

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19435

研究課題名（和文）異常蛋白質の排除機構に関する新原理の探究

研究課題名（英文）Exploration of a new principle for the elimination mechanism of abnormal proteins

研究代表者

堂浦 克美（Doh-ura, Katsumi）

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00263012

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：アルカリフォスファターゼは、プリオンのような難分解性蛋白質凝集体に対する新たな細胞内分解系の原理の究明につながる手掛かりであると考えた。しかし、この2年間の研究成果としては、プリオン持続感染細胞においてアルカリフォスファターゼがプリオン量に影響を与えることは確認できたが、その機序解明につながる手掛かりは得られなかった。また、アルカリフォスファターゼが働く細胞局所のアルカリ性環境がプリオンの分解排除に関わるとの仮説をたてていたが、仮説の正否を判断できないままであり、今後さらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難分解性蛋白質凝集体が細胞内でどのように分解・代謝されているのか、その基本原理は不明であり、既知の分解系だけでは説明できない。新たな基本原理の究明は、難分解性蛋白質凝集体が細胞や組織中に蓄積する様々な疾患に対して、新たな治療開発の糸口を与えてくれる可能性がある。難分解性蛋白質凝集体の代表であるプリオンにおいて、アルカリフォスファターゼとの関係に光をあてた本研究は、この新たな基本原理の究明に結びつく可能性を残し、アルカリフォスファターゼの新たな機能解明につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：From the preliminary study alkaline phosphatase was thought to provide a clue to the principle of a new intracellular degradation system for persistently accumulating protein aggregates such as prions. The results of our research over the past two years have confirmed that alkaline phosphatase affects prion levels in persistently prion-infected cells, but have not provided any clues to elucidate the mechanism of this effect. In addition, it was hypothesized that the alkaline environment at the subcellular domain where alkaline phosphatase acts may be involved in prion degradation and elimination, but it is still undetermined whether this hypothesis is correct or not, and further studies are needed.

研究分野：神経内科学

キーワード：プリオン アルカリフォスファターゼ 細胞内分解系

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 異常蛋白質凝集体で、明瞭な自己増殖能を有する「プリオン」は、代表的な難分解性蛋白質であり、強力な蛋白質変性条件でないと自己増殖能を失わない。一方、細胞レベルでは、プリオンは細胞膜上やエンドソーム・ゴルジ装置などで自己増殖し、リソソームに蓄積して『感染』し続けることが可能である（引用文献1）。
- (2) リソソーム活性を上げたり、オートファジーを誘導すると、プリオンの一部は分解されるものの、完全に失われることはない（引用文献2）。また、プリオンはユビキチン化を受けず、プロテアソーム系が分解に関与していないことも広く認知されている（引用文献3）。
- (3) これまでにプリオンのような難分解性蛋白質を細胞内で完全に分解排除するメカニズムは明らかになっていない。
- (4) 研究代表者は、プリオン持続感染細胞を用いて検討したところ、細胞内の異常蛋白質排除に関わる新たな蛋白質分解系の存在を示唆する結果を得た。

### 2. 研究の目的

- (1) 本研究では、手掛かりと考えているアルカリフォスファターゼを中心に、「新たな蛋白質分解系」に関わる要素群を調べ、これまでに知られていない難分解性蛋白質凝集体の細胞内分解系の新原理を究明しようとした。

### 3. 研究の方法

- (1) 難分解性プリオン株 22L に持続感染が可能な神経芽腫細胞の3群のサブクローン（持続感染成立細胞、感染消失細胞、非感染細胞）を用いた。
- (2) アルカリフォスファターゼ関与の妥当性を検証するため、以下を実施した。
  - ① アルカリフォスファターゼの発現状況・局在を蛋白質レベルで確認するとともに、アルカリフォスファターゼ活性を調べた。ともに GPI アンカー型蛋白質であるアルカリフォスファターゼ（引用文献4）と正常型プリオン蛋白質の局在を、それぞれの特異抗体を用いた免疫蛍光染色で観察した。また、両者の相互作用を、細胞膜を架橋剤処理後に特異抗体で免疫沈降してウエスタンブロットで確認した。
  - ② アルカリフォスファターゼ遺伝子の発現変動（ノックダウン）を行い、異常型プリオン蛋白質量をウエスタンブロット法で測定することでプリオンへの影響を調べた。
  - ③ アルカリフォスファターゼの生理的基質類（引用文献5）やそれらの脱リン化物をプリオン持続感染細胞に添加し、異常型プリオン蛋白質量をウエスタンブロット法で測定することでプリオンへの影響を調べた。
- (3) アルカリフォスファターゼが関係するシグナル伝達系の関与を調べるため、以下を実施した。
  - ① アルカリフォスファターゼが関係するシグナル伝達系（引用文献6）として、これまでに報告がある PI3K/AKT 系、MAPK 系、Wnt/ $\beta$ -catenin 系に関して入手可能な各種阻害剤をプリオン持続感染細胞に添加し、異常型プリオン蛋白質量をウエスタンブロット法で測定することでプリオンへの影響を調べた。
  - ② アルカリフォスファターゼは細胞膜上や小胞内においてアルカリ性環境（pH9-11）で活性を発揮すると考えられていることから、細胞膜非透過性化合物を用いた pH イメージング法を用いて、局所 pH 環境とアルカリフォスファターゼの発現部位と

の関連を調べた。また、細胞膜上の局所を一時的にアルカリ性環境に変えて、異常型プリオン蛋白量をウェスタンブロット法で測定することでプリオンへの影響を同様に調べた。

#### 4. 研究成果

- (1) アルカリフォスファターゼ関与の妥当性を検証するために行った実験では、以下の結果が得られた。
  - ① アルカリフォスファターゼの発現状況・局在を蛋白質レベルで確認し、GPI アンカー型蛋白質である正常型プリオン蛋白との共局在が一部に示唆された。両者の相互作用について、免疫沈降法では明確な結果を得ることができなかった。一方、細胞のアルカリフォスファターゼ活性とプリオン量には負の相関関係が見られた。
  - ② アルカリフォスファターゼ遺伝子を siRNA で遺伝子ノックダウンを行い、プリオン量の変化をあらためて確認した。ノックダウン効果の特異性については、ターゲット配列の変更などで確認した。また、遺伝子ノックダウンが正常型プリオン蛋白の発現や局在に影響を及ぼさないこともあらためて確認した。
  - ③ アルカリフォスファターゼの各種生理的基質類やそれらの脱リン酸化物を細胞培養液に添加して、正常型プリオン蛋白やプリオンへの影響を調べたが、細胞増殖に影響しない濃度域では両者への影響は観察されなかった。
- (2) アルカリフォスファターゼが関係するシグナル伝達系の関与を調べるために行った実験では、以下の結果が得られた。
  - ① アルカリフォスファターゼが関係するシグナル伝達系として報告がある PI3K/AKT 系、MAPK 系、Wnt/ $\beta$ -catenin 系に対する様々な阻害剤を細胞培養液に添加して、正常型プリオン蛋白やプリオンへの影響を調べたが、細胞増殖に影響しない濃度域では両者への影響は観察されなかった。
  - ② pH イメージング法を使って局所 pH とアルカリフォスファターゼ局在との関連を調べたが、両者の関連性を明らかにできなかった。一方、細胞膜上の局所を一時的にアルカリ性環境に変えてプリオンへの影響を調べる実験は、細胞に障害を与えない範囲のアルカリ処理条件ではプリオンへの影響は観察されなかった。

#### <引用文献>

- 1, Hutti CR, Welle KA, Hryhorenko JR, Ghaemmaghami S. Global analysis of protein degradation in prion infected cells. *Sci Rep.* 2020;10(1):10800. Erratum in 2020;10(1):12952.
- 2, López-Pérez Ó, Badiola JJ, Bolea R, Ferrer I, Llorens F, Martín-Burriel I. An update on autophagy in prion diseases. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:975.
- 3, Zhu T, Hayat Khan S, Zhao D, Yang L. Regulation of proteasomes in prion disease. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2014;46(7):531-539.
- 4, アルカリホスファターゼの構造と機能. 石田陽子, 小丸圭一, 織田公光. *臨床化学* 2004;33:36-44.
- 5, Vimalraj S. Alkaline phosphatase: structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene.* 2020;754:144855.
- 6, Négyessy L, Györfy B, Hanics J, Bányai M, Fonta C, Bázsó F. Signal transduction pathways of TNAP: molecular network analyses. *Subcell Biochem.* 2015;76:185-205.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Teruya K, Doh-ura K.	4. 巻 392(1)
2. 論文標題 Therapeutic development of polymers for prion disease.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 349-365
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-022-03604-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 照屋健太、堂浦克美	4. 巻 97(4)
2. 論文標題 プリオン病の薬物治療	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 467-476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Teruya K, Oguma A, Takahashi S, Watanabe-Matsui M, Tsuji-Kawahara S, Miyazawa M, Doh-ura K.	4. 巻 107
2. 論文標題 Anti-prion activity of cellulose ether is impaired in mice lacking pre T-cell antigen receptor , T-cell receptor , or lytic granule function.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int Immunopharmacol.	6. 最初と最後の頁 108672
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.intimp.2022.108672.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Teruya K, Iwabuchi S, Watanabe Y, Tsuchida R, Watanabe-Matsui M, Konno H, Doh-ura K.	4. 巻 1866(4)
2. 論文標題 Activities of curcumin-related compounds in two cell lines persistently infected with different prion strains.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Gen Subj.	6. 最初と最後の頁 130094
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2022.130094.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ding M, Teruya K, Zhang W, Lee HW, Yuan J, Oguma A, Foutz A, Camacho MV, Mitchell M, Greenlee JJ, Kong Q, Doh-ura K, Cui L, Zou WQ.	4. 巻 58(9)
2. 論文標題 Decrease in Skin Prion-Seeding Activity of Prion-Infected Mice Treated with a Compound Against Human and Animal Prions: a First Possible Biomarker for Prion Therapeutics.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Neurobiol.	6. 最初と最後の頁 4280-4292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-021-02418-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Teruya K, Oguma A, Arai K, Nishizawa K, Iwabuchi S, Watanabe-Matsui M, Sakasegawa Y, Schatzl H, Gilch S, Doh-ura K.	4. 巻 560
2. 論文標題 Polymorphisms in glia maturation factor gene are markers of cellulose ether effectiveness in prion-infected mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 105-111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.04.116.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 堂浦克美
2. 発表標題 プリオンの概要.
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kenta Teruya, Katsumi Doh-ura
2. 発表標題 Our quest for anti-prion compounds 2022.
3. 学会等名 Asia Pacific Prion Symposium 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Teruya K, Iwabuchi S, Kato R, Konno H, Doh-ura K
2. 発表標題 Structure-activity relationship of curcumin-related compounds in ScN2a and N167.
3. 学会等名 Asia Pacific Prion Symposium 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Teruya K, Iwabuchi S, Okada M, Yaguchi N, Konno H, Doh-ura K
2. 発表標題 Characterization of the actions of CRANAD on two prion strains and PrP-amyloid.
3. 学会等名 第59回ペプチド討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松井 美紀、照屋 健太、小熊 歩、村山 和隆、堂浦 克美 .
2. 発表標題 フェロトキシ阻害剤による異常型プリオンタンパク質蓄積抑制機構の解明 .
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenta Teruya, Toshiya Ishikawa, Sara Iwabuchi, Miki Watanabe-Matsui, Katsumi Doh-ura.
2. 発表標題 Photoreaction-induced SDS-resistant PrPSc/res oligomer formation.
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院 医学系研究科 神経化学分野  
<https://www.neurochemistry.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------