

令和元年6月18日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04269

研究課題名(和文) プリオン伝達性・多様化をもたらすプリオンタンパク異常化分子機序の解明

研究課題名(英文) The elucidation of molecular basis of the diversity and transmissibility in abnormal prion protein formation

研究代表者

新 竜一郎 (Atarashi, Ryuichiro)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：90452846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではプリオン病の病原タンパク質であるプリオンタンパク(PrP)の試験管内異常化反応法を進展させ、その系を用いた解析により、プリオン病の伝達性・多様化をもたらすPrP異常化の分子機序の解明とタンパク単独仮説の最終的な検証を目的とした。これまでに我々は、大腸菌由来リコンビナントPrP(rPrP)を反応基質、複数のプリオン株を反応系のシードとした試験管内PrP異常化反応系において、そのプリオン株特有の異常型PrP(PrPres)の特性を維持したrPrPresを生成させることに成功した。現在この反応系の生成物の伝達性と多様性を調査するため、脳内接種したマウスの解析を進めているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

補助的因子を加えた試験管内異常化反応法により、これまで効率の低かったプリオン株(非典型牛海綿状脳症や慢性消耗病等)の高効率な変換が可能となった。またその補助的因子を加えることにより、大腸菌由来リコンビナントPrP(recPrP)を反応基質とした試験管内PrP異常化反応系において、そのプリオン株特有の産物を生成させることが初めて可能となった。これらの結果は、プリオン病の病態機構の理解を大きく進展させたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence suggests that the continuous conversion of normal form of prion protein (PrP^C) into abnormal form of PrP (PrP^{Sc}) in affected hosts plays a central role of the pathogenesis of prion diseases. However, the molecular basis of the diversity and transmissibility in PrP^{Sc} formation has not been well understood. Using the protein misfolding cyclic amplification (PMCA) technique, we found that some cofactors such as heparin sulfate or its analog heparin greatly enhanced the formation of PrP^{Sc} in vitro. Furthermore, we developed an advanced PMCA system using E-coli derived recombinant PrP as a substrate. We currently examined the diversity and transmissibility of the advanced PMCA products.

研究分野：ウイルス学

キーワード：プリオン病 プリオン株 PrP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プリオン病は感染性病原体プリオンによって引き起こされる致死性の神経変性疾患であり、ヒトのクロイツフェルトヤコブ病(CJD)、牛の牛海綿状脳症(BSE)などが代表的な疾患である。感染病原体プリオンはおそらくは単一のタンパク質である異常型プリオンタンパク(PrP)から構成されている、とするタンパク単独仮説が提唱され、多くの研究者に受け入れられているが、いまだ多くの解明されていない謎が残されている。具体的な例として、プリオンには病原特異的な核酸は見つかっていないにもかかわらず、病型の異なる株(プリオン株)の存在が挙げられる。これは株ごとに異常型PrPの構造がわずかに異なるためとされているが、実際に異常型PrPの構造の違いがどのように病型の多様性をもたらすかについてのメカニズムはほとんど解明されていない。また正常型から異常型への構造変換プロセスや異常型PrPの立体構造の詳細も不明なままであり、これらは、プリオン病の病態解明・治療開発を遅らせている大きな原因でもあり、その解明が必須である。

2. 研究の目的

プリオン病は急速進行性認知症を引き起こす伝達性(感染性)の神経変性疾患である。本研究ではプリオン病の病原タンパク質であるプリオンタンパク(PrP)の試験管内異常化反応法を進展させ、その系を用いた解析により、プリオン病の伝達性・多様性をもたらすPrP異常化の分子機序の解明とタンパク単独仮説の最終的な検証が目的である。

この試験管内反応法では、正常動物脳乳剤あるいは大腸菌由来リコンビナント PrP (rPrP)を反応基質、プリオン株(複数)を反応系のシードとして用いる。正常型から異常型への変換反応は、アミロイド形成反応と類似していると考えられており、異常型 PrP 凝集体の末端部のみ生じると想定されるため、反応チューブに間欠的に適当な強度と時間の超音波処理を行うことにより異常型 PrP 凝集体が断片化され、変換反応が劇的に促進される。しかしこれまでの条件では高効率に増殖できるプリオン株はごく限られている。さらに rPrP を基質とするとそのプリオン株の特性が維持されず、多くの場合で伝達性も失われることが報告されていた。本研究では試験管内 PrP 異常化反応系において、補助的因子を添加した様々な条件検討を行い、これまでの条件では限定的にしか増幅できないプリオン株においても高効率での増幅可能かつ、rPrP を基質とした場合でもプリオン株の特性や伝達性が維持される反応系の開発を試みた。

3. 研究の方法

まず、異常型プリオンタンパク質試験管内増幅法の一つである PMCA 法(Protein Misfolding Cyclic Amplification)において限定的な変換反応しか示さないプリオン株の効率的な試験管内変換反応を可能にする発展系 PMCA 法の確立のため、補助的因子(ポリアニオンや界面活性剤、テフロンビーズ等)を組み合わせることで反応を行った。実験に用いたプリオン株は以下の 10 種類である: 典型 BSE (C-BSE)、非典型 BSE2 種類 (H-BSE, L-BSE)、scrapie、シカ慢性消耗病 (CWD)、マウス順化プリオン株 (ME7, Chandler, 22L, Tsukuba-2, *E. coli* recombinant PrP^{Sc})。

次にその補助的因子を添加した反応条件において大腸菌由来リコンビナント PrP (rPrP)を反応基質とした advanced PMCA 法を行い、その産物の性状(プロテアーゼ分解性等)を解析し、マウスへの伝達実験を行った。

4. 研究成果

本研究では界面活性剤の一種であるジギトニンおよびポリアニオンの一種であるヘパリンを反応液に加えることで、実験に用いた様々なプリオン株すべての PrPres の増幅が促進されることが明らかになった。特にこれまで効率の低かったプリオン株(非典型牛海綿状脳症や慢性

消耗病等)の高効率な変換が可能となったことは特筆すべき結果である。またその補助的因子を加えることにより、大腸菌由来リコンビナント PrP(recPrP)を反応基質とした試験管内 PrP 異常化反応系(advanced PMCA)において、そのプリオン株特有の産物が生成させ、かつ反応を繰り返してもその特性を維持させることが初めて可能となった。現在、現在この反応系の生成物の伝達性と多様性を調査するため、脳内接種したマウスの解析を進めている。これらの結果は、プリオン病の病態機構の理解を大きく進展させたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Miyazaki Y, Ishikawa T, Kamatari YO, Nakagaki T, Takatsuki H, Ishibashi D, Kuwata K, Nishida N, Atarashi R. Identification of alprenolol hydrochloride as an anti-prion compound using surface plasmon resonance imaging. *Molecular Neurobiology*, 2019, 56 (1) 367 - 377 doi: 10.1007/s12035-018-1088-7. 査読有

〔学会発表〕(計 5件)

新竜一郎, 宮崎幸子, 石川岳志, 西田教行 Identification of alprenolol as an anti-prion compound using SPRi. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 (京都市) 2018 年 10 月

Imamura M, Tabeta N, Matsuura Y, Iwamaru Y, Kitamoto T, Ma J, Mohri S, Murayama Y, Takatsuki H, Mori T, Atarashi R. Simultaneous addition of digitonin, heparin and arginine ethyl ester improves in vitro amplification of PrPSc derived from various prion strains. *Asi Pacific Prion Symposium 2018 (Tokyo)* 2018 年 10 月

Imamura M, Tabeta N, Matsuura Y, Iwamaru Y, Kitamoto T, Ma J, Mohri S, Murayama Y, Takatsuki H, Mori T, Atarashi R. Highly sensitive detection of PrPSc derived from various prion strains by simultaneous addition of digitonin, heparin and arginine ethyl ester to protein misfolding cyclic amplification. *Prion 2018 (Santiago de Compostela)* 2018 年 05 月

新竜一郎, 今村守一, 森剛志, 高月英恵, 岩丸祥史 バキュロウイルス-昆虫細胞発現組換え PrP を用いた試験管内変換系の構築に基づくプリオン変換・生成機構の解明. 日本薬学会第 138 年会 (金沢市) 2018 年 03 月

Imamura M, Tabeta N, Iwamaru Y, Yokoyama T, Murayama Y, Mori T, Takatsuki H, Atarashi R. 自発的生成した異常型バキュロウイルス由来組換えプリオン蛋白質は感染性を有する. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪市) 2017 年 10 月

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/micro/greeting.php>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者

研究協力者氏名：今村 守一
ローマ字氏名：(IMAMURA, morikazu)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。