

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670422

研究課題名(和文)プリオン感染に必要なプリオン蛋白質以外の分子の同定

研究課題名(英文)Identification of a host molecule important for prion infection

研究代表者

坂口 末廣(SAKAGUCHI, Suehiro)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授

研究者番号：60274635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、新規の正常プリオン結合分子としてソーチリンを同定した。正常プリオンは、細胞膜表面でソーチリンと結合していた。プリオン持続感染細胞からソーチリンをノックダウンすると、異常プリオンが増加した。逆に、ソーチリンを過剰発現すると、異常プリオンは減少した。さらに我々は、ソーチリンのノックアウトしたマウス神経芽細胞を樹立し、プリオンを感染させた。その結果、コントロール細胞と比べて、ソーチリンのノックアウト細胞はプリオン感受性が著明に亢進し、異常プリオンも大量に産生した。これらの結果は、ソーチリンが正常プリオンから異常プリオンの構造変換に関与している可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：We identified sortilin as a novel PrPC-binding molecule in this study. Sortilin is a transmembrane protein playing an important role in protein trafficking. Immunocytochemical staining revealed that PrPC is colocalized with sortilin mainly on the plasma membrane. Knockdown of sortilin using siRNA caused increase in PrPSc levels in prion-infected mouse neuroblastoma N2a cells. On the contrary, forced overexpression of sortilin reduced PrPSc levels in prion-infected cells. We also established sortilin-knockout N2a cell lines and infected them with prions. Compared to control N2a cells, the knockout cells were highly susceptible to prions and produced much higher levels of PrPSc. These results indicate that sortilin functions to inhibit the conversion of PrPC into PrPSc.

研究分野：ウイルス学

キーワード：プリオン ソーチリン プリオン病 プリオンタンパク質 感受性

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って起こる神経変性疾患である。プリオンが感染すると、神経細胞に発現する正常プリオン蛋白質(以下、正常プリオン)の高次構造が変化し、異常プリオン蛋白質(以下、異常プリオン)に変換する。感染が進行すると、異常プリオンは脳内に蓄積し、プリオン病を引き起こす。従って、正常プリオンはプリオン感染に必須な分子であると考えられる。実際我々は、正常プリオン欠損マウスを作製し感染実験を行ない、これらのマウスがプリオン病に感染しない事を証明した(1)。

一方、正常プリオンが発現するにも関わらず、プリオンが感染しない組織が存在する事が古くから知られている。実際、正常プリオンをマウスの胸腺や肝臓に強制的に発現させても、これらの組織はプリオンに感染しない事が報告されている(2)。これらの事実は、プリオン感染には正常プリオン以外の宿主分子が重要な役割を果たしている事を示している。しかし、このような宿主分子は未だ同定されていない。プリオン感染のメカニズムを解明するためにも、このような宿主分子を同定することは重要である。

2. 研究の目的

プリオン感染のメカニズム解明を目指し、プリオン感染に関与する宿主分子の同定を行なう。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞

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

(2) プリオン感染実験

細胞を 6 ウェルプレートに播種し、24 時間後に 50 µg タンパク量を含む 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法

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 細胞由来のソーチリンノックアウト細胞を作製した。

(5) ウェスタンブロッティング

細胞ライセートを SDS-ポリアクリルアミドゲルにて展開し、各抗原に対する抗体を用

いて行なった。

(6) 細胞免疫染色

常法に従って行なった。異常プリオンの検出は mAb132 (北海道大学、堀内教授より分与)を用いて行なった(3)。

4. 研究成果

(1) ソーチリンは正常プリオンと細胞膜上で結合する

ソーチリンは、VPS10p ファミリーに属する小胞輸送に重要な積荷蛋白質受容体であり、アルツハイマー病の病態分子であるアミロイドβの産生に関与することが知られている。しかし、プリオンの感染及び産生におけるソーチリンの役割についての報告はない。そこで我々は、ソーチリンがプリオン感染に重要な機能を担っているのか解析することにした。

我々は、まず、ソーチリンが正常プリオンと結合するのか調べた。正常プリオンに対する抗体で N2aC24 細胞のライセートを免疫沈降すると、ソーチリンが共沈した(図1)。GST-ソーチリンは全長のレコンビナントプリオン蛋白質をプルダウンすることが出来たが、N 末アミノ酸 23-88 を欠損するレコンビナントプリオン蛋白質をプルダウンさせることは出来なかった。この結果は、正常プリオンが N 末アミノ酸 23-88 を介してソーチリンと結合していることを示した。さらに我々は、ソーチリンと正常プリオンに対する抗体を用いた免疫細胞化学的解析を行なった結果、ソーチリンと正常プリオンが細胞膜表面で共局在していることを見出した。

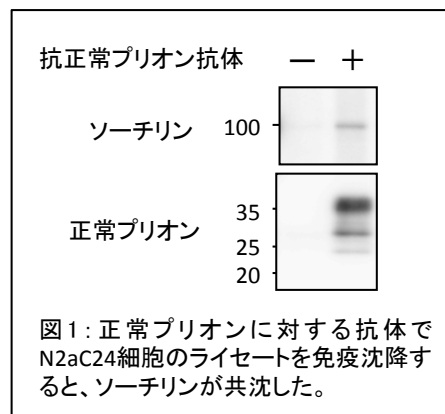


図1: 正常プリオンに対する抗体で N2aC24細胞のライセートを免疫沈降すると、ソーチリンが共沈した。

(2) ソーチリンは異常プリオンの産生に抑制的に機能する

ソーチリンが正常プリオンから異常プリオンへの構造変換に関与するのか調べるために、プリオン持続感染細胞(N2aC24L1-3細胞)のソーチリン発現をsiRNAを用いてノックダウンし、異常プリオンの産生量をウェスタンブロッティング法にて解析した。その結果、ソーチリンをノックダウンすることで、異常プリオンの産生量が増加することが分かった(図2)。また逆に、ソーチリンをN2aC24L1-3細胞に過剰発現させると、異常プリオンの産

生は抑制された。これらの結果は、ソーチリンが異常プリオン産生に抑制的に機能していることを示した。

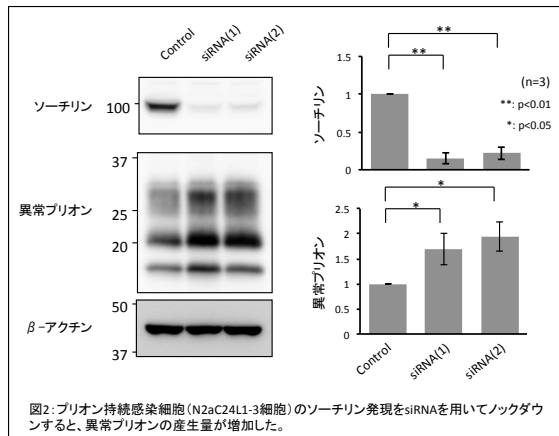


図2: プリオン持続感染細胞(N2aC24L1-3細胞)のソーチリン発現をsiRNAを用いてノックダウンすると、異常プリオンの産生量が増加した。

(3) ソーチリンはプリオン感染を抑制する
我々は、さらにプリオン感染に対するソーチリン役割について調べた。このために、CRISPR/CasシステムによりN2aC24細胞のソーチリン遺伝子をノックアウトしたN2aC24ΔSort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ェスタンブロッティング法により比較したところ、N2aC24ΔSort細胞ではN2aC24細胞の約5~10倍の異常プリオンが観察された。また、感染7及び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産生している細胞の割合を比較したところ、N2aC24ΔSort細胞ではN2aC24細胞の約5倍の細胞がプリオンに感染しており、異常プリオンを産生していることが分かった(図3)。これらの結果は、ソーチリンがプリオン感染に抑制的に機能していることを示した。

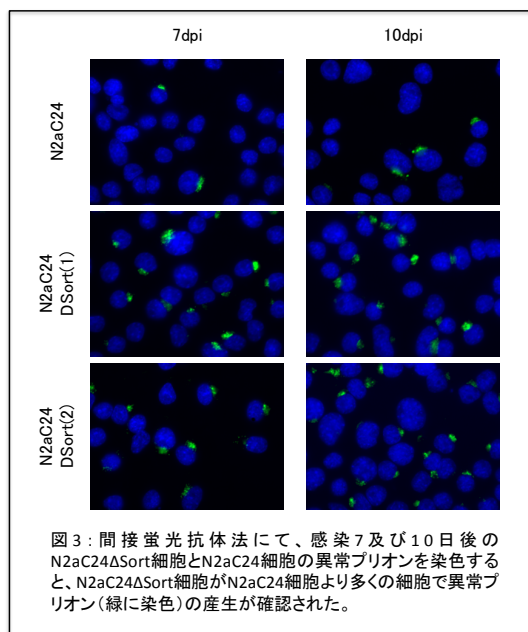


図3: 間接蛍光抗体法にて、感染7及び10日後のN2aC24ΔSort細胞とN2aC24細胞の異常プリオンを染色すると、N2aC24ΔSort細胞がN2aC24細胞より多くの細胞で異常プリオン(緑に染色)の産生が確認された。

<引用文献>

- (1) Sakaguchi S, Katamine S, Shigematsu K, Nakatani A, Moriuchi R, Nishida N, Kurokawa K, Nakaoke R, Sato H, Jishage K, Kuno J, Noda T, Miyamoto T: Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *Journal of Virology* 69: 7586-7592, 1995.
- (2) Raeber AJ, Sailer A, Hegyi I, Klein MA, Rulicke T, Fischer M, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C: Ectopic expression of prion protein (PrP) in T lymphocytes or hepatocytes of PrP knockout mice is insufficient to sustain prion replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(7):3987-92, 1999.
- (3) Yamasaki T, Suzuki A, Shimizu T, Watarai M, Hasebe R, Horiuchi M: Characterization of intracellular localization of PrP(Sc) in prion-infected cells using a mAb that recognizes the region consisting of aa 119-127 of mouse PrP. *J Gen Virol.* 93:668-80. 2012.

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 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-プリオン病治験耐性の確立に向けて- 2015年2月14日 名古屋国際会議場国際会議室 (愛知県・名古屋市)
- ② 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年11月10-12日 パシフィコ横浜会議センター (神奈川県・横浜市)
- ③ 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年10月15-18日 国立京都国際会館 (京都府・京都市)
- ④ 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年6月28-29日 山口大学吉田キャンパス (山口県・山口市)

[その他]

ホームページ等

<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・疾患酵素学研究センター・教授
研究者番号：60274635

(2) 研究分担者

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