

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650186

研究課題名(和文) 蛍光1分子イメージングによるプリオン蛋白重合度の解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of prion protein oligomers by single molecule fluorescence imaging

研究代表者

岩城 徹 (Iwaki, Toru)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40221098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン蛋白(PrP)の重合度はプリオン病の病態形成機序と密接な関連がある。プリオン感染細胞溶解液中のPrPの重合状態を、全反射蛍光顕微鏡を用いて分子レベルで調べた。細胞溶解液を分子サイズに準じてゲルろ過で分画した。オリゴマー分画とモノマー分画の両方について蛍光標識抗PrP抗体(SAF70および8G8)と反応させた。明るい輝点は異常型PrPでは特異的epitopeが埋没していると考えられている8G8抗体よりも、SAF70抗体とオリゴマー分画を反応させた条件で多く見られた。全反射蛍光顕微鏡によるイメージングは病態形成過程におけるPrPオリゴマーの重合状態と特性の決定に役立つと思われる。

研究成果の概要(英文)：The degree of polymerization of PrP has a close relationship with the pathological mechanisms of prion diseases. We examined the polymerization state of PrP in lysates of prion-infected cells using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). The crude lysates were fractionated by gel filtration. Both the oligomer-rich and the monomer-rich fractions were probed with fluorescein-labeled anti-PrP antibodies (mAb SAF70 and mAb 8G8). Fluorescent spots of varying intensity were detected, with the ratio of intense fluorescent spots being greater in the oligomer fraction samples with mAb SAF70 than those with 8G8, the specific epitope of which is thought to be buried in abnormal PrP molecules. The results indicated that PrP oligomers could be specifically detected and conformational changes of abnormal PrP molecules observed. Imaging by TIRFM may aid in determining the polymerization state and properties of PrP oligomers in pathological processes.

研究分野：総合領域、神経病理学

キーワード：脳神経疾患 プリオン病 病理学 蛋白重合度 検出技術 全反射蛍光顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

(1) プリオン病は脳内のプリオン蛋白(PrP)の異常な沈着によって引き起こされる進行性致死性の神経変性疾患である。これらの沈着は主に、正常な細胞型 PrP(PrP^C) 由来の、重合した疾患関連 PrP(PrP^{Sc}) によって構成されている。PrP^{Sc}はPrP^Cの β -helixが β -sheetへと大きく構造変化しており、そのため PrP^{Sc} は界面活性剤不溶性の凝集体を形成しやすく、部分的に proteinase K (PK) 抵抗性を示す。プリオン病は通常 PK 抵抗性の異常型 PrP(PrP^{Res}) の検出によって診断される。しかし、プロテアーゼ感受性 PrP^{Sc} (sPrP^{Sc}) の存在が近年明らかにされた。PrP^{Res} だけでなく sPrP^{Sc} も (すなわち PrP^{Sc} 全体) を検出するために、コンフォメーション依存イムノアッセイを含む、プロテアーゼ処理を行わない代替的手法が発展してきた。

(2) 近年の研究によって 14-28 個の PrP 分子 (300-600kDa) に相当するオリゴマー状態の PrP は高度に凝集した繊維状 PrP よりも感染性や細胞毒性が高いことが示唆されている。PrP 分子の重合状態と病的メカニズムは密接な関係があるため、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーやショ糖勾配沈降法、蛍光強度分布解析法(FIDA)など重合状態を識別する技術は重要であるといえる。また、重合状態の情報を得るために蛍光をパラメータとして用いる研究も近年報告されている。

2. 研究の目的

PrP オリゴマーを検出し、分子レベルで実際の重合数を可視化するために、蛍光抗体法を用いた全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)での 1 分子イメージングを、不純物を含むシンプルな培養細胞系に応用してみた。TIRFM は蛍光相関分光法 (FCS) のような系全体の平均を測定する手法と異なり、個々の分子をイメージングする一般的な装置である。アルツハイマー病研究においては、TIRFM は A β オリゴマーによって形成された膜細孔に流入する Ca²⁺ のイメージングに用いられている。本研究で我々は病理過程における PrP の分子状態を調べる目的で TIRFM を用いて個々の PrP 分子をイメージングすることに取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) サンプル調整

PrP は培養した F3 細胞から抽出した。N2a#58 細胞はマウス神経芽細胞腫 N2a 細胞に対して正常型 PrP が 5 倍過剰発現した細胞であり、これに Fukuoka-1 株を持続感染させ維持しているのが F3 細胞株である。F3 細胞は 10% ウシ胎仔血清を加えた Opti-MEM (Invitrogen, CA, USA) 培地内で集密状態になるまで培養したのち、溶解バッファー(100mM Tris, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, pH 7.6)で可溶化した。溶解液中の未精製タンパク質はゲルろ過ス

ピンカラム(CHROMA SPIN-200, Clontech, CA, USA)で分子サイズごとに分画した。分画番号 3 番(Fig.1 に図示) はオリゴマーを多く含む分画であり、分画番号 7 番はモノマーを多く含む分画である。各分画のタンパクは 12% Bis-Tris gels (Invitrogen)を用いた SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) によって分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Immobilon-P; Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。メンブレンは抗体の非特異的吸着をブロッキングするために Tween-20 を含むトリス緩衝生理食塩水(TTBS) (10 mmol Tris-HCl, 150 mmol NaCl, 0.05% Tween-20)で希釈した EzBlock (ATTO, Tokyo, Japan) に浸して室温で 1 時間インキュベートした。その後、抗プリオン抗体(mouse monoclonal SAF70 または mouse monoclonal SAF83, Cayman, MI, USA) で室温 1 時間インキュベート、続いてペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 2 次抗体 (AP192P, 1:20000; Chemicon, Temecula, CA, USA) と反応させた。免疫反応は ECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare; Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK) を用いて可視化した。

(2) 抗体のラベリング

本研究ではアミノ酸残基 142-160 を認識する mAb SAF70 とアミノ酸残基 95-110 を認識する mAb 8G8 の 2 つの抗プリオン 1 次抗体を用いた。2 つの抗体はそれぞれ IgG Purification Kit-G (Dojindo, Kumamoto, Japan)を用いて精製し、精製した各 IgG のアミノ基を Fluorescein Labeling Kit-NH2 (Dojindo, Kumamoto, Japan)を用いて蛍光ラベルした。各抗体のラベル率は取扱説明書に従って測定し、その結果 SAF70 では 12.3、8G8 では 11.2 であった。

(3) 顕微鏡観察

各蛍光抗体(10 pmol) は分画したタンパク 20 mg/ml と室温で 1 時間反応させた。サンプルは lysis buffer で fluorescein 濃度が約 1nM になるように希釈したのち、2 枚のカバーガラスで作成した chamber に流し込んだ。使用するカバーガラスは 3M KOH に 12 時間浸けて表面を洗ったあと、蒸留水ですすいだ。Fluorescein 標識抗プリオン抗体を PrP 分子と反応、もしくは反応させずにガラス表面に吸着させ、TIRFM を用いて観察した。ブルーレーザー (wavelength 488nm) を使用した TIRF 装置は IX71 顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) に接続し開口数 1.45 (100 \times Plan Apo TIRFM, Olympus) の対物レンズと高感度 CCD カメラ (Roper, TX, USA) を使用した。すべての条件において露光時間 1000 ms で静止画数十枚を撮影した。

(4) イメージ解析

背景のムラを画像解析ソフト(ImageJ, NIH, MD, USA) の rolling-ball アルゴリズムによって補正したのち、個々の輝点の境界と蛍光強度、各スポットの面積を別の画像解析ソフ

ト(MetaMorph, Molecular Devices, CA, USA)を用いて検出した(Fig. 2D)。各輝点の面積と輝度を掛け合わせた integrated intensity の分布のヒストグラムを条件ごとにプロットした。ヒストグラムのメジャーピークは1次のガウス分布で近似し、ガウス分布内の面積を計算した。このガウス分布の 99.9%を除外した領域を明るいスポットと定義した。すべての輝点数に対する明るいスポットの割合を重合状態の指標として用いた。

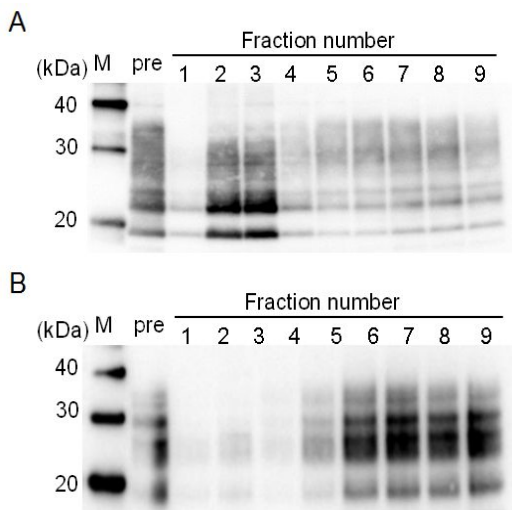
4. 研究成果

(1) 分画の選択

ゲルろ過スピンカラムを用いた遠心を繰り返すことにより PrP 分子を分子サイズごと(もしくは重合状態ごと)に分離することに培養細胞系で初めて成功した。各分画に溶出した PrP はラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) によって評価した (Fig. 1)。先行論文での報告により、分画番号 3 の分子量は >200 kDa と見積もられ、モノマー PrP に相当する約 30 kDa の分子量のタンパク質は分画番号 6-8 に溶出していることが分かっている。F3 細胞溶解液のオリゴマーが多く含まれる分画(分画番号 3)とモノマーが多く含まれる分画(分画番号 7)の両方を以降の実験に使用した。

Figure 1. 培養細胞ホモジネートをゲルろ過スピンカラムにより分離した溶出分画の Western blot 解析

細胞溶解液を、ゲルろ過スピンカラムを用いてサイズ分画した。大きい分子は早い分画に、小さい分子は遅い分画に集められる。各分画に溶出した PrP は SDS-PAGE にて評価した。M: 分子量マーカー, pre: 分画前サンプル。(A) F3 細胞溶解液の分画パターン。mAb SAF70 を1次抗体として用いた。図示するとおり PrP 分子は SDS 処理により変性しているが、分画番号 3 番はオリゴマーを多く含む分画とみなし、分画番号 7 番はモノマーを多く含む分画とみなした。(B) N2a 細胞溶解液の分画パターン。mAb SAF83 を1次抗体として用いた。



(2) 検出されたスポットの蛍光強度の測定
 点在する蛍光輝点は PrP 特異抗体と反応させたオリゴマー分画とモノマー分画の両方のサンプルで観察された(Fig. 2)。これらの輝点は蛍光抗体を含まない条件では観察されなかった。シグナル強度のヒストグラムは SAF70 抗体と反応させた条件においてモノマー分画よりもオリゴマー分画で明るい輝点数が多かったことを示している(Fig. 3A)。8G8 抗体と反応させたサンプルでは PrP オリゴマーとモノマー間でのシグナル強度の差が小さかった(Fig. 3B)。

Figure 2. TIRF 顕微鏡による蛍光輝点の観察 (A) Fluorescein-SAF70 と反応させたオリゴマー分画. (B) Fluorescein-SAF70 と反応させたモノマー分画. (C) Fluorescein-8G8 と反応させたオリゴマー分画. (D) 個々の蛍光輝点の境界の認識.

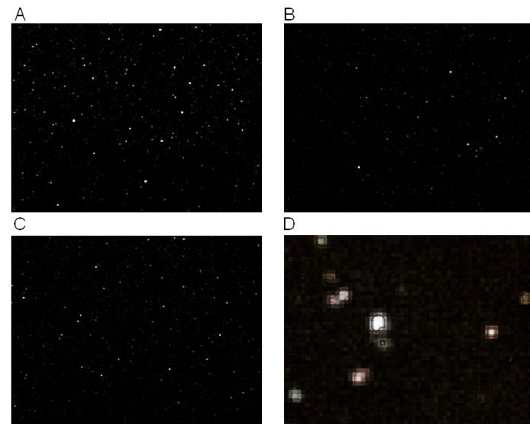
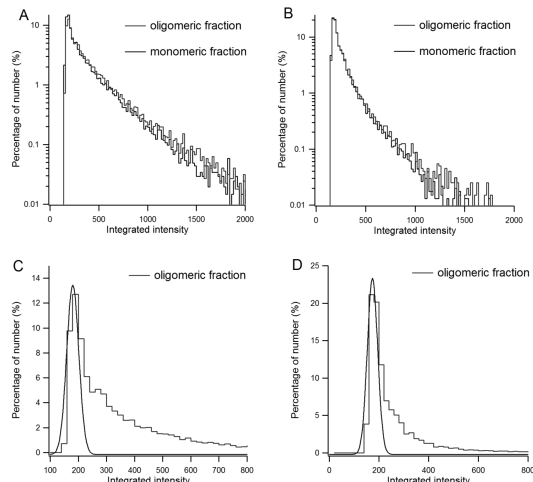


Figure 3. シグナル強度のヒストグラム

(A) SAF70 抗体. (B) 8G8 抗体. すべての画像のデータを条件ごとに1つにまとめ、片対数グラフで示した。オリゴマー分画とモノマー分画の差は 8G8 抗体よりも SAF70 抗体でよく検出された。(C, D) オリゴマー分画と SAF70 抗体(C) もしくは 8G8 抗体(D) を反応させた条件での各ヒストグラムのメジャーピークをガウス分布でフィッティングし、蛍光抗体 1 分子に相当する蛍光強度を示す領域を抽出した。



(3) 明るい輝点の検出割合の違い

蛍光強度のヒストグラムの形は複数のガウス分布の重ね合わせと捉えることができる。蛍光抗体 1 分子の蛍光強度に相当するであろう領域を抽出するために各ヒストグラムのメジャーピークをガウス分布でフィッティングした (Fig. 3C, 3D)。明るい輝点の割合の平均はヒストグラム全体の面積から、蛍光抗体 1 分子相当領域のガウス分布の面積の 99.9% を引くことによって計算した (Table. 1)。SAF70 抗体を用いた時の明るい輝点の割合はモノマー分画で $58.3 \pm 9.0\%$ 、オリゴマー分画で $64.4 \pm 8.3\%$ であった。この 2 条件の差は有意であった (Student's t test, $p = 0.018$)。一方、8G8 抗体を用いた 2 条件では有意差は得られなかった (モノマー分画で $38.8 \pm 7.2\%$ 、オリゴマー分画で $41.3 \pm 6.5\%$)。

Table 1. 明るい輝点の検出割合の比較

* Student's t-test. n.s.: no significant.

Antibody	PrP fraction	Average number of spots by image	Average rate of intense spots (%)	
SAF70	oligomer	929 ± 348	64.4 ± 8.3	* $p = 0.018$
	monomer	819 ± 222	58.3 ± 9.0	
8G8	oligomer	834 ± 218	41.3 ± 6.5	n.s.
	monomer	763 ± 208	38.8 ± 7.2	

(4) 考察

本研究で我々は TIRFM を使い様々な輝度の蛍光輝点を検出した。このアプローチは蛍光相関分光法のような他のいくつかの技術のように系全体の平均値を測定することはできないが、個々の輝点ひとつひとつから PrP 分子の重合状態を見積もるシンプルで有効な手段である。TIRFM は未精製の細胞溶解液中の PrP 分子の様々な重合状態の解析を可能にする。Birkmann らは、燐タンゲステン酸ナトリウム (PTA) 沈殿により異常型 PrP を濃縮したのち蛍光抗プリオン抗体と免疫反応させた重合 PrP を、共焦点レーザー走査顕微鏡に準拠した FIDA という装置で検出している。しかし、PTA 沈殿による濃縮はほとんどのモノマー PrP を排除してしまう上に低サイズの PrP オリゴマーもおそらく減少させてしまう。本研究の未精製の細胞溶解液による試行はそのため、低サイズの PrP オリゴマーを検出することが可能であり、偏った PrP の重合状態の測定を避けることに有効である。

本研究では、異なるエピトープを持つ特異的抗体を用いた比較解析により PrP オリゴマーの構造変化が検出できた。ヒストグラムに示された輝度のメジャーピークはフリーの蛍光抗体と、モノマー PrP に結合した蛍光抗体 1 分子の両方を含んでいる。蛍光強度は抗体のラベル率、免疫複合体における蛍光の分子間相互作用、露光時間内における蛍光分子

のガラスへの吸着時間などに影響を受けるため、メジャーピークは幅広い分布を示している。蛍光抗体 1 分子がフリーであるかモノマー PrP と結合しているかどうかは識別不能であるため、メジャーピークをモノマー PrP とは定義できないが、蛍光強度が低いこのメジャーピークを除外することによって、複数の蛍光抗体と反応したポリマー PrP の量を浮き彫りにすることができる。上述の不確かさの理由から重合状態を定義する特定のカットオフ値は設定しなかった。この考えのもとに明るい輝点の割合を見積もり、オリゴマー分画とモノマー分画間で蛍光強度の分布の差を比較した結果、8G8 抗体よりも SAF70 抗体と反応させたときにその差が大きかった。これは SAF70 抗体が認識するエピトープ (PrP142-160) が重合状態にかかわらず露出している一方、8G8 抗体のエピトープ (PrP95-110) は異常型 PrP の大部分で埋没してしまうためと考えられる。このことから検出された輝点の様々な輝度は PrP の重合度を反映していることが示唆された。

オリゴマー分画とモノマー分画の結果における差は有意ではあったが、SAF70 抗体においてでさえ期待したよりも顕著ではなかった。この理由に関して 3 つの可能性が挙げられる。第一に、使用したスピナラムの低い分画能では各分画内でオリゴマーとモノマーを分離するには不十分であった可能性である。第二に、モノマー分画に含まれる PrP 分子は、プリオン感染細胞株から抽出したものであるため、サンプル調整中にオリゴマーに重合しやすい部分があったと考えられる。タンパクの重合反応は非常に動的であり、非常に不均一な集団の平衡状態は周囲の環境によって容易に変化することが予想される。第三に、ひとつのオリゴマー (1000 kDa) に複数の抗体が結合することで互いに干渉しあう可能性がある。オリゴマー分画は高度に凝集したフィブリルは含まないため、蛍光強度の増加程度も限られている。8G8 抗体を用いた条件で観察されたいくつかの明るい輝点はオリゴマーにおける PrP 分子のいくつかはルーズに折りたたまれていて、コアドメイン中の特異的エピトープが露出していたか、もしくは単に蛍光抗体が凝集していたと考えられる。より正確なデータを得るためには、余剰な蛍光抗体の量が不透明である等のいくつか解決すべき問題がある。加えて、抗体とタンパクの反応濃度比の選別、露光時間などの検出条件を含む実験手法の発展などさらなる検討が必要である。しかしながら結論として、我々はプリオン感染細胞の未精製溶解液中の PrP オリゴマーを検出し、異常型 PrP 分子の構造変化を識別した。TIRFM は本研究で検討した病理過程における PrP の分子状態の測定だけでなく、今後他のコンフォメーション病研究への応用も可能である。

<引用文献>

Minaki H, Sasaki K, Honda H, Iwaki T. Prion protein oligomers in Creutzfeldt-Jakob disease detected by gel-filtration centrifuge columns. *Neuropathology* 2009; 29: 536-542.

Sasaki K, Minaki H, Iwaki T. Development of oligomeric prion-protein aggregates in a mouse model of prion disease. *J Pathol* 2009; 219: 123-130.

Birkmann E, Henke F, Weinmann N et al. Counting of single prion particles bound to a capture-antibody surface (surface-FIDA). *Vet Microbiol* 2007; 123: 294-304.

Tremblay P, Ball HL, Kaneko K et al. Mutant PrPSc conformers induced by a synthetic peptide and several prion strains. *J Virol* 2004; 78: 2088-2099.

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4件)

Kobayashi A, Matsuura Y, Iwaki T, Iwasaki Y, Yoshida M, Takahashi H, Murayama S, Takao M, Kato S, Yamada M, Mohri S, Kitamoto T. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease MM1+2C and MM1 are identical in transmission properties. *Brain Pathol*. In press 査読有
DOI: 10.1111/bpa.12264.

Hamasaki H, Honda H, Suzuki SO, Hokama M, Kiyohara Y, Nakabeppu Y, Iwaki T. Down-regulation of MET in hippocampal neurons of Alzheimer's disease brains. *Neuropathology* 34: 284-290, 2014 査読有
DOI: 10.1111/neup.12095.

Shibano S, Sasaki K, Kidoaki S, Iwaki T. Detection of prion protein oligomers by single molecule fluorescence imaging. *Neuropathology* 33: 1-6, 2013 査読有
DOI: 10.1111/j.1440-1789.2012.01316.x

Honda H, Ishii R, Hamano A, Itoh K, Suzuki SO, Fushiki S, Nakagawa M, Iwaki T. Microsphere formation in a subtype of Creutzfeldt-Jakob disease with a V180I mutation and codon 129 MM polymorphism. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 39: 844-848, 2013 査読有
DOI: 10.1111/nan.12047.

[学会発表](計5件)

本田裕之、発症に17年の差をみとめたGSS一卵性双生児姉妹例の病理学的検討. 第55回日本神経病理学会、2014年6月6日、学術総合センター(東京都・千代田区)

濱崎英臣、アルツハイマー病脳におけるHGF受容体の発現変化. 第55回日本神経病理学会、2014年6月6日、学術総合センター(東

京都・千代田区)

本田裕之、プリオン蛋白陽性の小球状構造物を有するV180I CJDにおける免疫組織化学的・蛋白化学的検討. 第54回日本神経病理学会、2013年4月26日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

Hideomi Hamasaki, Altered expression of c-Met in Alzheimer's disease brains. 第35回日本分子生物学会、2012年12月11日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

本田裕之、V180I CJDの剖検例における特異なプリオン蛋白沈着パターン. 第53回日本神経病理学会、2012年06月30日、朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩城 徹 (IWAKI Toru)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 40221098

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

木戸秋 悟 (KIDOAKI Satoru)

九州大学・先端物質化学研究所・教授

研究者番号: 10336018

本田裕之 (HONDA Hiroyuki)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号: 90624057