

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500324

研究課題名（和文）正常型プリオン蛋白質とそのホモログが引き起こす神経変性／保護作用の分子機構解明

研究課題名（英文） The molecular mechanism of the prion protein and the homolog which cause the neuro-degenerative / -protective function.

研究代表者

山口 尚宏 (Yamaguchi Naohiro)

長崎大学・病院・医員

研究者番号：40432976

研究成果の概要（和文）：

今回の研究で我々は正常プリオン蛋白質(Prion protein:PrP)は Ca²⁺動員性の受容体：グルタミン酸受容体 I 型(mGluR1)と結合し神経細胞内 Ca²⁺濃度を調節していることを確認した。これは PrP は mGluR1 受容体と相互作用することで細胞内 Ca²⁺を調節しており、その調節機構が破綻することで神経細胞の変性死が引き起こされること示唆している。今回はマウスを使った実験の結果は間に合わなかったがプリオン蛋白質(PrP)遺伝子ノックアウト(Ngsk Prnp^{-/-})マウスでのプルキンエ細胞死やプリオン病での神経変性はこの機構によるものである可能性もある。また cDNA ライブラリを用いた expression cloning 法により新たに plasmalemma vesicle associated protein (Plvap/PV-1)を結合蛋白質候補としてクローニングすることができた。またプリオン蛋白質のホモログである Dpl は培養細胞にてプリオン感染にはほとんど影響しないこと、Shadoo は感染細胞において異常型プリオン蛋白質の蓄積を促進するかもしれないことが判明した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, We proved that the Prion protein(PrP) bind to the glutaminic acid receptor type I (mGluR1) which regulated the Ca²⁺ in nerve cells. So the function of PrP is to regulate the Ca²⁺ in the cell by interacting with mGluR1 receptor, and this suggests that neuronal degeneration is caused by the adjustment this mechanism's failure. The Purkinje cell death in the PrP knockout mouse (Ngsk Prnp^{-/-}) and the neurodegeneration of prion disease might be caused by this mechanism. In addition, We cloned a new PrP intracting gene : plasmalemma vesicle associated protein (Plvap/PV-1) by expression cloning method using the cDNA library from mouse brain. Additionally we proved that Dpl which is homolog of PrP isn't influenced prion infection, and Shadoo which is another homolog of PrP may promote accumulation of PrPSc(abnormal type of Prion protein) in culture cell systems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1800000	540000	2340000
2009年度	800000	240000	1040000
2010年度	900000	270000	1170000
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経変性疾患、プリオン

1. 研究開始当初の背景

正常型プリオン蛋白質(PrP)の生理的機能は未だ明確ではない。この PrP の機能を調べるために申請者らが作製した PrP ノックアウト(KO)マウスでは小脳プルキンエ細胞変性死を起こした。ところがこれは PrP が発現しない上に Doppel(Dpl)という別の蛋白質が異所性に発現するために起こることが後にわかった。Dpl は PrP と非常に立体構造が似ており大きな違いは Dpl の N 末は短く、PrP には存在する Octapeptiderepeats(OR)や Central hydrophobic region(CR)がないことである。そのためこの Dpl に PrP の N 末をつなげた N 末をつなげた PrP-Dpl fusion を発現したトランスジェニック(Tg)マウスを作製したところ Dpl による変性作用が抑えられることがわかった。また逆に PrP の N 末がないもの(PrP Δ 32-121)や、CR 領域のみを削ったもの(PrP Δ CR)もプルキンエ細胞の変性作用を持つことも知られている。これらのことは PrP の CR 領域が神経保護的な作用に重要であることを意味している。この現象の分子機構は PrP や Dpl、そのミュータント蛋白質が膜貫通型の未知の蛋白質(Tr)に C 末と CR 領域の 2 カ所で結合し、そのシグナル伝達を修飾して起こると考えられている(Fig.2)が、現在のところこの Tr は未同定であり、機能発現の分子機構は未解明である。そこで申請者らはまず、一連の細胞変性/保護作用が培養細胞で再現できるかどうかを試みた。マウスの神経芽細胞種の Neuro-2a で Dpl を過剰発現させると同時に RNAi 法により PrP を抑えると細胞死が有意に起こることを見いだした。またアフリカツメガエル卵母細胞(Xenopus oocyte) 発現系を用いた実験で Dpl 過剰発現卵は、細胞内カルシウムイオン (Ca²⁺) 動員系シグナルである Muscarinic M1R 刺激による細胞内カルシウムイオン濃度([Ca²⁺]_i)上昇を、繰り返しアセチルコリン投与においても脱感作現象 (desensitization) を起こすことなく上昇させた。これは通常、過剰の[Ca²⁺]_i 上昇に対して起こる細胞防衛反応である脱感作を抑制する、つまり細胞内 Ca²⁺オーバーロードを起こしているものと考えられている (申請者らは前記 Neuro-2a の系でも Ca²⁺シグナル系の異常を観察した)。細胞内 Ca²⁺オーバーロードは細胞死のメカニズムで最もよく知られている現象であるが、PrP 関連のプルキンエ細胞死の分子機構として詳細に研究した報告は少ない。また近年、PrP の新たなホモログとして Shadoo という分子が見つ

った。この Shadoo も PrP の CR 領域のような hydrophobic region を持つ GPI アンカー型の蛋白質であるが、これは培養細胞において Dpl が起こす神経毒性作用を抑えるのみならず、プリオン感染マウス脳においてその発現が有意に減少しているとの報告があり、神経保護的に働いているのではないかと考えられる。そのためこれらの研究がプリオン感染の病態解明にもつながるものと期待している。

2. 研究の目的

この研究の最大の目的は正常型プリオン蛋白質(Prion Protein/PrP)とそのホモログ、及びそれらのミュータント蛋白質が起こす神経変性/保護作用の分子機構解明であり、申請者らはその結果をもってプリオン病の病態解明や治療へと応用していきたいと考えている。

3. 研究の方法

(1)Ex vivo (培養細胞) モデル系の構築

Dpl の過剰発現マウスにおけるプルキンエ細胞死を培養細胞(Ex vivo)で効率よく再現できるようにする。現在の所、神経系の細胞である Neuro-2a 細胞において endogenous な PrP の発現を RNAi で抑制すると同時に Dpl を過剰発現すると細胞死を起こすことがわかっているため、これらの導入効率を上げ細胞死の効率を良くする。また神経系ではないが現在 PrP ノックアウトマウスから樹立した骨髄間質細胞(MSC)があり、これは神経系に分化できることが知られている。そのためこの PrP ノックアウト MSC に Dpl を過剰発現させて細胞死が起こるかどうかが、また神経系への分化させた後はどうかなどを確認する。

(2)PrP・Dpl・Shadoo の分子機構解明

Xenopus の卵に Dpl を導入するとアセチルコリンの複数回刺激に対して脱感作を示す。この現象が PrP、Shadoo を導入したときかどうか、またそれらの組み合わせでどう変わるかを検討する。また(1)で樹立した細胞において PrP や Dpl、Shadoo の発現量を変えることによって細胞死を起こす細胞の数の変化を調べる。またそれぞれの細胞の PKC 活性を測定したり G-CAMP を導入することで脱感作に関連した Ca シグナリングの動きを観察する。また阻害剤や各種抗体などを使用し細胞死へのシグナル経路を明らかにする。

(3)Tr の同定

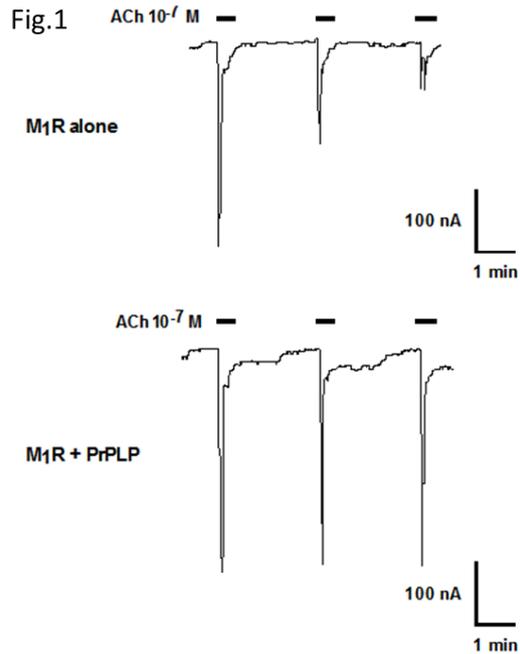
現在までに報告されている PrP の結合分子ではこれらの現象を説明できないので、新たに PrP またはそのホモログに細胞膜上で結合する分子を同定する。方法としてはマウスの脳や Neuro-2a 細胞から cDNA ライブラリを作製し、これをレトロウイルスを用いて、浮遊系の細胞に感染させ発現させる。次に PrP またはそのホモログのリコンビナント蛋白質を作製し、培養ディッシュにコートする。そこで先ほどライブラリを感染させた浮遊系の細胞を育てると、コートしたリコンビナント蛋白質に結合する cDNA ライブラリが導入された細胞はディッシュに張り付くのでそこから cDNA を回収する、という方法をとる。

(4)KO、Tg マウスを用いた分子機構の確認
主に申請者らが作製した PrP ノックアウトマウスと生後 90 日ほどでプルキンエ細胞死を起こす Dpl 過剰発現 Tg マウスを用いる。(2)で解析した経路を抑える薬剤や抗体、もしくは経路分子のノックアウトマウスや Tg マウス等と掛け合わせるによりプルキンエ細胞死が抑えられるか、促進されるかを観察する。Ca²⁺の濃度によるものかどうかを検討するために Ca²⁺ dependent kinase(PKC)の活性を測定するなどを行う。

(5)プリオン病の病態解明への応用
プリオン持続感染細胞を用いて行う。(2)で解析した経路がどうなっているか、その経路を活性化した場合・不活性化した場合にプリオンの感染量(異常型プリオン蛋白質の産生量)はどう変化するかを Shadoo の発現量とからめて検討する。加えて Neuro-2a 等にあらたにプリオンを感染した場合にそれらの経路のシグナルがどのように変化するかを追うことで、解析結果がプリオン病と関連しているかどうかを調べる。

4. 研究成果

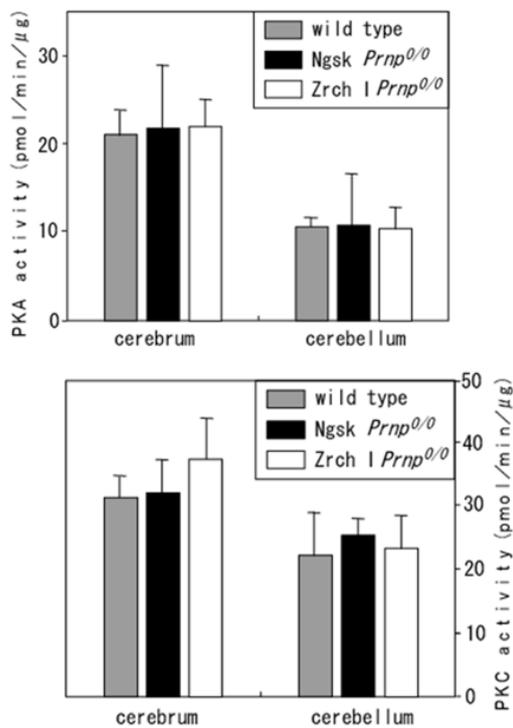
我々は、PrP は Ca²⁺動員性の受容体と相互作用することで細胞内 Ca²⁺を調節しており、その調節機構が破綻することで神経細胞の変性死が引き起こされることを考え、プルキンエ細胞に多く発現している Ca²⁺動員性受容体である代謝型グルタミン酸受容体 I 型(mGluR1)と PrP 関連蛋白質との結合を、マウスの培養神経細胞に発現させ免疫沈降及び蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を用いてを検討し、mGluR1 と PrP、Dpl と mGluR1 が結合しうることが確認された。このことは PrP および Dpl が mGluR1 を介して神経細胞内 Ca²⁺濃度を調節していることを示唆している。これは *Xenopus oocyte* に PrP や Dpl と mGluR1



を強制発現させてグルタミンによる刺激を繰り返したところ、PrP でも Dpl でも脱感作の抑制が観察できた(Fig.1)。PrP や Dpl、Shadoo がそれぞれ相互作用をしているかどうか調べるために、3 者を N2a に強制発現させて免疫沈降法にて確認したがそれぞれに相互作用はみられなかった。また PrP との細胞膜上での他の結合蛋白質を cDNA ライブラリを用いた expression cloning 法によりスクリーニングを行った。その結果、新たに plasmalemma vesicle associated protein (Plvap/PV-1) を結合蛋白質候補としてクローニングすることができた。その後、PV-1 と Shadoo に対する抗体の作成に入った。大腸菌を用いてリコンビナント蛋白質を作成しようとしたがそれほど多く発現しなかったため、Shadoo の方は業者に抗体を作成してもらった。PV-1 と PrP の相互作用については PV-1 の抗体がないため今のところ確認はできていない。Shadoo の抗体は非常にいい出来であったのでそれを用いて検討したところ、プリオン持続感染 N2a 培養細胞(22L)で Shadoo が発現しているかどうかを確認したところ、発現はほとんど見られなかった(Dpl はほとんど発現していないことを以前に確認している)。そのため、22L 感染細胞に Dpl と Shadoo を強制発現させて、異常型プリオン蛋白質(PrPSc)の量を比較したところ、Dpl を発現させた場合は発現させてない場合と変わりなかったが、Shadoo を発現させたところ PrPSc の量は増加傾向にあった。よって Shadoo は神経細胞においてプリオン病の進展を促進している可能性がある。マウス個体での結果は既に報告されているが、プリオン感染マウスの脳では非感染のマウスに比

べて Shadoo の発現は低くなっていた。これは Shadoo 発現細胞において PrP^{Sc} の蓄積が促進されたため神経変性死が起きた、と考えれば辻つまが有る。今後はプリオン感染細胞と Shadoo の発現量の局在を病的に検討したいと思うが、プリオン感染細胞を感度よく特異的に検出する手段がまだないために難しいかもしれない。話を戻して Ca²⁺と神経変性についての *in vivo* の検討であるが Ngsk PrP ノックアウトマウスにおいて Ca²⁺の濃度がプルキンエ細胞死と関連があるかを調べるために Dpl の過剰発現である Ngsk ノックアウトマウスと Dpl 過剰発現のない PrP ノックアウトマウス (Zrch Prnp^{-/-}) の大脳と小脳の PKA と PKC を測定したが差が見られなかった (Fig. 2)。これは脳には多彩な細胞

Fig.2



が存在するため影響が見えにくいのかと考えこれらのマウスの脳からプルキンエ細胞のみを培養しようと試みたが、ノックアウトマウスの脳からの培養は成功しなかったため検討できなかった。これらの結果より正常型プリオン蛋白質は Ca²⁺代謝になんらかの影響をしており、それはプリオン病の病態にも影響している可能性がある。また PrP のホモログも Ca²⁺の代謝に影響している可能性があるが、Dpl は脳に発現していないためかプリオン病の病態にはそれほど関係していない代わりに Shadoo の方はプリオン病の病態にかかわっている可能性があることが示唆された。

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 8 件)

Bone marrow stroma cells are susceptible to prion infection. Takakura Y, Yamaguchi N, Nakagaki T, Satoh K, Kira J, Nishida N. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Dec 19;377(3):957-61. (査読あり)

Dominant-negative effects of the N-terminal half of prion protein on neurotoxicity of prion protein-like protein/doppel in mice. Yoshikawa D, Yamaguchi N, Ishibashi D, Yamanaka H, Okimura N, Yamaguchi Y, Mori T, Miyata H, Shigematsu K, Katamine S, Sakaguchi S. *J Biol Chem*. 2008 Aug 29;283(35):24202-11. (査読あり)

A case of unilateral adrenal hyperplasia being difficult to distinguish from aldosterone-producing adenoma. Shigematsu K, Yamaguchi N, Nakagaki T, Sakai H. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009 Mar;117(3):124-8. (査読あり)

Analysis of mRNA expression for steroidogenic enzymes in the remaining adrenal cortices attached to adrenocortical adenomas. Shigematsu K, Nakagaki T, Yamaguchi N, Kawai K, Sakai H, Takahara O. *Eur J Endocrinol*. 2008 Jun;158(6):867-78. (査読あり)

A case of unilateral adrenal hyperplasia being difficult to distinguish from aldosterone-producing adenoma. Shigematsu K, Yamaguchi N, Nakagaki T, Sakai H. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009 Mar;117(3):124-8. (査読あり)

Human Papillomavirus DNA in Plasma of Patients with HPV16 DNA-positive Uterine Cervical Cancer.

Shimada T, Yamaguchi N, Nishida N, Yamasaki K, Miura K, Katamine S, Masuzaki H. *Jpn J Clin Oncol*. 2010 Feb 4. (査読あり)

Escherichia coli contamination of menstrual blood and effect of bacterial endotoxin on endometriosis.

Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Yamaguchi N, Katamine S, Matsuyama T, Nakashima M, Fujishita A, Ishimaru T,

Masuzaki H. Fertil Steril. 2010 Dec;94(7):2860-3.e1-3. (査読あり)

Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S, Yamada M, Mizusawa H, Kitamoto T, Klug G, McGlade A, Collins SJ, Nishida N. Nat Med. 2011 Feb;17(2):175-8. (査読あり)

〔学会発表〕 (計 3 件)

松原 岳大, Cellular prion protein regulates the intracellular Ca²⁺ signaling through its binding to metabotropic glutamate receptor type I, mGluR1. 第 33 回日本分子生物学会総会 2010 年 12 月 7 日神戸ポートアイランド

松原 岳大, Cellular prion protein binds to metabotropic glutamate receptor type I and regulates its function 第 32 回日本分子生物学会総会 2009 年 12 月 9 日 パシフィコ横浜

松原 岳大, 異常型プリオン蛋白質による神経細胞変性死における mGluR1 の役割とプリオン蛋白質との相互作用。
日本薬理学会 2009 年 3 月 16 日 パシフィコ横浜

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 尚宏 (YAMAGUCHI NAOHIRO)

長崎大学病院・消化器内科・医員

研究者番号：40432976

(2) 研究分担者

上園 保仁 (UEZONO YASUHITO)

国立がんセンター研究所・がん患者病態生理研究部・部長

研究者番号：20213340