

平成 31 年 4 月 29 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09687

研究課題名(和文)人工プリオンを用いたプリオン病感染因子の解明

研究課題名(英文)Identification of synthetic prion protein-binding cofactors

研究代表者

佐野 和憲 (sano, kazunori)

福岡大学・薬学部・講師

研究者番号：50534343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：病原体プリオンは、脳内の正常型プリオンタンパク(PrP)から構造変換によって凝集・蓄積される異常型PrPが主要構成因子と推測されている。しかしながら、プリオンの正体は不明確なままであり、またPrP以外の因子のプリオン感染への関与についてもまだ議論のあるところである。研究代表者らはリコンビナントPrP(rPrP)のみだけで感染性を示す人工プリオンを作製したが、感染性が非常に低く、PrP以外の因子のプリオン感染に対する関与が示唆された。そこでナノ磁性微粒子を用いてrPrPに結合する因子を探索し、その因子の一つとしてPrPと同様に脳内において凝集・蓄積することが知られている因子Xを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プリオン病は指定難病に分類され、現段階において有効な治療方法は存在しない。治療法開発において、これまでの基礎研究ではPrPを標的にした研究が大多数であり、一方でPrP以外の因子に注目した研究は数少なく、このことがプリオン病の治療法開発を遅らせている大きな原因の一つであると考えられる。本研究においてPrPと結合する因子の同定に成功したことは、不治の疾患であるプリオン病の今後の病態解明、予防・治療法開発において貢献できるものであると期待でき、またプリオン病と同様に脳内に異常なタンパク質が蓄積する疾患であるレビー小体型認知症などの認知症の病態解明、予防・治療法開発への基盤ともなりうると考えている。

研究成果の概要(英文)：Although the pathogenic mechanisms have not been fully elucidated, prion disease is thought to occur through autocatalytic conversion of normal prion protein (PrP^C) to abnormal prion protein (PrP^{Sc}). We demonstrated that recombinant prion protein (rPrP) fibrils formed in vitro cause the accumulation of PrP^{Sc} in the brains of PrP-overexpressing transgenic (Tg) mice. This result suggests that rPrP can be converted into a PrP^{Sc}-like form in vitro. However, the infectious titers seem to be much lower than that of authentic PrP^{Sc}, suggesting that unknown cofactors are required for the propagation of prion infectivity. Using rPrP-immobilized FG beads, cofactor X, is known to accumulate in the brains, was identified as the specific binding proteins of PrP.

研究分野：神経分子病態学

キーワード：プリオン 感染症 リコンビナントタンパク質 ビーズ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プリオン病 (別名; 伝達性海綿状脳症) は病原体プリオンによって引き起こされる致死性の神経変性疾患であり、ヒトのクロイツフェルトヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease: CJD)、ヒツジのスクレイピー、牛の牛海綿状脳症 (Bovine Spongiform encephalopathy: BSE) などが代表的な疾患である。現在、病原体プリオンはウイルス、細菌などとは異なり、病原特異的な核酸を持たず、各動物種の中枢神経系に発現している正常型プリオンタンパク (PrP) から構造変換によって凝集・蓄積される異常型 PrP が主要構成因子と推測されている。しかしながら、病原体プリオンの純粋な分離精製にはいまだ成功しておらず、病原体の特定が不明確なままである。一方では、PrP 以外の因子の存在することを示唆する報告もなされているが、それら因子の存在についてはまだ議論のあるところであり、プリオン感染病態における役割も解明されていない。

2. 研究の目的

研究代表者らは以前に、大腸菌から精製した、正常型 PrP と同じ構造を持つリコンビナント PrP (rPrP) を試験管内で異常型に変換する方法 (Real-time Quaking-Induced Conversion; RT-QuIC) を確立し、この方法により rPrP のみだけで人工プリオンを作製することに成功した。しかしながら、人工プリオンは、病原体が得られた感染脳乳剤と比較して感染価が非常に低く、プリオン感染に PrP 以外の因子が関与することが示唆された。本研究は、rPrP 及び人工プリオンを利用して感染に関与する因子を解明し、プリオン病の病態解明、さらにその因子を標的とした治療薬探索へと臨床応用を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス rPrP を大腸菌に発現させ、Fast Protein Liquid Chromatography を用いて精製する。rPrP 精製の確認は、SDS-PAGE 後の CBB 染色、Western blot 法および LC-MS/MS を用いて行う。また、生体内の PrP と同じ二次構造かどうかの確認については、CD (circular dichroism: 円二色性スペクトル)、FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy: フーリエ変換赤外線分光分析装置) を用いて行う。

(2) 精製した rPrP を用いて RT-QuIC 反応を行い、異常型 rPrP を作製する。異常型 rPrP の感染性についてはプリオン感染に対して感受性の高い遺伝子改変マウス (tga20: PrP を過剰発現) を用いて確認し、感染性を示した異常型 rPrP を人工プリオンとして使用する。

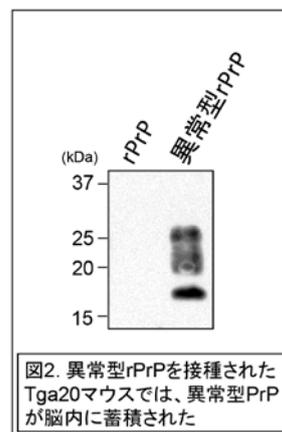
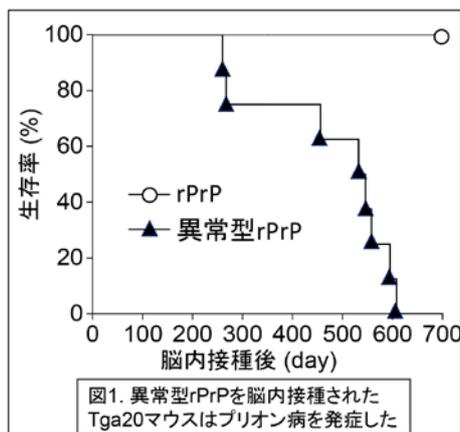
(3) アフィニティ担体である機能性ナノ磁性微粒子 (FG ビーズ) への rPrP あるいは人工プリオンの固定化を行い、マウス脳内において rPrP あるいは人工プリオンと相互作用する PrP 以外の因子を探索する。未固定 FG ビーズとの差異解析には SDS-PAGE 及び銀染色法を用い、因子の同定は LC-MS/MS を用いて行う。

(4) 同定した因子のリコンビナントタンパク質を精製し、その因子が脳内において PrP と相互作用を示すのか FG ビーズを用い検証する。また、その因子は脳内においてリン酸化体、多量体で存在していることが知られているので、試験管内でリコンビナントタンパク質を用いてその状態を再現し、そのリン酸化体および多量体がプリオン感染に関与するのかを解析する。

4. 研究成果

(1) rPrP 精製は Western blot 法および LC-MS/MS により確認され、その精製度は >99% であった。CD および FTIR により、rPrP は α ヘリックス構造を多く含み、正常型 PrP と同様の二次構造を示した。

(2) プリオン感染検体を用いず rPrP のみだけで、RT-QuIC により異常型 rPrP を作製し、その異常型 rPrP を脳内接種された tga20 マウスは、接種後 477.8 ± 139.9 日の生存期間を示し (図 1)、また脳内において異常型 PrP 蓄積が認められ (図 2)、プリオン病の発症が確認された。



(3) rPrP を固定化した FG ビーズにおいて、BCA 法により rPrP 固定化量は FG ビーズ 1mg 当たり 66.1 μg と算出された。その rPrP 固定化ビーズとマウス脳乳剤を混合後、磁器分離を行い、熱 (98°C) 及び塩 (1M KCl) により rPrP と結合する因子を含むサンプルを溶出した (図 3、サンプル①)。また対照群として、rPrP 固定化ビーズと 100mM KCl 緩衝液 (脳乳剤作製用緩衝液) を混合した群 (図 3、サンプル②)、未固定ビーズと脳乳剤を混合した群 (図 3、サンプル③) を用意し、同様の方法で溶出した。各々のサンプルを SDS-PAGE により分子サイズに応じて分離し、銀染色法により差異解析を行った。熱溶出及び塩溶出共にサンプル①において複数のバンドが検出され、そのうち 250、120、90、65、35、34、33、18、17、15 kDa にサンプル①特異的バンドが観察され、これらは rPrP と結合する因子由来のバンドであることが考えられた (図 3)。また Western blot 法では、これらのバンドは抗 PrP 抗体により検出されず、PrP 由来ではないことが示された (図 4)。一方、熱溶出及び塩溶出共にサンプル①、②において、45、23、12 kDa に抗 PrP 抗体陽性のバンドが検出され (図 4)、23 kDa バンドが PrP モノマー、45kDa バンドが PrP ダイマー、12kDa が一部切断を受けた PrP であることが推測された。

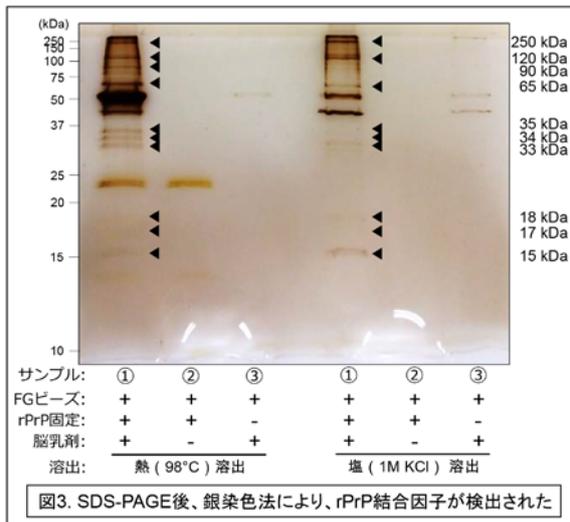


図3. SDS-PAGE後、銀染色法により、rPrP結合因子が検出された

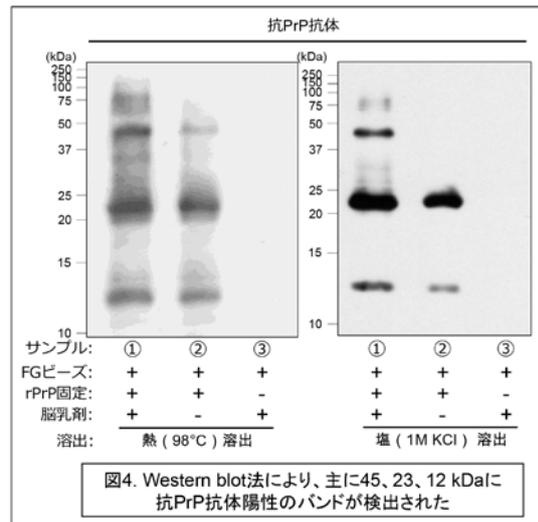


図4. Western blot法により、主に45、23、12 kDaに抗PrP抗体陽性のバンドが検出された

さらに、rPrP 固定化ビーズと脳乳剤との混合時に新たに rPrP を添加し、ビーズに固定化した rPrP と rPrP との結合が示唆された因子との結合が阻害されるかどうかを検証した (図 5)。rPrP 固定化ビーズと脳乳剤との混合時に、対照群として 10mM リン酸緩衝液 (rPrP 溶媒) を添加した群 (図 5、サンプル④)、新たに rPrP を添加した群 (図 5、サンプル⑤) を用意し、同様の方法で溶出した。熱溶出サンプルでは 17、15kDa、塩溶出サンプルでは 18、17、15kDa において、rPrP 添加による明らかなバンドの減弱が認められ、これらは rPrP と結合する因子由来のバンドであることがさらに強く示唆された (図 5)。

そこで、塩溶出サンプル④の銀染色後のゲルから 18、17、15kDa のゲル片を切り出し、LC-MS/MS を用いて因子の同定を行った。LC-MS/MS 解析により複数の因子が同定され、その一つに PrP と同様に脳内において凝集・蓄積することが知られている因子 X が含まれることが明らかとなった。また人工プリオンに結合する因子については、現在、探索・同定中である。

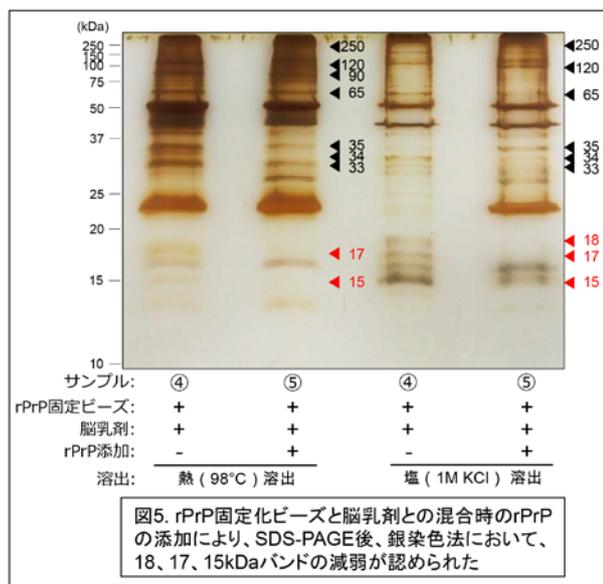


図5. rPrP固定化ビーズと脳乳剤との混合時のrPrPの添加により、SDS-PAGE後、銀染色法において、18、17、15kDaバンドの減弱が認められた

(4) 因子 X は脳内においてリン酸化体、多量体で存在していることが知られていることから、因子 X のリコンビナントタンパク質を精製し、試験管内でリコンビナントタンパク質を用いてリン酸化及び多量体の状態を再現した。現在、そのリン酸化体及び多量体のプリオン感染病態における役割を、マウス及び培養細胞を用いて解析している段階である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

Kazunori Sano, Ryuichiro Atarashi, Katsuya Satoh, Daisuke Ishibashi, Takehiro Nakagaki, Yasushi Iwasaki, Mari Yoshida, Shigeo Murayama, Kenichi Mishima, Noriyuki Nishida. Prion-Like Seeding of Misfolded α -Synuclein in the Brains of Dementia with Lewy Body Patients in RT-QuIC. *Molecular neurobiology*. 査読有. 55 巻. 2018. 3916-3930. DOI: 10.1007/s12035-017-0624-1.

〔学会発表〕（計 5 件）

- 1) 森山 祐平、佐野 和憲、平川 香織、窪 香澄、堀 有美子、明瀬 孝之、山下 郁太、入江 圭一、三島 健一、Phos-tag SDS-PAGE を用いたシヌクレイノパチー病原蛋白質 α シヌクレインのセリン/スレオニン-リン酸化解析、日本薬学会第 139 年会、2019
- 2) Kazunori Sano, Prion-like seeding of pathological α -synuclein in the brains of DLB in RT-QuIC, 1st Trento-Nagasaki Symposium, 2018
- 3) 佐野 和憲、 α -シヌクレインのプリオン様のシード依存的凝集反応、日本薬学会第 138 年会、2018
- 4) 平川 香織、佐野 和憲、新 竜一郎、佐藤 克也、岩崎 靖、吉田 眞理、入江 圭一、三島 健一、西田 教行、RT-QuIC を用いたレビー小体型認知症における異常 α -シヌクレインの高感度検出、第 36 回日本認知症学会学術集会、2017
- 5) Kazunori Sano, RT-QuIC of alpha-synuclein, Asian Pacific Prion Symposium, 2017

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。