

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870479

研究課題名(和文)正常プリオン蛋白質の銅イオン結合部位を介したプリオン病原性の決定メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the prion pathogenic decision mechanism through a copper ion binding site of a prion protein

研究代表者

原 英之(HARA, Hideyuki)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教

研究者番号：40469953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン病では、病原体「プリオン」が感染すると、宿主蛋白質である正常型プリオン蛋白質が凝集性の異常型プリオン蛋白質へ構造変換する。しかし、この変換機構は不明である。本研究では、プリオン蛋白質の51-90番目のアミノ酸領域(OR部位)を欠損した遺伝子改変マウスでは、プリオンの種類によって感染しやすさに違いが存在することを明らかにした。これはプリオンによって構造変換の機構が異なる可能性を示唆している。また、OR部位には、銅イオンが結合することから、プリオンの種類と銅イオンがプリオン病の病態進行にどのように影響するかを検討したが、銅イオンはプリオン病の病態進行には影響を及ぼさなかった。

研究成果の概要(英文)：Prion diseases are characterized by the replicative propagation of disease-associated forms of prion protein (PrP<sup>Sc</sup>; PrP refers to prion protein). Structural conversion of the normal cellular isoform, designated PrP<sup>C</sup>, into PrP<sup>Sc</sup> is a key event in prion propagation. However, the conversion mechanism remains unclear. In this study, we intracerebrally inoculated prions into tg(PrP<sup>OR</sup>)/Prnp0/0 mice, which express mouse PrP missing only the octapeptide repeat (OR) region on the PrP-null background. There are different incubation time in infected the prions. As a result, the mechanism of structural conversion was depending on the type of prions. Also we examined the effects of copper ions on the pathological progression of prion disease. However, copper ions didn't have any influence on the pathological progression.

研究分野：神経内科学

キーワード：プリオン 構造変換 銅イオン オクタペプチドリピート

## 1. 研究開始当初の背景

プリオン病は、プリオンの感染により起こる感染性神経変性疾患である。プリオンの実体は完全に解明されていないが、健常神経組織に発現する正常型プリオン蛋白質（以下、正常型プリオン）から構造変換によって生じた異常型プリオン蛋白質（以下、異常型プリオン）であると考えられている。また、異常型プリオンは、凝集体を形成している。

プリオンが感染すると、凝集した異常型プリオンが正常型プリオンに作用し、正常型プリオンの構造を異常型プリオンに変換させる。申請者は、正常型プリオンから異常型プリオンへの構造変換には100-104番目のアミノ酸領域が必須であることをすでに報告している(Hara et al., *J. Virol.*, 2012)。プリオンには、異常型プリオンのアミノ酸組成は同一でも、異なる病原性を示す多くの「プリオン株」が存在する。異常型プリオンは、アミノ酸組成は同一でも、異なる高次構造をとれることが知られている。従って、現在、異なるプリオンの病原性は異常型プリオンの高次構造の違いによって決定されていると考えられている。しかし、異なるプリオンが感染すると、正常型プリオンがどのように異なる高次構造の異常型プリオンに変換するのか、そのメカニズムは全く不明である。

## 2. 研究の目的

プリオン病では、病原体「プリオン」が感染すると、宿主蛋白質である正常型プリオン蛋白質が凝集性の異常型プリオン蛋白質へ構造変換する。しかし、この変換のメカニズムは不明である。申請者は、100-104番目のアミノ酸領域がこの変換には必須であることを報告した(Hara et al., *J. Virol.*, 2012)。また申請者は、最近、51-90番目のアミノ酸領域（以下、OR部位）を欠損した正常型プリオン蛋白質が、あるプリオンの感染では変換しやすいが、他のプリオンの感染では変換しにくいことを発見し、プリオンによって構造変換のメカニズムが異なる可能性を見出した。本研究では、プリオン蛋白質の構造変換のメカニズムを解明することを目的とし、異なるプリオン感染時の構造変換におけるOR部位の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) プリオンの感受性に及ぼす宿主の正常型プリオン蛋白質のOR部位の影響  
OR部位を欠損した遺伝子改変(Tg)マウス（以下、 $\Delta$ ORマウス）と野生型マウス(C57BL/6マウス)にプリオン感染を行い、プリオンの種類とOR部位の有無がプリオン病の病態進行（異常型プリオンの動態や空胞形成などの病理学的特徴）にどのように影響するのかを

明らかにした。

4種類のプリオン(RML、22L、福岡-1、BSE)を4-6週齢の $\Delta$ ORマウスとC57BL/6マウス各15匹へ感染させ、通常の餌及び飲水で飼育した。

上記の(A)でプリオン感染したTgマウスとC57BL/6マウスを、感染後から発症まで40日ごとに各3匹の脳を採材し、病理学的解析と生化学的解析を行った。

- (2) 異なるプリオンの感受性に及ぼす銅イオンの影響

脳内の銅イオン濃度を变化させたマウスにプリオン感染を行い、プリオンの種類と銅イオンがプリオン病の病態進行（異常型プリオンの動態や空胞形成などの病理学的特徴）にどのように影響するのかを明らかにした。

4種類のプリオン(RML、22L、福岡-1、BSE)を4-6週齢のC57BL/6マウス各45匹へ感染させ、次の1.~3.の餌及び飲水でそれぞれ15匹ずつ飼育した。

1. 通常食（銅含有量：12  $\mu$ g/g 飼料）+ 通常の飲水
2. 高銅食（銅含有量：300  $\mu$ g/g 飼料）+ 通常の飲水
3. 低銅食（銅含有量：1  $\mu$ g/g 飼料）+ 通常の飲水

プリオン感染したC57BL/6マウスを銅濃度が通常の餌で飼育した場合、発症まで約160日かかるので、上記の(A)でプリオン感染したC57BL/6マウスを、感染後から発症まで40日ごとに各3匹の脳を採材し、病理学的解析と生化学的解析を行った。

## 4. 研究成果

- (1) プリオンの感受性に及ぼす宿主の正常型プリオン蛋白質のOR部位の影響  
 $\Delta$ ORマウスとC57BL/6マウスに4種類のプリオン(RML、22L、福岡-1、BSE)を感染させ、経過を観察した。その結果、C57BL/6マウスについては、全てのプリオン感染において潜伏期間に有意な違いは見られなかったが、 $\Delta$ ORマウスについては、潜伏期間がC57BL/6マウスと比べて短くなるプリオン(RML、22L)と長くなるプリオン(福岡-1、BSE)の2つの傾向が確認された(表1)。この時、感染中期及び末期の脳を抗プリオン蛋白質抗体や抗GFAP抗体を用いた病理学的解析や、プロテアーゼK抵抗性のプリオン蛋白質を定量する生化学的解析を行ったが、 $\Delta$ ORマウスとC57BL/6マウスにおける潜伏期間の違いを説明

できる違いは見出せなかった。

表1. 4種類のプリオンを感染させた野生型及びOR部位欠損マウスでの潜伏期間の比較

マウス	プリオン	潜伏期間 (日数)
C57BL/6	RML	165± 4
ΔOR	RML	147± 9
C57BL/6	22L	160± 4
ΔOR	22L	116± 7
C57BL/6	福岡-1	162± 2
ΔOR	福岡-1	187± 3
C57BL/6	BSE	187± 6
ΔOR	BSE	331±15

(2) 異なるプリオンの感受性に及ぼす銅イオンの影響

C57BL/6 マウスに4種類のプリオン(RML、22L、福岡-1、BSE)を感染させ、3種類の濃度(300、12、1 μg 銅/g 餌)の銅を含んだ餌で飼育し、経過を観察した。その結果、全てのプリオン感染において餌中の銅濃度は潜伏期間に有意な変化を与えなかった(表2)。

この時、感染中期及び末期の脳についても抗プリオン蛋白質抗体や抗GFAP抗体を用いた病理学的解析や、プロテアーゼK抵抗性のプリオン蛋白質を定量する生化学的解析を行ったが、なんら違いを見出すことは出来なかった。

表2. 4種類のプリオンを感染させた野生型マウスを銅イオン濃度を変化させた餌で飼育した場合の潜伏期間の比較

マウス	プリオン	餌中の銅イオン濃度	潜伏期間 (日数)
C57BL/6	RML	12 μg/g	181± 5
		300 μg/g	180± 8
		1 μg/g	173±10
C57BL/6	22L	12 μg/g	147± 3
		300 μg/g	156± 2
		1 μg/g	150± 2
C57BL/6	福岡-1	12 μg/g	174± 7
		300 μg/g	177± 5
		1 μg/g	178± 7
C57BL/6	BSE	12 μg/g	174± 5
		300 μg/g	174± 8
		1 μg/g	184± 8

(1)の結果は、プリオン病の潜伏期間がOR部位の有無による影響を受けており、その影響がプリオンの種類によって異なることを示している。つまり、OR部位は、RMLや22Lといったプリオンでは病気に対して防御的に働き、福岡-1やBSEでは、攻撃的に働いていると考えることができる。

(2)の結果については、OR部位に特異的に結合することが知られている銅イオンの濃度を変化させても、プリオン病の潜伏期間に変化がなかったことから、プリオン病の病態

進行は銅イオンには直接的な影響を受けないことを示している。つまり、プリオン病の病態進行におけるOR部位の役割は、銅イオンとは関係がないと考えることができる。

これらの結果は、OR部位がプリオン病の病態進行において、アクセル役にもブレーキ役にもなりうるという重要な知見を与えてくれた。

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2件)

Uchiyama, K., Miyata, H., Yano, M., Yamaguchi, Y., Imamura, M., Muramatsu, N., Das, N. R., Chida, J., Hara, H., and Sakaguchi, S., Mouse-hamster chimeric prion protein (PrP) devoid of N-terminal residues 23-88 restores susceptibility to 22L prions, but not to RML prions in PrP-knock-out mice., PLoS One, 査読有、9、2014、e109737、10.1371/journal.pone.0109737

原 英之、「プリオン仮説」の最終照明に挑戦しませんか?、生物工学会誌、査読無、91、2013、471、[http://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9108/9108\\_biomed3.pdf](http://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9108/9108_biomed3.pdf)

[学会発表](計2件)

清水 七海、古賀 雄一、作道 章一、原 英之、坂口 末廣、金谷 茂則、超高温菌由来プロテアーゼによるプリオンタンパク質分解の評価、第87回日本生化学会、2014年10月15日~18日、京都国際会館(京都府・京都市)

古賀 雄一、清水 七海、作道 章一、原 英之、坂口 末廣、金谷 茂則、超高温菌由来プロテアーゼによるプリオンタンパク質分解の評価、第66回日本生物工学会大会、2014年9月9日~11日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

[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]  
ホームページ等

<http://pub2.db.tokushima-u.ac.jp/ERD/person/246661/work-ja.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原 英之 (HARA, Hideyuki)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教

研究者番号：40469953

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし