

令和 3 年 6 月 26 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07393

研究課題名（和文）孤発性および遺伝性プリオン病におけるプリオン自発的生成機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of spontaneous prion production in sporadic and familial prion diseases

研究代表者

今村 守一（IMAMURA, MORIKAZU）

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：10391442

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、組換えプリオン蛋白質および遺伝性プリオン病の原因遺伝子変異を導入した組換えプリオン蛋白質をプリオン様構造に効率的に自発変換させる試験管内系を確立した。それらの産物はバイオアッセイから実際にプリオンとして機能することが示されたことから、孤発性および遺伝性プリオン病の試験管内モデルの構築に成功したと結論づけた。また、この試験管内プリオン自発生成系を応用し、性状が異なるプリオン株が生成する要因のひとつに構造変換に関わる補因子の組成の違いがあることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では、孤発性および遺伝性プリオン病の試験管内モデルの構築に成功した。この実験系は、未だ明らかになっていない正常プリオン蛋白質からプリオンへの構造変換メカニズムを解明するために非常に有用である。さらに、この実験系はプリオン病の治療・予防薬のスクリーニング系として用いることができる。その他に本課題では、性状が異なるプリオン株が生成する要因のひとつに構造変換に関わる補因子の組成の違いがあることを明らかにした。この結果は、ある種類の動物種から異なる性状をもつプリオン株が複数生じるメカニズムを解明するための重要な手がかりになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established an in vitro system for efficient spontaneous conversion of recombinant prion protein and recombinant prion protein carrying the causative gene mutation of familial prion diseases into prion-like structures. Bioassays showed that these products actually functioned as prions, and we concluded that we had successfully constructed an in vitro model of solitary and hereditary prion diseases. We also applied this in vitro prion spontaneous generation system to reveal that one of the reasons for the generation of prion strains with different properties is the difference in the composition of cofactors involved in structural transformation.

研究分野：ウイルス学

キーワード：孤発性プリオン病 遺伝性プリオン病 プリオン 試験管内変換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在プリオン病に対する有効な予防法・治療法は確立しておらず、一刻も早い予防法・治療法の開発が求められている。ヒトのプリオン病は、原因不明に自然発生する孤発性プリオン病とプリオン蛋白質遺伝子変異が原因で発生する遺伝性プリオン病が97%を占める。これらのプリオン病は、正常プリオン蛋白質(PrP^C)または遺伝子変異PrP^Cが脳内で自発的に異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})に構造変換することによって発症するが、これらの自発変換メカニズムは明らかになっていない。プリオンの自発変換メカニズムを明らかにするためにはプリオンの試験管内自発生成系を構築することが有効であると考えられる。2001年に健常動物由来脳乳剤をPrP^C供給源としてインキュベーションと超音波処理を繰り返すことで極微量のPrP^{Sc}を試験管内で爆発的に複製させる方法(Protein misfolding cyclic amplification ; PMCA)が開発された。PMCA法は脳内で起こるPrP^{Sc}の増幅を模倣していると考えられ、PrP^CからPrP^{Sc}への変換メカニズムの解明に向けた研究に利用されている。このPMCA法を用いてPrP^{Sc}の試験管内自発生成が可能であることが4例報告されている。しかしながら、どの方法もPrP^{Sc}の自発生成をコントロールできず、生成は偶然に任せるしかなかった。また、3例は野生型のPrPだけが用いられており(Deleault *et al.*, 2007, Wang *et al.*, Science 2010, Kim *et al.*, Journal of Biological Chemistry 2010) 残り1例は遺伝性プリオン病の原因遺伝子変異を導入したrPrPと野生型rPrPが使われていたが、野生型rPrPはPrP^{Sc}に変換できなかった(Elezgarai *et al.*, Scientific reports 2017)。したがって、申請者が目指す孤発性および遺伝性プリオン病の発症モデルとなる、PrP^{Sc}の試験管内自発生成系の構築には、これまでに成功していなかった。申請者らは、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系により発現させた組換えプリオン蛋白質(Bac-PrP)が脳由来の内因性PrP^Cと同様にPMCAによりPrP^{Sc}に構造変換することを示した(Imamura *et al.*, Journal of Virology 2011)。さらに、申請者らは哺乳類由来因子を必要としない、昆虫細胞由来因子のみ(プロテアーゼ・熱処理昆虫細胞液と粗精製Bac-PrP)でPrP^{Sc}の試験管内増幅が可能であることを明らかにしている(insect cell-PMCA; Imamura *et al.*, PLOS ONE 2013)。さらに申請者らはinsect cell-PMCA通常反応温度(37℃)より高温(45℃)で行うことでPrP^{Sc}様プロテアーゼ抵抗性Bac-PrPが自発生成することを示している。

2. 研究の目的

本研究はPrP^{Sc}の試験管内自発生成系を構築することにより、PrP^Cおよび遺伝性プリオン病の原因となる遺伝子変異を導入した変異PrP^CがPrP^{Sc}へと自発的に構造変換する分子メカニズムを解明することを目的とする。PrP^{Sc}の自発生成機構を解明することにより、孤発性および遺伝性プリオン病の発症メカニズムを明らかにし、最終的にはこれらのプリオン病の予防・治療法の開発に繋げる。

3. 研究の方法

本研究では、孤発性および遺伝性プリオン病の発症メカニズムを模倣する、PrP^{Sc}を試験管内で自発生成する系を確立し、PrP^{Sc}の自発生成機構を解明するため、以下の3項目を行うことを計画した。

(1) Bac-PrPをPrP^{Sc}様構造へ高効率に自発変換するようにinsect cell-PMCA法を改良する。

我々は、Insect cell-PMCAにおいて反応温度を37℃から45℃に上げることによりPrP^{Sc}非存在下においてもBac-PrPがPrP^{Sc}様構造に100%の確率で自発変換することを明らかにしている(未発表)。しかしながら、変換効率が低かったため、より少ない連続増幅操作で安定かつ高効率でPrP^{Sc}様Bac-PrPが自発生成するよう、insect cell-PMCAの反応条件を検討した。

(2) Insect cell-PMCAを基にした自発生成系により得られたPrP^{Sc}様Bac-PrPについて感染性の有無を含む性状解析を行う。

孤発性プリオン病のモデルとして野生型Bac-PrP、遺伝性プリオン病のモデルとしてゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病(GSS)の原因変異を導入したP101L Bac-PrPから45℃insect cell-PMCAによりPrP^{Sc}様Bac-PrPを自発生成させた。自発生成したPrP^{Sc}様Bac-PrPの生化学的性状をウエスタンブロット法により解析した。さらに、生成したPrP^{Sc}様Bac-PrPの感染性の有無や既知のプリオン株との異同を調べるため、野生型マウスへの接種試験を行った。

(3) Bac-PrP^{Sc}の試験管内自発生成に必要な補助的因子を同定する。

PrP^CからPrP^{Sc}への変換には、PrP^CとPrP^{Sc}以外に補助的因子を必要とするが、それらはまだ明らかになっていない。自発生成機構を明らかにするには、基質となるBac-PrP以外に構造変換に必要な補助的因子をすべて同定する必要がある。そこで、これまでに構造変換に関わ

ることが報告されている生体分子をターゲットとして、これらが補助的因子として機能するかを調べる。具体的には、各種候補分子を組み合わせた PMCA 反応液を調製し、自発生成するか否かを Bac-PrP を基質とした PMCA を行うことで調べた。

4. 研究成果

Insect-cell PMCA において、バキュロウイルス-昆虫細胞由来組換えマウスプリオン蛋白質 (Bac-PrP) からプリオン様構造の指標となるプロテアーゼ抵抗性構造 (Bac-PrPres) へ効率的に変換する条件を検討した。まず、複数ある PMCA 装置の自発生成効率を比較した。その結果、PMCA を繰り返す連続増幅なしで Bac-PrPres が生成し、最多でも 2 回連続 PMCA を行うことで PrPres が生成した。以前は最小 2 回、最多 16 回連続増幅する必要があったことから比較すると、かなり効率が改善した。

Insect-cell PMCA により野生型 Bac-PrP および遺伝性プリオン病である GSS の原因変異を導入した P101L Bac-PrP をプロテアーゼ抵抗性構造へ変換させた。その結果、P101L Bac-PrPres の分子量は野生型マウス Bac-PrPres より数 kDa 大きくなっており、1 アミノ酸置換により Bac-PrPres の立体構造が変化することが示唆された。次に、野生型マウス Bac-PrPres と P101L Bac-PrPres が感染性をもつか否か、さらには、P101L Bac-PrPres 接種個体が発症した場合 GSS に似た症状を示すかを検討するため、C57BL6J マウスに脳内接種した。その結果、接種から 680 日経過した現在、野生型 Bac-PrPres を接種したマウス 6 匹全頭が致死したのに対し (平均生存期間 525 日 ± 173 日) P101L Bac-PrPres を接種したマウスについては 6 匹中 3 匹が致死し (平均生存期間 641 日 ± 13.3 日) 残り 3 匹は生存している。ヒトプリオン病の場合、野生型 PrP^C が自発生成して発症する孤発性プリオン病は進行が早く、発症から 1-2 年で死亡するのに対し、GSS では発症から 2-10 年後に死亡する。このように P101L Bac-PrPres 接種個体の方が野生型 Bac-PrPres 接種個体より生存期間が延長していたことは、ヒトにおける孤発性プリオン病と GSS の生存期間との関係とよく相関しており、本実験系が孤発性および遺伝性プリオン病の試験管内自発生成モデルとして適していることを示唆している。どちらの発症マウスの脳にもごく微量の PrP^{Sc} が蓄積しているのみで、既知のマウス順化プリオン株 PrP^{Sc} を接種した場合とは明らかに異なっていた。蓄積量が微量なため PrP^{Sc} のバンドパターンの比較等生化学的性状解析が進んでいない。今後発症マウスの脳乳剤を再度 C57BL6J マウスに接種し (第二世代継代) マウスに順化した状態で生化学的、病理学的性状解析を行う必要がある。自発生成した P101L Bac-PrP^{Sc} がヒトの GSS プリオンと同様の性状を示した場合、遺伝性プリオン病の試験管内モデルが構築できたといえるだろう。

ポリアニオン等の複数の既知生体分子のみで構成した PMCA により通常反応温度でも Bac-PrPres が自発生成することを示した。さらに、異なる補因子の組み合わせで PMCA を行うと、それぞれ異なるタイプの Bac-PrPres が生成することを明らかにした。自発生成した 4 種類の異なるタイプの Bac-PrPres を野生型マウスへ接種したところ、接種から 630 日以上ですべての実験区でプリオン病の発症または脳内での PrP^{Sc} の蓄積が認められた。そのうちのひとつは既知プリオン株である Fukuoka-1 株と非常によく似ていたが、それ以外の 3 株は互いに異なっており、さらに、既知のマウス順化プリオン株とも異なっていると考えられた。現在接種マウス脳内に蓄積した PrP^{Sc} の生化学的性状の解析を行っている。これまでの実験結果から、異なる補因子の組み合わせで異なるプリオンが生成する可能性が示された。このことは、一次構造は同一であるが性状が異なる「プリオン株」が生成する原因を示唆している。PrP^C から PrP^{Sc} の自発的構造変換の過程でそれぞれの補因子は構造変換を促進するが、PrP^C または PrP^{Sc} の異なる位置に結合する等作用点異なることで異なる立体構造に変換する要因であると考えられる。

以上のように研究期間中に当初計画した研究を完遂することはできなかった。しかしながら、遺伝性プリオン病の試験管内モデルの構築にはほぼ成功し、プリオン株が生成する要因のひとつに構造変換に関わる補因子の組成の違いがあることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuura Y, Miyazawa K, Imamura M, Yokoyama T, Iwamaru Y.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 First case of atypical scrapie in a goat in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci.	6. 最初と最後の頁 986-989
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.18-0710.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Imamura M, Miyazawa K, Matsuura Y, Iwamaru Y, Kitamoto T, Mohri S, Takatsuki H, Mori T, Atarashi R
2. 発表標題 Isolation of hidden minor prion conformers from classical scrapie isolates in advanced protein misfolding cyclic amplification in the presence of arginine ethyl ester.
3. 学会等名 APPS2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Imamura M, Tabeta N, Matsuura Y, Iwamaru Y, Kitamoto T, Ma J, Mohri S, Murayama Y, Takatsuki H, Mori T, Atarashi R
2. 発表標題 Simultaneous addition of digitonin, heparin and arginine ethyl ester improves in vitro amplification of PrPSc derived from various prion strains.
3. 学会等名 APPS 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Imamura M, Tabeta N, Matsuura Y, Iwamaru Y, Kitamoto T, Ma J, Mohri S, Murayama Y, Takatsuki H, Mori T, Atarashi R
2. 発表標題 Highly sensitive detection of PrPSc derived from various prion strains by simultaneous addition of digitonin, heparin and arginine ethyl ester to protein misfolding cyclic amplification.
3. 学会等名 Prion 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Miyazawa K, Yokoyama T
2. 発表標題 In vitro approach to estimate the human transmission risk of prions
3. 学会等名 Prion 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------