

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18790

研究課題名(和文) 成熟プリオン蛋白には存在しないアミノ酸変異がプリオン蛋白異常化をおこす機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of prion protein conversion caused by an amino acid substitution in glycosylphosphatidylinositol anchoring signal peptide

研究代表者

小林 篤史 (Kobayashi, Atsushi)

北海道大学・獣医学研究科・准教授

研究者番号：50431507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性プリオン病を引き起こす遺伝子変異の中にM232R変異がある。この変異は成熟プリオン蛋白中には含まれないことからプリオン蛋白異常化との関連が疑問視されてきた。本研究ではM232R変異を持つモデルマウスを用いてプリオン感染実験をおこない、この変異がプリオン蛋白異常化を促進することを世界で初めて実証した。M232R変異がプリオン蛋白異常化を促進する理由を探るため、GPIアンカーが付加されなくなる可能性や細胞内局在が変化する可能性を検証したが、M232Rマウスと野生型マウスで差は見られなかった。今後はM232R変異がGPIアンカーの構造に影響を与える可能性について解析する必要があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A point mutation of methionine to arginine at codon 232 (M232R) of the prion protein (PrP) gene accounts for ~15% of Japanese patients with genetic prion diseases. The pathogenic roles of the M232R mutation in the induction of prion disease have remained elusive because the M232R mutation is located in the C-terminal signal peptide for glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchoring that is cleaved off from the mature PrP when the GPI anchor is attached. To elucidate the mechanisms for the induction of prion disease by the M232R mutation, we have performed transmission studies using PrP-humanized knock-in mice carrying the M232R mutation and have investigated the biochemical properties and subcellular localization of the M232R PrP in the present study. The mice expressing the M232R PrP were more susceptible to the transmission of human prion disease. Meanwhile, the expression level, GPI-anchoring, or the subcellular localization of the M232R PrP was not altered.

研究分野：神経病理学

キーワード：プリオン 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

プリオン病は正常型プリオン蛋白の立体構造が変化して異常型プリオン蛋白となり、脳内に蓄積することで起きる致死性の神経変性疾患である。ヒトプリオン病の中で最も多いのはプリオン蛋白異常化の原因が不明の孤発性プリオン病である。その一方、プリオン蛋白遺伝子変異が原因となり異常化が起きる遺伝性プリオン病は全体の約1割を占める。近年、その遺伝性プリオン病を起こす遺伝子変異の中に興味深い変異が見つかった。欧米には見られず、わが国を含むアジア諸国のみに見られる M232R という変異である。この変異の大きな特徴は、プリオン蛋白 C 末端のグリコシル ホスファチジル イノシトール アンカリング シグナルペプチド (GPI-SP) 中に存在するため、M232R 変異アレルから作られる成熟プリオン蛋白のアミノ酸配列は野生型と 100% 相同であるという点である。野生型と同じアミノ酸配列の成熟プリオン蛋白が作られるにもかかわらず、M232R 変異によってプリオン病が引き起こされる理由は分かっていない。

2. 研究の目的

本研究課題はプリオン病自然発病モデル動物を作製し、そのプリオン蛋白異常化機構を解明することを目的とする。本研究では遺伝性プリオン病の原因となるが成熟プリオン蛋白中には存在しないアミノ酸変異 M232R に着目し、この変異を有するモデル動物を作製して、プリオン蛋白異常化が起きる分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

成熟プリオン蛋白には存在しない M232R 変異がプリオン蛋白異常化を起こす機序を解明するため、本研究では申請者らが独自に開発したマウスを用いて下記の3点を明らかにする。

(1) M232R 変異を導入したヒトプリオン蛋白遺伝子を発現するノックインマウス (Ki-M232R マウス) はプリオン病自然発病モデルとなるのか?

Ki-M232R マウスを飼育し、削瘦、ふらつき、沈鬱などの症状を示すか経時的に観察をおこなう。発病したマウスの脳組織切片を作製し、病変の分布や異常型プリオン蛋白の沈着パターンを解析する。また、脳内に蓄積する異常型プリオン蛋白の生化学的性質を解析する。

(2) Ki-M232R マウスではプリオン感染の際にプリオン蛋白異常化が起こりやすいのか?

Ki-M232R マウスを用いてプリオン感染実験をおこない、M232R 変異によりプリオン蛋白異常化が促進されるのか調べる。Ki-M232R マウスと野生型ヒトプリオン蛋白遺伝子ノックインマウス (Ki-Hu) に孤発性プリオン由来のプリオンを脳内接種し、症状を経時的に観察する。発病したマウスを実験(1)と同様に解析する。

(3) M232R 変異は GPI アンカリング不全を起こしプリオン蛋白異常化を誘導するのか?

GPI-SP 中の M232R 変異はプリオン蛋白の GPI アンカリング不全を起こし、プリオン蛋白異常化を誘導するのではないかと、という仮説を検証するため、抗 GPI-SP 抗体によって GPI が付加されず GPI-SP を保持したままのプリオン蛋白を検出する。また、Triton X-114 相分離により M232R 変異プリオン蛋白が GPI アンカーを保持しているか解析する。さらに、M232R 変異がプリオン蛋白の脂質ラフトへの局在や細胞内局在を変化させるのかどうかを flotation assay ならびに免疫染色により解析する。

4. 研究成果

(1) M232R 変異を導入したヒトプリオン蛋白遺伝子を発現するノックインマウス

(Ki-M232R マウス)はプリオン病自然発病モデルとなるのか？

Ki-M232R マウスを寿命まで飼育したが、神経症状や脳内への異常型プリオン蛋白蓄積を示す個体はみられなかった。

(2) Ki-M232R マウスではプリオン感染の際にプリオン蛋白異常化が起こりやすいのか？

Ki-M232R マウスに孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病プリオン株 M1 を脳内接種すると、野生型 Ki-Hu マウスに比べて 100 日も早くプリオン病を発病することが明らかになった(図 1)。発病したマウスにおける病変や異常型プリオン蛋白の生化学的性質は Ki-M232R マウスと野生型 Ki-Hu マウスで同様であった。本研究結果により、成熟プリオン蛋白には存在しないアミノ酸変異 M232R がプリオン蛋白異常化を促進することを世界で初めて実証できた。

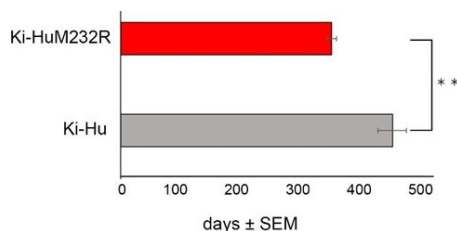


図 1 プリオン感染実験における潜伏期間

(3) M232R 変異は GPI アンカリング不全を起しプリオン蛋白異常化を誘導するのか？

M232R 変異によりプリオン蛋白の GPI アンカリング不全が起きるのかを検証するため、Triton X-114 相分離による GPI(+)プリオン蛋白の検出とプリオン蛋白 GPI-SP に対する特異抗体による GPI(-)プリオン蛋白の検出を試みた。すると M232R 変異をもつモデル動物でもプリオン病患者でも GPI-SP の切断および GPI アンカーの付加は正常におこなわれていることが明らかになった。

さらに、M232R 変異が GPI アンカーの性状を変化させることでプリオン蛋白の脂質ラ

フトへの局在や細胞内局在を変化させる可能性を検討したが、flotation assay や免疫染色におけるプリオン蛋白の分布に変化は見られなかった。今後は M232R 変異が GPI アンカーの構造へ影響を与える可能性について解析する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Ito Y, *Sanjo N, Hizume M, Kobayashi A, Ohgami T, Satoh K, Hamaguchi T, Yamada M, Kitamoto T, Mizusawa H, Yokota T. Biochemical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with valine-to-isoleucine substitution at codon 180 on the prion protein gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018; 496: 1055-1061. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.119 査読有
2. Munesue Y, Shimazaki T, Qi Z, Isoda N, Sawa H, Aoshima K, Kimura T, Mohri S, Kitamoto T, *Kobayashi A. Development of a quick bioassay for the evaluation of transmission properties of acquired prion diseases. *Neurosci Lett*, 2018; 668: 43-47. doi: 10.1016/j.neulet.2018.01.014 査読有
3. *Iwasaki Y, Saito Y, Aiba I, Kobayashi A, Mimuro M, Kitamoto T, Yoshida M. An autopsied case of MV2K + C-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease presenting with widespread cerebral cortical involvement and Kuru plaques. *Neuropathology*, 2017; 37: 241-248. doi: 10.1111/neup.12350 査読有
4. Sehgal A, Kobayashi A, Donaldson DS, *Mabbott NA. c-Rel is dispensable for the differentiation and functional maturation of M cells in the follicle-associated

epithelium. *Immunobiology*, 2017; 222: 316-326. doi:

10.1016/j.imbio.2016.09.008 査読有

5. Takeuchi A, Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Morita M, Uno S, *Kitamoto T. Distinctive properties of plaque-type dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in cell-protein misfolding cyclic amplification. *Lab Invest*, 2016; 96: 581-587. doi: 10.1038/labinvest.2016.27 査読有
6. Kobayashi A, Matsuura Y, Iwaki T, Iwasaki Y, Yoshida M, Takahashi H, Murayama S, Takao M, Kato S, Yamada M, Mohri S, *Kitamoto T. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease MM1+2C and MM1 are identical in transmission properties. *Brain Pathol*, 2016; 26: 95-101. doi: 10.1111/bpa.12264 査読有
7. Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Mohri S, *Kitamoto T. Neuropathological and biochemical criteria to identify acquired Creutzfeldt-Jakob disease among presumed sporadic cases. *Neuropathology*, 2016; 36: 305-310. doi: 10.1111/neup.12270 査読有

【学会発表】(計 16 件)

1. Kobayashi A. Diagnostic approaches for acquired Creutzfeldt-Jakob disease MMiK, 日本認知症学会・シンポジウム, 英語, 金沢, 2017.
2. Kobayashi A. Diagnostic approach for a novel acquired CJD subgroup, acquired CJD-MMiK, Asian Pacific Society of Prion Research・シンポジウム, 英語, オーストラリア・メルボルン, 2017.
3. Kobayashi A. Mechanisms of transmission of prion diseases, 日本神経学会・シンポジウム, 英語, 神戸, 2016.

4. Kobayashi A. Iatrogenic transmission of Creutzfeldt-Jakob disease, PRION・特別講演, 英語, 東京, 2016.

【図書】(計 2 件)

1. Kobayashi A, Kitamoto T, Mizusawa H. Elsevier. *The Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 153, Human Prion Diseases (Edited by Pocchiari M and Manson J). 2018 (in press).
2. 小林篤史. 中外医学社. *Clinical Neuroscience*, 36 巻 2 号, ニューロジェネティクス新時代 - 次世代シーケンサーが拓く新しい世界 (小林靖編). 2018. 総ページ数 106 (分担ページ 236-237).

【産業財産権】

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

【その他】

ホームページ等

北海道大学大学院獣医学研究院比較病理学
教室

<https://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/comp-pathol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 篤史 (Kobayashi Atsushi)

北海道大学・大学院獣医学研究院・准教授

研究者番号：50431507

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()