

機関番号：17301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591002

研究課題名 (和文) プリオン感染に関与する新規分子の探索、およびその作用機序の解明

研究課題名 (英文) Identification of the novel factors relating to prion infection, and analysis of its molecular mechanisms

研究代表者

布施 隆行 (Fuse Takayuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30432975

研究成果の概要 (和文):

我々は、プリオン病の病原体の精製と感染に必須な因子を同定する事を目的に研究を行った。単一な培養細胞系としてプリオン感染マウス神経細胞を用いて、培養上清または細胞抽出液から感染価の高いプリオンの精製に成功した。さらに最も感染価の高い精製物においてタンパク質解析を行い、細胞抽出成分から 33 種類、培養上清成分から 93 種類の感染細胞で特異的に存在するタンパク質群の同定に成功した。

研究成果の概要 (英文):

We can propose that purification and identification of the novel factor relating to prion infection in this study. To purify for prion, we had collected the supernatants or cell extract from prion affected mouse neuronal culture cells, and then, they had been separated to refine by density-gradient centrifugation. The collected fractions had been analyzed the accumulation of PrP^{Sc} and determined its infectivity. Moreover, we had been successful in identification of specific proteins relating to prion infection including 33 or 93 kinds of proteins from the cell extract, or the supernatants in prion affected cells, respectively.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：感染症、神経変性疾患、プリオン、精製、タンパク質

1. 研究開始当初の背景

ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) や牛の海綿状脳症 (BSE) は、脳組織の海綿 (スポンジ) 状変性を特徴とする中枢神経系の疾患であり、別名プリオン病とも呼ばれている。現在、効果的な治療薬・治療法は無く、畜産業においては廃棄、ヒトに対しては対処療法のみが行なわれている。食の安全性やヒトへの危険性を回避するためには治療薬の開発および感染予防措置の確立が必要不可欠であるが、そのほとんどは成されていない。これはプリオン病の病原体や感染機構が、ほとんど解っていないためである。この疾患を克服するためには、病原体の感染、増殖機構を明確にする必要がある。

2. 研究の目的

プリオン病は致死性の中枢神経系の疾患であり、現在、効果的な治療薬・治療法は無い。本研究は、感染に必須な因子を精製・同定し、病原体の感染メカニズムを解明する事で治療薬の開発、治療法の確立に寄与する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 非血清培地での感染細胞の維持

プリオン感染に関与する因子の同定を行うため、より単一な培養細胞系を出発材料にした。しかし、プリオン研究で常用されるマウス神経細胞は、通常牛の血清を補栄養素としており特定の分子を同定する上で非常に大きな障害となる。そこで我々は、保有するプリオン感染細胞を非血清培養条件にするため、血清以外の補栄養素として、B27、N-2 および G-5 を培養液に添加して、細胞の増殖および異常型プリオンタンパク質 (PrPres) 産生への影響について解析した。

(2) 感染性因子の濃縮と精製

プリオン病の病原体は PrPres を含む構造物として考えられている事から、感染性因子はある程度大きな複合体として存在している事が示唆されている。そのため、感染性因子の精製は、PrPres および感染価の両方を指標に行った。プリオン感染細胞ならびに非感染細胞の上清および細胞抽出液を出発材料とし分画操作を行った。培養上清は、超遠心法により 1,000 倍濃縮した後、細胞抽出液と同様、それぞれ 30-60% Nycodenz 密度勾配遠心法により分離した。遠心後、上部から 1 ml ずつ溶液を回収し、Fracti on No. 1

~10 を得た。各 Fracti on における PrPres の存在をウエスタンブロット法 (WB) で確認すると共に、感染価を測定した。

(3) 感染に関与する因子の同定

最も感染価の高い精製 Fracti on は、Trypsin で消化後、LC-MS 解析によって、存在するタンパク質群を網羅的に同定した。さらに、差異解析として感染細胞のタンパク質群のデータから非感染細胞から得られた同様のデータを引くことで、感染細胞に特異的に存在するタンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) 非血清培地での感染細胞の維持

非血清培養液として、B27、N-2 および G-5 を培養液に添加して細胞培養を行った。細胞の増殖性を比較すると、B27 を添加した培養液でのみ細胞の増殖が見られ、N-2、G-5 の補助栄養因子では細胞が維持できなかった。さらに B27 添加培養液での PrPres 維持を検討したところ、剥離剤によって大きく影響する事が分かった (図 1)

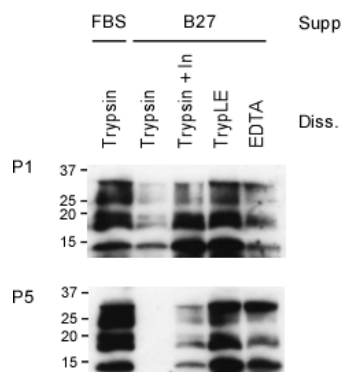


図 1 B27 培養液による異常型 PrP の維持と剥離剤による影響。

B27 添加培養細胞は、Trypsin 剥離剤を使用すると PrPres が消失するため、細胞の維持には TrypLE を用いる必要があった。以上の結果から、非血清条件下で培養できる条件を選定する事に成功した。

(2) 感染性因子の精製

プリオン感染マウス神経細胞の上清または細胞抽出液を準備し、分子密度の違いにより分画 (密度勾配遠心法) した (図 2)。

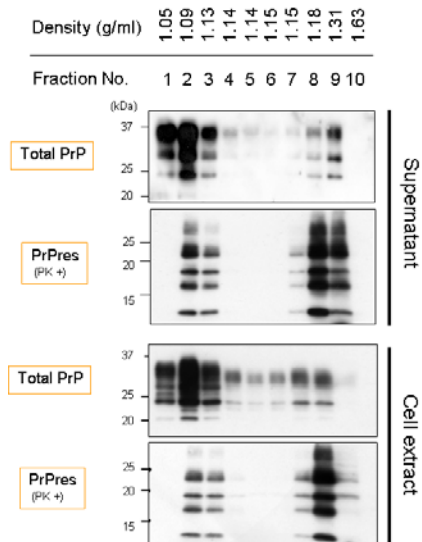


図 2 Nycodenz 密度勾配遠心法による異常型 PrP の分離精製。上部に上清、下部に細胞抽出液における精製結果を示す。

上清および細胞抽出液において、正常型 PrP は非常に軽い Fraction に検出された。しかし一方で、異常型 PrP は、Fraction No. 8~9、密度 1.18~1.31 g/ml の重い分画に検出された。この結果は正常型 PrP と異常型 PrP の分子密度が異なる事、つまり分子を構成する立体構造又は構成成分が異なる事が示唆された。

さらに各分画における感染価を測定した結果、分子密度に応じて感染性が異なり、異常型 PrP が多く存在する Fraction No. 8~9 に約 9 割の感染価が濃縮されていた (図 3)。これらの結果から培養細胞からのプリオン精製に成功した事を確認した。

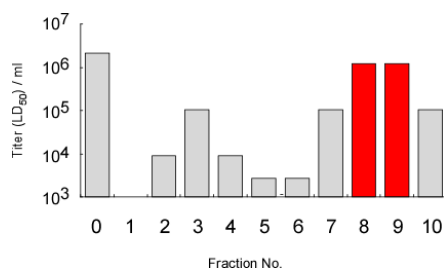


図 3 精製 Fraction における感染価

(3) 感染に関与する因子の同定

最も感染価の高い精製 Fraction No. 8, 9 に存在するタンパク質群を、LC-MS 解析によって網羅的に同定した。さらに、差異解析によって感染細胞に特異的に存在するタンパ

ク質を見出した。感染細胞でのみで発現するタンパク質群として、細胞抽出成分から 33 種類、培養上清成分から 93 種類の分子の同定に成功した。

(4) 国内外における位置づけとインパクト

得られた同定タンパク質群には、先に報告された Exosome 関連タンパク質の他に、今までプリオンとの関連性が知られていない NCAM1 や CD47 などの膜タンパク質 (他 3 種)、HSP70 や HSP83 などのシャペロン関連群 (他多数)、Ras などのシグナル伝達関連 (他多数)、その他には酵素や他の微生物由来のタンパク質も見出されている。

これらの結果は国内外における初の知見であり、同定タンパク質はプリオンの構成成分の一部として存在する事や感染に関与する Key のタンパク質である可能性が示唆された。これらの結果をもとに今後、詳細に検討する事で、プリオンの本体ならびに感染機構を明らかにする事ができ、新たな知見の創出や治療薬の開発に発展すると期待できる。

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 7 件)

- ① Guo CW, Liu G, Xiong S, Ge F, Fuse T, Wang YF, Kitazato K, The C-terminus of MP-T3 protein is required for ubiquitin-proteasome-mediated degradation in human cells., FEBS Lett., 査読有り, 15, 2011.(in press)
- ② Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaoka H, Shirabe S, Yamada M, Mizusawa H, Kitanoto T, Klug G, McGlade A, Collins SJ, Nishiida N Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion., Nature medicine, 査読有り, 17(2), 2011, pp. 175-8.
- ③ Matsui Y, Satoh K, Mutsukura K, Watanabe T, Nishiida N, Matsuda H, Sugino M, Shirabe S, Eguchi K, Kataoka Y, Development of an Ultra-Rapid Diagnostic Method Based on Heart-Type Fatty Acid Binding Protein Levels in the CSF of CJD Patients., Cell Mol Neurobiol, 査読有り, 30(7), 2010, pp. 991-9.

- ④ Satoh K, Tobiura M, Matsui Y, Mutsukura K, Nishida N, Shiga Y, Eguchi K, Shirabe S, Sata T., Establishment of a standard 14-3-3 protein assay of cerebrospinal fluid as a diagnostic tool for Creutzfeldt-Jakob disease., Lab Invest, 査読有り, 90(11), 2010, pp.1637-44.
- ⑤ Miyazawa K, Kanaya T, Takakura I, Tanaka S, Hondo T, Watanabe H, Rose MF, Kitazawa H, Yamaguchi T, Katamine S, Nishida N, Aso H. Transcytosis of murine-adapted bovine spongiform encephalopathy agents in an in vitro bovine M cell model. J Virol, , 査読有り, 84(23), 2010, pp.12285-91
- ⑥ Fujihara A, Atarashi R, Fuse T, Ubagai K, Nakagaki T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Katamine S, Nishida N. Hyperefficient PrP Sc amplification of mouse-adapted BSE and scrapie strain by protein misfolding cyclic amplification technique, FEBS J., 査読有り, 276(10), 2009, pp.2841-8.
- ⑦ Takakura Y, Yamaguchi N, Nakagaki T, Satoh K, Kira J, Nishida N. Bone marrow stroma cells are susceptible to prion infection. Biochem Biophys Res Commun, 査読有り, 377(3), 2008, pp957-961

[学会発表](計4件)

- ① 布施 隆行、他、プリオン株における増殖性と細胞膜タンパク質への結合性の違い、日本ウイルス学会学術集会、2010年(徳島)
- ② 布施 隆行、他、プリオン病における感染特異的分子の探索、日本ウイルス学会、2009年(東京)
- ③ 布施 隆行、他、プリオン株における細胞指向性と感染機構の解明、長崎感染症研究会、2009年(長崎)
- ④ 布施 隆行、他、異常型 PrP (PrPres) の感染性、日本ウイルス学会、2008年(岡山)

[図書](計1件)

山口尚宏, 布施隆行, 他、最新医学社、ヒト

のプリオン病の病態、2008、3: 77-96, 2008

[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

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/crb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

布施 隆行 (Fuse Takayuki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 30432975

(2) 研究分担者

西田 教行 (Nishida Noriyuki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 40333520

(3) 連携研究者

なし