

平成21年3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19500339  
 研究課題名（和文） クロイツフェルト・ヤコブ病関連分子 14-3-3 タンパク質の3次元可視化構造解析  
 研究課題名（英文） Three-dimensional structural analysis of Creutzfeldt-Jakob disease-related molecules

研究代表者  
 諸根 信弘（MORONE NOBUHIRO）  
 国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部・室長  
 研究者番号：50399680

研究成果の概要：クロイツフェルト・ヤコブ病の感染に関わる分子としては、プルシナー博士による「タンパク質仮説」が有力視されているが、詳しい素過程は解明されていない。本研究では、この診断マーカーである「14-3-3とタンパク質」がミトコンドリアに濃縮していることや、シャペロンタンパク質との複合体形成が「膜中コレステロール濃度の低下」や「アクチンフィラメントの脱重合」により解離することを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：脳神経疾患、タンパク質、細胞・組織

## 1. 研究開始当初の背景

(1) クロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jacob disease (CJD) の感染機構としては、当初ウイルスによると考えられたが感染物質中に核酸が含まれていないために否定された。その後、プルシナーによる「タンパク質仮説」(Prusiner et al., 1998)が有力視されるよう

になる。これによれば、プリオンのような病因タンパク質には3次元構造のみが異なる2種類の異性体が存在し、神経細胞の膜に存在し、 $\alpha$ ヘリックス構造に富む正常型は、プリCJDの病態進行に伴い、 $\beta$ シート構造率の高い、不溶性のプロテアーゼ耐性を持つ病原性型が形成される。この概観としては、体外か

ら侵入した病原性型が細胞内在性の正常型の鑄型となって病原性の立体構造が連鎖的に繋がることで感染すると考えられている。しかし、この実態は解明されていない。この仮説の最大の問題点のひとつは、「正常型から病原性型への高次構造変換機構」が明確でないことにある。

(2) 一方で最近、CJD の髄液に検出される 14-3-3 と呼ばれるタンパク質が注目され、CJD 診断の生化学マーカーとして利用されている。この 14-3-3 タンパク質は中枢神経系の組織細胞には通常発現しているが、CJD では 14-3-3 タンパク質は髄液に流出してしまう。この原因もいまだ全く解明されていない。

## 2. 研究の目的

(1) CJD の病態素過程で、正常型の病因タンパク質の 3 次元構造が急変して悪性化する機構は、ある種のタンパク質のフォールディング異常である。そのため、シャペロンなどの分子が悪性化過程に関与している可能性があり、病因タンパク質分子等々の構造変換が機能変化 (= 機能異常) を誘起していると考えられるが、現在でも解かれていない。そのため、私たちは「14-3-3 とタンパク質」に注目して、未分化の神経幹細胞を材料に、病因タンパク質の集まりについて以下の点を明らかにしたい。この際、超薄電子顕微鏡法や徳安法に加えて、世界に先駆けて私たちが開発したナノサイズのドメイン可視化法 (Morone et al., 2006) の応用を検討した。

① 病因タンパク質分子の高次構造変換の場が細胞形質膜あるいは内膜、細胞質のどこにあるか？

② 14-3-3 とタンパク質の集まりは、細胞質内

部の何処に濃縮ドメインを形成しているのか？

③ 14-3-3 とタンパク質の集まりは、電子顕微鏡でどのように可視化できるのか？

④ 病因タンパク質分子の悪性化 (= 線維状化) と 14-3-3 タンパク質複合体への結合 / 解離との関係を注目して、CJD の感染機構で有力視されている「タンパク質仮説」を検証できるか？

## 3. 研究の方法

### (1) 病因タンパク質集合体の細胞内分布

多成分系の免疫電子顕微鏡観察によって、「病因タンパク質の複合体」を分類した。14-3-3 とタンパク質や各種シャペロン分子に対する抗体 (異なる粒径の金コロイド吸着済み) で免疫染色した超薄切片試料を電子顕微鏡で観察した。この多成分系で、病因タンパク質の集まりを区別し、その各々の分子複合体の相関分布を調べた。病因タンパク質に関係する 14-3-3 となどの単成分系、あるいは多成分系からなる「病因タンパク質の複合体」の局在が高密度である領域を「病因タンパク質の高次構造変換の場」と仮定できるか検討した。

### (2) 病因タンパク質集合体の局在分布に対する膜状態の影響

① 細胞膜中コレステロール濃度変化の影響 : 神経細胞を methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) 処理することで、膜中のコレステロールを細胞外へ抽出し、膜の相構造を変化させた。この処理前後で、14-3-3 とタンパク質等々に対する抗体 (直径 1.5~5nm 金コロイド吸着済み) により免疫染色した試料を「急速凍結・ディープエッチ・免疫フリーズレプリカ電子

顕微鏡法」で観察し、「病因タンパク質の集まり」の細胞形質膜上での局在分布を調べた。細胞質内部の内膜系に対しては、急速凍結→凍結置換→水溶性樹脂包埋→超薄切片→免疫染色後に、電顕観察した。

#### ②細胞骨格形成の影響

細胞を Latrunculin-A や Cytochalasin-D で処理することで、アクチン線維を部分的脱重合させた。一方、Jasplakinolide 処理することでアクチンを安定化させた。このような処理の前後で、病因タンパク質複合体の分布を電子顕微鏡観察により調べた

#### 4. 研究成果

クロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jacob disease, CJD) の感染に関わる分子としては、プルシナー博士による「タンパク質仮説 (1998)」が有力視されているが、詳しい病態は解明されていない。本研究では、この病因タンパク質の高次構造の変換機序を理解するために、組織細胞内での構造変換の場や、ここで相互作用するタンパク質を明らかにすることを目的とした。私たちは、CJD の診断マーカーである「14-3-3とタンパク質」に注目して、ヒト由来神経前駆細胞での局在や他の分子との複合体形成について、電子線構造解析の点から検討した。培養状態にある活きた細胞を液化ヘリウムで冷却した純銅に圧着することで急速凍結をおこない、細胞構造やタンパク質の局在を瞬時に固定した。免疫超薄切片法や徳安法により、14-3-3とタンパク質が、ミトコンドリアに濃縮していること、シャペロンタンパク質等と形成した複合体形成との相関性があることが構造解析により初めて示された。この 14-3-3とタンパク質複合体は、「脂質ラフトの細胞膜ドメイン」

に特徴的な「膜中コレステロール濃度の低下」や「アクチンフィラメントの脱重合」により解離する傾向があることも明らかにされた。以上のように、細胞内電子線構造解析により、病因タンパク質の高次構造変換の局所場がミトコンドリア上の脂質ラフトドメインであることが提案され、CJD の感染・病態の新たな素過程が解明されたと考えられる (投稿準備中)。

#### 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 3 件)

① Morone N, Nakada C, Umemura Y, Usukura J, Kusumi A. Three-dimensional molecular architecture of the plasma-membrane-associated cytoskeleton as reconstructed by freeze-etch electron tomography. *Methods Cell Biol.* 査読無. 88 (2008) 207-36.

② 木森義隆, 諸根信弘, 片山栄作. *Mathematical morphology* に基づくバイオイメージからの構造情報の抽出解析. *顕微鏡.* 査読有. 44 (2008) 1-6.

③ Kobayashi T, Morone N, Kashiya T, Oyamada H, Kurebayashi N, Murayama T. Engineering a novel multifunctional green fluorescent protein tag for a wide variety of protein research. *PLoS ONE.* 査読有. 3 (2008) e3822.

[学会発表] (計 2 件)

① Morone N, Wakui F, Kohno T, Yamamura T, Satoh J, and Yuasa S. GPI-Anchored Protein And Membrane Structure Inside Human Neural Progenitors. The 5<sup>th</sup> international

Forum on Oxidative Stress and Aging (2008)

Ancona Italy.

- ② Morone N, Wakui F, Kohno T, Kimori Y,  
Yuasa S. GPI-anchored Protein's complex and  
membrane skeleton in human neural  
progenitors as revealed by electron microscopy.  
The 48th annual meeting of the American  
Society for Cell Biology (2008) San Francisco  
USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特にありません。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

諸根 信弘 (MORONE NOBUHIRO)

国立精神・神経センター神経研究所微細構  
造研究部・室長

研究者番号：5 0 3 9 9 6 8 0

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし