

令和元年6月11日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08038

研究課題名(和文) 異常プリオン蛋白質生成に関与する宿主細胞膜上分子群の網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive analyses of protein interactors of disease associated prion protein

研究代表者

岩丸 祥史 (Iwamaru, Yoshifumi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・ユニット長

研究者番号：20355142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン病では、正常プリオン蛋白質(PrP<sup>C</sup>)が異常プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)に構造変換される。本研究ではPrP<sup>Sc</sup>特異免疫細胞化学とEMARS法によるFITC標識を用い、細胞膜上でPrP<sup>Sc</sup>と共局在する分子群の探索を行った。プリオン蛋白質アミノ末端を認識する抗体は、プリオン感染細胞表面上の繊維状PrP<sup>Sc</sup>と、生理的条件下で反応した。この免疫細胞化学法とEMARS法を組み合わせ、生細胞上のプリオン蛋白質に共局在する分子群のFITC標識に成功した。免疫沈降法でFITC標識分子群を濃縮後、感染/非感染細胞間で比較したところ、感染細胞にのみ選択的にFITC標識された分子群が検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生理的条件下で、プリオン感染細胞膜上の異常プリオン蛋白質を効率的に標識可能となった。この免疫細胞化学法とEMARS法を組み合わせ、生細胞上の異常プリオン蛋白質に近接する分子群を特異的に標識可能であること示した。異常プリオン蛋白質と共局在する分子群を同定し、治療標的とすることで、未だ有効な治療法のないプリオン病に対する予防、治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To identify the candidate molecules capable of interacting with abnormal prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) and facilitating PrP<sup>Sc</sup> formation at the cell membrane, we applied a biochemical labelling method termed 'enzyme-mediated activation of radical sources (EMARS). First, the optimal conditions to label cell-surface PrP<sup>Sc</sup> in viable cells were investigated. Using an approach based on a recent study describing amino-proximal anti-PrP antibodies react natively with cell surface PrP<sup>Sc</sup> in its physiological context, we evaluated several amino-proximal anti-PrP antibodies and optimized the immunocytochemical conditions for immunolabeling aggregated PrP<sup>Sc</sup> on the cell-surface of prion-infected GT1-7 cells. EMARS was applied to the prion-infected GT1-7 cells whose cell surface PrP<sup>Sc</sup> was pre-labelled with one of the amino-proximal anti-PrP antibodies. Co-immunoprecipitation and Western blot analysis showed several proteins were labelled with FITC in a PrP<sup>Sc</sup>-specific manner.

研究分野：獣医学、細胞生物学、ウイルス学

キーワード：プリオン 異常プリオン蛋白質 培養細胞 EMARS 近接標識 細胞膜 FITC

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

### 1. 研究開始当初の背景

プリオン病では、宿主に発現する正常プリオン蛋白質 (PrPC) の立体構造が変換した、異常プリオン蛋白質 (PrPSc) が主として中枢神経系に蓄積する。この PrPC から PrPSc への変換は、細胞表面あるいはエンドソーム内で起こると考えられているが、詳細な分子機構は不明なままである。PrPC あるいは PrPSc と相互作用する分子が構造変換に関与することが指摘され、実際に PrPC に相互作用する glypican1 の発現抑制により、PrPSc 生成が一部阻害されるという報告がある。

最近申請者らは、PrPC 構造変換に関与する分子群の同定を目的とし、PrPC と共局在する分子群の検索を、EMARS (enzyme-mediated activation of radical sources)法を用いて行った。EMARS 法では、生細胞上の標的分子を抗体標識後、抗体に結合した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) により aryl azide-biotin をラジカル化させ、標的分子に近接する蛋白質を biotin 標識する。この手法は、免疫沈降法と比較し、より生理的条件下で共局在分子の検索を可能とする。実験の結果、神経特異的微小管再構築調節蛋白質 SCG10 が PrPC と共局在することを、我々は見出し (J Neurochem. 136(6):1204-1218, 2016)。しかしながら、siRNA による SCG10 のノックダウンは、プリオン持続感染細胞の PrPSc 生成に影響を及ぼさなかった。この結果を受け、標的分子を PrPC から PrPSc に変更し、PrPSc と共局在する分子群の検索へと着想を転換するに至った。

### 2. 研究の目的

PrPSc を標的分子にするには、プリオンに持続感染した生細胞上の PrPSc を、特異的に標識する必要がある。ところが、PrPSc は PrPC の構造異性体であり、抗プリオン蛋白質 (PrP) 抗体は一般的に PrPC と PrPSc 両者に反応することから、生細胞の細胞膜上の PrPSc のみを特異的に標識することは困難である。プリオン感染細胞から PrPSc を免疫染色法で検出するには、細胞をホルマリン固定後、凝集状態の PrPSc を変性剤処理し、PrPC と比較して高密度に存在する PrPSc 凝集体のエピトープを露出させる。生じた蛍光強度の差で PrPC と PrPSc を識別している。この手法と EMARS 法の組み合わせでは、EMARS 法の最大の利点である生理的条件下で標識を行わず、またホルマリン固定化された細胞から標識蛋白質を同定することは困難であることから、実用的でなかった。しかしごく最近、PrPSc のアミノ末端の特定のエピトープが生理的条件下で露出しており、この部位を認識する 8B4 抗体により、生細胞の細胞膜上の PrPSc を特異的に免疫染色できることが報告された (J Cell Biol. 204(3):423-441, 2014)。本研究では、生理的条件下で PrPSc を特異的に抗体標識し、EMARS 法を用いて PrPSc と共局在する分子群の網羅的検索を行い、PrPC から PrPSc への構造変換分子機構 PrP の分子基盤を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1)未固定条件下での抗体による PrPSc 特異標識の確認:

プリオン持続感染 GT1-7 細胞に、プリオン蛋白質アミノ末端エピトープを認識する 8B4 抗体 (アミノ酸配列 37-44 位) あるいは 8D5 抗体 (アミノ酸配列 31-39 位) を添加し、生細胞の細胞膜上の PrPSc と反応させた。免疫蛍光細胞化学染色後に共焦点レーザー顕微鏡で観察し、これらの抗体が PrPSc を特異的に認識しているか確認した。陰性コントロール作製のため、ペントサンポリサルフェート (PPS) 処理により持続感染 GT1-7 細胞に細胞のプリオンを脱落させ、プリオン非感染細胞を作出した。

#### (2) EMARS (enzyme-mediated activation of radical sources)反応に用いる標識用化合物

aryl azide-FITC は市販されていないため、1,5-Diaminopentane Dihydrochloride と 4-Azido-2-hydroxybenzoic Acid から 4-Azido salicyl amide を合成する予定であったが、申請後市販され入手可能となった。また aryl azide-FITC を tyramid-FITC に変更し標識効率を高めた次世代 EMARS 法も試行した。

#### (3)EMARS 反応による相互作用分子の標識:

プリオン持続感染 GT1-7 細胞に、抗 PrP 抗体である 8B4 あるいは 8D5 抗体を添加後、HRP 結合抗マウス IgG 抗体で標識した。細胞を洗浄後、aryl azide-FITC あるいは tyramid-FITC の添加により、PrPSc と共局在している分子を FITC 標識した。

#### (4) EMARS 反応による標識分子の確認

EMARS 反応後、細胞を回収し破碎後、細胞膜を含むミクロソーム画分を遠心分離法により分画した。ウエスタンブロット (WB) 法により、FITC 標識された分子を抗 FITC 抗体で検出した。また、EMARS 反応後、細胞をパラフォルムアルデヒドで固定し、Alexa546 結合抗マウス IgG 抗体で PrPSc を蛍光染色し、FITC 標識された分子との共局在を共焦点レーザー顕微鏡で確認した。

#### (5) EMARS 反応による標識特異性の検証

EMARS 反応後、細胞を回収し界面活性剤を用いて溶解した。抗 FITC 抗体を固相化した磁性ビーズを用いて、FITC 標識された分子を免疫沈降した。免疫沈降物のウエスタンブロット (WB) 解析を行い、PrP と共局在の報告がある neural cell adhesion molecule (NCAM) と共局在の報告がないトランスフェリン受容体 (TfR) の検出を行った。免疫沈降物のウエスタンブロット (WB) 解析を行い、各分子の FITC 標識の有無を検証した。

#### (6) EMARS 反応による標識分子の同定

免疫沈降法により FITC 標識された PrPSc 共局在候補分子の濃縮と部分精製を行い、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(LC-MS/MS)を用いて、共局在候補分子の同定を行った。

#### 4. 研究成果

先行論文と同じく、プリオン持続感染 GT1-7 細胞と 8B4 抗体を用いたが、PrPSc を蛍光免疫細胞化学で特異的に染色できなかった。そのため、PrPSc 蓄積量が非常に多いプリオン持続感染 GT1-7 細胞クローンを北海道大学から導入し、染色条件の検討を行った。その結果、8B4 抗体と 8D5 抗体を用いた蛍光免疫細胞化学では、プリオン持続感染 GT1-7 細胞表面上で集積した短い繊維状の PrPSc が主として観察され、非感染 GT1-7 細胞上では砂粒状の PrPC が観察され(図 1) PrPSc と PrPC の染色像は大きく異なっていた。これらの結果は、実験で使用しているプリオン持続感染 GT1-7 細胞表面上の PrPC は発現が低下している、あるいは両抗体に対するエピトープが被覆されているために、PrPSc が特異的に標識されていると考えられた。PrPSc のシグナルは 8B4 抗体と比較して 8D5 抗体の方が強かったため、以降の実験は 8D5 抗体を用いることとした。

続いて EMARS 反応により、PrPC と PrPSc の近接する分子に FITC 標識されるか確認した。プリオン持続感染 GT1-7 細胞と非感染 GT1-7 細胞を 8D5 抗体で標識し、実験方法に記載したように EMARS 反応を行った。陰性コントロールとして 8D5 抗体のアイソタイプコントロール IgG (ISO) を添加した細胞も用意し、同様に EMARS 反応を行った。EMARS 反応後に、8D5 抗体で標識された PrP と FITC 標識分子が共局在していることを蛍光免疫細胞化学法で確認した(図 2)。

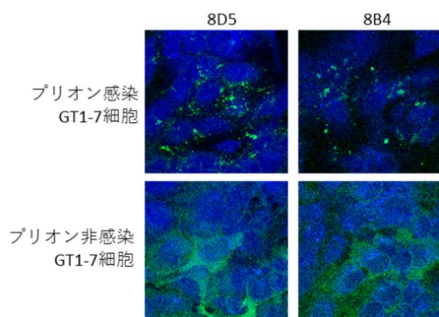


図 1. GT1-7 細胞の PrP の蛍光免疫細胞化学。プリオン感染細胞では、8D5 と 8B4 抗体により、細胞膜上に集積した短い繊維状の PrPSc が観察される。

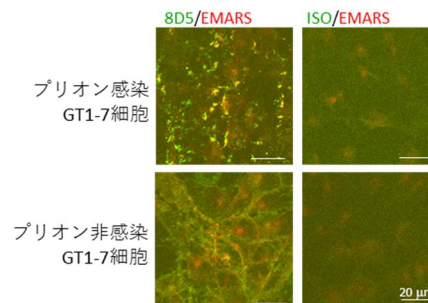


図 2. EMARS 後の GT1-7 細胞の蛍光免疫細胞化学。8D5 抗体で標識された PrP (緑) と、FITC 標識された分子(赤)は近接していることが観察される。

次に EMARS 反応による FITC 標識特異性の検証を行った。EMARS 反応後の細胞溶解液を、抗 FITC 抗体を用いた免疫沈降により、FITC 標識分子の濃縮を行い、WB 法により NCAM と TfR の検出を行った。PrPC と共局在することが知られている NCAM が抗 FITC 抗体により免疫沈降されたのに対し、共局在が報告されていない TfR は抗 FITC 抗体により免疫沈降されなかった(図 3)。これらの結果は、EMARS 法が PrP に近接する分子を特異的に FITC 標識することを示している。

最後に EMARS 反応による標識分子の同定を行った。免疫沈降法で FITC 標識分子を濃縮後、感染/非感染 GT1-7 細胞間でそのプロファイルと比較した。すると感染 GT1-7 細胞において、質量 50, 57, 75 KDa の蛋白質が高効率で FITC 標識されていた。これらの蛋白質が含まれたゲルを切出し、液体クロマトグラフィー(LC)とタンデム質量分析(MS/MS)を連結した LC-MS/MS を用い、同定と同時にペプチド断片のイオン検出強度をもとにして各タンパク質の量的相違を比較した。しかし、感染/非感染細胞間で明瞭な量的相違差が認められる蛋白は同定できなかった。今後、感染/非感染 GT1-7 細胞由来の検体を、2次元電気泳動を用い展開し、そのプロファイルと比較し、LC-MS/MS で同定する

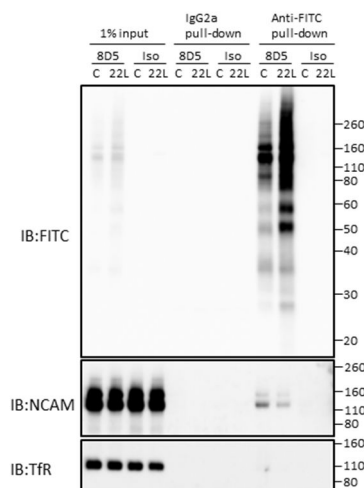


図 3. EMARS 反応後の各細胞溶解液の免疫沈降。細胞溶解液から免疫沈降法で FITC 標識分子を濃縮した。抗 FITC 抗体による WB では非感染細胞(C)と感染細胞(22L)で、FITC 標識された分子のプロファイルが異なる。NCAM 分子は EMARS 法で FITC 標識されているのに対し、TfR は標識されていない。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 11 件)

- (1) Miyazawa K, Masujin K, Matsuura Y, Iwamaru Y, Yokoyama T, Okada H. Interspecies transmission to bovinized transgenic mice uncovers new features of a CH1641-like scrapie isolate. *Vet Res.* 2018. 49(1):116. 査読有
- (2) Iwamaru Y, Mathiason CK, Telling GC, Hoover EA. Chronic wasting disease prion infection of differentiated neurospheres. *Prion.* 2017. 11(4):277-283. 査読有
- (3) Hagiwara K, Iwamaru Y, Tabeta N, Yokoyama T, Tobiume M. Evaluation of rapid post-mortem test kits for bovine spongiform encephalopathy (BSE) screening in Japan: Their analytical sensitivity to atypical BSE prions. *Prion.* 2017. 11(2):113-127. 査読有
- (4) Okada H, Masujin K, Miyazawa K, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Arai S, Fukuda S, Murayama Y, Yokoyama T. Experimental Infection of Cattle With a Novel Prion Derived From Atypical H-Type Bovine Spongiform Encephalopathy. *Vet Pathol.* 2017. 54(6):892-900. 査読有
- (5) Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Miyazawa K, Matsuura Y, Masujin K, Murayama Y, Yokoyama T. Oral Transmission of L-Type Bovine Spongiform Encephalopathy Agent among Cattle. *Emerg Infect Dis.* 2017. 23(2):284-287. 査読有
- (6) Imamura M, Miyazawa K, Iwamaru Y, Matsuura Y, Yokoyama T, Okada H. Identification of the first case of atypical scrapie in Japan. *J Vet Med Sci.* 2017. 10;78(12):1915-1919. 査読有
- (7) Imamura M, Kato N, Iwamaru Y, Mohri S, Yokoyama T, Murayama Y. Multiple affinity purification of a baculovirus-derived recombinant prion protein with in vitro ability to convert to its pathogenic form. *Prep Biochem Biotechnol.* 2017. 47(1):1-7 査読有
- (8) Okada H, Miyazawa K, Imamura M, Iwamaru Y, Masujin K, Matsuura Y, Yokoyama T. Transmission of atypical scrapie to homozygous ARQ sheep. *J Vet Med Sci.* 2016. 78(10):1619-1624. 査読有
- (9) Imamura M, Tabeta N, Kato N, Matsuura Y, Iwamaru Y, Yokoyama T, Murayama Y. Heparan Sulfate and Heparin Promote Faithful Prion Replication in Vitro by Binding to Normal and Abnormal Prion Proteins in Protein Misfolding Cyclic Amplification. *J Biol Chem.* 2016. 291(51):26478-26486. 査読有
- (10) Masujin K, Okada H, Miyazawa K, Matsuura Y, Imamura M, Iwamaru Y, Murayama Y, Yokoyama T. Emergence of a novel bovine spongiform encephalopathy (BSE) prion from an atypical H-type BSE. *Sci Rep.* 2016. 6:22753. 査読有
- (11) Iwamaru Y, Kitani H, Okada H, Takenouchi T, Shimizu Y, Imamura M, Miyazawa K, Murayama Y, Hoover EA, Yokoyama T. Proximity of SCG10 and prion protein in membrane rafts. *J Neurochem.* 2016. 136(6):1204-1218. 査読有

### 〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) Iwamaru Y, Yamasaki T, Masujin K, Miyazawa K, Matsuura Y, Horiuchi M. Immunolabeling of cell-surface abnormal prion protein in viable cells. The 43rd FEBS congress(国際学会) . 2018年7月7日 2018年7月12日 . Prague, Czech Republic.
- (2) Iwamaru Y. Proximity-dependent labeling of molecules colocalizing with prion protein . 第18回日本蛋白質科学会年会 . 2018年6月26日 2018年6月28日 . 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)
- (3) Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Miyazawa K, Yokoyama T. In vitro approach to estimate the human transmission risk of prions. Prion2018 (国際学会) . 2018年5月22日 2018年5月25日 . Santiago de Compostela,
- (4) Iwamaru Y, Yamasaki T, Masujin K, Miyazawa K, Matsuura Y, Horiuchi M. Antibody labeling of cell-surface abnormal prion protein in living cells. 2017年度 生命科学系学会合同年次大会 . 2017年12月6日 2017年12月9日 . 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

### 〔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：

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

## 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：中西 淳

ローマ字氏名：Jun Nakanishi

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。