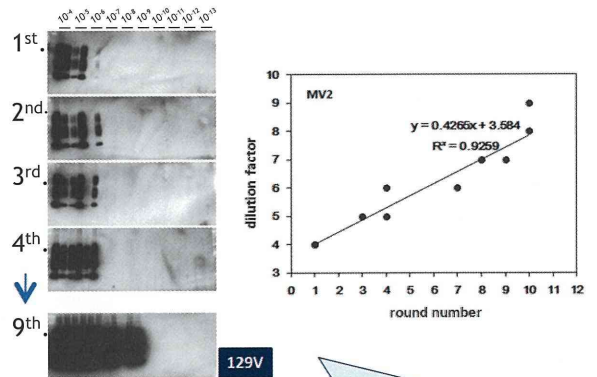


10⁻³



MV2プリオンまたはVV2プリオンは、基質の遺伝子型が129Vであるとき、PMCAによる増幅効率が非常に高い

4. MV2プリオンの高感度検出



MV2プリオンは129VのPrP^Cを基質として用いたときに、マルチラウンドPMCAにより高効率で増幅可能であった。今回の系では、10ラウンドで約10⁻⁸希釈の脳ホモジネートからPrP^{Pres}を検出可能であった

解 説

- sCJDの中でもMM1プリオンは基質の遺伝子型が129Mか129Vかに関わらず、PMCAによる増幅効率が非常に低く、今後の課題となった。
- MV2及びVV2プリオンは基質の遺伝子型が129Vの場合に非常に高効率に増幅されることが分かった。MV2プリオンに関しては、約10⁻⁸希釈した脳ホモジネートからもPrP^{Pres}が検出可能であり、高感度検出系へ応用が期待された。

異常プリオン蛋白質の性状解析に関する研究

研究分担者: 動物衛生研究所プリオン病研究センター 横山 隆

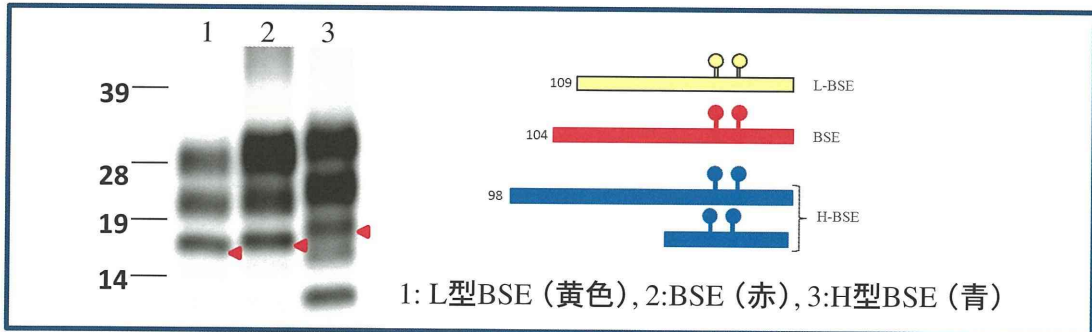


図1. プロテイナーゼKによるBSE由来PrP^{Sc}の分類

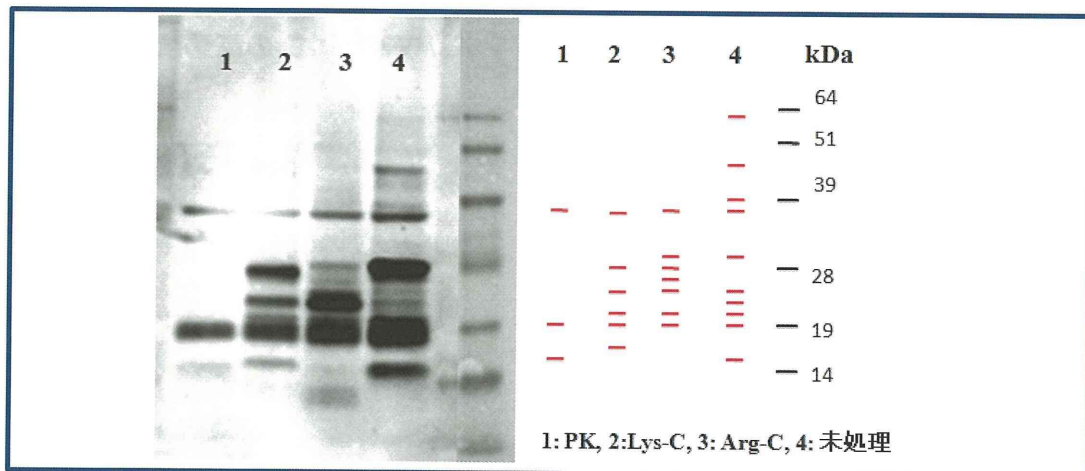


図2. エンドプロテイナーゼによるスクレイピー由来PrP^{Sc}の型別

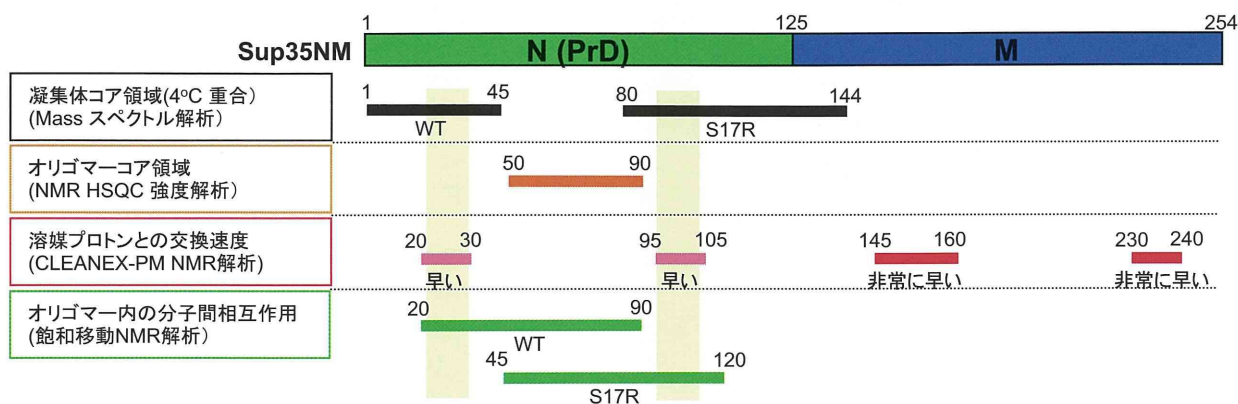
解 説

1. 異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})はプロテイナーゼK(PK)消化後の断片により区分される。図は牛海綿状脳症(BSE)および非定型BSE(L型、H型)のPrP^{Sc}バンド型別とそれぞれの概略を示す(図1)。
2. PK以外の酵素処理(エンドプロテイナーゼLys-C, Arg-C)した際のPrP^{Sc}の型別(図2)とプリオン株の関連を明らかにする。

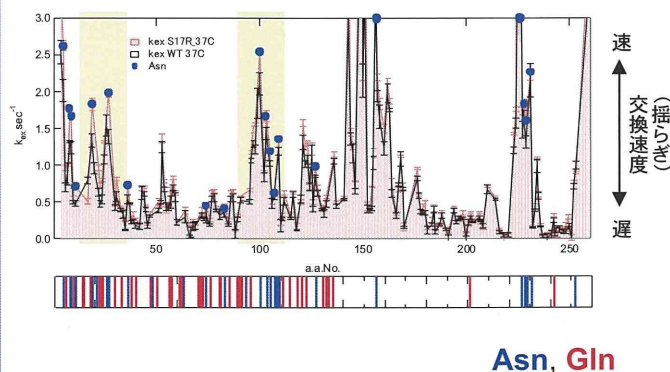
蛋白質の凝集体形成における揺らぎの役割を解明

研究分担者: 独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター 大橋祐美子

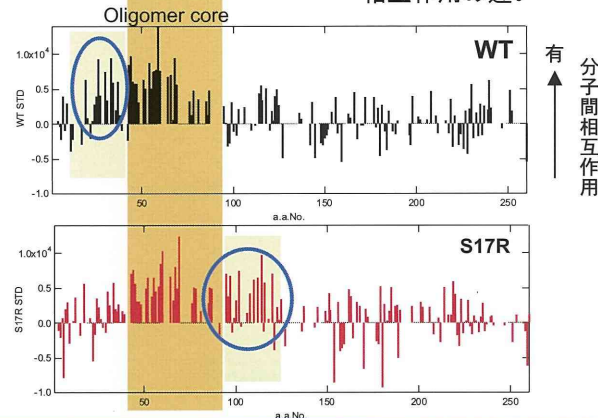
1. 明らかになったオリゴマー及び凝集のコア領域と、構造、揺らぎ情報のまとめ



2. モノマーのCLEANEX-PM(NMR)測定から分かった蛋白質アミドプロトンと溶媒プロトンの交換速度 k_{ex} (sec⁻¹)



3. 飽和移動NMRで見たオリゴマー内の分子間相互作用の違い



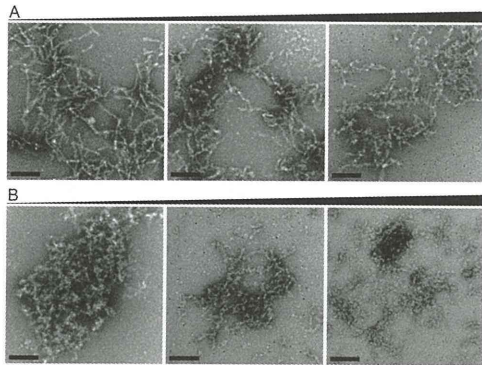
解説

- 1アミノ酸置換S17Rによって誘導されるSup35-NMの凝集体多形について、前駆体蛋白質モノマー及びオリゴマーの揺らぎに着目した研究を行った。
- 以前の研究から凝集体コア形成には、ある程度の揺らぎが必要であるとの結果を得ていたが、本年度の研究からは、揺らぎが大きすぎることもまた、凝集体コア形成の妨げとなることが示された。
- 中程度に速いアミドプロトンの交換速度を持つ領域が分子内に二箇所存在することがCLEANEX-PM測定から示され、そこはアスパラギン残基の集まる領域であった。
- 飽和移動NMRではオリゴマー内でオリゴマーコアの外側にも分子間相互作用があることがわかり、WT、S17Rでそれぞれ異なる領域に位置していた。
- 凝集体コア、中程度に速い交換速度を持つ領域、オリゴマー内の分子間相互作用の領域は完全に一致し、この領域が凝集の起点となっていることが示唆された。

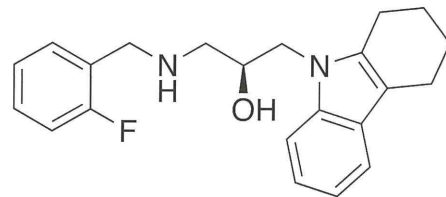
プリオン立体構造変換原理の解明とその制御

研究分担者: 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 桑田一夫

1. 構造変換メカニズムの解明

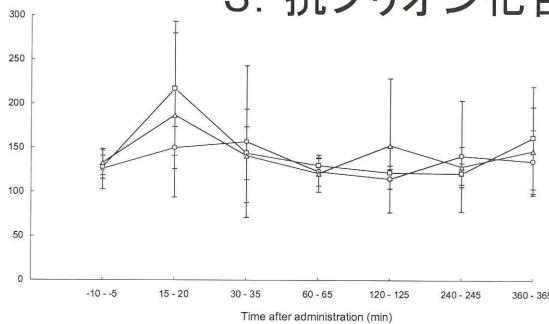


2. 抗プリオン化合物の最適化

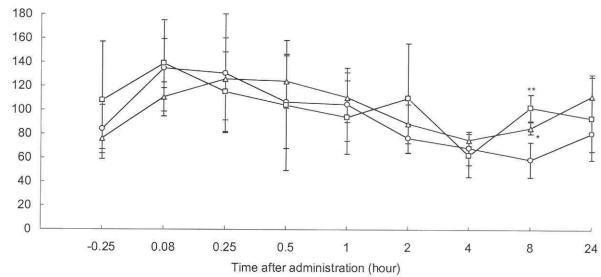


Anti-prion compound
 IC_{50} : 1.11 μ M
(GT+FK cells)

3. 抗プリオン化合物の安全性薬理試験



呼吸数



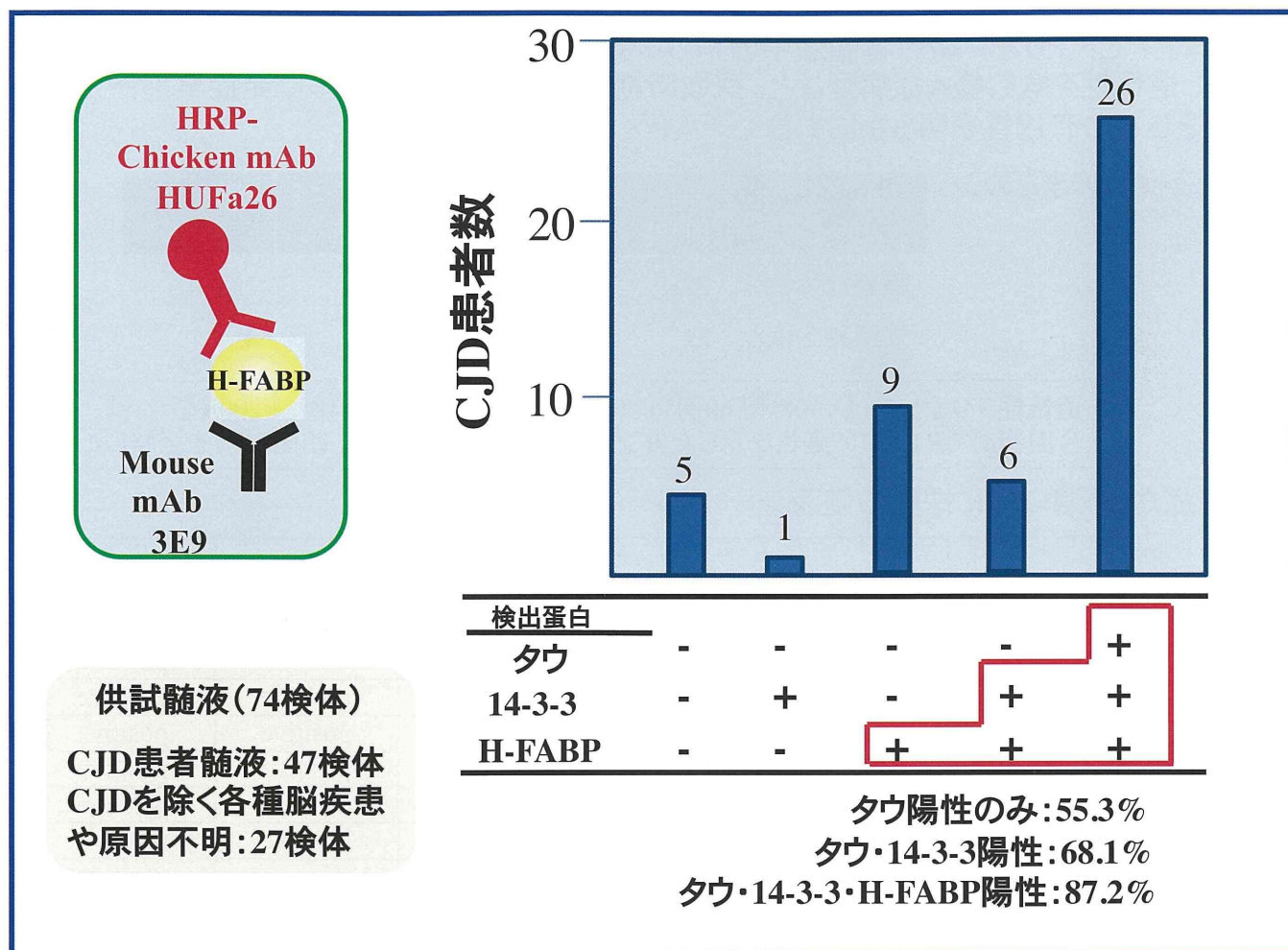
心拍数

解説

1. 超音波の照射強度や持続時間を変えることにより、生ずるプリオン凝集体の‘かたち’や‘大きさ’を制御できることが分かった。
2. プリオン病治療薬候補のひとつとして、カルバゾール骨格を有する低分子化合物を最適化した。
3. 開発した抗プリオン・リード化合物(GN8)に対し、生体に投与した場合の安全性を評価した。

CJDにおける髄液H-FABP検査の有用性

研究分担者: 広島大学大学院生物圏科学研究科 松田治男



解 説

1. CJD患者髄液(47検体)を含む計74検体の髄液を検体として、本研究で構築した高感度H-FABP検出系をタウ蛋白検出および14-3-3蛋白検出と比較した。
2. 上記の図にある通り、タウ・14-3-3・H-FABPの3マーカーの検出が最も高精度にCJDを診断できる可能性を示唆している。