

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293212

研究課題名(和文)プリオン病の新規病態として発見した細胞膜蛋白質の小胞輸送障害のメカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidation of the vesicular trafficking mechanism for prion propagation on the basis of our previous findings of the disturbed vesicular trafficking in prion disease

研究代表者

坂口 末廣 (SAKAGUCHI, Suehiro)

徳島大学・先端酵素学研究所・教授

研究者番号：60274635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、プリオンの分解を促進する分子として、蛋白質輸送関連分子ソーチリンを同定した。ソーチリンは、正常プリオン蛋白質及び異常プリオン蛋白質の両者と結合し、両者の分解を促進した。しかし、プリオンが感染すると、ソーチリンはリソゾームでの分解が促進され低下することが分かった。また我々は、ノックアウトマウスはコントロールマウスと比べて早期にプリオン病を発症し、早期に死亡することを明らかにした。脳内の異常プリオン蛋白質の蓄積は、ノックアウトマウスでは早期から検出できた。以上の結果から、プリオンはソーチリンの発現を低下させることにより、自己増殖していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified that sortilin promotes degradation of prions. Sortilin interacted with the normal and abnormal prion proteins and transported them to lysosomes for degradation. Downregulation of sortilin increased the abnormal prion protein in prion-infected cells. The normal prion protein was also increased by downregulation of sortilin in prion-uninfected cells. Interestingly, prion infection reduced sortilin by promoting lysosomal degradation of sortilin. Finally, we intracerebrally inoculated prions into sortilin-knockout (KO) and control wild-type (WT) mice. Sortilin-KO mice developed prion disease and died significantly earlier than WT mice. Sortilin-KO mice also accumulated the abnormal prion protein from the earlier stages of infection, compared to control WT mice. These results suggest that prions could propagate themselves through reducing sortilin.

研究分野：プリオン学

キーワード：プリオン プリオン病 ソーチリン 蛋白質輸送 蛋白質分解 ノックアウトマウス 神経変性疾患

### 1. 研究開始当初の背景

プリオン病は、異常型プリオン蛋白質（以下、異常プリオン）から構成される感染性蛋白質「プリオン」の脳内蓄積により起こる神経疾患である①。異常プリオンは、神経細胞の細胞膜に発現する正常型プリオン蛋白質（以下、正常プリオン）が構造変化を来たしたものである。プリオン病では、正常プリオンが異常プリオンに構成的に変換し、神経細胞死をきたす。しかし、どのようなメカニズムを介して正常プリオンが異常プリオンに構成的に変換するのか不明である。

ソーチリンは、蛋白質の細胞内輸送に関与する蛋白質である②。また、ソーチリンファミリー分子の遺伝子多型が神経変性疾患であるアルツハイマー病の病態に関与することが知られている③。さらに、ソーチリンファミリー分子がアルツハイマー病の原因因子として考えられている Aβ の分解を促進することが報告されている④。しかし、プリオン病におけるソーチリンの役割については明らかでない。

### 2. 研究の目的

本研究では、異常プリオンの脳内蓄積におけるソーチリンの役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞

マウス神経芽腫由来 N2a 細胞にプリオン蛋白質遺伝子を導入した N2aC24 細胞をプリオン非感染細胞として、またプリオン持続感染細胞には 22L プリオン持続感染 N2aC24L1-3 細胞を使用し、培養には DMEM 培地を用いた。

#### (2) プリオン感染

N2aC24 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、24 時間後に RML プリオン感染マウス脳乳剤を加え 2 または 3 日おきに継代した。

#### (3) ソーチリンノックダウン

6 ウェルプレートに播種した N2aC24 細胞または N2aC24L1-3 細胞に、Lipofectamine RNAiMax (Thermo Scientific) を用い Stealth siRNA(Thermo Scientific) を導入した。

#### (4) ソーチリンノックアウト細胞の作製

CRISPR/Cas システムにより N2aC24 細胞由来 Sortilin ノックアウト細胞を作製した。

#### (5) ソーチリンノックアウトマウスへのプリオン感染

ソーチリンノックアウトマウス⑤と野生型マウスの脳内に RML プリオン感染マウス脳乳剤を接種した。接種後、経時的に脳を摘出し、ウエスタンブロット法に供し、異常プリオンを検出した。

### 4. 研究成果

#### (1) プリオン感染によりソーチリンは低下する

プリオン非感染 N2aC24 細胞およびプリオン感染 N2aC24L1-3 細胞においてソーチリン発現量を、抗ソーチリン抗体を用いたウエスタンブロット法により比較したところ、N2aC24L1-3 細胞においてソーチリン発現量が低下していた（図1）。ソーチリン発現量低下が N2aC24L1-3 細胞特有の現象であることが懸念されたので、非感染細胞である N2aC24 細胞に RML プリオンを感染後、経時的にソーチリン発現量を解析した。ソーチリンの発現はプリオン感染 6 日後で有意に低下した。また、感染 9 日後に間接蛍光抗体法によりソーチリンおよび異常プリオンを観察したところ、異常プリオンが観察されない細胞ではソーチリンの強い蛍光が観察されるのに対して、異常プリオンを蓄積している細胞ではこれが観察されず、プリオン感染がソーチリン発現低下を引き起こしていることが示された。

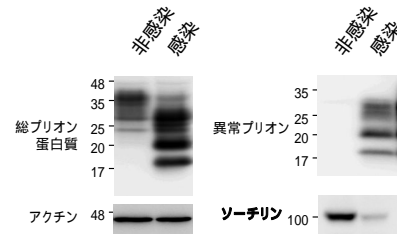


図1. 非感染細胞と感染細胞におけるソーチリン発現量の比較  
プリオン感染細胞ではソーチリン発現量が減少している。

#### (2) ソーチリンの機能抑制はプリオン蛋白質の蓄積を引き起こす

次に、ソーチリンの機能抑制が、正常プリオンおよび異常プリオンに対してどのように作用するのかを解析した。まず、非感染 N2aC24 細胞に対して siRNA によりソーチリンをノックダウンしたところ、正常プリオンの発現量は上昇し、細胞表面に蓄積した（図2）。しかし、プリオン蛋白質遺伝子の転写レベルに変化はなく、この正常プリオンの増加は正常プリオンの分解が抑制されているものと考えられた。

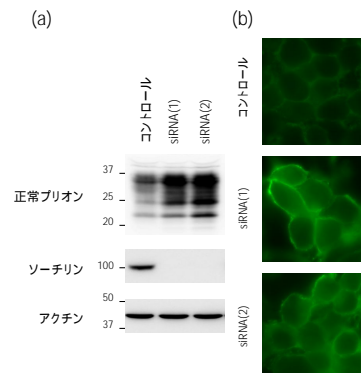


図2. ソーチリンノックダウンにより非感染細胞で正常プリオンが細胞表面に蓄積する  
(a)ウエスタンブロットによる正常プリオン発現量の比較。ソーチリンノックダウンにより正常プリオンが増加する。(b)間接蛍光抗体法による正常プリオン局在の比較。局在変化は見られないが細胞表面での蛍光強度は増加している。

また、感染N2aC24L1-3細胞においても非感染細胞同様にソーチリンをノックダウンしたところ、異常プリオンも増加することが示された(図3)。これらの結果は、ソーチリンが発現低下すると、正常プリオンおよび異常プリオンの分解が促成され、細胞に蓄積することを示した。

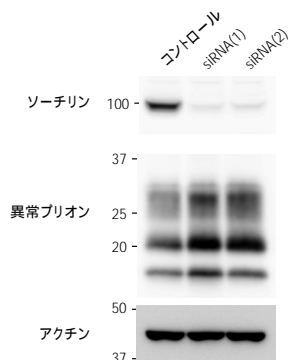


図3. 感染細胞におけるソーチリンノックダウン  
感染細胞においても、ソーチリンをノックダウンすることにより異常プリオンが増加する。

### (3) ソーチリンは正常プリオンおよび異常プリオンに結合する

ソーチリンが正常プリオンおよび異常プリオンの分解を促進するメカニズムを明らかにするために、ソーチリンが正常プリオンおよび異常プリオンに結合するか免疫沈降法にて調べた。その結果、ソーチリンは両者とも結合することが分かった。この結果は、ソーチリンは正常プリオンおよび異常プリオンと結合し、リソソームに運搬し分解を促進する可能性を示した。

### (4) ソーチリンの機能が抑制された細胞はプリオン感染に対して高感受性を示す

プリオン感染に対するソーチリンの作用について解析するために、CRISPR-Cas9システムによりN2aC24細胞のソーチリンをノックアウトしたN2aC24□Sort細胞を構築し、N2aC24細胞とRMLプリオン感染に対する感受性を比較した。プリオン感染9日後での異常プリオン量をウエスタンブロットにより比較したところ、N2aC24□Sort細胞ではN2aC24細胞の約5~10倍の異常プリオンを蓄積することが示された。また、感染7および10日後において、間接蛍光抗体法によりプリオンに感染し異常プリオンを蓄積している細胞の割合を比較したところ、N2aC24□Sort細胞ではN2aC24細胞の約5倍の細胞がプリオンに感染していた。これらの結果は、ソーチリンの機能抑制はプリオン感染に対して高感受性になることを示した。

### (5) ソーチリンノックアウトマウスは異常プリオンの脳内蓄積を促進し、プリオン病を早期に発症する

最後に、プリオン病の病態におけるソーチリンの役割を明らかにするために、ソーチリ

ンノックアウトマウスと野生型マウスにRMLプリオンを脳内接種した。感染後、脳を経時的に摘出し、ウエスタンブロット法にて異常プリオンの脳内蓄積を比較した。その結果、ソーチリンノックアウトマウスの脳内では、異常プリオンが野生型マウスと比較して早期から検出された。また、ソーチリンノックアウトマウスは、野生型マウスと比較して、早期にプリオン病を発症し、早期に死亡した(図4)。これらの結果は、ソーチリンが異常プリオンの蓄積を阻害し、プリオン病の発症を遅延する機能を有することを示した。

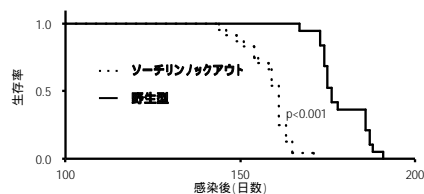


図4. プリオン感染後のソーチリンノックアウトの生存率  
ソーチリンノックアウトは、野生型マウスと比較して、プリオン病を早期に発症し、早期に死亡した。

## < 引用文献 >

Prusiner SB Prions. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 13363-13383, 1998.

Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, et al. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. Nature 427: 843-848, 2004.

Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, et al. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. Nature genetics 39: 168-177, 2007.

Caglayan S, Takagi-Niidome S, Liao F, Carlo AS, Schmidt V, et al. Lysosomal sorting of amyloid-beta by the SORLA receptor is impaired by a familial Alzheimer's disease mutation. Science translational medicine 6: 223ra220, 2014.

Jansen P, Giehl K, Nyengaard JR, Teng K, Lioubinski O, et al. Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. Nature neuroscience 10: 1449-1457, 2007.

## 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)

Das NR, Miyata H, Hara H, Uchiyama K, Chida J, Yano M, Watanabe H, Kondoh G, Sakaguchi S. Effects of prion protein devoid of the N-terminal residues 25-50 on prion pathogenesis in mice. Archives of Virology (in press). 査読有り(2017)

doi: 10.1007/s00705-017-3295-3.

Hamanaka T, Nishizawa K, Sakasegawa Y, Oguma A, Teruya K, Kurahashi H, Hara H,

Sakaguchi S, Doh-ura K. Melanin or melanin-like substance interacts with the N-terminal portion of prion protein and inhibits abnormal prion protein formation in prion-infected cells. *Journal of Virology*, 2017, 91(6). pii: e01862-16. 査読有り doi: 10.1128/JVI.01862-16.

Nagasawa Y, Takahashi Y, Itani W, Watanabe H, Hidaka Y, Morita S, Suzuki K, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Imamura M, Yokoyama T, Horiuchi M, Sakaguchi S, Mohri S, Rose MT, Nochi T, Aso H. Prion Protein Binds to Aldolase A Produced by Bovine Intestinal M Cells. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2015, 5, 43-60. 査読有り doi: 10.4236/ojvm.2015.53007.

Uchiyama K, Miyata H, Yano M, Yamaguchi Y, Imamura M, Muramatsu N, Das NR, Chida J, Hara H, 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-Knockout Mice. *PLoS ONE* 9(10):e109737, 2014. 査読有り doi: 10.1371/journal.pone.0109737.

〔学会発表〕(計15件)

内山圭司, 坂口末廣. プリオン病における異常プリオンの蓄積メカニズム. 第39回日本分子生物学会, 2016/11/30-12/2, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市). Keiji Uchiyama, Suehiro Sakaguchi. Sorting of prion protein and PrP<sup>Sc</sup> accumulation. PRION 2016/Asian Pacific Prion Symposium 2016, 2016/5/10-13, Hitotsubashi Hall, National Center of Science Building(東京都千代田区).

内山圭司, 富田満, 坂口末廣. プリオン感染により過剰な異常プリオンが蓄積する分子メカニズム. 第38回日本分子生物学会年会/第88回日本生化学会大会合同大会, 2015/12/1-4, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).

内山圭司, 富田満, 坂口末廣. Inhibition of Sortilin-mediated PrP degradation by prion infection causes excessive accumulation of abnormal prion protein. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 2015/11/22-24, Fukuoka International Congress Center(福岡県福岡市).

Keiji Uchiyama, Mitsuru Tomita, Suehiro Sakaguchi. Mechanism of sortilin-mediated PrP degradation. Asian Pacific Prion Symposium 2015, 2015/9/4-5, Ishikawa Ongakudo(金沢県石川市).

内山圭司, 坂口末廣. Novel molecular mechanism for accumulation of abnormal prion protein -Inhibition of Sortilin-mediated PrP degradation. 第15回

日本蛋白質科学会年会, 2015/6/24-26, あわぎんホール(徳島県徳島市).

坂口末廣. プリオン病におけるポストゴルジ小胞輸送障害. 革新的医療研究開発で挑む神経変性疾患—プリオン病治療耐性の確立に向けて—, 2015/2/14, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市).

坂口末廣. 蛋白質感染粒子「プリオン」と細胞内小胞輸送. 第8回共同利用・共同研究「酵素学研究拠点」シンポジウム—タンパク質代謝・分解系の酵素学—, 2015/2/10, 徳島大学藤井節郎記念ホール(徳島県徳島市).

坂口末廣, 内山圭司. プリオンによるポストゴルジ膜輸送障害. 第36回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム「生体膜における蛋白質の機能制御システムと疾患」, 2014/11/20-21, 徳島大学蔵本キャンパス(徳島県徳島市).

内山圭司, 富田満, 臼井健, 坂口末廣. 新規プリオン結合因子Sortilinのプリオン感染における役割. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 2014/11/10-12, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

内山圭司, 坂口末廣. プリオン感染と小胞輸送障害. 第87回日本生化学会シンポジウム 認知症克服に向けて: プリオン病をもっと知る, 2014/10/15-18, 国立京都国際会館(京都府京都市).

坂口末廣. プリオン病のイントロダクション. 第87回日本生化学会シンポジウム 認知症克服に向けて: プリオン病をもっと知る, 2014/10/15-18, 国立京都国際会館(京都府京都市).

Suehiro Sakaguchi. Vesicular trafficking in prion disease. Asian Pacific Prion Symposium 2014, 2014/7/6-7, Jeju International Convention Center, Jeju (Korea).

内山圭司, 坂口末廣. プリオン感染によるSortilin発現低下が異常プリオン蓄積を引き起こす. 第29回中国四国ウイルス研究会, 2014/6/28-29, 山口大学吉田キャンパス(山口県山口市).

Keiji Uchiyama, Suehiro Sakaguchi. Prions disturb post-Golgi membrane trafficking to the cell surface. The 9th International Symposium of the Institute Network, 2014/6/19-20, Ichokaikan, Osaka University(大阪府大阪市).

〔その他〕

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ier/divisions/nerve.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂口末廣(SAKAGUCHI, Suehiro)  
徳島大学・先端酵素学研究所・教授  
研究者番号: 60274635

(2)研究分担者

千田 淳司 (CHIDA, Junji)  
徳島大学・先端酵素学研究所・助教  
研究者番号：20437651

(3)研究分担者

原 英之 (HARA, Hideyuki)  
徳島大学・先端酵素学研究所・助教  
研究者番号：40469953

(4)研究分担者

矢野 雅司 (YANO, Masashi)  
徳島大学・先端酵素学研究所・技術専門職員  
研究者番号：10531858