

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06403

研究課題名（和文）糖鎖プロファイルに着目したプリオン株生成機構解析

研究課題名（英文）Analysis of prion strain generation based on glycosylation profile of disease associated prion protein

研究代表者

岩丸 祥史（Iwamaru, Yoshifumi）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・グループ長

研究者番号：20355142

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）：プリオンは蛋白質性の病原体で、宿主の正常プリオン蛋白質（PrPC）の構造異性体である異常プリオン蛋白質（PrPSc）が主要構成成分である。PrPCは、膜結合蛋白質であり、2カ所のアスパラギン結合型糖鎖付加部位が存在する。プリオンには病原体特異的な核酸が存在しないにも関わらず、生物学的性状の異なる「株」が存在する。本研究では、PrPScの糖鎖構造に着目し、高密度レクチンアレイを用いてPrPScの糖鎖構造の特徴抽出を精密かつ迅速に行うことで、複数のマウススクレイピープリオン株を簡便に識別でき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

プリオン株は、PrPScの3次あるいは4次構造により規定されると考えられ、高額な測定機器を必要とする蛋白質高次構造解析により、プリオン株の識別が試みられてきた。本研究では、PrPScの糖鎖プロファイリング解析により、簡便かつ迅速にプリオン株を識別できることを示した。現在までのところプリオン病に対する有効な予防・治療法は存在しておらず、それらの開発は極めて重要である。プリオン株によりプリオン複製阻害剤に対する感受性が異なることが知られており、簡便なプリオン株の識別法の開発は、治療法の開発の観点から意義深いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Prions are protein-only infectious agents and consist mainly of the disease-associated isoform of normal cellular prion protein (PrPC), referred to as PrPSc. PrPC is a membrane-bound glycoprotein and contains two potential N-glycosylation sites. Although prions appear not to contain a specific nucleic acid, different prion strains exhibiting different biological properties have been identified. In this study, we demonstrated that mouse scrapie prion strains can be distinguished by a lectin microarray analysis which characterizes the composition and structural diversity of N-linked glycans associated with PrPSc.

研究分野：プリオン

キーワード：プリオン アスパラギン結合型糖鎖 スクレイピー 株 レクチンアレイ

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、病原体「プリオン」により引き起こされる致死性の神経変性疾患である。異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) は、宿主の神経細胞で主に発現するプリオン蛋白質 (PrP^C) の構造異性体であり、プリオンの主たる構成成分と考えられている。PrP^{Sc} が中枢神経系に蓄積することで、感染個体では神経変性が生じる。細菌やウイルスとは異なり、プリオンには病原体特異的な核酸が存在しないにも関わらず、生物学的性状の異なる「株」が存在することが知られている。プリオン株によって感染個体の病理組織学的な特徴や潜伏期間が異なり、また異種動物への伝達効率に差異が認められる。現在のところプリオンの株は、主要構成成分である PrP^{Sc} の立体構造の違いにより生じていると推察されているが、プリオン株の生物学的性状を規定する詳細な機構は未解明である。

神経細胞は、その機能や形態により多様なサブタイプが存在している。各プリオン株ではこれら神経細胞サブタイプへの指向性が変化に富んでおり、結果として株としての多様な生物学的性状が生じている可能性が考えられる。PrP^{Sc} の基質である PrP^C は、グリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) によって細胞膜に繫留された膜蛋白質であり、2 カ所のアスパラギ (N-) 結合型結合型糖鎖付加部位が存在する。糖鎖は多数の酵素で合成される二次産物であるため、糖転移酵素の発現量や活性の大きな影響を受ける。このため、各プリオン株の神経細胞サブタイプ指向性が多様であるとすれば、プリオン各株の PrP^{Sc} は株固有の糖鎖プロファイルを示す可能性が高い。しかしながら、PrP^{Sc} のグライコム解析を行い、PrP^{Sc} 糖鎖プロファイルの比較によりプリオン株の識別を試みた報告はない。

2. 研究の目的

本研究は、プリオンの主要構成成分である PrP^{Sc} の糖鎖構造に着目し、PrP^{Sc} の糖鎖プロファイルを基にしたプリオン株の簡便な識別法の確立と、プリオン株が多様な生物学的性状を示す機構を明らかにすることを目的とする。

プリオン株を識別する方法として、蛋白質分解酵素処理後の PrP^{Sc} のウエスタンブロット解析が知られている。2 糖鎖型、1 糖鎖型、無糖鎖型 PrP^{Sc} に由来するバンドパターン、あるいは無糖鎖型 PrP^{Sc} の分子量を比較することで、識別可能なプリオン株も存在するが、大部分のプリオン株はこの解析方法で識別するのは難しい。糖鎖は複雑な樹状構造を持つことから、その構造解析には多大な労力と時間がかかっていた。本研究では、産業技術総合研究所で開発された独自の糖鎖解析技術である高密度レクチンアレイを用い、PrP^{Sc} の糖鎖プロファイリング解析を行うことで、各プリオン株の PrP^{Sc} の糖鎖構造の特徴抽出を精密かつ迅速に行う。

3. 研究の方法

複数のプリオン株のマウス接種試験

プリオン株としてマウススクレイピー-22L, Chandler, ME7 を用いた。近交系マウス (CD-1 マウス) に各プリオン株マウス脳乳剤の脳内接種を行った。約 150 日後に発症し、安楽殺したマウスから脳を回収し、一部はホルマリン固定し、免疫組織学的解析を行った。残りは -80 °C に保存した。

複数のプリオン株感染マウス脳からの PrP^{Sc} 部分精製

回収した脳と陰イオン性界面活性剤添加緩衝液を用いて脳乳剤を作製し、核酸分解酵素処理に続き、蛋白質分解酵素処理を行った。高速遠心後の上清を超速心し、沈殿画分を得た。超音波処理による陰イオン性界面活性剤添加緩衝液への分散後に再度超速心を行い、部分精製 PrP^{Sc} を得た。正常脳を同様に処理した検体を作製し、陰性コントロール (NC) として用いた。

マウス脳から部分精製した PrP^{Sc} 糖鎖プロファイルの比較

部分精製した PrP^{Sc} は凝集度が高いため、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 存在下で加熱し脱凝集させた後に、SDS を希釈した。その後、蛋白質濃度測定と蛍光色素 (Cy3) 標識し、余分な色素を SephadexG25 カラムで除去した。

蛍光標識した部分精製 PrP^{Sc} (各株 3 匹) を、高密度レクチンアレイに終夜反応させた。使用したレクチンの一覧は表 1 に示す。翌日エバネッセント蛍光スキャナーを用いて蛍光測定を行った。得られたデータセットを用い、Cluster 3.0 によりクラスタリングを実行し、Java TreeView により結果を可視化した。

また、部分精製後に SDS 化した PrP^{Sc} を各株 3 匹分まとめ、各検体の蛋白量を一致させた。PNGase 処理により、N-結合型糖鎖を遊離後、Glycoblottting 法による糖鎖捕捉と標識を行い、質量分析により糖鎖の推定構造を決定した (受託解析、医科学創薬株式会社)。

培養細胞で複製された各プリオン株の PrP^{Sc} 部分精製

培養細胞として、マウス視床下部性腺刺激ホルモン放出ホルモン産生細胞株である GT1-細胞とマウス神経芽腫由来の N2a 細胞を用いた。各細胞に、正常マウスと Chandler および 22L 株感染マウス脳由来のミクロソーム画分を暴露し、継代数が一致したプリオン持続感染細胞を作出した。細胞を Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C (PIPLC) 処理後に蛋白質分解酵素処理を行った。あるいは細胞溶解液を蛋白質分解酵素処理後に、PrP の免疫沈降を行った。

表 1：高密度レクチンアレイに使用したレクチンの一覧

番号	略称	レクチン名	番号	略称	レクチン名
1	LFA	Limax flavus	49	AOL	Aspergillus oryzae
2	WGA	Triticum vulgare	50	AAL	Aleuria aurantia
3	PVL	Psathyrella velutina	51	rAAL	Aleuria aurantia
4	MAL	Maackia amurensis	52	rPAIIL	Pseudomonas aeruginosa
5	MAH	Maackia amurensis	53	rSIIL	Ralstonia solanacearum
6	ACG	Agrocybe cylindracea	54	rPTL	Pholiota terrestris
7	rACG	Agrocybe cylindracea	55	PSA	Pisum sativum
8	rGal8N	Homo sapiens	56	LCA	Lens culinaris
9	SNA	Sambucus nigra	57	rAOL	Aspergillus oryzae
10	SSA	Sambucus sieboldiana	58	rBC2LCN	Burkholderia cenocepacia
11	TJAI	Trichosanthes japonica	59	LTL	Lotus tetragonolobus
12	rPSL1a	Polyporus squamosus	60	UEAI	Ulex europaeus
13	ADA	Allomyrina dictyoma	61	TJAI	Trichosanthes japonica
14	PHAL	Phaseolus vulgaris	62	MCA	Momordica charantia
15	DSA	Datura stramonium	63	FLAG-EW29Ch	Lumbricus terrestris
16	TxLcl	Tulipa gesneriana	64	PTLI	Psophocarpus tetragonolobus
17	ECA	Erythrina cristagalli	65	GSLIA4	Griffonia simplicifolia
18	RCA120	Ricinus communis	66	rGC2	Geodia cydonium
19	rGal7	Homo sapiens	67	GSLIB4	Griffonia simplicifolia
20	rGal9N	Homo sapiens	68	rMOA	Marasmius oreades
21	rGal9C	Homo sapiens	69	EEL	Euonymus europaeus
22	rC14	Gallus gallus domesticus	70	rPAIL	Pseudomonas aeruginosa
23	rDiscoidin II	Dictyostelium dicodeum	71	LEL	Lycopersicon esculentum
24	BPL	Bauhinia purpurea alba	72	STL	Solanum tuberosum
25	rCGL2	Homo sapiens	73	rGal3C	Homo sapiens
26	PHAE	Phaseolus vulgaris	74	rLSLN	Laetiporus sulphureus
27	GSLII	Griffonia simplicifolia	75	rCGL3	Coprinopsis cinerea
28	rSRL	Sclerotium rolfsii	76	PNA	Arachis hypogaea
29	UDA	Urtica dioica	77	ACA	Amaranthus caudatus
30	PWM	Phytolacca americana	78	HEA	Hericium erinaceum
31	rF17AG	Escherichia coli	79	ABA	Agaricus bisporus
32	rGRFT	Griffithia sp.	80	Jacalin	Artocarpus integrifolia
33	NPA	Narcissus pseudonarcissus	81	MPA	Maclura pomifera
34	ConA	Canavalia ensiformis	82	HPA	Helix pomatia
35	GNA	Galanthus nivalis	83	VVA	Vicia villosa
36	HHL	Hippeastrum hybrid	84	DBA	Dolichos biflorus
37	ASA	Allium sativum	85	SBA	Glycine max
38	DBAI	Dioscorea batatas	86	rPPL	Pleurocybella porrigens
39	CCA	Castanea crenata	87	rCNL	Clitocybe nebularis
40	Heltuba	Helianthus tuberosus	88	rXCL	Xerocomus chrysenteron
41	rHeltuba	Helianthus tuberosus	89	VVA I	Vicia villosa
42	VVAII	Vicia villosa	90	WFA	Wisteria floribunda
43	rOryzata	Oryza sativa	91	rABA	Agaricus bisporus
44	rPALa	Phlebotomus aureum	92	rDiscoidin I	Dictyostelium Discodeum
45	rBanana	Musa acuminata	93	DBAIII	Dioscorea batatas
46	rCalsepa	Calystegia sepium	94	rMalectin	Homo sapiens
47	rRSL	Ralstonia solanacearum	95	CSA	Oncorhynchus keta
48	rBC2LA	Burkholderia cenocepacia	96	FLAG-EW29Ch-E20K	Lumbricus terrestris

4. 研究成果

感染脳乳剤を蛋白質分解酵素 (PK) 処理のみ行った精製前の検体と、部分精製を行った検体を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) し、PVDF 膜に転写後、抗プリオン蛋白質 (PrP) 抗体 (クローン T2) で PrP 検出を行った (WB 法)。検出後の PVDF 膜を、コロイド金総タンパク質染色し、膜上の総蛋白質を検出した。WB 解析では、両検体とも陰性対照 (NC) を除き全ての株から、PrP^{Sc} に特徴的な 3 本バンドのシグナルが検出された (図 1 左)。コロイド金総タンパク質染色解析では、精製前の検体から多くの夾雑蛋白質が検出されるのに対し、部分精製した検体からは、すべての株で PrP^{Sc} に一致する蛋白質のみが検出されており、PrP^{Sc} が高度に精製されていることが示唆された (図 1 右)。

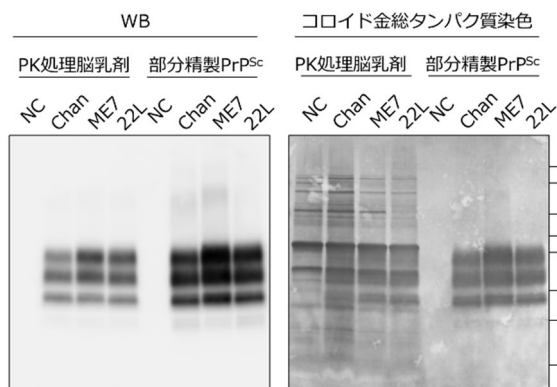


図 1. 精製前と部分精製された PrP^{Sc} の WB とコロイド金総タンパク質染色解。

部分精製PrP^{Sc}を蛍光標識後、高密度レクチンアレイに反応させ、エバネッセント蛍光スキャナを用いて糖鎖プロファイルを取得した。クラスター解析を行った結果、プリオン株ごとに解析検体（各株3匹）がクラスターリングされた。このことから、部分精製PrP^{Sc}の糖鎖プロファイルに基づき、プリオン株が識別可能であると考えられた（図2）。

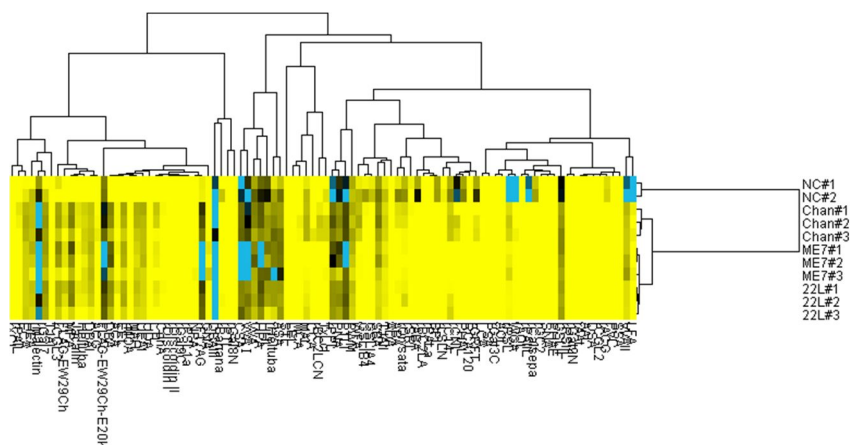


図2. 各株感染マウス(n=3)から部分精製した PrP^{Sc}に対応するレクチン結合プロファイルの階層クラスター分析

続いて同じ検体を使用し、Glycoblottting 法を用いて各プリオン株の N-結合型糖鎖プロファイルを取得した。3 株で合計 21 種類の糖鎖構造が検出された。構成糖に Deoxyhexose を含む構造が多く検出され、構成糖に Deoxyhexose を含む構造を合計すると全体の約 97~98%を占めた。シアル酸を持たない中性糖鎖が全体の 88~90%を占めた。検出される糖鎖構造の種類は、各株固有の特徴を示した（表2）。

最後に培養細胞で複製された各プリオン株の PrP^{Sc} の糖鎖プロファイルの比較を行うため、プリオン持続感染細胞からの PrP^{Sc} 部分精製を試みた。はじめに、プリオン持続感染細胞を PIPLC 処理し、回収された細胞表面の GPI アンカー型蛋白質から異常プリオン蛋白質の部分精製を試みたが、解析に使用可能な収量ならびに精製度に達しなかった。次に、大量のプリオン持続感染細胞を正常マウス脳乳剤に添加し、マウス脳からの異常プリオン蛋白質の部分精製法を適用した。しかし、回収された PrP^{Sc} の収量・精製度ともに低いままであった。最後に、蛋白質分解酵素処理した持続感染細胞溶解液を濃縮し、SDS 存在下で加熱後に希釈し、免疫沈降を行った。しかし、ビーズに固相化した抗体が漏出し、抗原溶出条件を見出すことができなかった。

表2. 各プリオン株 PrP^{Sc} の N-結合型糖鎖プロファイル

Peak No.	Chandler SAF	ME7 SAF	22L SAF
1	0	0.512549844	0
2	1.229535525	1.325280618	1.781598993
3	0.413457692	0.37936384	0.500754679
4	6.792271621	7.60249765	7.046500561
5	1.062721686	1.212462336	1.632067981
6	0.329879681	0.291212262	0
7	1.114950333	0	1.26416801
8	1.073281938	1.278009979	1.374923199
9	0.490924614	0.549406146	0.548150402
10	11.5780199	13.23935899	12.262876
11	0.690902357	0.748598325	1.020658257
12	0.233842679	0.237131465	0.501823512
13	1.188084394	1.055540399	0.971153585
14	0.349150272	0.305123913	0.470710843
15	0.759423392	0.949797186	1.03108567
16	2.394991927	2.142880249	2.581686575
17	0.34717778	0.482034723	0.296085507
18	0.302706719	0	0
19	0.81374232	0.6672226	0.85806773
20	0.368987011	0.432063678	0.563825225
21	0.661275978	0.829720953	0.827035028
	32.19532782	34.24025516	35.53317176
Internal standerd	66.66666667	66.66666667	66.66666667

注1：蛋白量 100 μg あたりの糖鎖量（単位：pmol）を表示

注2：推定糖鎖構造は割愛

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuura Yuichi, Miyazawa Kohtaro, Horiuchi Motohiro, Suzuki Akio, Yokoyama Mayumi, Imamura Morikazu, Ikeda Keigo, Iwamaru Yoshifumi	4. 巻 66
2. 論文標題 Extended application of the rapid post mortem test kit for bovine spongiform encephalopathy to chronic wasting disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 212～215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12968	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 Onodera Takashi, Sakudo Akikazu, Iwamaru Yoshifumi, Yokoyama Takashi, Haritani Makoto, Sugiura Katsuaki, Shimakura Hidekatsu, Haga Takeshi, Onishi Rumiko, Furusaki Koichi	4. 巻 17
2. 論文標題 Calcium bicarbonate as an antimicrobial, antiviral, and prion-inhibiting agent (Review)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/br.2022.1540	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 Imamura Morikazu, Tabeta Naoko, Iwamaru Yoshifumi, Takatsuki Hanae, Mori Tsuyoshi, Atarashi Ryuichiro	4. 巻 613
2. 論文標題 Spontaneous generation of distinct prion variants with recombinant prion protein from a baculovirus-insect cell expression system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 67～72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.04.137	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩丸祥史、宮澤光太郎、松浦裕一、池田圭吾、館野浩章
2. 発表標題 異常プリオン蛋白質の糖鎖プロファイルに基づくプリオン株の識別
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022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	館野 浩章 (Tateno Hiroaki) (30450670)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究 グループ長 (82626)	

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