

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月8日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780299

研究課題名（和文）新規プリオン蛋白質（PrP）ファミリーShadoo と PrP の相互作用に関する研究
 研究課題名（英文） Analysis of interaction between novel prion protein (PrP) family Shadoo and PrP

研究代表者

作道 章一（SAKUDO AKIKAZU）

琉球大学・医学部・准教授

研究者番号：10397672

研究成果の概要（和文）：

本研究では、プリオン蛋白質（PrP）遺伝子発現が Shadoo(Sho)遺伝子発現に与える影響を解析するため、PrP 遺伝子欠損細胞株(HpL)を用いて PrP 遺伝子導入により Sho 遺伝子の発現量はどうか、また血清除去すると Sho 遺伝子の発現量に変化はあるかの解析を行った。HpL に PrP 遺伝子発現ベクターを導入した PrP 細胞と空ベクターを導入した EM 細胞で Sho 遺伝子の発現量は変わらなかったことから、PrP 遺伝子発現は Sho 遺伝子発現に特に影響を与えないことが示唆された。また、血清除去下で EM 細胞と PrP 細胞で Sho 遺伝子の発現量は変わらなかった。PrP 遺伝子発現はアポトーシス抑制するが、これは Sho 遺伝子の発現に関係ないものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the influence of prion protein (PrP) expression on Shadoo (Sho) expression, the levels of Sho in PrP-deficient cell line (HpL) was analyzed before and after serum deprivation. In the presence of serum, the similar expression levels of Sho between HpL and HpL expressing PrP were observed, suggesting that the PrP expression did not affect the levels of Sho. In addition, serum deprivation did not change the expression levels of Sho in both HpL and HpL-PrP cells. These suggest anti-apoptotic function of PrP is independent of Sho expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：病原微生物

1. 研究開始当初の背景

プリオン病はプリオンと呼ばれる蛋白質からなる感染性粒子によって引き起こされる致死性の神経変性疾患である。プリオンの主要構成成分である異常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）は正常型プリオン蛋白質（PrP^C）を異常型に変換する。プリオン病に感染した動物細胞内では PrP^C が低下し PrP^{Sc} が増加するものと考えられている。プリオン蛋白質（PrP）は哺乳動物間で高い相同性を持ち、脳に高く発現していることが知られているが、そ

の生理機能はあまりわかっていない。これまでに私たちは、PrP 機能を解析するために PrP 遺伝子欠損細胞を作製し、解析を行ってきた。PrP 遺伝子ノックアウトマウスから得られた PrP 遺伝子欠損細胞株が樹立されており、その一つである HpL（神経前駆細胞）を血清除去すると細胞はアポトーシスを起こし、HpL に PrP 遺伝子を再導入した細胞では血清除去してもアポトーシスを起こさないことが分かっている。このことから、PrP にはアポトーシスを抑制する機能があると

考えられる。PrP の構造のうちオクタリピート領域と疎水性領域がアポトーシス抑制に関与していると考えられており、それとよく似た構造を持つプリオン関連蛋白質として Shadoo 蛋白質 (Sho) がある。Sho のテトラリピート領域が PrP のオクタリピート領域、Sho の疎水性領域が PrP の疎水性領域とそれぞれ対応している。PrP の機能がまだ分かっていない部分が多いことから、PrP 関連蛋白質の構造的または機能的な比較研究が進められている。

2. 研究の目的

本研究では、PrP 遺伝子発現が Sho 遺伝子発現に与える影響を解析するため、PrP 遺伝子欠損細胞株を用いて PrP 遺伝子導入により Sho 遺伝子の発現量はどう変わるか、また血清除去すると Sho 遺伝子の発現量に変化はあるかの解析を行った。

3. 研究の方法

HpL3-4 に PrP 遺伝子発現ベクターを導入した HpL3-4-PrP (PrP 細胞) と空ベクターを導入した HpL3-4-EM (EM 細胞) を実験に用いた。

4. 研究成果

EM 細胞と PrP 細胞で Sho 遺伝子の発現量は変わらなかったことから、PrP 遺伝子発現は Sho 遺伝子発現に特に影響を与えないことが示唆された。また、血清除去下で EM 細胞と PrP 細胞で Sho 遺伝子の発現量は変わらなかったことから、PrP 遺伝子発現によるアポトーシス抑制は Sho 遺伝子の発現に関係ないものと考えられた。プリオンに感染した動物の脳内では Sho の発現量が低下すると言われているが、これらのことからプリオン病での PrP^C の発現量低下と Sho の発現量低下には関連がないものと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

- (1) Hirata A, Hori Y, Koga Y, Okada J, **Sakudo A**, Ikuta K, Kanaya S, Takano K, Enzymatic activity of a subtilisin homolog, TK-SP, from *Thermococcus kodakarensis* in detergents and its ability to degrade the abnormal prion protein, BMC biotechnol, in press. (査読有)
- (2) Ano Y, **Sakudo A**, Onodera T, The role of microglia in oxidative toxicity associated with encephalomyocarditis virus infection in the central nervous system, Int J Mol Sci, 2012, 13(6), 7365-7374. (査読有)
- (3) **Sakudo A**, Ikuta K, A technique for capturing broad subtypes and circulating recombinant forms of HIV-1 based on anionic polymer-coated magnetic beads, Int J Mol Med, 2012, 30(2):437-442. (査読有)
- (4) **Sakudo A**, Onodera T, Virus capture using

- (5) anionic polymer-coated magnetic beads, Int J Mol Med, 2012, 30(1):3-7 (査読有)
- (6) Xue G, Aida Y, Onodera T, **Sakudo A**, The 5' flanking region and intron1 of the bovine prion protein gene (PRNP) are responsible for negative feedback regulation of the prion protein. PLoS ONE 2012, 7(3), e32870. (査読有)
- (7) **Sakudo A**, Suganuma Y, Sakima R, Ikuta K, Diagnosis of HIV-1 infection by near-infrared spectroscopy: Analysis using molecular clones of various HIV-1 subtypes, Clin Chim Acta 2012, 413, 467-472. (査読有)
- (8) **Sakudo A**, Hot Topic: Bioorganic Chemistry for Medicine and Health Sciences, Mini-Rev Org Chem 2012, 9(1), 2. (査読無)
- (9) Uraki R, **Sakudo A**, Ano Y, Kono J, Yukawa M, Zanusso G, Toniolo A, Onodera T, Penetration of Infectious Prion Protein in the Intestine During the Lactation Period, Mini-Rev Org Chem 2012, 9(1), 27-30. (査読有)
- (10) 小野寺節, **作道章一**. 遅発性感染症に関する研究とフランス国立ヒト遺伝研究所訪問. 日仏生物学会誌(Bulletin de la Societe Franco-Japonaise de Biologie) 52: 73-80, 2012 (査読無)
- (11) Uraki R, **Sakudo A**, Michibata K, Ano Y, Kono J, Yukawa M, Onodera T, Blocking of FcR suppresses the intestinal invasion of scrapie agents, PLoS ONE 2011, 6:e17928. (査読有)
- (12) Shintani H, **Sakudo A**, McDonnell GE, Method of Rapid Microbiological Assay and Application to Several Area, Biocontrol Sci, 2011, 16:13-21. (査読有)
- (13) **Sakudo A**, Ano Y, Onodera T, Nitta K, Shintani H, Ikuta K, Tanaka Y, Fundamentals of Prions and Their Inactivation, Int J Mol Med, 2011, 27, 483-489. (査読有)
- (14) **Sakudo A**, Onodera T, Tissue- and cell type-specific modification of prion protein (PrP)-like protein Doppel, which affects PrP endoproteolysis, Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404, 523-527. (査読有)
- (15) **作道章一**, 田中康春, プリオン蛋白質 (PrP) と PrP ファミリー蛋白質、防衛防衛, 39, 77-81, 2011. (査読無)

[学会発表] (計 8 件)

- (1) **作道章一**. プリオン蛋白質(PrP)遺伝子欠損細胞株を用いた PrP の機能解析.

- 第 155 回日本獣医学会学術集会, 東京, 3 月 28 日~30 日, 2013.
- (2) 花城日向子, 松田盛, 小野寺節, **作道章一**. プリオン蛋白質 (PrP) 遺伝子欠損株を用いたプリオン関連蛋白質 Shadoo の発現解析. 日本ウイルス学会, 大阪, 11 月 13 日~15 日, 2012.
 - (3) Koga Y, Tanaka S, **Sakudo A**, Hirata A, Takano K, Ikuta K, Kanaya S. Proteolysis of PrPSc with a thermostable protease and the analysis of its infectivity. Yokohama, APPS2012, July 29-30, 2012.
 - (4) 平田あずみ, 古賀雄一, 田中俊一, **作道章一**, 生田和良, 金谷茂則, 高野和文. Tk-subtilisin による異常型プリオンタンパク質分解効果の生物学的検討. 第 23 回日本生体防御学会学術集会. 東京, 7 月 9 日~11 日, 2012.
 - (5) 松田盛, 花城日向子, **作道章一**. プリオン蛋白質ファミリー Shadoo の組織局在解析. 第 23 回日本生体防御学会学術集会. 東京, 7 月 9 日~11 日, 2012.
 - (6) Hori Y, Hirata A, Koga Y, **Sakudo A**, Ikuta K, Kanaya S, Takano K. Degradation of abnormal prion protein by a hyper-stable protease. Amsterdam, Prion2012, May 9-12, 2012
 - (7) **Sakudo A**, Uraki R, Onodera T. Establishment of prion protein gene-deficient macrophage-like cell lines. APPS2011. Karuizawa, July 10-11, 2011.
 - (8) **作道章一**, 浦木隆太, 田中康春, 小野寺節. プリオン蛋白質遺伝子欠損細胞株を用いた正常型プリオン蛋白質の機能解析: マクロファージ様細胞の作製と性状解析. 第 95 回琉球大学保健科学研究会, 沖縄, 4 月 8 日, 2011.

[図書] (計 13 件)

- (1) Onodera T, **Sakudo A**. Introduction. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. Current Progress in Advanced Research, UK, Horizon Scientific Press, 2013. in press
- (2) Onodera T, Sugiura K, Matsuda S, **Sakudo A**. Function of cellular prion protein. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. Current Progress in Advanced Research, UK, Horizon Scientific Press, 2013. in press
- (3) **Sakudo A**. Prion protein and the family members, Doppel and Shadoo. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. Current Progress in Advanced Research, UK, Horizon Scientific Press, 2013. in press
- (4) **Sakudo A**. CWD and other prion diseases. In: Sakudo A, Onodera T, Eds. Current Progress in Advanced Research, UK, Horizon Scientific Press, 2013. in press

- (5) **Sakudo A**, Onodera T. Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE). In: Liu D Ed. MANUAL OF SECURITY SENSITIVE MICROBES AND TOXINS, New York, TAYLOR & FRANCIS, 2013. in press
- (6) **作道章一**. プリオン. In: 作道章一・編 食・健康の高安全化 ー殺菌、滅菌、消毒、不活化、有害物除去技術, 東京, サイエンス&テクノロジー株式会社, pp263-271, 2012.
- (7) **作道章一**. ウイルス. In: 作道章一・編 食・健康の高安全化 ー殺菌、滅菌、消毒、不活化、有害物除去技術, 東京, サイエンス&テクノロジー株式会社, pp233-243, 2012.
- (8) **作道章一**, 松田盛. 滅菌処理の評価法と無菌性保証. In: 作道章一・編 食・健康の高安全化 ー殺菌、滅菌、消毒、不活化、有害物除去技術, 東京, サイエンス&テクノロジー株式会社, pp34-41, 2012.
- (9) 高山正彦, **作道章一**. 殺菌, 滅菌, 消毒, 不活技術に関する基礎用語の意味. In: 作道章一・編 食・健康の高安全化 ー殺菌、滅菌、消毒、不活化、有害物除去技術, 東京, サイエンス&テクノロジー株式会社, pp27-33, 2012.
- (10) **作道章一**. はじめに. In: 作道章一・編 食・健康の高安全化 ー殺菌、滅菌、消毒、不活化、有害物除去技術, 東京, サイエンス&テクノロジー株式会社, pp1, 2012.
- (11) **Sakudo A**, Chapter 1.1: Preface in "Sterilization and disinfection by plasma: Sterilization mechanisms, biological and medical applications", NOVA Science Publishers, 2011, pp. 1-2.
- (12) **Sakudo A**, Onodera T, Tanaka Y, Chapter 2: General information on sterilization, disinfection and inactivation (Inactivation of viruses) in "Sterilization and disinfection by plasma: Sterilization mechanisms, biological and medical applications", NOVA Science Publishers, 49-60, 2011.
- (13) Onodera T, **Sakudo A**, Xue G, Zanusso G, Sugiura, K, Prions. In Molecular Detection of Human Viral Pathogen, Chapter 82, Taylor & Francis, 1095-1107, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://cellmetab.exblog.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

作道 章一 (SAKUDO AKIKAZU)

琉球大学・医学部・准教授

研究者番号：10397672

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし