

プリオンタンパク質の異常型構造への分岐とプリオン病の予防

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

研究協力者：本田 諒 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

山口圭一 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

研究要旨

ストップフロー法、連続フロー法、及びNMRによる水素・重水素交換反応を用いた詳細な速度論的解析により、プリオン蛋白質の巻き戻り過程は、U（変性状態）I（中間状態）A（MG状態）N（天然状態）の順に進むことが分かった。このとき、A状態は、オリゴマー形成への分岐点となる。A状態では、ヘリックスIは変性しており、ヘリックス 及び は、一部不安定化している状態にあることも分かった。従って、N型を安定化させ、A型生成を抑制する薬剤が、プリオン病の予防に役立つ。現在、治験に向けた準備が行われている P092 塩は、まさにこの作用点に働く治療薬候補化合物である。

A. 研究目的

感染性のプリオン蛋白質は凝集する。凝集体の全てが感染性を有するわけではないが、他のプリオンライクなタンパク質の凝集体も、多かれ少なかれ感染性を有することが明らかになってきている。従って、プリオン蛋白質が構造変化を起こした場合、どの段階から凝集体（オリゴマー）形成に進むのか？を原子分解能で知ることは、発症予防や治療薬設計の観点からも極めて重要である。

我々は、詳細な速度論的解析を行うことにより、天然構造とオリゴマー構造の分岐点に位置する構造がA型であることを突き止めた。

B. 研究方法

ストップフローや連続フローによる速度論的解析を主に用いた。また、NMR検出による水素・重水素交換、ゲル濾過HPLCによる凝集体のポピュレーション解析を用いた。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

プリオン蛋白質の巻き戻り過程は、U（変性状態）I（中間状態）A（MG状態）N（天然状態）の順に進む。このとき、A状態は、オリゴマー形成への分岐点となることが判明した。A状態では、ヘリックスIは変性しており、ヘリックス 及び は、一部不安定化している状態にある。

【考察】オリゴマーへの分岐点であるA状態が、天然状態の近傍に存在することが分かった。これは、わずかな環境変化による天然構造の揺らぎが、オリゴマー形成の引き金になることを示している。この微妙なバランスを、P092塩のような低分子化合物により変えることにより、異常型は激減すると考えられる。

D. 考察

N型を安定化させ、A型生成を抑制する薬剤が、プリオン病の予防に役立つ可能性がある。現在、治験に向かって進みつつあるP092塩には、このような性質があり、本研究によりその作用機序の一端がより明確になった。

E. 結論

新しく見出されたA型を直接の標的とするプリオン病の予防法開発が可能となる。

【参考文献】

該当なし

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表 (2015/4/1~2016/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Hosokawa-Muto J, Yamaguchi KI, Kamatari YO, Kuwata K. Synthesis of double-fluorescent labeled prion protein for FRET analysis. Biosci Biotechnol Biochem.2015 Nov;79(11):1802-9
- 2) Oroguchi Tomotaka, Sekiguchi Yuki, Kobayashi Amane, Masaki Yu, Fukuda Asahi, Hashimoto Saki, Nakasako Masayoshi, Ichikawa Yuichi, Kurumizaka Hitoshi, Shimizu Mitsuhiro, Inui Yayoi, Matsunaga Sachihiro, Kato Takayuki, Namba Keiichi, Yamaguchi Keiichi, Kuwata Kazuo, Kameda Hiroshi, Fukui Naoya, Kawata Yasushi, Kameshima Takeshi, Takayama Yuki, Yonekura Koji, Yamamoto Masaki. Cryogenic coherent X-ray diffraction imaging biological non-crystalline particles using the KOTOBUKI-1 diffraction apparatus at SACLA. J. Phys. B. 2015 48(18)184003.
- 3) Honda RP, Xu M, Yamaguchi KI, Roder

H, Kuwata K. A native-like intermediate serves as a branching point between the folding and aggregation pathways of the mouse prion protein. Structure. 2015 Sep 1;23(9):1735-42.

- 4) Ma B, Yamaguchi K, Fukuoka M, Kuwata K. Logical design of anti-prion agents using NAGARA. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Jan 22;469(4):930-5

2. 学会発表

【国際学会一般公演】

- 1) Kazuo Kuwata. Therapeutic approaches to prion disease and other neurodegenerative conditions associated with protein misfolding. Toward a first in human trial of a medical chaperone for prion diseases. Cold Spring Harbor Laboratory, America. Sep15-18,2015

【国際学会ポスター発表】

- 2) Kei-ichi Yamaguchi, Ryo P. Honda, Abdelazim Elsayed Elhelaly, Kazuo Kuwata : Continuous ultrasonication induces the rapid formation of mPrP aggregates. APPS2015 9月4日~5日 石川音楽堂、石川
- 3) Ryo P. Honda, Kazuo Kuwata : 'A-state' of PrP a branching point between the folding and misfolding pathways. APPS2015 9月4日~5日 石川音楽堂、石川
- 4) Yuji O.Kamatari, Junji Hosokawa-Muto, Kei-ichi Yamaguchi, Kazuo Kuwata : Strategy for elucidating abnormal structure of prion proteins using the

double-fluorescent labeling method and FRET analysis. APPS2015 9月4日～5日 石川音楽堂、石川

【国内学会・シンポジウムポスター発表】

- 5) 桑田一夫：Toward the First in Human Clinical Trial of Medical Chaperone for Prion Diseases 第56回日本神経学会学術大会 2015年5月20日～23日 朱鷺メッセ、ホテル日航新潟、新潟
- 6) Toshinobu Shida, Yuji Kamatari, Yoshiki Yamagushi, Kazuo Kuwata, Motomasa Tanaka : Structural Characterization of Two Distinct Yeast Prion Protein Interaction 第15回日本蛋白質科学会年会 2015年6月24日～26日 あわぎんホール、徳島
- 7) Kei-ichi Yamaguchi, Ryo P. Honda, Kazuo Kuwata : Molten globule state and misfolding of a prion protein 第15回日本蛋白質科学会年会 2015年6月24日～26日 あわぎんホール、徳島
- 8) Kazuo Kuwata : Elucidation of the pathogenic conversion mechanism of a prion protein, diagnosis and treatment

第15回日本蛋白質科学会年会 2015年6月24日～26日 あわぎんホール、徳島

【国内特別講演】

- 9) 桑田一夫：新しい in-silico 創薬の方法と実際、一網打尽創薬への挑戦、希少難病治療から始まる真の個別医療の未来へ TRI 講演会 2015年5月12日 先端医療振興財団臨床研究情報センター
- 10) 桑田一夫：戦略的 in silico 創薬によるプリオン病治療薬開発 革新的医療技術創出拠点プロジェクト統合戦略会議 2015年11月6日 日本医療研究開発機構（東京）

**H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む.)**

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他