

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460557

研究課題名(和文)新規プリオン結合因子ソーティリンによるプリオン病治療基盤技術の開発

研究課題名(英文)Development of basic technology for therapy of prion diseases based on Sortilin function

研究代表者

内山 圭司 (UCHIYAMA, Keiji)

徳島大学・先端酵素学研究所(次世代)・准教授

研究者番号：60294039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：新規プリオン結合因子としてソーティリンを同定した。ソーティリンは、プリオンのソーティング受容体として作用し、細胞表面からの取り込みおよび、後期エンドソームへのソーティングに関与していることを示した。ソーティリンの機能抑制が異常プリオン分解抑制、過剰蓄積を引き起こすことも示した。また、プリオン感染は、ソーティリンの過剰分解を引き起こしその機能を障害していることを示した。さらに、ソーティリン過剰発現によるその機能回復が、有意に異常プリオンの減少を引き起こすことを示した。また、ソーティリン欠損マウスでは、プリオン感染に対して早期に異常プリオンが蓄積し、潜伏期間および生存期間が短縮することを示した。

研究成果の概要(英文)：We have identified a novel prion (PrP)-binding protein, Sortilin, and found that it mediates trafficking of PrP to late endosomal/lysosomal compartments. Sortilin dysfunction causes delayed degradation and accelerated accumulation of abnormal prion protein (PrPSc). Remarkably, prion infection reduces Sortilin expression by inhibiting retromer-mediated retrieval of Sortilin from endosomes to the TGN, resulting in its overdegradation in lysosomes. These results indicate that PrPSc is protected from lysosomal degradation and accumulated by reducing Sortilin expression by itself. Moreover, recovery of Sortilin function by overexpression of Sortilin significantly reduced PrPSc in prion infected cells. We also showed that Sortilin deficiency in mice accelerates PrPSc accumulation and reduces incubation and survival period for prions.

研究分野：ウイルス学(プリオン)

キーワード：プリオン プリオン病 異常プリオン Sortilin ソーティング

1. 研究開始当初の背景

プリオン病の根本的な治療法は開発されておらず、これは、プリオン病の分子病態としての「プリオン感染による神経細胞死誘導機構」、「正常プリオン(PrP^C)の異常化機構」、「異常プリオン(PrP^{Sc})蓄積機構」が解明されていないことがその要因である。これに対して新規プリオン結合因子としてソーティリンを同定しており、PrP分解とPrP^{Sc}蓄積への関与を示す予備的な研究成果を得ていた。そこで、PrP分解に対するソーティリンの役割とその機能抑制によるPrP^{Sc}の蓄積メカニズムを明らかにし、「異常プリオンの蓄積抑制と除去」という観点からプリオン病治療法の開発を展開するための基盤研究を行うこととした。

2. 研究の目的

我々が新たにプリオン結合因子として同定したソーティリンは、プリオン分解に必要であることおよび、プリオン感染細胞においてソーティリンの発現量が低下していることを明らかにしていた。そこで、本研究では、ソーティリンを介したプリオン分解およびその機能抑制による異常プリオン蓄積の分子機構を明らかにし、プリオン病の治療応用へと展開するための基盤となる研究を行うことにした。具体的には、(1)プリオン分解に対するソーティリンの作用機序の解明、(2)異常プリオン蓄積機構の解明、(3)ソーティリンをターゲットとしたプリオン病治療の有用性の検証、を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)細胞および培地

マウス神経芽腫由来 N2a 細胞に由来する、N2aC24 細胞、そのプリオン持続感染細胞である N2aC24L1-3 細胞を用いた。細胞培養には、DMEM 培地を使用した。

(2)細胞または脳抽出液の調整

細胞またはマウス脳乳剤を 0.5% Triton X-100 および 0.5% DOC を含む可溶性緩衝液に懸濁した後、遠心分離(20kg, 4℃, 2min)により不溶性画分を除去したものを抽出液として用いた。

(3)マウスにおけるプリオン感染実験

1%(w/v) RML または 22L プリオン感染マウス脳乳剤 20μL をソーティリンノックアウトマウス(Sort1^{-/-})および野生型マウス(Sort1^{+/+})の脳内に直接接種した。潜伏期間、生存期間は、ログランク検定により検定した。

(4)免疫沈降

最終濃度が 0.2%(w/v)となるように CHAPS を加えた MES 緩衝液(pH7.0)により細胞またはマウス脳を可溶化した後、抗プリオン抗体(SAF61)または、抗ソーティリン抗体を加えた。4℃で2時間穏やかに拡散した後、Protein G sepharose を加えさらに2時間攪拌し、その後、Protein G sepharose を遠心分離(500g, 1min, 4℃)で回収、洗浄した。

4. 研究成果

(1)ソーティリンは新規のプリオン結合因子である

プリオン蛋白質(PrP)とソーティリンとの相互作用を確認するために、まず、抗 PrP 抗体を用いて非感染細胞抽出液に対して免疫沈降を行った結果、図1に示すように PrP とともにソーティリンが共沈殿し、ソーティリンは PrP^C と相互作用を示すことが明らかになった。次に、抗ソーティリン抗体を用い、プリオン感染細胞抽出液に対して免疫沈降を行った後、回収した Protein G sepharose を 50μg/mL の Proteinase K で処理し、共沈殿される PrP^{Sc} の検出を試みた結果、図2に示すように、ソーティリンとともに、PrP^{Sc} が検出された。これらのことから、ソーティリンは PrP^C、PrP^{Sc} の両方と相互作用を示すことが明らかになった。

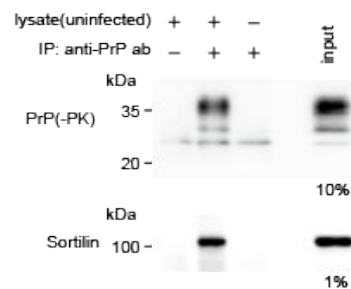


図1. ソーティリンと PrP^C の相互作用

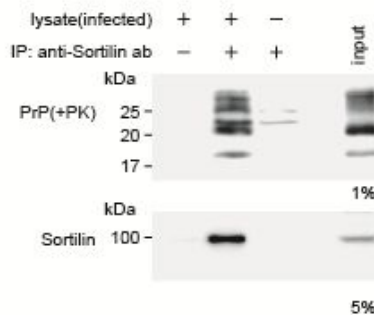


図2. ソーティリンと PrP^{Sc} の相互作用

(2)ソーティリンは PrP 分解に重要な因子である

Sortilin は、細胞内小胞輸送において積荷タンパク質受容体として働くことが知られており、酵母のホモログである VPS10 は、積荷タンパク質の液胞へのソーティングに関与していることが報告されている。そこで、ソーティリンが PrP の分解経路への輸送に関与を調べるために、siRNA により Sortilin の機能を抑制し、PrP の分解に対する影響を解析した。図3に、非感染細胞、プリオン感染細胞における結果を示す。どちらの場合も、PrP^C、PrP^{Sc} 蓄積が認められ、一方、プリオン遺伝子の発現量増加は認められなかったことから、ソーティリンは PrP の分解に重要であると考えられた。

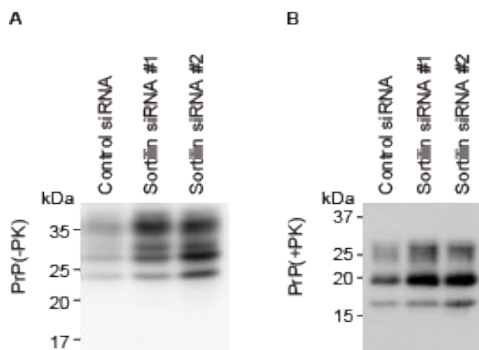


図3 . ソーティリンノックダウン
(A)非感染細胞、(B)プリオン感染細胞

(3)プリオン感染はソーティリン発現低下を引き起こす

ソーティリンは、PrP 分解に重要であることが示された。そこで、プリオン感染により PrP^{Sc} が過剰に蓄積する原因は、プリオン感染によりソーティリン機能が抑制されているためではないかと考え、非感染細胞、プリオン感染細胞において Sortilin 発現量を比較したところ、プリオン感染細胞ではソーティリン発現量が低下していることが明らかになった。そこで、プリオン感染がソーティリン発現を低下させるのかを確認するために、非感染細胞対するプリオン感染実験を実施し、感染早期に PrP^{Sc} 発現とソーティリン発現との関係を蛍光免疫染色により解析した結果、PrP^{Sc} が検出される細胞においてのみ Sortilin 発現の低下が確認された。

(4)プリオン感染細胞ではレトロマー複合体によるソーティリンのトランスゴルジネットワークへの回収が障害されている

プリオン感染がなぜソーティリン発現量低下を引き起こすのかを明らかにするために、プリオン感染細胞をリソソーム阻害剤またはプロテアソーム阻害剤で処理し、ソーティリン発現量への影響を解析した結果、リソソーム阻害剤のみソーティリン発現量増加が認められた。これは、プリオン感染細胞では、ソーティリンが過剰にリソソームへ流入しており、これがソーティリンの過剰分解を引き起こしていることを示唆している。ソーティリンは、リソソームでの過剰分解を回避するために、エンドソームにおいてレトロマー複合体によりトランスゴルジネットワーク(TGN)へ回収されることが知られている。そこで、非感染細胞、プリオン感染細胞においてレトロマー複合体構成成分で Sortilin と直接結合することが知られている VPS35 とソーティリンとの共局在を定量的に解析した結果、プリオン感染細胞において明らかに VPS35 とソーティリンのきょう局在は減少していた。これらの結果から、プリオン感染細胞ではレトロマー複合体によるソーティリンの TGN への回収に障害が生じており、これ

がソーティリンの過剰分解を引き起こし最終的にソーティリン発現量が低下することが明らかになった。

(5)ソーティリン機能回復は異常プリオンの低下させる

プリオン感染細胞において、ソーティリン発現量が低下しており、これが PrP^{Sc} の過剰蓄積を引き起こしていると考えられた。そこで、ソーティリンの機能回復がプリオン病の病態の改善に有効であるのかを確認するために、プリオン感染細胞におけるソーティリン過剰発現が PrP^{Sc} 発現低下を引き起こすのかを確認した結果、過剰発現 4 日後には約 50%にまで PrP^{Sc} を低下させた(図4)。この結果から、継続的なソーティリン機能回復はプリオン病の治療に有効であると示唆された。

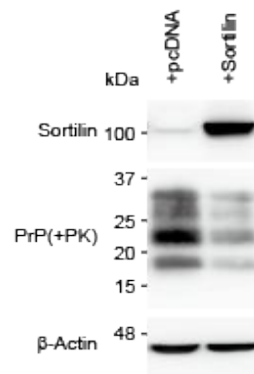


図4 . プリオン感染細胞におけるソーティリン過剰発現

(6)マウスにけるソーティリン機能欠損はプリオン病の早期発症を引き起こす

培養細胞において、ソーティリン機能は PrP^{Sc} 分解に重要であることを明らかにした。そこで、生体(マウス)においてもソーティリン機能は PrP^{Sc} 分解に重要であるのか、また、プリオン病の病態に関与しているのかを明らかにするために、ソーティリン欠損(Sort1^{-/-})マウスおよび野生型(Sort1^{+/+})マウスにおけるプリオン感染実験を実施した。Sort1^{-/-}マウスでは、早期に PrP^{Sc} の蓄積がみられ、感染60日目では Sort1^{+/+}マウスの2~3倍の PrP^{Sc} が検出された(図5)。また、Sort1^{-/-}マウスでは、有意に潜伏期間(Sort1^{-/-}:150.9±7.8日, Sort1^{+/+}:171.9±6.0日)および生存期間(Sort1^{-/-}:158.5±6.3日, Sort1^{+/+}:179.7±6.4日)の短縮が認められた(図6)。

これらの結果から、マウスにおいてもソーティリンは異常プリオンの分解に重要であり、ソーティリン機能欠損マウスでは PrP^{Sc} 分解が抑制されるため、感染早期から PrP^{Sc} が蓄積し、これが早期発症と生存期間短縮の原因となっていると考えられた。

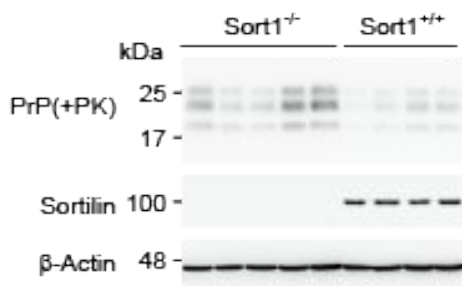


図5 . プリオン感染 60 日目での PrP^{Sc} の比較

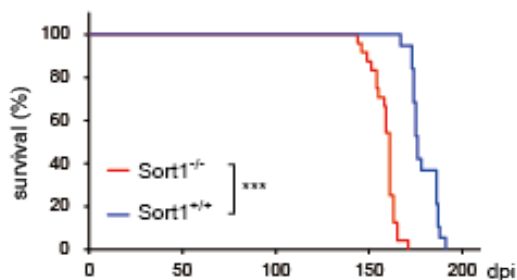


図6 . プリオン感染実験でのマウス生存曲線

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 3 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, p-1-102017 (2017) (査読有) doi:10.1007/s00705-017-3295-3.

Uchiyama K, Miyata H, Yano M, Yamaguchi Y, Imamura M, Muramatsu N, Rani Das N, Chida J, Hara H and Sakaguchi S. Mouse-hamster chimeric prion protein (PrP) devoid of N-terminal rResidues 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) doi:10.1371/journal.pone.0109737.

Yuasa T, Amo K, Ishikura S, Nagaya H, Uchiyama K, Hashida S and Ebina Y. Development of invitro model of insulin receptor cleavage induced by high glucose in HepG2 cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 445(1):236-243. (2014) (査読有) doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.187.

[学会発表](計 13 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年会, 2P-0593, パ

シフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) (2016.11.30-12.2)

内山圭司, 坂口末廣, Dysfunction of Sortilin by prion infection, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, P1-106, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市) (2016.10.23-25)

Uchiyama K and Sakaguchi S, Sorting of prion protein and PrP^{Sc} accumulation. International Prion Congress-Prion 2016, Hitotsubashi Hall, Chiyoda, Tokyo, Japan (2016.5.10-13)

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, Biochemistry and Molecular Biology (BMB) 2015 (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), 1P1224, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市) (2015.12.1-4)

Uchiyama K, Tomita M and Sakaguchi S. 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 ワークショップ「Prions」, W3-C-01, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市) (2015.11.22-24)

Uchiyama K, Tomita M and Sakaguchi S, Mechanism of Sortilin-mediated PrP degradation. Asia Pacific Prion symposium 2015, 2-10(p74), Ishikawa Ongakudo, Kanazawa, Ishikawa, Japan (2015.9.4-5)

Tomita M, Uchiyama K, Usui T and Sakaguchi S, Analysis of roles of N-terminal region of prion protein in the conversion into scrapie form by using prion-knockout cell. Asia Pacific Prion symposium 2015, 2-8(p72), Ishikawa Ongakudo, Kanazawa, Ishikawa, Japan (2015.9.4-5)

Uchiyama K and Sakaguchi S. Novel molecular mechanism for accumulation of abnormal prion protein - Inhibition of Sortilin-mediated PrP degradation. 第 15 回蛋白質科学会年会ワークショップ「New development of prion biology」, 2WC1-4, あわぎんホール (徳島県・徳島市) (2015.6.24-26)

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, 01-6-15, シフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) (2014,11,10-12)

富田満, 臼井健, 内山圭司, 坂口末廣, プリオンノックアウト細胞を用いたプリオンタンパク質 N 末端領域の異常プリオン形成における役割の解明, 第 62

回日本ウイルス学会学術集会, P2-117,
パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
(2014.11.10-12)

内山圭司, 坂口末廣, プリオン感染と小
胞輸送障害, 第 87 回日本生化学会大会シ
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」, 3S02-a-3, 京都香
西会館(京都府・京都市)(2014.10.15-18)

内山圭司, 坂口末廣, プリオン感染によ
るポストゴルジ小胞輸送障害、第 66 回
日本細胞生物学会大会, 2P-09, 奈良県新
公会堂(奈良県・奈良市)(2014.6.11-13)

Uchiyama K and Sakaguchi S, Post-Golgi
trafficking of membrane proteins
impaired by prion infection.
International Prion Congress-Prion,
Trieste, Italy (2014.5.27-30)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 圭司 (UCHIYAMA, Keiji)
徳島大学・先端酵素学研究所・准教授
研究者番号: 6 0 2 9 4 0 3 9

(2) 連携研究者

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: 6 0 2 7 4 6 3 5

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: 1 0 5 3 1 8 5 8