

プリオン蛋白質の安定性及び iPS 細胞の分化に伴うプリオン感受性の変化

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 岐阜大学大学院医学研究科分子病態学

エルヘラリ・アブデラジム

岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

研究要旨（プリオン蛋白質の安定性及び iPS 細胞とその分化系細胞におけるプリオン感受性に関する研究）

我々は、プリオン蛋白質が酸性側において‘A型’と呼ばれる特殊なモルテン・グロビュール状態をとることを突き止めた。さらにこのA型が、プリオン蛋白質のモノマーと凝集体との分岐点に位置することを明らかにした。A型構造は、プリオンの感染性獲得においても、重要な役割を果たしている、と考えられる。一方、プリオン蛋白質に超音波を照射すると、そのアミロイド形成速度はモノマー濃度に依存したが、リゾチームではそのような濃度依存性はみられなかった。これらのことは、プリオン蛋白質が酸性側において、特殊な構造変化による凝集体形成をする性質が特に高くなることを示している。これまで、マウス及びヒト iPS 細胞を用い、プリオン（ヒト GSS 由来 FK-1 株）の感染性を調べた結果、iPS 細胞の分化に伴いプリオン感受性が変化することが分かった。今後、iPS 細胞をさらに分化させ、細胞膜局所環境（ラフト形成など）の変化によるプリオン感受性への影響を、原子分解能で調べる予定である。

A. 研究目的（原子分解能におけるプリオン感受性の探求）

他家幹細胞等移植におけるプリオン感染を防止する予防薬を開発するため、iPS 細胞を様々な種類の細胞に分化させ、プリオンに対する感受性を調べ、原子分解能でそのメカニズムを解明する。まず、プリオン感染はラフトにおいて起きると考えられていることから、酸性環境において、プリオンタンパク質の立体構造や安定性がどのように変わるかを調べる。次に iPS 細胞の分化に伴うプリオン感受性の変化を調べることにより、原子分解能での感染メ

カニズムを解明する。

B. 研究方法

リコンビナントプリオンタンパク質の酸性側における構造変化や凝集過程を、蛍光、円偏光二色性（CD）スペクトル、NMR、ストップトフローCDなどの物理化学的測定を用いて、様々な条件で測定した。また、超音波を照射しながら CD、NMR をそれぞれ測定する「リアルタイム CD」、及び「リアルタイム NMR」を独自に開発した。また、細胞周辺におけるプリオン立体構造変化を直接観測するための In

Cell NMR 法を導入した。

iPS 細胞の分化では、文献で使用されている様々の手法を用いた。特に我々は、マウス iPS 細胞を PA6 細胞と共存させることにより、Neurosphere に分化させ、そのプリオン感受性を調べた。また、同様にヒト iPS 細胞を神経誘導因子により、Neural Stem Cell に分化させ、そのプリオン感受性を調べた。

(倫理面への配慮)

プリオン感染実験は、全て、P3 細胞感染実験室において行った。

C. 研究結果

プリオン蛋白質が酸性側において 'A 型' と呼ばれる特殊なモルテン・グロビュール状態をとることを突き止めた。さらにこの A 型が、プリオン蛋白質のモノマーと凝集体との分岐点に位置することを明らかにした。A 型構造は、プリオンの感染性獲得においても、重要な役割を果たしている、と考えられる。一方、プリオン蛋白質に超音波を照射すると、そのアミロイド形成速度はモノマー濃度に依存したが、リゾチームではそのような濃度依存性はみられなかった。これらのことは、プリオン蛋白質が酸性側において、特殊な構造変化を起こし、凝集体形成が促進されることを示している。これまで、マウス及びヒト iPS 細胞に対するプリオン(FK-1)の感染性を調べた結果、明らかな感染はみられなかった。しかし、これらを神経細胞の方向に分化させたマウス Neurosphere やヒト Neural Stem Cell においては、プリオン感受性が增大することが分かった。今後、iPS 細胞をさらに分化させ、細胞膜局所環境(ラフト形成など)の変化によるプリオン感受性の変化を in cell NMR 法などを用いて、原子分解能で

解明する予定である。

D. 考察

プリオンタンパク質が酸性側で構造変換し凝集しやすい性質を獲得することは、これが異常プリオンと相互作用した場合に容易に構造変化を起こし、異常型に変化しやすいことを意味する。従って、細胞のプリオン感受性は、プリオンタンパク質の発現量のみならず、そのような酸性環境に依存する可能性が高い。

今回、iPS 細胞においては、分化に伴いプリオン感受性が增大することが分かったが、これらは、プリオン蛋白質の発現量や、細胞表面、あるいは細胞内部の環境に原因があると考えられる。今後、In Cell NMR などを用いて、細胞表面あるいは細胞内環境におけるプリオン蛋白質の構造変化を測定し、異常構造変換の舞台を原子分解能で解明したい、と考えている。

また、近年の我々の研究(文献 4 - 6)より、不安定な蛋白質を選択的に安定化させる低分子化合物の設計が可能であることが、理論及び実験の両面から証明された。このような細胞表面あるいは細胞内部の特殊環境において特異的に作動する低分子シャペロンの設計を、上記メカニズムに基づいて設計することにより、プリオン感染予防に役立てたい、と考えている。

E. 結論

プリオン蛋白質が酸性側で構造変換し、凝集しやすい性質を獲得することが分かった。また、これまで、マウス iPS 細胞に対するプリオン(FK-1)の感染性を調べた結果、iPS 細胞の分化に伴い、感受性が変化することが分かった。今後、細胞膜局所環境(ラフト形

成など)の変化によるプリオン感受性の変化を in cell NMR 法などを用いて、原子分解能で解明する計画である。さらに、細胞表面あるいは細胞内部の特殊環境において特異的に作動する低分子シャペロンの設計を行い、他家幹細胞移植によるプリオン感染の予防薬を創製する予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Biao Ma, 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) Nongluk Sriwilaijaroen, Sadagopan Magesh, Akihiro Imamura, Hiromune Ando, Hideharu Ishida, Miho Sakai, Erika Ishitsubo, Takanori Hori, Setsuko Moriya, Takeshi Ishikawa, Kazuo Kuwata, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Hiroaki Hiramatsu, Kenji Tsukamoto, Taeko Miyagi, Hiroaki Tokiwa, Makoto Kiso, and Yasuo Suzuki, A Novel Potent and Highly Specific Inhibitor against Influenza Viral N1–N9 Neuraminidases: Insight into Neuraminidase–Inhibitor Interactions, *Journal of medicinal chemistry*, 2016 May 26;59(10):4563-77
- 3) Ferdausi Ali, Keiichi Yamaguchi, Mayuko Fukuoka, Abdelazim Elsayed Elhelely, and Kazuo Kuwata, Logical

design of an anti-cancer agent targeting the Plant Homeodomain (PHD) in Pygopus2, *Cancer Science*, 2016 Sep;107(9):1321-8

- 4) Kabir Aurangzeb, Ryo P. Honda, Yuji O. Kamatari, Satoshi Endo, Mayuko Fukuoka, and Kazuo Kuwata, Effects of ligand binding on the stability of aldo-keto reductases (AKR), *Protein Science*, 2016 Sep 6. doi: 10.1002/pro.3036
- 5) Kabir Aurangzeb, Satoshi Endo, Naoki Toyooka, Mayuko Fukuoka, Kazuo Kuwata, and Yuji O. Kamatari. Evaluation of compound selectivity of aldo-keto reductases using differential scanning fluorimetry. *Journal of Biochemistry* 2016 Dec 21. pii: mvw063. doi: 10.1093/jb/mvw063. [Epub ahead of print]
- 6) Satoshi Endo, Sayaka Takada, Ryo P. Honda, Kathrin Müller, Jochen H. Weishaupt, Peter M. Andersen, Albert C. Ludolph, Yuji O. Kamatari, Toshiyuki Matsunaga, Kazuo Kuwata, Ossama El-Kabbani, Akira Ikari, Instability of C154Y variant of aldo-keto reductase 1C3, *Chemico-Biological Interactions* 2016 Dec 23. pii: S0009-2797(16)30758-X. doi: 10.1016/j.cbi.2016.12.018. [Epub ahead of print] (2017)

2. 学会発表

【国際学会一般公演】

- 1) Kazuo Kuwata: The 11th China-Japan International Conference of Virology 7月1日～2日 四国の観音寺市(大阪

大学微研観音寺研究所)主催

- 2) Keiichi Yamaguchi, Yuji O Kamatari, Ryo P Honda, Kazuo Kuwata, Real-Time *In vitro* Conversion of Prion Protein Detected by NMR, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, August 21-26, 2016, Kyoto International Conference Center

【国際学会ポスター発表】

- 1) Satoshi Endo¹, Sayaka Takada¹, Ryo Honda², Kathrin Müller³, Yuji O. Kamatari⁴, Toshiyuki Matsunaga¹, Kazuo Kuwata², Jochen Weishaupt³, Akira Ikari¹, 18th International Workshop on the Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism Instability of C154Y variant of aldo-keto reductase 1C3 found in familial amyotrophic lateral sclerosis July 12-17, 2016 Costa Brava, Spain
- 2) Kazuo Kuwata, Logical design of a therapeutic agent for prion diseases, PRION 2016 Tokyo, 一ツ橋ホール 東京 *prion* S13-S14 May 10-13, 2016
- 3) Ryo P. Honda, Kei-ichi Yamaguchi, Kazuo Kuwata, Folding and misfolding pathways of prion protein, PRION 2016 Tokyo, 一ツ橋ホール 東京 *prion* S22 May 10-13, 2016
- 4) Toshinobu shida, Yuji O. Kamatari, Kazuo Kuwata, Motomasa Tanaka, A local conformation of natively disordered yeast prion monomer determines interspecies prion transmissibility, PRION 2016 Tokyo,

一ツ橋ホール 東京 *prion* S25 May 10-13, 2016

- 5) Kei-ichi Yamaguchi, Junji Hosokawamuto, Yuji O. Kamatari, Kazuo Kuwata, Calibration of ultrasonic power and conformational analysis of MoPrP amyloid fibrils, PRION 2016 一ツ橋ホール 東京 *prion* S41 May 10-13, 2016
- 6) Baio Ma, Kei-ichi Yamaguchi, Mayuko Fukuoka, Kazuo Kuwata, Discovery of anti-prion agents using PyMOL plugin-based logical drug design platform NAGARA, PRION 2016 一ツ橋ホール 東京 *prion* S46-S47 May 10-13, 2016

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