

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19300251  
 研究課題名（和文） プリオン関連蛋白質の解析と食育・食健康  
 研究課題名（英文） Analysis of prion and prion related protein for the purpose of food safety

研究代表者  
 松田 覚（MATSUDA SATORU）  
 奈良女子大学・生活環境学部・教授  
 研究者番号：50242110

## 研究成果の概要：

アポトーシスや細胞膜抗酸化作用との関連を追究するために、プリオン及びドッペルの発現ベクターを作製して、リンパ系細胞に強制発現させ、紫外線照射時や血清除去時のアポトーシスに対する細胞の挙動変化を解析した。プリオン関連蛋白質と微小RNAとの結合の有無を検討したが、特定のRNAとは結合していない。ドッペル蛋白質ではプリオン蛋白質と異なる機能が報告されており、Bcl2 関連アポトーシスカスケードの中で機能していることが示唆された。アダプター蛋白質NESHとの相互作用を免疫沈降やウエスタン法で確認した。SOD活性については、WAT1を用いて測定し、ドッペル蛋白質がSOD活性を阻害していることが判明した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活、食の安全、プリオン

## 1. 研究開始当初の背景

日本の食生活も欧米化が進み肉食が多くなったことから牛肉問題や狂牛病は現在最も注目されている。狂牛病は食習慣によって予防できるとされており生活習慣病に

属する。しかし、この病気の発症機構や科学的な予防法が未だ明確になっていないので、どのような食習慣の改善が望ましいのかについても基礎的な研究を行いつつ考えていく必要がある。本研究は、

狂牛病などの原因に関与するプリオン遺伝子とドッペル遺伝子についてその正常機能を追究する。また高い特異性を示す RNAi に着目して、食生活レベルでのプリオン病の予防法を考案するなど、この疾患予防のための基礎研究を行うことが本研究の目的である。

着想に至った経緯として、申請者は有用かつ無害な腸内細菌と高い特異性を示す RNAi に着目し、大腸ポリープ・癌など生活習慣病の日常食生活レベルでの予防法を考案し研究しているが、病気に関わる生命現象に対して、特に遺伝子あるいは分子レベルでの詳細な解明が為されなければ有用な対応が考えられないことが挙げられる。遺伝子発現制御を行うため、正常細胞内制御機構に RNAi (RNA 干渉) が備わっており本研究でもこれを利用する。RNAi は線虫の実験系で発見された遺伝子発現の新しい制御機構であるが、哺乳動物細胞でも RNAi は機能していることが証明されており、その作用の鍵を担っているのが Dicer/Herna である。この分子は特殊なヘリカーゼであるが、20bp ほどの短い二重鎖 RNA 配列を認識して同じ配列をもつ mRNA を特異的に分解する。その特異性と効率是非常に高く、実験室レベルの細胞機能の研究には従来のアンチセンスオリゴに替わって世界中で広く使用されている。申請者はこのキー分子 (Dicer/Herna) のクローニングに先駆けて成功しており、その作用である RNAi の応用性の高さから本研究のヒントを得た。

学術的背景として、複数のグループがプリオンとドッペルの解析を独立して推し進め、両分子とも神経疾患そして癌などとの密接な関わり合いを持つことが報告されてきている。本研究も、RNA や金属イオ

ンなどを用いた新機序でプリオンやドッペルの蛋白質機能をコントロールしようとするもので、今後の医学や生化学領域の研究開発にも画期的な進歩をもたらすと考えた。

## 2. 研究の目的

RNAi を利用した医学応用は広く試みられ顕著な成果が上がってきている。初期研究者は、当該年度の医学生理学賞にも選ばれた。こうした最新の分子生物学的流れに沿いつつ、本研究は生化学的成果を有機的に結びつけながら病態学的に発展させる位置づけにあると同時に日常食生活レベルで疾病予防を切り開く実用的な試みである。狂牛病は現代生活者の重大な関心事であることから、正確な科学情報は食生活に安心をもたらすばかりでなく産業界への貢献も大きい。RNAi の高い特異性から変異遺伝子の siRNA が正常細胞に取り込まれてもほとんど作用しないことは明らかであるが、これまでに見出されているスラミンや銅イオンなどとの相乗効果も食生活レベルでの予防法として大いに期待できる。プリオン病は正常プリオン蛋白質が病的プリオン蛋白質に連鎖的に変化することが原因とされている。しかし、プリオン及びドッペルなどプリオン関連蛋白質の正常機能の多くは不明であり、消化管から脳までの蛋白質移動メカニズムも明確ではない。ところでプリオン遺伝子欠損マウスではプリオン病を発症しないことから、遺伝子レベルでの疾患予防は理論的には可能である。これまでの研究結果をつなぎ合わせて考えてみると、特殊な配列の蛋白質を媒介に RNAi を用いたプリオン病の予防は充分可能である。この目的のために申請者がこれまで成果を上げてきた癌のシグナル伝達解析をさらに進め、これらを応用して狂牛病対策に食健

康の観点からアプローチすることが研究の特色である。

### 3. 研究の方法

作製したプリオン及びドッペルの発現ベクターを用いて、リンパ系細胞に強制発現させ、細胞の挙動変化を解析する。特にアポトーシスや細胞膜抗酸化作用との関連を追及する。また、GSTとの融合蛋白質を作製し、プリオン関連蛋白質と微小RNAとの結合の有無を検討する。結合する場合、そのRNA塩基配列を決定する。ドッペル蛋白質ではプリオン蛋白質と異なる機能が報告されている。これらの蛋白質間で、細胞内の代謝系に変化がないか調べ、ユビキチン・プロテオソーム系との関わりやアポトーシスとの関連を明らかにする。神経細胞で重要な役割を果たす分子であるSHPS-1/SIRPa1やCaveolinの相互作用についても検討する。SHPS-1/SIRPa1とCaveolinの相互作用に加え、申請者が発見した新規アダプタータンパク質NESH・NESCAにおけるがんへの細胞内シグナル伝達系での解析とプリオンのシグナル伝達系についてさらに検討を加えていく。

### 4. 研究成果

プリオンは狂牛病の原因分子とされているが、発症機構や科学的な予防法が未解決であるばかりでなく、分子の本来の機能も未知である。一方、プリオンやプリオン関連蛋白質であるドッペルは、最近発がんとの関わりも指摘されている。本研究では、プリオン遺伝子とドッペル遺伝子についてその遺伝子産物の正常機能を、特に、活性酸素除去機能(SOD活性)や細胞アポトーシス活性制御に関して追究し、また、RNAiを利用して細胞内

のがん情報伝達系を解析した。

まずアポトーシスや細胞膜抗酸化作用との関連を追究するために、作製したプリオン及びドッペルの発現ベクターを用いて、リンパ系細胞に強制発現させ、紫外線照射時や血清除去時のアポトーシスに対する細胞の挙動変化を解析した。プリオン関連蛋白質と微小RNAとの結合の有無を検討したが、特定のRNAとは結合していない。ドッペル蛋白質ではプリオン蛋白質と異なる機能が報告されており、Bcl2関連アポトーシスカスケードの中で機能していることが示唆された。アダプター蛋白質NESHとの相互作用を免疫沈降やウェスタン法で確認し、生化学的な検討を詳細に加えた結果、アポトーシスのシグナル伝達系においてNESCAが核内から細胞質への移動していることが明らかになった。しかし、この挙動変化がどのような機能と結びついているのかは不明である。SOD活性については、WAT1を用いて測定し、ドッペル蛋白質がSOD活性を阻害していることが判明した。

また情報伝達カスケードをターゲットとしたsiRNAシステムを利用して、RNAiによる細胞内のプリオン蛋白質とドッペル蛋白質の機能変化及び相互作用の変化を検討しながら、アダプター蛋白質の局在変化やSOD活性とアポトーシス制御能を探った。さらに分子間の相互作用とがん化情報伝達と細胞膜変化の解析を進め、プリオン関連蛋白質とアダプター蛋白質のNESCA、NESHについてもプリオン関連蛋白質との関係を明らかにした。特にNESHの挙動について解析した結果を論文に発表した。

がんに関わるカスケードをターゲットとしたsiRNAシステムを利用して、RNAiによる細胞内のプリオン蛋白質とドッペル蛋白質の機能変化及び相互作用の変化を検討し、アダプター蛋白質の局在変化やSOD活性とアポ

トランス制御能を探った。さらに分子間の相互作用とがん化情報伝達と細胞膜変化の解析を進め、プリオン関連蛋白質とアダプター蛋白質の NESCA, NESH についてもプリオン関連蛋白質との関係を明らかにした。特に NESH の挙動について解析した結果を論文に発表した。さらにがん転移の抑制に応用させるべく解析を続けている。

また乳がんなどに関わる ErbB2 と相互作用する分子として申請者らが発見した Tob を用いて、膵臓がん細胞の増殖抑制を 3 種類の細胞を用いて検討した結果、2 種類の細胞において実験動物の腹膜にがんが広がるのを効率よく抑制した。

#### 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 3 件)

① Yanagie H, Tanabe T, Sumimoto H, Sugiyama H, Matsuda S, Nonaka Y, Ogiwara N, Sasaki K, Tani K, Takamoto S, Takahashi H, Eriguchi M Tumor growth suppression by adenovirus-mediated introduction of a cell growth suppressing gene tob in a pancreatic cancer model. Biomed Pharmacother. 63:275-286. (2009)  
査読有

② Matsuda S, Ichigotani Y, Okumura N, Yoshida H, Kajiya Y, Kitagishi Y, Shirafuji N. NESH expression switches to the adverse effect of imatinib mesylate. Mol Oncol. 2:16-19. (2008)  
査読有

③ Matsuda S, Yokozaki S, Yoshida H, Kitagishi Y, Shirafuji N, Okumura N. Insulin receptor substrate protein 53 (IRSp53) as a binding partner of antimetastasis molecule NESH, a member of Abelson interactor protein family. Ann. Oncol. 19:1356-1357. (2008)  
査読有

[学会発表] (計 1 件)

① Prion 類似膜糖蛋白質 Doppel の機能解析 奥村奈央子 松田 覚 日本家政学会 第 59 回大会 2007/05/12 長良川国際会議場

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松田 覚 (MATSUDA SATORU)  
奈良女子大学・生活環境学部・教授  
研究者番号：50242110

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし