

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790846

研究課題名（和文）プリオンタンパク高次構造を標的としたプリオン病の病態機構の解明

研究課題名（英文）Reconstruction of infectious prion protein *in vitro*

研究代表者

佐野 和憲（SANO KAZUNORI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50534343

研究成果の概要（和文）：試験管内で間欠的に攪拌することによって異常型に高い効率で変換する方法（Quaking-Induced Conversion; QUIC）によりリコンビナントPrP（recPrP）アミロイドを作製し、そのrecPrPアミロイドの立体構造、感染性を解析した。シードとしてごく少量のプリオン株の異なる感染脳乳剤（22L、Chandler株）を混和することによって生成したrecPrPアミロイドは、プリオン株特異的に感染脳から精製したPrP^{Sc}と同様の二次構造、構造安定性を示した。さらに、これらのrecPrPアミロイドは野生型マウスに対して感染性が有り、感染性の無いrecPrPアミロイドとは異なる繊維構造形態であることが判明した。以上の結果から、試験管内反応においても、プリオン株特異的な構造はrecPrPアミロイドへ伝播され、そのrecPrPアミロイドは新たに感染性を獲得することが明らかとなり、プリオンの本体がPrPアミロイドであることが示唆された。また、感染性の有無には、PrPアミロイド繊維構造の違いが影響することも示唆された。

研究成果の概要（英文）：Recently, we developed an *in vitro* recombinant PrP (recPrP) conversion system with shaking (Quaking-Induced Conversion; QUIC). We generated recPrP-amyloid *in vitro* by the tiny amounts of mouse brain homogenates with Chandler and 22L strains using this system. The shape of β -sheet spectrum by infrared spectroscopy in these recPrP-amyloids was similar to that of PrP^{Sc} isolated from each infectious brain, and unique to the strains. Additionally, the conformational stability analysis using denaturation by guanidine-hydrochloride demonstrated that the stability of recPrP-amyloid was similar to that of PrP^{Sc} in brains, indicating that prion strain specific conformations are seemed to be conserved. To determine infectivity of recPrP amyloids, recPrP amyloids was inoculated intracerebrally into wild-type mice. recPrP amyloids significantly accelerated the onset of disease. These results suggest that prion strain-specific conformations are transmitted to recPrP-amyloid, which is PrP^{Sc}-like infectious agents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学

1. 研究開始当初の背景

プリオン病（別名：伝達性海綿状脳症）は感染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（Creutzfeldt-Jakob disease; CJD）、ヒツジのスクレイピー、牛の牛海綿状脳症（Bovine Spongiform encephalopathy; BSE）などが代表的な疾患である。感染病原体プリオンはウイルス、細菌などとは異なり、病原特異的な核酸を持たず、おそらくは単一の異常型プリオンタンパク（PrP^{Sc}）のみから構成されていると推測されている（タンパク単独仮説）。PrP^{Sc}は、哺乳類の主に神経系に発現している正常型プリオンタンパク（PrP^C）が構造上変化したものである。外部より PrP^{Sc} が宿主細胞内に侵入すると、細胞内で定常的に発現する PrP^C に作用し、PrP^C から PrP^{Sc} への構造変化が誘導される。PrP^{Sc} と PrP^C ではアミノ酸配列に違いはなく、その立体構造のみが異なっている。PrP^C は α -helix 構造を多く含み、可溶性で柔軟な構造をしているが、PrP^{Sc} は β -sheet 含量が非常に高く、そのため①凝集しやすく不溶性、②蛋白分解酵素処理に抵抗性、③アミロイド斑を形成する、などの性質を持つことが知られている。しかしながら、PrP^C から PrP^{Sc} への構造変換プロセス、そして、PrP^{Sc} の立体構造は未だ解明されておらず、このことが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の一つである。

2. 研究の目的

本研究は、プリオン病を引き起こすメカニズムとして現在最も有力とされている、PrP^C から PrP^{Sc} への変換プロセスや、PrP^{Sc} の立体構造、さらにその構造と感染性がどのように関連するかなど、多くのいまだ解明されていない基礎的問題の解決に迫り、プリオン病の病態解明・治療へと研究を展開するための研究基盤を確立することが目的である。

3. 研究の方法

最近、本研究の研究協力者である新は、大腸菌から精製した、正常型と同じ構造を持つ、リコンビナント PrP（recPrP）を試験管内で異常型に、非常に高い効率で変換する方法を世界で最初に確立した（Atarashi et al. Nature Methods 2007&2008）。この方法は、多量の recPrP とごく少量の感染動物由来の PrP^{Sc} を混合して、recPrP から recPrP アミロイドへの変換反応を *in vitro* で起こさせるというものである。しかし、そのままでは反応はすぐに頭打ちになってしまうため、そこに間欠的に攪拌を繰り返し、新たに生成された

recPrP アミロイド凝集体を断片化すると、その結果、増幅反応の核（シード）の量が増え、反応を劇的に促進させることができる（Quaking-Induced Conversion; QUIC）。

本研究の実験プロトコールとして、①QUICを用いて recPrP アミロイドを生成後、②生成した recPrP アミロイドの構造を、フーリエ変換赤外分光装置（Fourier Transform infrared Spectrometer; FT-IR）、透過型電子顕微鏡（Transmission Electron Microscope; TEM）を用いて解析し、③その recPrP アミロイドを野生型マウスに脳内接種し感染性と構造の関連性を検討する。

4. 研究成果

(1)QUICによる recPrP アミロイドの生成

QUIC による変換過程に影響を与える因子として温度、塩濃度、pH、変性剤の影響を検討し、recPrP アミロイド生成における最適条件（温度:40°C、塩濃度:300mM NaCl、pH:7.5、変性剤なし）を決定した。

この条件下において、マウス recPrP にシードとして 100pg PrP^{Sc} 相当のプリオン株の異なる Chandler、22L 株感染マウス脳乳剤を混和することによってアミロイドが形成された（Ch-Amyloid, 22L-Amyloid）（図1）。一方、正常脳乳剤の添加ではアミロイド形成は誘発されなかった。また、recPrP 濃度を変化させることで、シードを添加せず recPrP のみでもアミロイドが形成された（No seed-Amyloid）（図1）。

これらの recPrP アミロイドは、PrP^{Sc} と同様にタンパク分解酵素である Proteinase-K（PK）に対して抵抗性を示した。Ch-Amyloid, 22L-Amyloid は 21、18、12、11、10kDa の PK 抵抗性の断片が見られたのに対して、No seed-Amyloid では 12、11、10kDa の PK 抵抗性の断片が見られ、両者に構造上の違いがあることが示唆された（図2）。

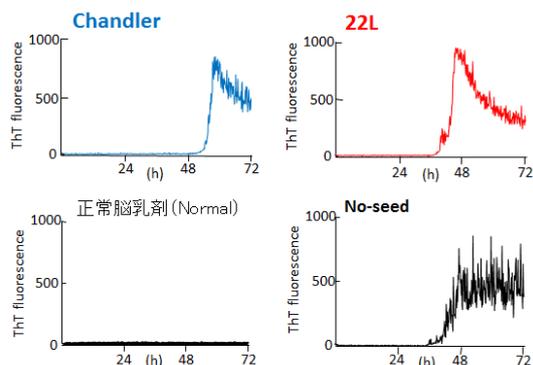


図1. QUICによるrecPrPのアミロイド形成反応

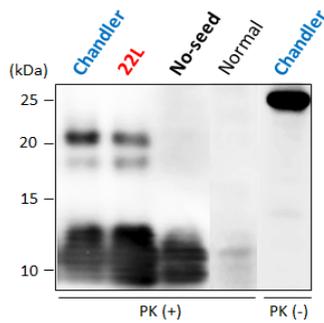


図2. recPrPアミロイドのProteinase Kに対する抵抗性

(2) プリオン株特異的な構造の recPrP への伝播

FT-IR 測定により、Ch-Amyloid, 22L-Amyloid は、プリオン株特異的に β -sheet 構造が異なっており、さらに、それぞれ感染脳から精製した PrP^{Sc} と同様の β -sheet 構造を有することが明らかとなった (図 3)。Ch-Amyloid, 22L-Amyloid は、No seed-Amyloid との比較においても β -sheet 構造、構造安定性に違いが見られた。

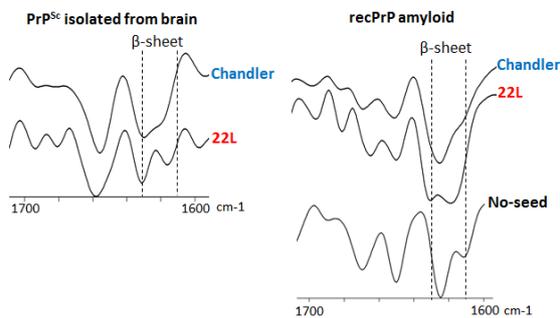


図3. FT-IRによるrecPrPアミロイドの二次構造解析

(3) recPrP アミロイドの感染性

recPrP アミロイドを野生型マウスに脳内接種し、プリオン病の生存期間を検討した結果、Ch-Amyloid, 22L-Amyloid はそれぞれ対照群と比べて有意に生存期間を短縮し、感染価を高めることが明らかとなった (図 4)。(recPrP を加えず、シードとして 100pg PrP^{Sc} 相当の脳乳剤のみで QUIC 反応させ、終了後に recPrP を混和した recPrP 非アミロイドを対照群として用いた。) 一方、No seed-Amyloid には感染性が無いことが判明した。また、透過型電子顕微鏡を用いた測定によって、感染性を有する Ch-Amyloid, 22L-Amyloid は、不規則な枝分かれ、ねじれが多数ある繊維状構造を示したのに対し、感

染性の無い No seed-Amyloid は枝分かれ、ねじれがほとんど無い繊維状構造を示した (図 5)。

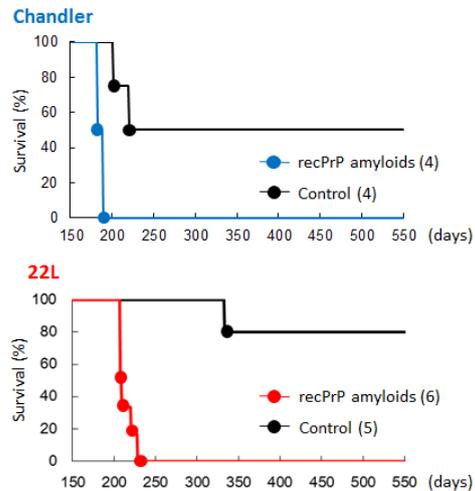


図4. recPrPアミロイド接種によるプリオン病の生存期間



図5. 透過型電子顕微鏡によるrecPrPアミロイドの形態解析

以上の結果から、試験管内反応においても、プリオン株特異的な構造は recPrP へ伝播され、その recPrP アミロイドは新たに感染性を獲得することが明らかとなり、プリオンの本体が PrP アミロイドであることが示唆された。また、感染性の有無には、PrP アミロイド繊維構造の違いが影響することも示唆された。

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)

- ① Jason M. Wilham, Christina D. Orru, Richard A. Bessen, Ryuichiro Atarashi, Kazunori Sano, Brent Race, Kimberly D. Meade-White, Lara M. Taubner, Andrew Timmes, Byron Caughey, Rapid End-Point Quantitation of Prion Seeding Activity with Sensitivity Comparable to Bioassays, PLoS pathogens, 査読有, 6 巻, 2010, e1001217
- ② Ryuichiro Atarashi, Katsuya Satoh,

Kazunori Sano, Takayuki Fuse, Naohiro Yamaguchi, Daisuke Ishibashi, Takehiro Matsubara, Takehiro Nakagaki, Hitoki Yamanaka, Susumu Shirabe, Masahito Yamada, Hidehiro Mizusawa, Tetsuyuki Kitamoto, Genevieve Klug, Amelia McGlade, Steven J Collins, Noriyuki Nishida, Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion, Nature medicine, 査読有, 17 卷, 2011, 175-178

〔学会発表〕(計 1 件)

- ① 佐野和憲、Reconstruction of infectious prion protein *in vitro*、第 83 回日本生化学会大会

〔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：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

()

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：