

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業
 （難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

プリオン病における神経変性阻害効果を持つ医薬品の探索

研究分担者：八谷如美 東京医科大学病態生理学分野
 研究協力者：宮下佳奈 東京医科大学病態生理学分野

研究要旨 本研究は、プリオン病の進行を遅延させるため、本疾患に伴う神経変性に関与する5つの標的分子(14-3-3 η , γ , ζ , Tom70, Miro1)を対象に、これらと作用し神経変性抑制効果を有する医薬品の探索・同定を行う研究である。本年度は培養細胞を用いて 14-3-3 作用薬 Fusicoccum および D-ロイシンの効果を見いだした。

A. 研究目的

プリオン病における神経変性を防ぐ手段を検討することは、病気の進行を遅らせる手法に繋がるものである。本件分子機構の詳細は長らく不明であったが^{1),2)}、我々は、関連分子として、14-3-3 η , γ , ζ , Tom70³⁾, Miro1⁴⁾の5分子を同定した。本疾患で、神経変性に抗する医薬品の探索は、これまでに見当たらない。本研究では、上述5分子を標的とし、これらを阻害する医薬品を見いだすことで、プリオン病の進行を遅らせることを目的とする。

B. 研究方法

マウス神経芽細胞腫由来 neuro2a (N2a) 細胞において PrP^Cを過剰発現させ、上述の細胞死経路を再構成し、14-3-3 タンパク質作用薬を添加することで、14-3-3/PrP^C複合体の形成阻害効果および細胞死遅延あるいは阻害効果を持つものを探索した。効果の判定には、MTT アッセイ法および蛍光顕微鏡によるイメージング解析を行った。また、プリオン持続感染細胞株 ScN2a 細胞 22L 株を用いて、L-、および D-アミノ酸を添加してプリオン化抑制効果の転化効果実験を行った。判定はプロテイナーゼ K を用いた酵素処理実験およびウエスタンブロッティングによる検出および定量で行った。

（倫理面への配慮）

培養細胞での実験であるから本研究は該当しない。

C. 研究結果

既知の 14-3-3 作用薬のうち、Fusicoccum および BV02 について、添加効果を検討した。その結果、Fusicoccum 添加した時のみ、細胞死遅延効果が観察された。ちなみに、Fusicoccum は、Fusicoccum amygdali (植物に感染するカビの一種)が産生する毒素である。14-3-3 タンパク質に対して modeIII で結合する基質に対し、結合阻害活性を呈するが、modeI あるいは II においてはその活性を示さない。一方、14-3-3 阻害剤として知られている BV02 にはこの活性が見られなかった。さらに、アミノ酸キラル異性体である D-ロイシンには、ScN2 細胞において、プロテアーゼ抵抗性 PrP を減少させる活性を持つことを見いだした。

D. 考察

プリオン病で必発する、神経変性および神経脱落を遅延させることは、病気の進行を遅らせることにほかならない。しかも、我々が同定した神経変性に至る経路にかかる分子群は、プリオン病以外の神経変性疾患でも共通しうることを示唆しているから、かかる医薬品の同定に至れば、その波及効果は大きい。

E. 結論

14-3-3 作用薬 Fusicoccum は、培養細胞において正常型プリオンタンパク質とミトコンドリアが介する神経細胞死を抑制する活性を有することを見いだした。さらに、および D-ロイシ

ンには、プリオン持続感染型培養細胞においてプリオン化を阻害する活性を有することを見いだした。

[参考文献]

- 1) Hachiya NS, et al. Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrPC) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrPC. *Neurosci Lett* 374:98-103, 2005.
- 2) Hachiya NS, et al. Prion protein with Y145 STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 27:894-899, 2005.
- 3) Rehling P, Brandner K, Pfanner N. Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:519-530, 2004.
- 4) Brickley K, et al. GRIF-1 and OIP106, members of a novel gene family of coiled-coil domain proteins. *J Biol Chem* 280:14723-14732, 2005.

F. 健康危険情報

本研究は該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyashita K, Nishijima K, Hachiya N. D-leucine suppresses prion formation in prion-infected culture cells. *Int J Neurol Neurother* 1:2, 2014.

2. 学会発表

- 1) Hachiya N. Direct approach for the analysis of aggregated protein-advanced laser micro dissection system and unfoldin-. 第14回日本蛋白質科学会年会, 横浜, 6.25-27, 2014.

- 2) Miyashita K, Nishijima K, Hachiya N. D-leucine suppresses prion formation in prion-infected culture cells. Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, July 6-7, 2014.

- 3) Hachiya N. Analysis of psychiatry-nanotechnology as a tool-. 14th ICGP congress, つくば, 10.1-4, 2014.

- 4) 加藤大樹, 宮下佳奈, 島 実紀, 鈴木森香, 西島佳奈, 八谷如美. Bimodal targeting of cellular prion protein; biochemical analysis of the neurodegeneration in culture cells. 第87回日本生化学会大会, 京都, 10.15-18, 2014.

- 5) Hachiya N. ALMD and Unfoldin-innovation for protein analysis-. JSPS Japan Hungary Joint Seminar, 吹田, 11.18-20, 2014.

- 6) 八谷如美, 宮下佳奈. ラマン共焦点イメージング微細マイクロダイセクターの開発. 第7回タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会. 熊取, 12.11-12. 2014.

- 7) 八谷如美. 微細レーザーダイセクターの開発とダイレクトバイオロジー. 第1回ダイレクトバイオロジー研究会, 東京, 2.13, 2015.

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

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業

（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

プリオン病治療戦略構築に向けてのプリオン蛋白質の性状解析

研究分担者：作道章一 琉球大学医学部保健学科生体代謝学

研究協力者：小野寺節 東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全センター

研究要旨 プリオン蛋白質(PrP)はプリオン病発症に必須な因子である。したがって、PrPを減少させることによりプリオン病の治療が可能と考えられるが、その際、正常型 PrP の機能が低下することによる副作用が出現する可能性がある。そこで、PrP 欠損時の性状変化を細胞レベルで解析するために、PrP 遺伝子欠損細胞株を用いて PrP の機能解析を行った。平成 26 年度は近年発見されたプリオン関連蛋白質である Shadoo 蛋白質(Sho)の発現に対する PrP の影響を中心に解析した。さらに、プリオン感染細胞の PrP を減少させることによる治療法開発のため、shRNA を用いた PrP 発現抑制法の検討を行った。

A. 研究目的

プリオンに感染すると正常型プリオン蛋白質(PrP^C)が異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})へと変換し、これがプリオン病の発症に重要な役割を果たしているものと考えられている。これをサポートするデータとして、PrP を発現しない PrP ノックアウトマウスはプリオン病原体を接種しても発症しないことが挙げられる。したがって、プリオン蛋白質(PrP)の供給を止めることで、プリオン病の治療ができることが期待される。一方で、PrP^Cは生理機能を持つものと考えられ、PrP 発現抑制は PrP^C減少を引き起こし、それによる副作用の発生が危惧される。

そこで、本研究課題では PrP 発現抑制によるプリオン病治療法開発を行うため、①効率的な PrP 発現抑制法の開発と②PrP の機能解析を行った。

これまでに我々は PrP 遺伝子欠損マウス由来不死化神経細胞株(HpL3-4)が無血清培地下においてアポトーシスを起こすと同時に、PrP 遺伝子の再導入によりアポトーシスが抑制されることを報告してきた[1]。さらに、PrP の Octapeptide repeat region(OR)と Hydrophobic region(HR)はアポトーシス抑制に重要であることを明らかにしてきた[2]。最近、OR や HR と似た構造を持つ PrP 関連蛋白質として Shadoo 蛋白質(Sho)が最近発見された。構造の

似た蛋白質の比較から機能に関する有益な情報が得られる場合も多いため、PrP と Sho の機能的比較を行うことにした。本年度は、これらの比較解析を行う前の基礎的解析として、HpL細胞における Sho 発現についてのデータを得るとともに、PrP 発現が Sho 遺伝子発現に与える影響を解析を行った。さらに、PrP 発現抑制法開発のため、shRNA を用いた方法の検討を各種神経細胞株を用いて行った。

B. 研究方法

空ベクター導入 HpL3-4 細胞(HpL3-4-EM)および PrP 遺伝子を再導入した HpL3-4 細胞(HpL3-4-PrP)について、血清除去を行った。回収した細胞ライゼートを Sodium dodecyl sulfate(SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後に抗 Sho 抗体を用いたウエスタンブロッティング(WB)による解析やリアルタイム polymerase chain reaction(PCR)で Sho 遺伝子等の発現解析を行った。

shRNA を用いた PrP 発現抑制法の解析では、PrP に対する shRNA を発現するレトロウイルスベクター-pMLP-Prnp shRNA をパッケージング細胞 PT67 に遺伝子導入後、その培養上清を N2a や GT1-7 細胞に添加することで、レトロウイルスを感染させた。その後、ピューロマイシン添加培地で培養を行い、細胞を選択した。それら

の細胞の PrP 量を抗 PrP 抗体を用いた WB で比較した。

（倫理面への配慮）

DNA 実験は遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）および琉球大学遺伝子組換え生物等使用安全管理規則に従って行った。

C. 研究結果

HpL3-4-EM と HpL3-4-PrP から cDNA やライゼートを調整し、リアルタイム PCR や WB により PrP 遺伝子、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子、Sho 遺伝子の発現量を調べた。その結果、PrP 遺伝子は HpL3-4-EM では発現せず、HpL3-4-PrP で発現が確認された。また、GAPDH 遺伝子、Sho 遺伝子の発現量は両細胞で差が見られなかった。血清除去下（血清除去後 0 時間、12 時間、24 時間）での PrP、Sho、GAPDH の発現量の違いをリアルタイム PCR の Threshold cycle (Ct) で比較したところ、血清除去前（血清除去後 0h）と血清除去後で HpL3-4-EM、HpL3-4-PrP の両方とも PrP、Sho、GAPDH の差は見られなかった。また WB で Sho の発現量を調べたが、差は見られなかった。これらの結果から、HpL3-4-EM と HpL3-4-PrP において、Sho 遺伝子の発現量には違いがなく、PrP 遺伝子発現は Sho 遺伝子発現に影響を与えないことが示唆された。これらのことから、HpL3-4 で見られた、PrP 遺伝子発現によるアポトーシス抑制には Sho 遺伝子の発現制御は関与せず、血清除去により Sho 遺伝子の発現は変わらないものと考えられた。

3種類のPrPに対するshRNAを検討した結果、N2a細胞に対しては、3種類ともPrP発現の抑制効果が確認され、一方、GT1-7細胞に対しては、3種類のうち1種類だけ、PrP発現抑制効果が確認できた。

D. 考察

本研究の結果から、HpL3-4 細胞において見られた PrP によるアポトーシス抑制効果には Sho 遺伝子の発現は関与していないものと考えられた。一方で、PrP 欠損下で Sho の発現抑制や過剰発現を行うことで、アポトーシスが影響

を受ける可能性も考えられるため、今後、HpL3-4 において Sho の過剰発現や shRNA による発現抑制を行い、PrP 欠損下での Sho とアポトーシスの関連について、さらなる解析を進める必要がある。

また、shRNA を発現するレトロウイルスベクターにより PrP 発現が抑制できる可能性が示された。今後、より効率的に PrP 発現を抑制できる shRNA を探索するとともに、プリオン感染細胞へ shRNA を適用し、PrP 発現抑制により PrP^{Sc} 蓄積が抑制できるのか、検討を進めていく。

E. 結論

PrP 遺伝子欠損細胞における PrP によるアポトーシス抑制メカニズムには Sho の発現は関与していないものと考えられた。また、PrP に対する shRNA を発現するレトロウイルスベクターを用いて PrP の発現抑制ができることが示された。

[参考文献]

- 1) Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T. Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400:225-226, 1999.
- 2) Sakudo A, Onodera T, Suganuma Y, Kobayashi T, Saeki K, Ikuta K. Recent advances in clarifying prion protein functions using knockout mice and derived cell lines. *Mini Rev Med Chem* 6:589-601, 2006.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Onodera T, Sakudo A, Tsubone H, Itohara S, Review of studies for normal function of prion protein using knockout mice under the immunological or pathophysiological stress. *Microbiol Immunol* 58:361-374, 2014.
- 2) Koga Y, Tanaka SI, Sakudo A, Tobiume M, Aranishi M, Hirata A, Takano K, Ikuta K, Kanaya S, Proteolysis of abnormal prion protein

with a thermostable protease from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:2113-2120, 2014.

3) Sakudo A, Onodera T, Prion protein (PrP) gene-knockout cell lines: insight into functions of the PrP. *Front Cell Dev Biol* 2:75, 2015.

4) Sakudo A, Onodera T, Chapter 104. Bovine spongiform encephalopathy (BSE). In: Liu D ed., Molecular detection of animal viral pathogens, Taylor & Francis CRC Press, London, in press.

5) Sakudo A, Onodera T, Chapter 105. Chronic wasting disease (CWD). In: Liu D ed., Molecular detection of animal viral pathogens, Taylor & Francis CRC Press, London, in press.

6) 作道章一. 狂牛病(プリオン). 小林典裕, 上田 宏, 三宅司郎, 荒川秀俊・編 免疫測定法の基礎と応用. 講談社サイエンティフィック, 東京, pp265-273, 2014.

2. 学会発表

1) 清水七海, 古賀雄一, 作道章一, 原 英之, 坂口末廣, 金谷茂則, 超好熱菌由来プロテアーゼによるプリオン蛋白質分解の評価. 第 87 回日本生化学会大会, 京都, 10.15-18, 2014.

2) 古賀雄一, 清水七海, 作道章一, 原 英之, 坂口末廣, 金谷茂則. 超好熱菌由来プロテアーゼによるプリオンタンパク質分解の評価. 第 66 回日本生物工学会大会, 札幌, 9.9-11, 2014.

3) Koga Y, Nami S, Sakudo A, Kanaya S. Proteolysis of abnormal prion protein with a thermostable protease from a hyper-thermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1. 59th annual meeting biophysical society, Baltimore, February 7-11, 2015.

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

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業
 （難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

治療薬探索に適したプリオン感染細胞モデルの探索

研究分担者：堂浦克美 東北大学大学院医学系研究科神経化学分野
 研究協力者：逆瀬川裕二 東北大学大学院医学系研究科神経化学分野
 研究協力者：宇田川輝久 東北大学大学院医学系研究科神経化学分野
 研究協力者：西澤桂子 東北大学大学院医学系研究科神経化学分野
 研究協力者：小熊 歩 東北大学大学院医学系研究科神経化学分野
 研究協力者：倉橋洋史 東北大学大学院医学系研究科神経化学分野

研究要旨 ビボに近い状態の細胞モデルとして、プリオン持続感染細胞を用いて、ポストマイトティックな感染細胞の作製を検討した。増殖阻害剤や分化誘導剤などを用いたいずれの処理でも細胞増殖を完全に止めることは出来なかったが、グリセロールやブチル酸は細胞増殖抑制効果が高く、かつ PrPres レベルも高い状態が観察された。これらの処理細胞では、PPS などの既知の抗プリオン薬の PrPres 阻害効果は限定的であった。したがって、グリセロールやブチル酸で処理した細胞は、新たな創薬標的を探るための細胞モデルになり得ると考えられる。

A. 研究目的

プリオン病の治療予防薬の開発に汎用されているプリオン感染細胞モデルは、死滅することなくプリオンを持続的に産生する不死化増殖細胞である。ビボではポストマイトティックな神経細胞にプリオンが感染して増殖する。したがって、ビボの感染した神経細胞の状態を反映する細胞としては、ポストマイトティックなプリオン感染細胞の方が治療薬探索には適していると考えられる。そこで、本年度はこのようなプリオン感染細胞モデルを探索した。

B. 研究方法

従来のプリオン持続感染細胞を用いて、細胞増殖を抑制する処置や分化誘導する処置を行い、ポストマイトティックなプリオン感染細胞が作製できるかどうかを検討した。また、既報告のプリオン形成阻害剤の有効性をこれらの細胞で検討した。

（倫理面への配慮）

該当しない

C. 研究結果

血清濃度の調整とブチル酸・ヘキササン酸・レチノイン酸・ジブチリル cAMP・グリセロール等の添加を組み合わせ、プリオン感染 N2a 細胞を処理して、細胞増殖抑制効果と PrPres 量・局在への影響を調べた。検討したいずれの処理においても、感染細胞の増殖を完全に止めることは出来なかった。ジブチリル cAMP を除いて、いずれの処理でも（通常では 3 日間程度で継代するところを）10 日間程度は継代しないで細胞をステーションナリーに近い状態で維持できたが、特に[低血清濃度+ブチル酸]、[通常血清濃度+グリセロール]は細胞増殖抑制効果が高く、かつ PrPres レベルも高い状態が観察された。処理方法により、細胞の形態や分化マーカーの発現に違いがあり、細胞内の異常プリオン蛋白の局在も異なった。ステーションナリーに近い状態のプリオン感染細胞で、pentosan polysulfate、compound B や polysaccharide-K 等（参考文献 1-3）の効果を検討したが、いずれも PrPres を十分に低減させることはできなかった。

D. 考察

通常プリオン感染増殖細胞を用いたスク

リーニングで見つかったプリオン形成阻害剤の効果は、細胞増殖による希釈のバイアスにより過大に評価されてきた可能性がある。また、通常のプリオン感染増殖細胞では、プリオン形成阻害効果を示す化合物は見つけやすかったのかもしれないが、既に蓄積しているプリオンを分解促進する効果を持つ化合物の探索には向いていなかった可能性がある。実際に、既報告のプリオン形成阻害剤のピボでの治療効果には限界があり、すでにプリオンが蓄積している発病後の介入では病気の進行を阻止できず、生命予後改善効果は限定的である(参考文献1, 2)。よりピボに近い状態(細胞増殖がステーションナリー状態でプリオンが飽和状態)の細胞モデルで治療薬を探索することで、優れた治療効果を持つシーズを発見できる可能性がある。

本年度の研究結果から、処理方法により感染細胞のPrPresの代謝が異なることが示唆されたため、複数の細胞モデルを用いて治療薬候補物を探索する必要があると考えられる。検討した中では、[低血清濃度+ブチル酸]あるいは[通常血清濃度+グリセロール]による処理細胞は有望であったので、今後はこれらの処理細胞でPrPres量を激減させる化合物等を探索していくとともに、一層最適な細胞モデルの探索を継続していく。

E. 結論

治療薬探索に適したプリオン感染細胞モデルを開発し、グリセロールやブチル酸で処理したプリオン感染細胞は有望であることを発見した。

[参考文献]

- 1) Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Mohri S, Race R, Iwaki T. Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol* 78:4999-5006, 2004.
- 2) Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen CJ, Teruya K, Sakasegawa Y, Doh-ura K. Orally administered amyloidophilic compound is effective in prolonging the incubation periods of animals cerebrally infected with prion diseases in a prion strain-dependent manner. *J Virol* 81:12889-12898,

2007.

- 3) Hamanaka T, Sakasegawa Y, Ohmoto A, Kimura T, Ando T Doh-ura K. Anti-prion activity of protein-bound polysaccharide K in prion-infected cells and animals. *Biochem Biophys Res Commun* 405:285-290, 2011.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishizawa K, Oguma A, Kawata M, Sakasegawa Y, Teruya K, Doh-ura K. Efficacy and mechanism of a glycoside compound inhibiting abnormal prion protein formation in prion-infected cells: implications of interferon and phosphodiesterase 4D interacting protein. *J Virol* 88:4083-4099, 2014.
- 2) Kurahashi H, Sakasegawa Y, Doh-ura K. Detection of proteinase K-resistant prion protein(PrPres) in mouse neuroblastoma cells. *PSSJ Arch* 7:e074, 2014.

2. 学会発表

- 1) Sakasegawa Y, Doh-ura K. A platinum compound enhances the protease sensitivity of PrPres in cell lysates. Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, July 6-7, 2014.
- 2) 堂浦克美. TSE プリオンとプリオノイドの違い. 第55回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 6.5-7, 2014.

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

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業
 （難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

転写因子 IRF3 に対するプリオンの抑制メカニズム

研究分担者：石橋大輔 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子解析学分野
 研究協力者：本間拓二郎 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子解析学分野
 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感染分子解析学分野

研究要旨 これまで真偽されてきたクロイツフェルトヤコブ病（プリオン病）の病原体（プリオン）について、宿主の自然免疫応答インターフェロンシステムに注目し、プリオンの感染病態を解明する。

A. 研究目的

病原体（ウイルス等）の宿主への侵入後、初期防御機構として自然免疫機構が働く。その機構の一つ IRF3 は、抗ウイルス効果を示す I 型 IFN の誘導に寄与しており、我々は、IRF3 がプリオン感染に対して保護的に働くことを過去に報告している。興味深いことに当研究室においてプリオン持続感染細胞における IRF3 遺伝子の発現減少が確認された。そこで本研究では、IRF3 の転写に着目し、この IRF3 抑制のメカニズムについて検討した。

B. 研究方法

1) IRF3 の転写開始地点から上流-2000bp までの間でプロモーター活性に重要な領域について、デュアルルシフェラーゼアッセイ (DLA) にて探索した。2) コアプロモーター領域におけるプロモーター活性についてプリオン持続感染細胞を用いて検討した。3) 転写因子 Oct-1 の IRF3 プロモーター領域における影響について DLA にて検討した。また、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) を用いて Oct-1 結合領域の検討を行った。4) プリオン持続感染細胞およびプリオン感染マウス脳における Oct-1 の蛋白発現を検討した。

（倫理面への配慮）

本課題では、遺伝子組換えマウスの実験は動物への倫理面での配慮を条件に組換え DNA 実験申請を行い所属機関の長の承認下に行わ

れるものであり、すでに承認済みである。また、全ての実験動物は所属機関の動物実験指針に従い、且つ動物実験委員会の審査を受け動物実験施設内で行う。実験計画終了後の実験動物は苦痛軽減に配慮し、イソフルラン吸入麻酔下にて安楽死させる。

C. 研究結果

1) IRF3 の転写開始上流-119/-1 がプロモーター活性のコア領域であることを認めた。2) プリオン持続感染細胞では非感染細胞に比べ、プロモーター活性が 1/4 程度であり、抗プリオン効果を示す薬剤 (Congo-Red、Pentosan polysulfate) 処理により 3 倍上昇した。3) Oct-1 は IRF3 プロモーター活性を有意に増加させた。また ChIP により -119/-1 の領域と Oct-1 との結合が確認された。4) 細胞およびマウスにおいてプリオン感染により Oct-1 の減少が見られた。

D. 考察および

E. 結論

Oct-1 は IRF3 の主要な転写因子であり、プリオン感染後の IRF3 発現低下は、Oct-1 の発現減少に伴った結果と示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Fuse T, Sano K, Satoh K, Atarashi R, Nishida N. Persistent prion infection disturbs the function of Oct-1, resulting in the down-regulation of murine interferon regulatory factor-3. *Sci Rep* 4:6006, 2014.
- 2) Sano K, Atarashi R, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Nishida N. Conformational properties of prion strains can be transmitted to recombinant prion protein fibrils in real-time quaking-induced conversion. *J Virol* 88:11791-11801, 2014.

2. 学会発表

- 1) Ishibashi D, Homma T, Nakagaki T, Sano K, Yamaguchi N, Mori T, Satoh K, Atarashi R, Nishida N. Metabolism of PrPSc differs depending on prion strains. Prion2014, Trieste, May 27-30, 2014.
- 2) 本間拓二郎, 石橋大輔, 新竜一郎, 西田教行. 正常型プリオン蛋白のプロテアソーム分解機構を再考する. 第33回分子病理学研究会宮城蔵王シンポジウム, 蔵王, 7.25-26. 2014.
- 3) 石橋大輔, 本間拓二郎, 西田教行. 病原体プリオンによる転写因子 IRF3 の発現抑制機構. 第67回日本細菌学会九州支部総会・第51回

日本ウイルス学会九州支部総会, 鹿児島, 9.5-6, 2014.

- 4) 石橋大輔. プリオン感染における宿主自然免疫応答の役割 Role of the host innate immune responses against prion pathogenesis. 第87回日本生化学会大会, 京都, 10.15-18, 2014.
- 5) Ishibashi D, Homma T, Nakagaki T, Atarashi R, Nishida N. Metabolism of PrPSc differs depending on prion strains. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 11.10-12, 2014.
- 6) Ishibashi D, Homma T, Nakagaki T, Nishida N. Persistent prion infection disturbs the function of Oct-1, resulting in the down-regulation of murine interferon regulatory factor-3. 第43回日本免疫学会学術集会 The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 京都, 12.10-12, 2014.

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

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業

（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

培養細胞を用いた新規のプリオン解析系の確立 ープリオン感受性および持続感染性にすぐれた細胞株作出の試みー

研究分担者：桶本優子（中村優子） 国立感染症研究所細胞化学部

研究要旨 プリオンへの感受性および感染持続性にすぐれた培養細胞株を樹立し、新規解析系の確立を目指す。本年度は、プリオン蛋白質の多型や変異を有する細胞株作出への応用を念頭に、新規のプリオン蛋白質欠損細胞株の樹立を行った。

A. 研究目的

プリオンの感染性やその性状を解析するため、マウスニューロブラストーマ細胞株 Neuro-2a やマウス視床下部由来の不死化神経細胞株 GT1-7 などの培養細胞株が今日までの研究において汎用されてきた。これらの細胞株（あるいはこれらに由来する細胞株）は、プリオンに対する感受性が高く持続感染も成立しやすいことから、薬剤スクリーニング等を含め、多岐にわたるプリオン研究に用いられている。一方、ヒトプリオン病の解明・克服を目的としてヒト由来細胞株を用いた解析系が望まれるが、汎用性の高い系は未だ確立されていない。これまでの我々の検討結果から、プリオンへの感受性を有するヒト由来細胞株は存在するものの、その感染効率や感染持続性が非常に低いことが明らかとなっている。これらの問題点を改善するため、以下の検討を行う。

ヒトのプリオン蛋白質 (PrP) の遺伝子 (*PRNP*) には複数の正常多型が存在し、コドン 129 多型などプリオン病発症率と関連すると考えられる多型も報告されている。また、*PRNP* 変異が関与する遺伝性プリオン病の存在も報告されているが、これらの多型や変異によりプリオン病の発症動態になぜ差異が生じるのか、そのメカニズムは明らかにされていない。しかし、多型や変異を有する PrP を産生させることで、培養細胞におけるプリオン感受性や持続感染性に変化が生じる可能性があるとして期待し、検討を行う。プリオン感受性や持続感染性にすぐれた細胞株が樹立されれば、プリオン高感度検

出系としての利用が可能であるだけでなく、多型や変異を反映させた治療薬の選別等にも応用可能であると期待される。

B. 研究方法

まず、これまでに検討したプリオン感染実験の結果より、プリオンへの感受性を有すると考えられるヒトニューロブラストーマ細胞株を選別、これら細胞株に由来する PrP 欠損細胞株の樹立を行う。さらに多型や変異を有する *PRNP* を再導入し、それぞれの安定発現細胞株の樹立を試みる。これら新規に樹立した細胞株に対してプリオン感染実験を行い、感受性および持続感染性を比較検討する。

（倫理面への配慮）

動物実験等は無く倫理面での配慮は必要とされないが、プリオンタンパク質 (PrP) の取り扱いや組換え DNA に関する実験においては国立感染症研究所の規定に従った。

C. 研究結果

本年度は遺伝子改変 (ゲノム編集) 技術による PrP 欠損細胞株の樹立が可能か、検討を試みることにした。用いるシステムあるいは標的遺伝子配列等に関する条件検討を行い、第20染色体上に存在する *PRNP* コーディング領域のほぼ全長を欠失する細胞株の樹立を試みた。まず、PCR 法での増幅塩基配列のサイズ変化により PrP 欠損の可能性があると判断したクローンを選別 (図1)、さらにゲノムシーケンスにより得ら

れた塩基配列情報により、*PRNP*コーディング領域の欠損が生じたクローンを確定した。また、これらの細胞株におけるPrP産生がないことを、間接蛍光抗体法やウエスタンブロッティング法においても確認した(図2、3)。

D. 考察

本年度における検討により、プリオンに感受性を有するヒト由来の細胞株を用い、PrP欠損細胞株の樹立に成功した。PrP欠損細胞株においてはプリオン感受性を示さないが、*PRNP*の再導入により、プリオン感受性は回復するものと期待される。次年度以降、多型や変異を有するPrPの再導入および安定発現細胞クローンの樹立を試みる予定である。

E. 結論

プリオンに感受性を有するヒト由来の細胞株を用いた PrP 欠損細胞株の樹立に成功した。本細胞株は、多型や変異を有する PrP 再導入株の樹立に必須であり、プリオン高感度検出系や薬剤スクリーニング系を構築する上での基礎となる、重要な新規細胞株である。

[参考文献]

1) Mastrianni JA. The genetics of prion diseases. *Genet Med* 12:187-195, 2010.

2) Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res* 49:219-225, 1989.

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

なし

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

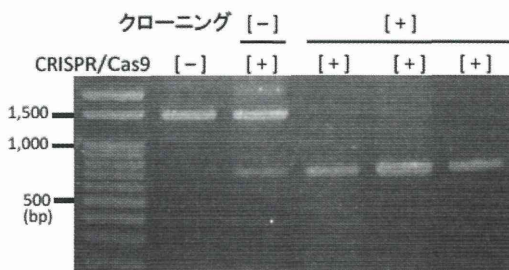


図1. PCR法によるPrP ORFの欠損の確認
PrPコーディング領域(ORF)を含む領域をPCR法にて増幅、検出した。ゲノム編集を行わない細胞のゲノムからは約1500bpのPCR産物が得られるが、PrP ORFゲノム上で欠損がおきた場合には約700bpのPCR産物が検出された。

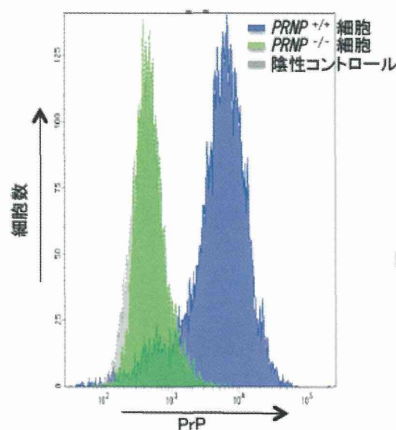


図2.フローサイトメトリーによるPrP産生レベルの確認
フローサイトメトリーによる解析において、新規に樹立されたクローンではPrPの産生がみられないことが確認された。

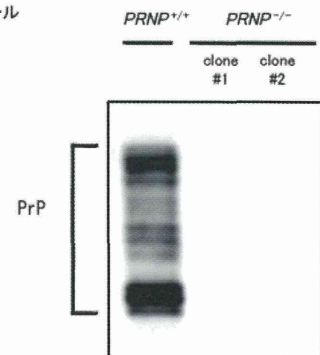


図3.ウエスタンブロッティング法によるPrP産生レベルの確認
ウエスタンブロッティング法による解析においても、新規に樹立されたクローンではPrP産生がないことが確認された。

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業
 （難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

異常プリオンタンパク質蓄積における Sortilin の役割

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：内山圭司 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、新規プリオン結合因子として Sortilin を同定した。Sortilin は、VPS10p ファミリーに属する小胞輸送における積荷タンパク質受容体であり、VPS10p ドメインを介して proNGF、proBDNF、Trk 受容体などと相互作用を示し神経細胞の生存・維持に重要な役割を果たしていることが知られている¹⁾。しかし、これまで Sortilin がプリオンタンパク質 (PrP) の輸送に関与していることは報告されていない。そこで、本研究ではまず、Sortilin の PrP 細胞内輸送における役割を解明することにした。我々は、プリオン感染が Sortilin 発現量を低下させることを見出した。また、Sortilin の発現量低下による機能抑制は PrP^C および PrP^{Sc} 分解を抑制し、これらの蓄積を引き起こすことも明らかにした。これらの結果から、プリオン感染による PrP^{Sc} の蓄積は、Sortilin 減少による PrP 分解抑制が主因であると考えられた。また、Sortilin の機能抑制は過剰な PrP 蓄積を引き起こすとともに、プリオン感染に対して高感受性となることも明らかにした。

A. 研究目的

プリオン感染は、正常プリオンタンパク質 (PrP^C) の異常プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) への構造変換を誘導し、これがプリオン病の病態に重要であることを報告した²⁾。PrP^C 構造変換の結果形成された PrP^{Sc} は、PrP^C と比較して分解され難く細胞内に蓄積することは広く認識されている。しかし、PrP^{Sc} 分解が抑制されるメカニズムは不明である。そこで、本研究課題では PrP^{Sc} 分解促進によるプリオン病の治療方法開発を目指し、PrP^{Sc} 分解抑制の分子機構を解明することを目的とした。本年度は、PrP 細胞内輸送及び PrP 分解に対する Sortilin の役割を解明することにした。

B. 研究方法

培養細胞

マウス神経芽腫由来 N2a 細胞に *Prnp* 遺伝子を導入した N2aC24 細胞をプリオン非感染細胞としてまた、プリオン持続感染細胞には 22L プリオン持続感染 N2aC24L1-3 細胞を使用し、培養には DMEM 培地を用いた。

プリオン感染実験

N2aC24 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、

24 時間後に 50 µg タンパク量を含む RML プリオン感染マウス脳乳剤を加え 2 または 3 日おきに継代した。

Sortilin ノックダウン

6 ウェルプレートに播種した N2aC24 細胞または N2aC24L1-3 細胞に、Lipofectamine RNAiMax (Thermo Scientific) を用い Stealth siRNA (Thermo Scientific) を導入した。

Sortilin ノックアウト細胞の作製

CRISPR/Cas システムにより N2aC24 細胞由来 Sortilin ノックアウト細胞を作製した。

（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った。

C. 研究結果

プリオン感染により Sortilin 発現量は低下する

N2aC24 細胞および N2aC24L1-3 細胞において Sortilin 発現量を、抗 Sortilin 抗体を用いたウエスタンブロットにより比較したところ、N2aC24L1-3 細胞において Sortilin 発現量が低下していた (図1)。しかし、この Sortilin 発現量低下が N2aC24L1-3 細胞特有の現象であることが

懸念されたので、非感染細胞であるN2aC24細胞にRMLプリオンを感染後、経時的にSortilin発現量を解析した。Sortilinはプリオン感染6日後で有意に発現の低下がみられた。また、感染9日後に間接蛍光抗体法によりSortilinおよびPrP^{Sc}を観察したところ、PrP^{Sc}が観察されない細胞ではSortilinの強い蛍光が観察されるのに対して、PrP^{Sc}を蓄積している細胞ではこれが観察されず、プリオン感染がSortilin発現低下を引き起こしていることが示された(図2)。

Sortilinの機能抑制はPrPの蓄積を引き起こす

プリオン感染によりSortilin発現量が低下し、その機能が抑制されることを示した。そこで、Sortilinの機能抑制が、PrP^CおよびPrP^{Sc}に対してどのように作用するのかを解析した。まず、非感染細胞に対してsiRNAによりSortilinをノックダウンしたところ、PrP^Cの発現量は上昇し細胞表面に蓄積していた(図3)。しかし、*Prnp*転写レベルに変化はなく、このPrP^Cの増加はPrP^Cの分解が抑制されていると考えられた。次に、感染細胞においても非感染細胞同様にSortilinをノックダウンしたところ、PrP^{Sc}も増加することが示された(図4)。

Sortilinの機能が抑制された細胞はプリオン感染に対して高感受性を示す

プリオン感染に対するSortilinの作用について解析した。このために、CRISPR-CasシステムによりN2aC24細胞のSortilinをノックアウトしたN2aC24ΔSort細胞を構築しN2aC24細胞と、RMLプリオン感染に対する感受性を比較した。プリオン感染9日後でのPrP^{Sc}量をウェスタンブロットにより比較したところ、N2aC24ΔSort細胞ではN2aC24細胞の約5~10倍の異常プリオンを蓄積することが示された(図5)。また、感染7および10日後において、間接蛍光抗体法によりプリオンに感染しPrP^{Sc}を蓄積している細胞の割合を比較したところ、N2aC24ΔSort細胞ではN2aC24細胞の約5倍の細胞がプリオンに感染しており、Sortilinの機能抑制はプリオン感染に対して高感受性を示すことが明らかになった(図6)。

D. 考察

プリオン感染は、Sortilin発現量低下を引き起こしその機能を抑制する。また、Sortilinの機能

抑制は、PrP^CおよびPrP^{Sc}の蓄積を引き起こすことを明らかにした。これらの結果から、プリオン感染によるSortilinの減少が、PrP分解を抑制しPrP^{Sc}の蓄積を引き起こしていると考えられた。また、Sortilin欠損細胞ではプリオン感染により過剰なPrP^{Sc}蓄積を引き起こすだけでなく、プリオンに感染する細胞が野生型の約5倍に上昇しており、Sortilin機能抑制はプリオン感染に対して高感受性を示すことが示され、プリオン感染に対する細胞の防御機構としてSortilinは重要な機能を果たしていると考えられた。

E. 結論

Sortilinは、PrP^CおよびPrP^{Sc}の分解に関与している。しかし、プリオン感染がSortilinの発現量低下を引き起こすことでPrP^{Sc}分解を抑制し、この結果プリオン感染によりPrP^{Sc}が蓄積すると考えられた。

[参考文献]

- 1) Nykjaer A, Willnow TE. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci* 35:261-70, 2012.
- 2) Sakaguchi S, Shigematsu K, Nakatani A, Moriuchi R, Nishida N, Kurokawa K, Nakaoke R, Sato H, Jishage K, Kuno J, Noda T, Miyamoto T. 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

1. 論文発表

- 1) Uchiyama K, Miyata H, Yano M, Yamaguchi Y, Imamura M, Muramatsu N, Das NR, Chida J, Hara H, Sakaguchi S. Mouse-hamster chimeric prion protein (PrP) devoid of N-terminal residues 23-88 restores susceptibility to 22L prions, but not to RML prions in PrP-knockout mice. *PLoS One* 9:e109737, 2014.

2. 学会発表

- 1) 内山圭司, 坂口末廣. プリオン感染によるポストゴルジ小胞輸送障害. 第 66 回日本細胞生物学会, 奈良, 6.11-13, 2014.
- 2) Uchiyama K, Sakaguchi S. Prions disturb post-Golgi membrane trafficking to the cell surface. The 9th International Symposium of the Institute Network, Osaka, June 19-20, 2014.
- 3) Uchiyama U, Sakaguchi S. Post-Golgi trafficking of membrane proteins impaired by prion infection. Prion 2014, Trieste, May 27-30, 2014.
- 4) 内山圭司, 坂口末廣. プリオン感染による Sortilin 発現低下が異常プリオン蓄積を引き起こす. 第 29 回中国四国ウイルス研究会, 山口, 6.28-29, 2014.
- 5) 内山圭司, 坂口末廣. プリオン感染と小胞輸送障害. 第 87 回日本生化学会大会, 京都, 10.15-18, 2014.
- 6) 内山圭司, 富田 満, 臼井 健, 坂口末廣. 新規プリオン結合因子 Sortilin のプリオン感染における役割. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 11.10-12, 2014.
- 7) 富田 満, 内山圭司, 臼井 健, 坂口末廣. プリオンノックアウト細胞を用いたプリオンタンパク質 N 末端領域の異常プリオン形成における役割の解明, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 11.10-12, 2014.
- 8) 坂口末廣, 内山圭司, プリオンによるポストゴルジ膜輸送障害. 第 36 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 徳島, 11.20-21, 2014.

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

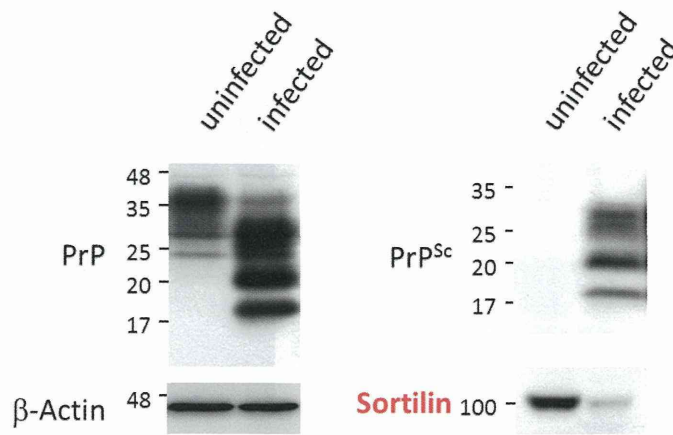


図1. 非感染細胞と感染細胞における Sortilin 発現量の比較
 プリオン感染細胞では Sortilin 発現量が減少している。

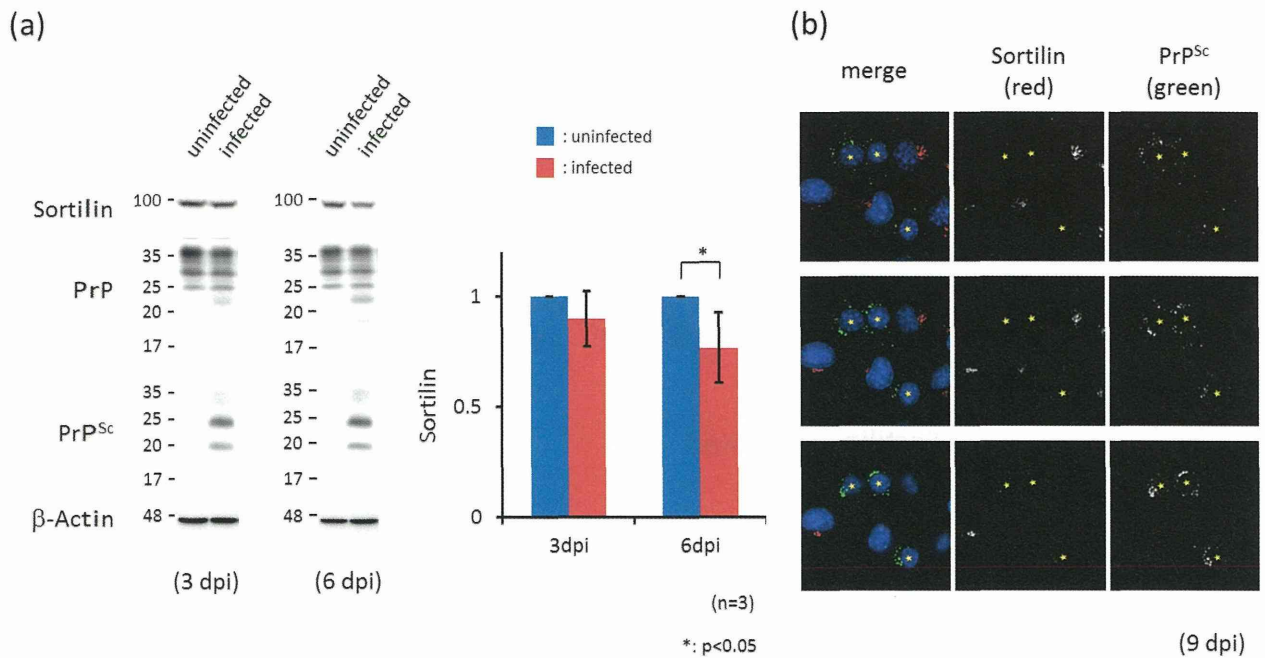


図2. N2aC24 細胞における RML プリオン感染後の Sortilin 発現
 (a)ウエスタンブロットによるプリオン感染3および6日後における Sortilin 発現量を比較した。プリオン感染6日後で有意に Sortilin 発現が低下している。(b)感染9日後の PrP^{Sc} (緑) および Sortilin (赤) の蛍光免疫染色。PrP^{Sc} のシグナルが観察されるプリオン感染細胞 (黄色星印) では非感染細胞と比較して、Sortilin のシグナルが明らかに低下している。

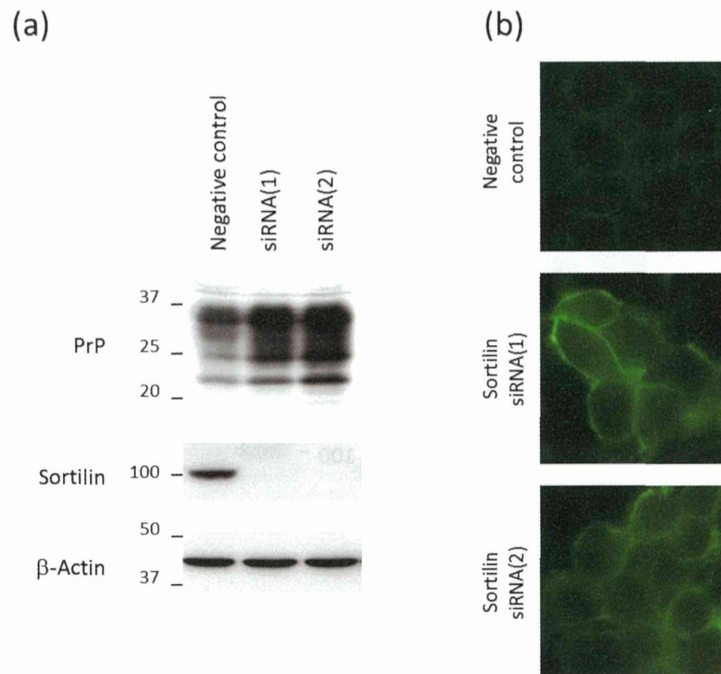


図 3. Sortilin ノックダウンにより非感染細胞で PrP^C が細胞表面に蓄積する
 (a)ウエスタンブロットによる PrP^C 発現量の比較。Sortilin ノックダウンにより PrP^C が増加する。(b) 間接蛍光抗体法による PrP^C 局在の比較。局在変化は見られないが細胞表面での蛍光強度は増加している。

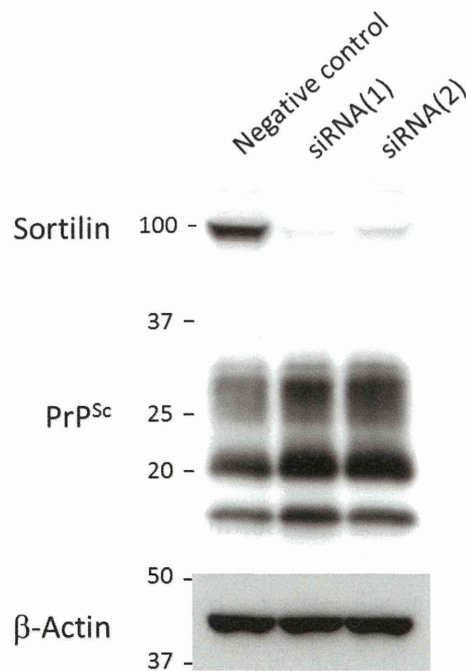


図 4. 感染細胞における Sortilin ノックダウン
 感染細胞においても、Sortilin をノックダウンすることにより PrP^{Sc} が増加する。

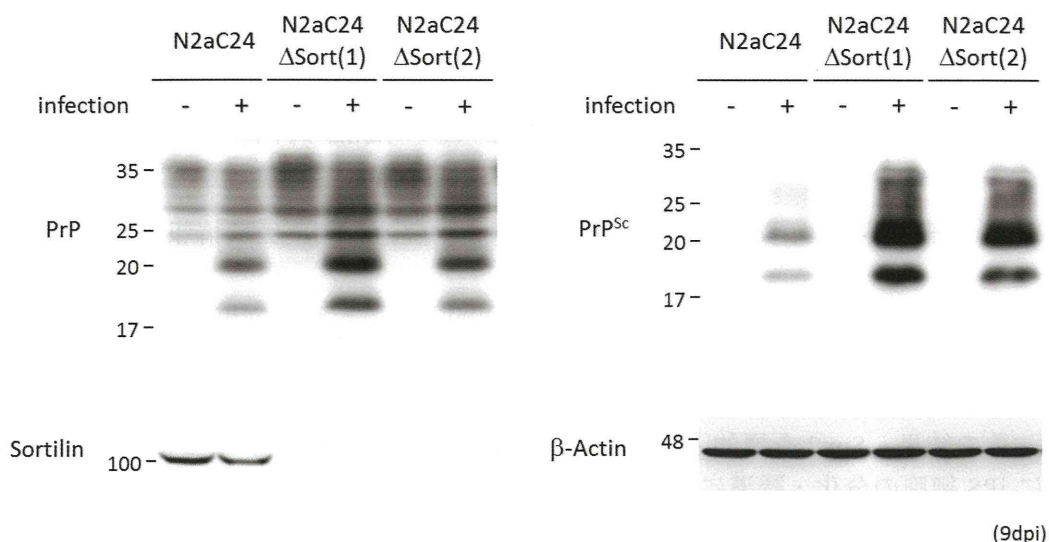


図5. プリオン感染により Sortilin ノックダウン細胞は過剰な PrP^{Sc} を蓄積する
Sortilin ノックダウン細胞および野生型細胞に対する RML プリオン感染 9 日後の異常プリオン蓄積量をウエスタンブロットにより比較した。Sortilin ノックダウン細胞では野生型細胞の 5~10 倍の PrP^{Sc} を蓄積する。

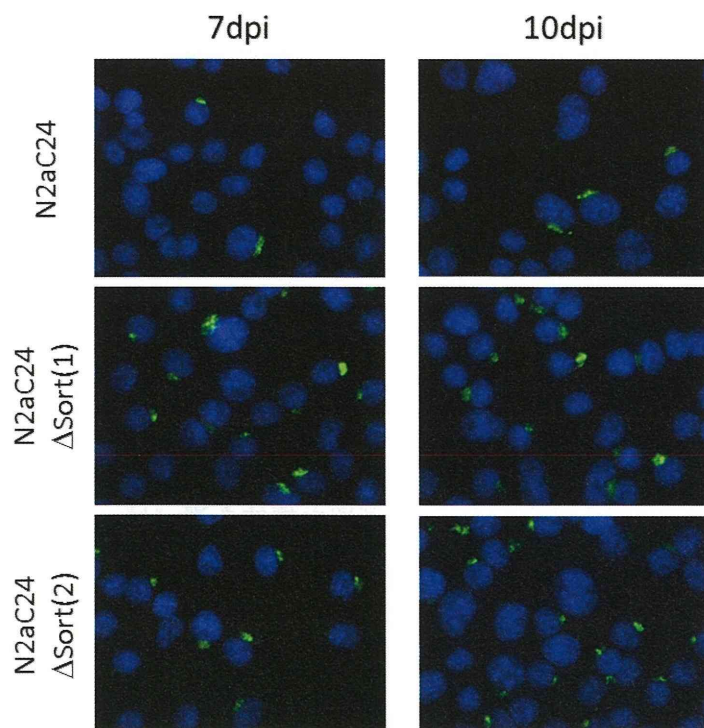


図6. Sortilin 機能抑制はプリオン感染に対して高感受性を示す。
間接蛍光抗体法により Sortilin ノックダウン細胞および野生型細胞におけるプリオン感染細胞の割合を比較した。Sortilin ノックダウン細胞では野生型細胞の約 5 倍の細胞で PrP^{Sc} (緑) が検出される。

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業
 （難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

論理的創薬による iPS 細胞制御

研究分担者：桑田一夫 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

研究要旨 本研究の目的は、Sox2, Nanog, Lin28 を標的としてこれを制御し、iPS の誘導及び神経細胞への分化を促し、プリオン病において神経細胞の再生を促進する低分子化合物を創製することにある。これら3種類の蛋白質を標的として、オリジナルソフト‘NAGARA’を用い、論理的創薬計算を行った。その結果、Sox2 を標的とした場合、10種類の化合物がヒットしたため、これらに関して、実際に iPS 細胞の分化・誘導に与える影響を調べた。その結果、化合物 S04 は、Sox2 に選択的に結合し、DNA との結合を阻害することにより、iPS 細胞の分化を促進し、分化の方向を制御すること示された。低分子化合物による選択的な分化制御が可能であることが証明された。

A. 研究目的

プリオン病の症状が発現する時点では、既に脳の大半の神経細胞が死滅している。プリオンを取り除けたとしても、脱落した機能を回復することは困難である。症状発現前の早期発見と先制治療の道を開くとともに、安全に神経再生を促進する技術を開発することが重要である。近年、iPS 細胞の発見により、reprogramming に関与する遺伝子群が次々に明らかになっている。しかし、論理的創薬法が適用できるのは、このうち3次元立体構造が明らかになっているものに限られる。そこで、本研究では、Sox2, Nanog, Lin28 を標的としてこれを制御し、iPS の誘導及び神経細胞への分化を促し、神経細胞の再生を促進する低分子化合物を創製することを目的とする。

B. 研究方法

上記3種類の蛋白質を標的として、古典力学と量子力学を組み合わせたオリジナルソフト‘NAGARA’を用い、論理的創薬計算を行った。その結果、Sox2 を標的とした場合、約30万種類の化合物のうちから、10種類の化合物がヒットし、これらに関して、実際に iPS 細胞の分化・誘導に与える影響を調べた。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

化合物S04は、顕著な作用を示した。S04の投与により、iPSコロニー形状の変形が見られ、ALP活性が著明に低下した。また、mRNAの発現レベルでは、内胚葉系の細胞への分化を示した。また、Sox2自体がSox2の発現を促進する機能があるが、S04の投与によりSox2の発現が選択的に抑制された。S04はSox2に選択的に結合し、DNAとの結合を阻害する可能性が高いことが分かった。その他の低分子も、同様にALP活性の抑制とiPSコロニーの形状の変形が認められた。分化の方向は、現在、確定中である。

D. 考察

Sox2 に選択的に結合する分子により、iPS 細胞の分化を促進し、分化の方向を制御できる可能性があることが分かった。このことは同時に、適切な標的を選べば、低分子化合物によるリプログラミングの可能性(iPS 細胞の誘導)があることも示唆している。低分子化合物による iPS の誘導と分化を制御できるようになれば、神経細胞の再生が可能となり、プリオン病の根本的治療法開発に大きく役立つ、と考えられる。

E. 結論

低分子化合物による選択的な分化制御が可能であることが証明された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Honda RP, Yamaguchi KI, Kuwata K. Acid-induced molten globule state of a prion protein: crucial role of strand 1-Helix 1-Strand 2 segment. *J Biol Chem* 289:30355-30363, 2014.

2. 学会発表

1) 桑田一夫. Toward the first in human clinical trial of medical chaperone. Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, July 6-7, 2014.

2) 桑田一夫, 山口圭一. Understanding the prion diseases and logical design of a medical chaperon. JSPS Japan Hungary Joint Seminar, 吹田, 11.18-20, 2014.

3) 桑田一夫, 山口圭一. CXDIによるアミロイド線維の一分子構造解析. 第14回日本蛋白質科学会年会, 横浜, 6.25-27, 2014.

4) 鎌足雄司, 桑田一夫. Sup35天然変性領域のアミロイド構造多形形成機構の解明. 第14回日本蛋白質科学会年会, 横浜, 6.25-27, 2014.

5) 本田 諒, 山口圭一, 桑田一夫. プリオン蛋白質のモンテグロビュール状態の発見とオリ

ゴマー形成との関連. 第14回日本蛋白質科学会年会, 横浜, 6.25-27, 2014.

6) 桑田一夫, 山口圭一. キネティック NMR によるタンパク質の‘かたち’の進化の観測. 第53回 NMR 討論会, 吹田, 11.4, 2014.

7) 小栗弘成, 遠藤智史, 宮城菜未希, 胡 大イ, 荒井裕貴, 松永俊之, 五十里彰, 桑田一夫, 原 明, 合田浩明, 豊岡尚樹. カルボニル還元酵素 (CBR1) 阻害活性を有する 8-Hydroxy-2-imino-2H-chromene-3-carboxamide 誘導体の創製. 第32回メディスナルシンポジウム, 神戸, 11.26-28, 2014.

8) 桑田一夫. プリオン病治験体制の整備. 革新的医療研究開発で挑む神経変性疾患—プリオン病治験体制の確立に向けて—, 名古屋, 2.14, 2015.

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

厚生労働科学研究委託事業 難治性疾患等克服研究事業
 （難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））

プリオン病及び遅発性ウイルス感染症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班 委託業務成果報告（業務項目）

酵母を用いたプリオン病異種間感染機構の解明

研究分担者：田中元雅 独立行政法人理化学研究所
 研究協力者：志田俊信 独立行政法人理化学研究所、東京工業大学大学院

研究要旨 これまでに構築してきた酵母プリオン蛋白質 Sup35NM の実験系を用いて、異種間でプリオン感染能を有する Sup35NM アミロイドを同定し、その構造を生物物理的手法などから明らかにすること、さらに、異種間でプリオン感染が生じる時の Sup35NM 蛋白質の動的構造変化の解明を目指す。今年度はこれらの実験を行うための様々な実験系の構築を行い、二種類の酵母間において、Sup35NM アミロイドのコア（中心部）を形成する領域のアミノ酸組成の一致度が、異種間でのプリオン感染に重要な役割を果たすことを示唆する知見を得た。

A. 研究目的

プリオン病は種の壁を越えてまれに異種間で感染する神経変性疾患であり、狂牛病を患ったウシからヒトへのプリオン感染はいまなお潜在的な脅威である。しかし、異種間プリオン感染の分子機構には不明な点が多く、例えばどのような構造をしたプリオン凝集体に異種間の感染力があるかは、いぜん不明である。本研究では、これまでに我々が独自に確立してきた、酵母プリオン Sup35NM¹⁾の NMR シグナルの帰属情報や、短期間で大規模なプリオン感染実験が可能な酵母の系²⁾を用いることが大きな特徴である。本研究では、酵母プリオンの系を用いた構造・細胞生物学的解析およびプリオン感染実験などを通して、異種間プリオン感染分子機構の解明を目指す(図1)。

B. 研究方法

本研究では、プリオン感染において種の壁が存在する遠縁の *S. cerevisiae* と *K. lactis*³⁾の二種類の酵母に着目する。酵母プリオンの系を用いて、*K. lactis* の Sup35NM 凝集体(アミロイド)のコアを形成するアミノ酸領域を質量解析から同定し、*S. cerevisiae* の Sup35NM アミロイドのコア領域と比較、検討する。また、超高磁場 NMR を用いて、約 270 アミノ酸からなる、*K. lactis* の Sup35NM モノマー蛋白質の NMR シグナルの帰属を行う。その帰属を用いて、*K. lactis*

の Sup35NM のモノマー構造の揺らぎをアミノ酸レベルで詳細に明らかにする。さらに、様々な条件下で作成した *K. lactis* の Sup35NM アミロイドと *S. cerevisiae* の Sup35NM モノマーとの共凝集の有無をアミロイドに特異的に結合するチオフラビン T の蛍光を用いて調べる。*In vitro* の実験で共凝集が観察された *K. lactis* の Sup35NM アミロイドを *S. cerevisiae* の非プリオン型(野生型)の酵母に導入し、異種間でのプリオン感染が起こるかどうか検討を行う。その実験で異種間感染能が認められた *K. lactis* の Sup35NM アミロイドや感染実験で生じたプリオン株の性質について、構造・細胞生物学的手法から明らかにする。

（倫理面への配慮）

ヒト試料を用いた研究は行っていないため、倫理面への配慮はない。

C. 研究結果

まず、共凝集に伴う Sup35NM の動的構造変化を調べるために、*S. cerevisiae* に加え、*K. lactis* の Sup35NM についても、ほぼ全ての主鎖アミドプロトン由来 NMR シグナルの帰属を行った(岐阜大学・桑田研究室との共同研究)。次に、*K. lactis* の Sup35NM アミロイドのコアを形成するアミノ酸領域を部分消化と質量解析で調べたところ、*S. cerevisiae* の Sup35NM アミロイド