

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870474

研究課題名(和文)プリオン蛋白過剰発現が誘導するオートファジーのメカニズム解明

研究課題名(英文)Prion protein overexpress induces on autophagy mechanism explication.

研究代表者

矢野 雅司 (YANO, Masashi)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・技術員

研究者番号：10531858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン病は、プリオン蛋白の過剰蓄積によって神経変性死が起こる疾患である。この神経細胞死のメカニズムは不明であるが、オートファジーを介したアポトーシスの関与が提唱されている。本研究課題ではHEK293T細胞にプリオン蛋白を過剰発現させることによっておこるオートファジーの活性化のメカニズムの解明に取り組んだ。さらに、HEK293T細胞でのこのメカニズムがプリオン病の神経細胞死に関与するのかをプリオン病モデルマウスを用いて解析する。

研究成果の概要(英文)：Prion is the disease to which neurodegeneration death happens by surplus accumulation of prion protein. The mechanism of this nerve cell death is unclear, but participation of apoptosis through autophagy is advocated. In this study, I worked on mechanism of activation of the autophagy which happens by the thing which makes a HEK293T cells protein overexpress. It's analyzed using a prion model mice whether this mechanism by HEK293T cells participates in nerve cell death of prion.

研究分野：プリオン

キーワード：プリオン オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

(1)プリオン蛋白には、正常型(以下、正常プリオン)と異常型(以下、異常プリオン)が存在する。両者のアミノ酸組成に違いはないが、高次構造が異なり、生化学的性質も異なる。正常プリオンは正常組織、特に脳に強く発現している。しかし、異常プリオンはプリオン感染組織にのみに検出される。

(2)異常プリオンはプリオンの構成成分である。プリオンが感染すると、異常プリオンが神経細胞の正常プリオンに作用し、正常プリオンの構造を異常プリオンの構造へと変化させる。こうして、異常プリオンが脳内に蓄積し、神経細胞死をきたす。実際、申請者らの研究室では、プリオン蛋白ノックアウトマウスに、プリオンを接種しても、異常プリオンの蓄積が認められず、神経細胞死も起こらないことを報告している。

(3)異常プリオンが細胞死を誘導するためには、正常プリオンが細胞膜上に発現することが必須であることが報告され (Science, 2005) 異常プリオンは正常プリオンを介して神経細胞死シグナルを活性化している可能性が提唱されている。実際、マウスの脳内に抗体を接種し正常プリオンをクロスリンクすると、神経細胞死が起こることが報告されている。従って、正常プリオンからの細胞死シグナルの解明は、プリオン病の神経細胞死のメカニズムの解明に重要である。

(4)近年、オートファジーを介したアポトーシスがプリオン病における神経細胞死に関与していると提唱されている。実際、申請者は、プリオン病を発症したマウスの脳内で、オートファジーのマーカである LC3 が活性化していることを見出している。そこで、申請者は正常プリオンを過剰発現することで、オートファジーが活性化され、細胞死を起こす培養細胞の検索を行った。その結果、HEK293T 細胞株に正常プリオンを過剰に発現させると、オートファジーが活性化され、細胞死が誘導されることを見出した。従って、正常プリオンの過剰発現による HEK293T 細胞の細胞死は、プリオン病の神経細胞死のメカニズム研究の in vitro モデルとなると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、プリオン病の神経細胞死のメカニズムを解明することを目的として、まず HEK293T 細胞におけるプリオン蛋白によるオートファジーの活性化と細胞死のメカニズムを解明し、次にこのメカニズムがプリオン病の神経細胞死に関与するのかをマウスプリオン病モデルを用いて解析する。

まず、HEK293T 細胞におけるオートファジーの活性化と細胞死に重要な正常プリオ

ンの部位を決定する。次に、この部位に結合する分子を網羅的に単離し、この中から、オートファジーの活性化と細胞死に重要な分子を同定する。さらに、マウスプリオン病モデルを用いて、この結合はプリオン感染により増強するのか、またこの結合はプリオン感染によるオートファジーの活性化や神経細胞死より先に起こるのかを経時的に解析する。

## 3. 研究の方法

(1)オートファジーの活性化及び細胞死に重要な正常プリオンの部位を決定する。

正常プリオンを HEK293T 細胞に過剰発現させることで、オートファジーを介した細胞死が起こることを発見した。そこで、この機能に重要な正常プリオンの領域を決定する。正常プリオンの様々な領域を回収し、オートファジーのマーカである LC3 の活性化をウェスタンブロット法で調べる。また、同時に細胞死についても解析する。こうして正常プリオンのどの領域が HEK293T 細胞のオートファジーを介した細胞死に重要かどうか分かる。

(2)HEK293T 細胞のオートファジーを介した細胞死に重要な正常プリオンの領域に結合する分子を同定する。

(1)で決定したオートファジーを介した細胞死に重要な部位を用いて正常プリオンの結合分子を同定する。酵母を用いた yeast two-hybrid 法を用いる。Beit には、(1)で決定した正常プリオンの部位を用いる。Pray にはマウス脳 cDNA ライブラリーを用いる。

Yeast two-hybrid 法で同定した分子に関しては、酵母内だけでなく哺乳動物でも結合するのか確認する。pCMV-Myc-正常プリオン、及び pCMV-HA-Pray を構築し、これらを HEK293T 細胞に導入する。細胞抽出液を回収し、免疫沈降法にて結合の確認を行う。

(3)オートファジーを介した細胞死に関与する正常プリオン結合分子の決定をする。

トランスフェクション法を用いた結合分子の決定

同定した分子がオートファジーを活性化させ、細胞死を誘導するのかを解析する。HEK293T 細胞にこれらの分子を導入し、ウェスタンブロット法により LC3 の活性化を解析する。また同時に、細胞死についても解析する。

ノックダウン解析を用いた結合分子の決定

トランスフェクション法による解析に加えて、siRNA を用いたノックダウン解析を行う。HEK293T 細胞に siRNA を導入し、正常プリオンによる LC3 の活性化を制御し、細胞死を阻害する分子を同定する。

#### オートファジー活性シグナルの解析

結合分子の下流のシグナルが既知であれば、下流の状態も検討する（発現量、リン酸化レベル、転写レベル等）。また、それらの分子に対するインヒビター等があれば、それらを用いて解析する。

(4)プリオン病における同定分子の関与について調べる。

上記で得られた分子と正常プリオンとの結合によるオートファジーの活性が、プリオン病の神経細胞死に關与するのか、プリオン病モデルマウスを用いて検討する。

プリオン感染脳内における結合分子の解析

マウスにプリオンを脳内接種し、経時的に脳を回収する。脳乳剤を作成し、免疫沈降法にて同定した分子が正常プリオンと結合しているのか調べる。また、その結合能が経時的に増強するのか検討する。

結合分子とオートファジー及び神経変性死の関連性の解析

上記同様に、プリオン感染脳を経時的に回収し、ウェスタンブロット法にてオートファジーの活性化を調べる。また、脳切片を作製し、組織染色により神経細胞死の進行を調べ、これらのオートファジーの活性化と神経変性死との結合能との関連性を経時的に調べる。

#### 4. 研究成果

(1)HEK293T 細胞に正常プリオンを過剰発現させることで、オートファジーのマーカーである LC3 の活性化をウェスタンブロット法で調べたところコントロールと比べてプリオン蛋白を過剰に発現させた細胞では LC3 が活性化されていたことを確認した。このことから、HEK293T 細胞に正常プリオンを過剰発現させることによってオートファジーが活性化され、細胞死を誘導することが確認された。

次に、この PrP によるオートファジーの活性化メカニズムを解明するために PrP 結合分子を同定した。Yeast two-hybrid 法により、Lrp11(low density lipoprotein receptor-related protein 11)を PrP 結合分子として同定した。その結合は、GST pull-down 法により確認した。Lrp11 は LDL 受容体ファミリーの一つで膜貫通型蛋白であるがその機能は不明である。

Lrp11 を HEK293T 細胞に過剰発現させたところ、PrP<sup>C</sup> と同様に顕著にオートファジーを誘導し、オートファジーの活性化を示す LC3 のシグナルが増強されていた（図 1）。

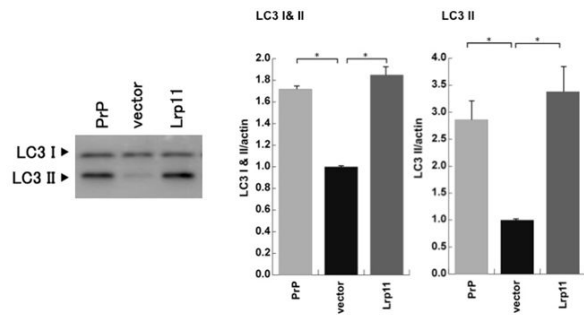


図 1

(2)さらに我々は、Src ファミリーである fyn が、PrP により誘導されるオートファジーに關与していることを見出した。Fyn の活性化型 CA-fyn を PrP と同時に HEK293T 細胞に導入したところ、LC3 の活性が増強された。逆に不活性化型 DN-fyn を導入すると PrP<sup>C</sup> 過剰発現による LC3 の活性が抑えられた（図 2）。

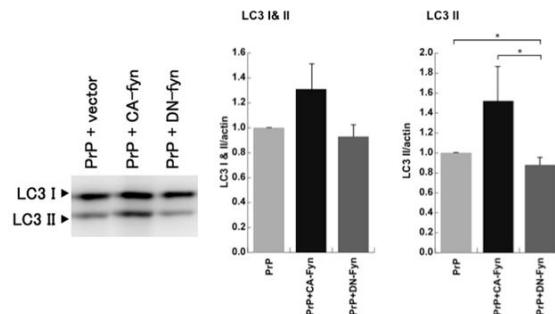


図 2

また、プリオン感染 N2a 細胞においてオートファジーの活性を調べたところ、非感染の N2a と比較して LC3 のシグナルが増強しており、また Lrp11 の転写レベルが上昇していたことにより、プリオン感染細胞においても Lrp11 がオートファジーに關与していることを確認した。これら N2a 細胞に Lrp11 を過剰発現させると、LC3 のシグナルがさらに強くなった。

(3)次に、マウスを使った in vivo での実験でオートファジーとプリオン感染との関係を調べる方法を考えた。オートファジー欠損マウスでプリオンを感染させて、コントロールマウスと比べることができればオートファジーのプリオン感染における評価が可能となる。しかし、オートファジー欠損マウスは生後すぐに死んでしまうためにプリオン感染実験が不可能である。そこで、胎児の脳を野生型のマウスの腎臓に移植した後、そのマウスの腹腔にプリオンを感染させる実験を計画した。その実験系を使えば、生後まもなく死亡するオートファジー欠損マウスの脳でプリオン感染実験が可能となる。

まず、実験条件を確立するために野生型マウスの胎齢 13.5 日の胎児脳を野生型マウス

の腎皮膜下に移植して、脳がきちんと生着するか確認をした。移植後数週間経過したマウスを解析してみると8割以上のマウスで腎皮膜下に脳が生着していることが確認された(図3 左:コントロール 右:脳を皮膜下に移植した腎臓)。



図3

次に、移植したマウスの腹腔に脳ホモジネートを注射してプリオンを感染させた。その後、数週間後に移植脳を回収して感染の有無を調べたところ通常の脳に感染させた時と同様に移植脳にも感染していたことが確認された。移植後のマウスにPBSを注入したマウスの移植脳ではProtenase Kで処理することにより、プリオン蛋白のバンドが検出されなくなるが、移植後のマウスにRMLを感染させるとProtenase Kに耐性のプリオン蛋白が存在することが確認された(図4)。

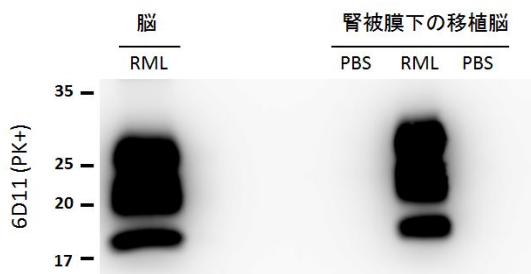


図4

今後、この実験系において移植後の胎児脳の生着率やプリオンの感染率を上げるための条件検討がもう少し必要である。そして、条件が確定した後にオートファジー欠損マウスである Atg7 欠損マウスを用いてプリオン感染実験を行い、オートファジー欠損によるプリオン感染の影響を調べる必要がある。

#### 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)

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. (査読有), 2014, 9(10), e109737. DOI: 10.1371

Uchiyama K, Muramatsu N, Yano M, Usui T, Miyata H, Sakaguchi S. Prions disturb post-Golgi trafficking of membrane proteins. Nat Commun. (査読有) 2013, 4: 1846. DOI: 10.1038

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0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0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
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

矢野 雅司 (YANO, Masashi)  
徳島大学・疾患酵素学研究センター・技術員

研究者番号: 10531858

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: