

## プリオンタンパク質のモルテングロビュール状態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

プリオン蛋白質は、酸性側で、A型と名付けた特殊な構造をとる。A型では、ヘリックスとその周辺のシートがランダム化しているが、ヘリックスとヘリックスの構造は、部分的に保存されている。A型は、凝集体形成に至る直前の状態に近く、また、天然型に至る中間体の構造にも近い。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。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有効であろう、と考えられる。現在、治験に向けた準備が行われている P092 塩は、この作用点に働く治療薬候補化合物である。従って、プリオン病の予防に P092 塩を用いることができる、と考えられる。

### 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極めて重要である。

正常型プリオン蛋白質が細胞内経路で異常型に変換する場合、pHは酸性に保たれるという特徴がある。しかし、プリオン蛋白質が、酸性条件でどのような立体構造を取るか、ということは、これまで系統的に調べられて来なかった。それは、プリオン蛋白質が酸性で、

容易に凝集体形成を生じるためであった。

我々は、イオン強度を調整することにより、酸性側においても凝集体形成を生じない条件を見出したため、その立体構造変化を系統的に調べた。また、さらに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特殊な構造を特定することができた。また、このような特殊構造の詳細な解析から、プリオンの異常型形成を予防する手がかりを得ることができた。

### B. 研究方法

分光学的な方法（蛍光スペクトル、円偏光2色性スペクトル、NMR）及び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

酸性側(pH2)では、プリオン蛋白質は、モルテン・グロビュール状態となることが分かったため、我々は、これをA型と命名した。溶液のA型の分子数と凝集体形成速度は、log-logプロットすると直線となるため、A型が直接、凝集体形成に関与すると考えられ、また同時にその反応様式も絞ることができた。

NMRによる水素・重水素交換反応から、A状態では、ヘリックスIは変性しており、ヘリックスI及びIIは、一部不安定化している状態にあることがわかった。

また、ストップフロー、連続フローを用いた速度論的解析から、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。従って、A状態は、オリゴマー形成とN状態との分岐点となることが判明した。

### D. 考察

天然構造とオリゴマーとの分岐点にA状態が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、変化させることにより、異常型のポピュレーションを制御できると考えられる。

### E. 結論

P092塩のように、A型を直接の標的とするプリオン病の予防薬開発が、今後、可能となるだろう。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究発表(2014/4/1~2016/3/31 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 boill Chem.* 289(44),30355-30363,2014 Sep12
- 2) 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
- 3) Oroguchi Tomotaka, Sekiguchi Yuki, Kobayashi Amane, Masaki Yu, Fukuda Asahi, Hashimoto Saki, Nakasako Masayoshi, Ichikawa Yuichi, Kurumizaka Hitoshi, Shimizu Mitsuhiro, Inui Yayoi, Matsunaga Sachihito, 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.
- 4) 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.
- 5) 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・ポスター発表】

- 1) 桑田一夫 : Toward the First in Human Clinical Trial of Medical Chaperone  
APPS2014 2014年7月6日~7日 済州, 大韓民国
- 2) 桑田一夫、山口圭一 : Understanding the Prion Diseases and Logical Design of a Medical Chaperon / 二国間交流事業セミナー「蛋白質異常凝集の原理と制御 ( Mechanism and regulation of aberrant protein aggregation ) 」2014年11月19日 大阪大学蛋白質研究所, 日本
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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・シンポジウム一般講演・ポスター発表】

- 7) 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 2014年6月27日 ワークピア横浜/横浜産貿ホール
- 8) 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 2014年6月27日 ワークピア横浜/横浜産貿ホール
- 9) 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 2014年6月27日 ワークピア横浜/横浜産貿ホール
- 10) 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 2014年11月4日 大阪大学コンベンションセンター
- 11) 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 2014年11月26日~28日 神戸国際会議場
- 12) 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—

2015年2月14日 名古屋国際会議場

- 13) 桑田一夫：PB2 を標的とする新規抗インフルエンザウイルス薬の開発 第9回中部橋渡し研究支援シンポジウム 2015年12月17日 名古屋大学、愛知
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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】

- 10) 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
- 11) 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

該当なし