

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22600

研究課題名(和文) 孤発性プリオン病の再現-液相分離から感染性アミロイドを作成する

研究課題名(英文) Replication of sCJD in vitro

研究代表者

西田 教行(Nishida, Noriyuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：40333520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン病の病原体、プリオンは異常型プリオンタンパク(PrP^{Sc})を主体とする。どのようなきっかけで最初のPrP^{Sc}が体内に生成されるか不明である。我々はデキストランとポリエチレングリコールを同時に使用することで、プリオンタンパク(PrP)を試験管内で液-液相分離させ、アミロイドゲル(rPrPゲル)を形成させることに成功した。このrPrPゲルはプロテアーゼK抵抗性であることや、チオフラビンTと結合するなど、PrP^{Sc}と似た性質を示した。試験管内での構造変換促進(シード活性)や動物への感染性は示さなかったものの、液-液相分離がPrP^{Sc}出現の最初のステップとなる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プリオン病の原因である異常型プリオンタンパクは、正常型プリオンタンパクの構造が異常化したものとされている。しかし、どのように異常化するのかが明らかになっていない。近年では様々なタンパク質が液相分離によって性質が変化し、凝集することが知られている。今回の研究では、プリオンタンパク(PrP)の液相分離を試験管内で再現することに成功した。また、このPrPは不溶性で凝集体を形成するなど、異常型プリオンタンパクと似た性質を有していた。これらの結果から、異常型プリオンタンパク形成には液相分離が関与していることが示唆され、プリオン病発症のメカニズムの一旦が明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：The pathogen of prion diseases, "prion", is mainly composed of abnormal prion protein (PrP^{Sc}). It is unknown how the first PrP^{Sc} is produced in the body. We have successfully induced liquid-liquid phase separation of prion protein (PrP) to form an amyloid gel (rPrP gel) in vitro by using dextran and polyethylene glycol. This rPrP gel exhibited properties similar to those of PrP^{Sc}, including protease K resistance and binding to thioflavin T. Although it did not show conformational conversion of normal prion protein (seeding activity) in vitro or infectivity in animals, the liquid-liquid phase separation can be the first step in the emergence of PrP^{Sc}.

研究分野：ウイルス学

キーワード：プリオン病 液相分離 アミロイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プリオン病は正常型プリオンタンパク(PrP^{C})が構造変換した異常型プリオンタンパク(PrP^{Sc})がアミロイドを形成して中枢神経系に蓄積し、神経細胞死を引き起こす。 PrP^{Sc} はシート優位の構造をもち、 PrP^{C} の構造変換を促進することで増殖する。ヒトプリオン病は孤発性、遺伝性、獲得性に分類されるが、およそ75%は孤発性であり、 PrP^{Sc} がどのようにして生じるかわかっていない。

大腸菌から作製したリコンビナントプリオンタンパク(rPrP)に振盪を加えることで構造変換が促進され、人工アミロイドを形成することができる。しかし、我々の研究室で作製した人工アミロイドは感染性を示さなかった。本法では激しい振盪によって rPrP の基本構造を破壊するため、感染性を持つに至らなかったと考えられる。つまり、感染性を持つアミロイドの生成には、 PrP の生理学的特性を維持しつつ、構造変換を促進する必要があると考えられる。

生体内の蛋白質は、細胞内の体積比の大半を占め、いつ凝集してアミロイドを形成してもおかしくない状況にある。この時、蛋白質は天然変性領域(intrinsically disordered regions: IDRs)を介して液相として振舞うことで生理学的活性を保ちつつ凝集を回避している。しかし、液相の蛋白質は互いに重合しているため、条件が揃えば、IDRは集合してクロスシート構造を形成する。アミロイド形成タンパク質の異常な相転移は、病的なアミロイド合成を促進すると考えられる。この現象は、アルツハイマー病のタウタンパク質や筋萎縮性側索硬化症のRNA結合タンパク質FUSなど、病原性アミロイドによる神経変性疾患の発症に関連することが報告されている。この様な事例からも、液相分離がタンパク質の異常化のファーストステップとなりうると考えられる。

我々は、異なる2つのポリマー間のより強い体積排除効果により PrP の液相分離が誘導できると考え、デキストラン(DEX)とポリエチレングリコール(PEG)を用いたaqueous two-phase system(ATPS)に rPrP を加えたところ、直後からポリマー分画の境界に液滴が出現した。DEXとPEGの割合、塩等の条件を検証し、安定して効率よく液相分離がおこる条件を見出した。

2. 研究の目的

液相分離によって試験管内で作成した rPrP の液滴の性状を検討し、タンパク質の異常化と感染性の獲得に至る条件を明らかにする。

3. 研究の方法

試験管内で液相分離を誘導して形成された rPrP の液滴の性状を検討し、生化学的特性や感染性の有無について評価した。

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (終濃度 120mM)、DEX、PEG (ともに終濃度 9%)を含む溶液に rPrP (終濃度 2-10 μM)を加えて液相分離を行った。

4. 研究成果

rPrP 液滴の性状

rPrP 液滴の性質を調べるために、液滴の挙動を連続的に観察した。界面に浮遊している液滴は、互いに継ぎ目なく融合しており、液滴が液相にあることが示唆された(図1)。

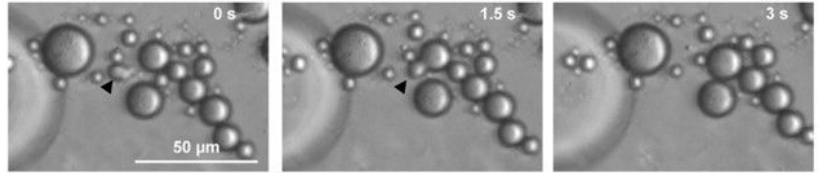


図1:rPrP は液-液相分離を起こす
PEG/DEXで形成したrPrPの液滴を観察すると、経時的に互いに融合していた。(矢頭)

さらに、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ を添加すると、rPrPは直ちに凝縮してPEG/DEX界面に液滴を形成した。次にrPrPをAlexa488でラベルした後、液滴を作成した。形成直後の新鮮な液滴と1時間静置して成熟させた液滴にレーザーを照射して、Alexa488の蛍光を退色させて、蛍光が回復するか観察した。

液-液相分離直後(0分)の新鮮な液滴は、光退色後60秒で強度が完全に回復したが、37で1時間インキュベートした液滴は観察時間中回復しなかった(図2)。このことから、新鮮な液滴の内部が液体であるが、その後、液-固相転移を起こしてrPrPゲルになったことが示唆された。

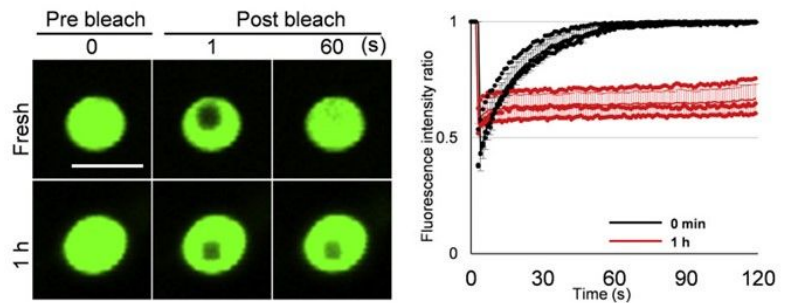


図2:rPrPの液滴は液-固相転移によってゲルを形成する
rPrPの液滴にレーザーを照射したところ、新鮮な液滴では蛍光が1分以内に回復したが、1時間成熟させた液滴では蛍光が回復しなかった。

rPrP の N 末端領域 (23-89 残基) が液-液相分離と液-固相転移を駆動する

PrP^CのN末端領域はIDRであることが知られているが、C末端は3つのヘリックスを持つ安定な二次構造であることが核磁気共鳴法により明らかにされている。N末端領域の役割を明らかにするために、ATPSにおける完全長rPrP (rPrP full)とN末端を欠損させたrPrP (23-89)の挙動を比較した。その結果、rPrP (23-89)の蛍光強度は増加しなかったが、界面でわずかにチオフラビンT (ThT) 陽性の凝集体を形成した。これらの凝集体は48時間までの観察期間中、ThT蛍光の増加を示さなかったが、rPrP fullの液滴は時間と共に蛍光強度が増加した(図3)。また、0分ではThT蛍光が見られない非常に小さな液滴 (<5 μm)でも、24時間培養すると明確に識別できるようになった。さらに、その蛍光強度は、1時間でrPrP (23-89)よりも有意に高く、48時間後にはより顕著になった。

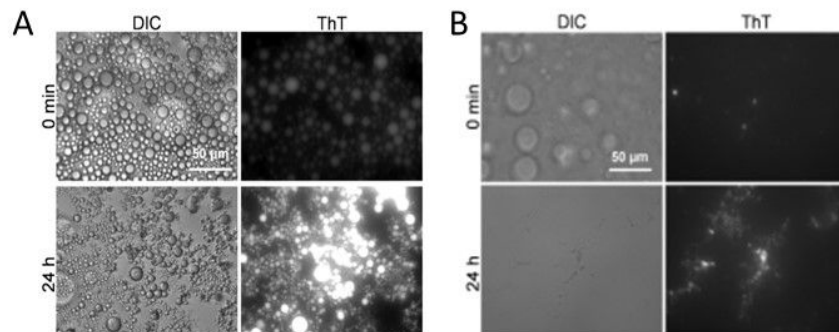


図3:rPrPのN末端領域は液-液相分離に必須である
rPrP fullとrPrPΔ(23-89)を液-液相分離を誘導したところ、rPrP fullはThT陽性の液滴を形成した(A)が、rPrPΔ(23-89)は液滴をほとんど形成しなかった(B)。

液-固相転移にはプリオンタンパク質のコンフォメーション変換が関与する

続いて、時間の経過が rPrP-ゲルの生化学的特性にどのような影響を与えるかを検討した。液滴を 30 分間熟成させた後、遠心分離したところ、rPrP-ゲルは ThT 陽性で、水には溶けなかった。その後、ゲルを 1% Sarkosyl に再懸濁し、遠心分離により再沈殿させた。

ウェスタンブロット解析の結果、rPrP は 1% Sarkosyl 溶液に不溶であった (図 4)。次に、rPrP-ゲルを 72 時間熟成させた後、PK で消化した。熟成ゲルの外観は、PK 消化後

も変化しなかったが、遠心分離により回収した熟成ゲルをウェスタンブロットティングすると、熟成液滴には rPrP のオリゴマーが含まれ、40%の rPrP が未消化のまま残っていた (図 5)。また、10-15 kDa 程度の小さな PrP-res 断片が検出された。老化した rPrP-ゲルと脳由来の PrP^{Sc}

は、異なるバンドパターンを示したが、PK 耐性に大きな違いはなかった。FTIR 解析の結果、熟成ゲルは、2 次誘導体スペクトルの シート領域の 1620cm^{-1} に、ネイティブ型の rPrP の ヘリックス領域の 1651cm^{-1} からシフトした特徴的なピークを有していた。これらの結果から、rPrP は液滴内部で PrP-res に変換され、シートに富む構造、洗剤不溶性、PK 耐性を獲得していることが示唆された。次に、熟成された rPrP-ゲルがシード活性を持つかどうかを検討した。熟成した rPrP-ゲルをシードとして Real Time-Quaking

Induced Conversion (RT-QuIC) を行った。その結果、rPrP-ゲルをシードとして添加したサンプルは ThT 陽性を示さず、100 サイクル反応させても rPrP-ゲルは形状を維持しており、rPrP-ゲルから生成した rPrP-res は seed 活性を持っていないことが示された。また、rPrP-ゲルをマウスに頭蓋内摂取したが、2 年以上経過してもプリオン病を発症しなかった。

我々は PrP の液 液相分離をおこし、液滴を形成する条件を見出した。さらに、これが シートに富んだ構造を有し、PK 抵抗性を示すなど、PrP^{Sc} と似た性質を示すことを明らかにした。つまり、PrP^{Sc} は液相分離を介して形成されることを示唆している。その一方で、RT-QuIC におけるシード活性やマウスへの感染性が認められなかったことから、病原性を有するにはさらに何らかの段階が必要であると考えられる。

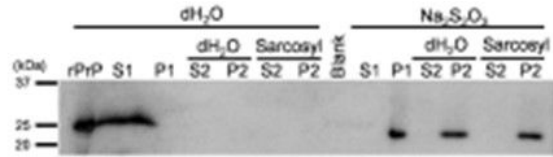


図4:ゲルを形成しているrPrPはサルコシルに不溶性である

rPrP-ゲルを1%サルコシルで懸濁した後、遠心分離すると、不溶性画分でrPrPが検出された。

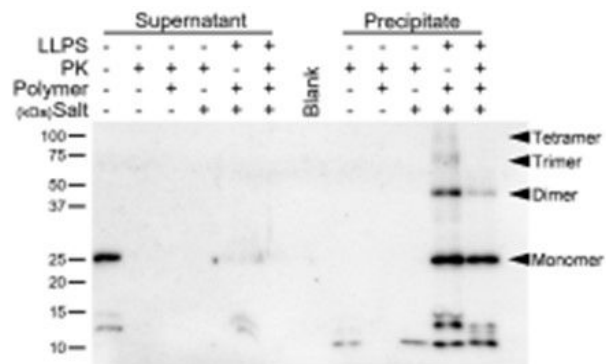


図5:ゲルを形成しているrPrPはProtease K抵抗性を示す

rPrP-ゲルをProtease Kで処理してもrPrPが検出された。さらに、10-15kDaの小さい断片も検出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hermann Peter, Appleby Brian, Brandel Jean-Philippe, Caughey Byron, Collins Steven, Geschwind Michael D, Green Alison, Haik Stephane, Kovacs Gabor G, Ladogana Anna, Llorens Franc, Mead Simon, Nishida Noriyuki, Pal Suvankar, Parchi Piero, Pocchiari Maurizio, Satoh Katsuya, Zanusso Gianluigi, Zerr Inga	4. 巻 20
2. 論文標題 Biomarkers and diagnostic guidelines for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Lancet Neurology	6. 最初と最後の頁 235 ~ 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/S1474-4422(20)30477-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tange Hiroya, Ishibashi Daisuke, Nakagaki Takehiro, Taguchi Yuzuru, Kamatari Yuji O., Ozawa Hiroki, Nishida Noriyuki	4. 巻 296
2. 論文標題 Liquid-liquid phase separation of full-length prion protein initiates conformational conversion in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100367 ~ 100367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100367	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 -
1. 著者名 Honda Hiroyuki, Mori Shinichiro, Watanabe Akihiro, Sasagasako Naokazu, Sadashima Shoko, Dong Trang, Satoh Katsuya, Nishida Noriyuki, Iwaki Toru	4. 巻 41
2. 論文標題 Abnormal prion protein deposits with high seeding activities in the skeletal muscle, femoral nerve, and scalp of an autopsied case of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 152-158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12717	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Altieri Andrea, Spiridonov Evgeny A., Sivtzev Semen I., Ishibashi Daisuke, Biggi Silvia, Nishida Noriyuki, Biasini Emiliano, Kurkin Alexander V.	4. 巻 28
2. 論文標題 Generation, optimization and characterization of novel anti-prion compounds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115717 ~ 115717
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2020.115717	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fuchigami Takeshi, Kawasaki Masao, Watanabe Hiroyuki, Nakagaki Takehiro, Nishi Kodai, Sano Kazunori, Atarashi Ryuichiro, Nakaie Mari, Yoshida Sakura, Ono Masahiro, Nishida Noriyuki, Nakayama Morio	4. 巻 90-91
2. 論文標題 Feasibility studies of radioiodinated pyridyl benzofuran derivatives as potential SPECT imaging agents for prion deposits in the brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nuclear Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 41 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nucmedbio.2020.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishibashi Daisuke, Ishikawa Takeshi, Mizuta Satoshi, Tange Hiroya, Nakagaki Takehiro, Hamada Tsuyoshi, Nishida Noriyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Novel Compounds Identified by Structure-Based Prion Disease Drug Discovery Using In Silico Screening Delay the Progression of an Illness in Prion-Infected Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurotherapeutics	6. 最初と最後の頁 1836 ~ 1849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13311-020-00903-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakagaki Takehiro, Ishibashi Daisuke, Mori Tsuyoshi, Miyazaki Yukiko, Takatsuki Hanae, Tange Hiroya, Taguchi Yuzuru, Satoh Katsuya, Atarashi Ryuichiro, Nishida Noriyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Administration of FK506 from Late Stage of Disease Prolongs Survival of Human Prion-Inoculated Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurotherapeutics	6. 最初と最後の頁 1850 ~ 1860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13311-020-00870-1	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 -

1. 著者名 Adachi Toshiyuki, Adachi Tomohiko, Nakagaki Takehiro, Ono Shinichiro, Hidaka Masaaki, Ito Shinichiro, Kanetaka Kengo, Takatsuki Mitsuhsa, Nishida Noriyuki, Eguchi Susumu	4. 巻 27
2. 論文標題 Difference in driver gene expression patterns between perihilar and peripheral intrahepatic cholangiocarcinoma in an experimental mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 477 ~ 486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.772	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ubagai Kaori, Fukuda Shigeo, Mori Tsuyoshi, Takatsuki Hanae, Taguchi Yuzuru, Kageyama Soichi, Nishida Noriyuki, Atarashi Ryuichiro	4. 巻 526
2. 論文標題 Discrimination between L-type and C-type bovine spongiform encephalopathy by the strain-specific reactions of real-time quaking-induced conversion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1049 ~ 1053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.183	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 丹下 寛也
2. 発表標題 プリオン蛋白の液相分離
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丹下 寛也
2. 発表標題 プリオン蛋白の液相分離
3. 学会等名 日本ウィルス学会九州支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丹下 寛也
2. 発表標題 Liquid phase separation of prion protein
3. 学会等名 Asia Pacific Prion Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究 分担者	石橋 大輔 (Ishibashi Daisuke) (10432973)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授 (17301)	

	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
研究 協力者	丹下 寛也 (Tange Hiroya)		

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
---------	---------