

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780313

研究課題名（和文）プリオン蛋白質相互作用分子群の探索による異常プリオン蛋白質生成機構解析

研究課題名（英文）Study of the molecular mechanisms of abnormal prion protein (PrP) production by exploration of PrP-interacting molecules.

研究代表者

岩丸 祥史 (IWAMARU YOSHIFUMI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・プリオン病研究センター・主任研究員

研究者番号：20355142

研究成果の概要（和文）：病原体“プリオン”の主要な構成成分は、異常プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）であり、宿主に発現している正常プリオン蛋白質（PrP^C）の立体構造が変換したものである。そのため、PrP^Cに相互作用する分子の同定は、立体構造変換機構を理解するうえで極めて重要である。本研究では、近年報告された蛋白質のビオチン標識法とショ糖密度勾配遠心法を組み合わせることで、PrP^Cの相互作用分子群を、界面活性剤不溶膜画分(DRM)に限局して網羅的に検索、同定を行なった。その結果、神経特異的に発現する微小管再構築調節蛋白質 Stathmin2 (Stm2) が同定され、Stm2 は PrP^C と近接して存在することが分かった。

研究成果の概要（英文）：Prion diseases are transmissible, fatal, neurodegenerative disorders. One of the hallmarks of prion diseases is progressive accumulation of a misfolded and protease-resistant isoform (PrP^{Sc}) of protease-sensitive prion protein (PrP^C) which is a host-encoded glycoprotein attached to the lipid-raft on the membrane. The conversion of PrP^C into PrP^{Sc} seems to take place at the cell surface or along the endocytic pathway, however, the molecular basis of the conversion remains unclear, particularly regarding role of other cellular factors in prion replication.

In this study, to understand the molecular events in the conversion, we analyzed what molecules interact with PrP^C in lipid-raft enriched detergent resistant microdomains (DRM) using the enzyme-mediated activation of radical sources (EMARS), a newly established biochemical labeling method for cell surface molecules. We demonstrated that neuronal microtubule regulatory phosphoprotein, Stathmin2 was colocalized with PrP in N2a cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用獣医学

キーワード：プリオン、界面活性剤不溶膜画分、ラフト

1. 研究開始当初の背景

病原体“プリオン”の主要な構成成分は、異常プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）であり、宿主に発現している正常プリオン蛋白質（PrP^C）の立体構造が変換したものである。PrP^Cはカルボキシル基末端にGPIアンカーを持つ細胞膜結合型の蛋白質であり、細胞膜上のコレステロ

ールリッチなナノドメイン（ラフト）に局在している。PrP^CからPrP^{Sc}への変換は、細胞表面あるいはPrP^Cの細胞内輸送過程で起こると考えられているが、その詳細な機構は未解明である。最近の研究では、シクロデキストリンやヒドロキシメチルグルタリルCoA(hydroxymethylglutaryl-CoA還元酵素阻害

薬を用いたコレステロールの生合成抑制や除去により、PrP^{Sc}生成が阻害されることが報告されており、ラフトならびにそこに存在する PrP^C 相互作用分子が立体構造変換に重要であることが示唆されている。PrP^C と相互作用する分子は現在までに多数報告されているが、興味深いことに、報告されている多数の相互作用分子の中で、ラフトに局在する分子として報告があるのは glypican 1 のみである。この理由として、相互作用が報告されている分子の大部分は、免疫沈降法や酵母ツーハイブリッド法により検索されていることが推察される。これらの手法はその原理上、PrP^C が局在する細胞膜ラフト上に限局して、相互作用因子を検索することは非常に困難である。近年、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) によりアリルアジドビオチンをラジカル化し(EMARS (enzyme-mediated activation of radical sources)反応)、蛋白質をビオチン標識する方法が報告された。EMARS 反応では HRP を中心に半径約 300 nm の範囲に存在する分子をビオチン標識可能である。HRP 標識抗 PrP^C 抗体とアリルアジドビオチンを組み合わせた EMARS 反応により、PrP^C に相互作用し、かつラフト上に存在する新規分子の検索を行える可能性が高いと考え、本課題を提案した。

2. 研究の目的

病原体プリオンの主要構成成分である PrP^{Sc} は、宿主に存在する PrP^C の構造異性体であり、PrP^C を基質として立体構造の変換が起こる。そのため、PrP^C の相互作用分子を同定することは、立体構造変換機構を理解するうえで極めて重要である。PrP^C は小胞体でカルボキシル基末端側に GPI 付加、ゴルジ体で糖鎖付加の翻訳後修飾を受け、細胞膜上のラフトへと輸送される。細胞表面の PrP^C は、ラフトあるいはクラスリン依存的にエンドサイトーシスされ、エンドソーム内でアミノ基末端側がプロセッシングされた後、再び細胞表面に輸送される。プロセッシングされた PrP^C は、PrP^{Sc} には変換されない。PrP^C の局在・細胞内輸送にはラフトが深く関与しており、PrP^{Sc} 生成におけるラフトの重要性が示唆されている。本研究では、正常プリオン蛋白質に相互作用する分子群をラフトに限局して網羅的に検索・同定し、同定された分子について、異常プリオン蛋白質への変換プロセスにおける役割を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) PrP^C の標識: Fab 化後、HRP 標識した抗 PrP^C 抗体 (T2 抗体) を使用し、氷上で N2a 細胞と反応させた。また生細胞表面上の PrP^C を認識しない抗 PrP^C 抗体 (4E10 抗体) ならびに、ラフトに局在するガングリオシド GM1 を認識するコレラ毒素の B サブユニット (CTxB) を陰性コントロールとして N2a 細胞と反応させた。標識後の細胞を回収し 4°C で界面活性剤を含む緩衝液に懸濁した。サンプルを高濃度シヨ糖溶液に混和し、シヨ糖密度勾配遠心法により DRM を分画し、回収した。
- (2) EMARS (enzyme-mediated activation of radical sources) 反応による相互作用分子の標識: 回収した DRM 画分にアリルアジドビオチンの添加し、プリオン蛋白質と相互作用している分子をビオチン標識した。サンプルをトリクロロ酢酸により沈殿後、2次元電気泳動を行った。PVDF 膜に蛋白質を転写後、HRP 標識ストレプトアビジンにより、ビオチン標識された蛋白質を検出した。
- (3) 標識蛋白質の同定: 2次元電気泳動後のゲルを銀染色し、検出された蛋白質と同じ等電点、分子量のスポットを切り出し、LC-MS/MS を用いて蛋白質の同定を行った。
- (4) 同定された蛋白質の免疫細胞化学法による細胞内局在解析: N2a 細胞をパラホルムアルデヒド固定後、同定したプリオン蛋白質相互作用分子に対する抗体と抗プリオン蛋白質抗体との二重免疫染色を行ない、共焦点レーザー顕微鏡で両者の共局在を検討した。
- (5) PLA (Proximity Ligation Assay) 法による相互作用解析: N2a 細胞を冷メタノール固定後、同定したプリオン蛋白質相互作用分子に対する抗体と抗プリオン蛋白質抗体を反応させ、核酸が結合した 2次抗体を反応させた (Duolink, Olink 社製)。2種類の 2次抗体が近接 (約 40 nm) している場合、核酸のライゲーション反応が生じ、環状構造が形成される。環状構造に沿って 1本鎖核酸を伸長させ、ここに蛍光標識されたオリゴヌクレオチドプローブをハイブリダイズさせ共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
- (6) 同定した相互作用分子群の PrP^{Sc} 生成への関与を検討: プリオン感染 N2a 細胞において siRNA を用いた RNA 干渉より、同定した分子の遺伝子発現を抑制した。細胞を回

収し、細胞抽出液を PK 処理後に、残存する PrP^{Sc} の増減をウェスタンブロット法にて検証した。

4. 研究成果

- (1) 各抗体で標識した N2a 細胞を回収し、4°C で界面活性剤を含む緩衝液に懸濁した。サンプルを高濃度ショ糖溶液に混和し、ショ糖密度勾配遠心法により分画したところ 5、6、7 画分に PrP^C (図 1)、CTxB、コレステロールが集積した。以降、5、6、7 画分を DRM 画分として使用した。



図 1 ショ糖密度勾配遠心後の各画分からの正常プリオン蛋白質の検出

- (2) 各抗体で標識された N2a 細胞の DRM 画分 (5、6、7 画分) をまとめ、アリルアジドビオチンを添加し、EMARS 反応を行った。サンプルを TCA 沈殿後に 2 次元電気泳動を行い、PVDF 膜に転写した後、ビオチン標識蛋白質を検出した。陰性コントロールである 4E10 抗体標識細胞との比較により、等電点が pH 8、分子量が 20 kDa 付近に 1~2 のスポットが特異的に検出された (図 2、白矢頭)。

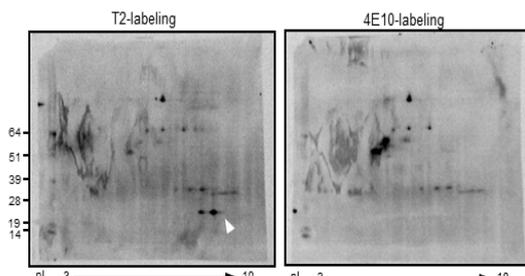


図 2 EMAR 反応後、2 次元電気泳動により展開されたビオチン標識蛋白質の検出

- (3) 2 次元電気泳動後のゲルを銀染色し、標識された蛋白質と同じ等電点、分子量のスポットを切り出し、LC-MS/MS を用いて蛋白質の同定を行ったところ、神経特異的に発現する微小管再構築調節蛋白質 Stathmin2 (Stm2) と同定された。そこで、N2a 細胞における Stm2 の局在を細胞免疫細胞化学法にて解析した。その結果、Stm2 は核周囲と細胞全体に小胞様に検出された。

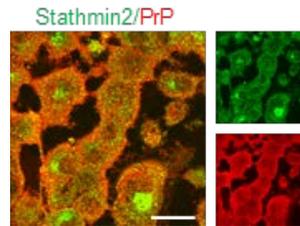


図 3 Stathmin2 の N2a 細胞内の局在

- (4) PrP^C と Stm2 の相互作用を可視化するため、PLA 法による解析を行った。その結果、PrP と Stm2 が近接していることを示す点状の蛍光が観察された。陽性対照として抗 PrP^C 抗体と抗 NCAM 抗体、陰性対照としてマウス IgG とウサギ IgG を用いた。

- (5) Stm2 の PrP^{Sc} 生成への関与を検討するため、プリオン感染 N2a 細胞の Stm2 遺伝子の発現を RNA 干渉により抑制し、PK 処理後に PrP^{Sc} を検出した。RNA 干渉によるプリオン蛋白質遺伝子の発現抑制は、ScN2a 細胞の PrP^{Sc} 量を大幅に減少させるのに対し、Stm2 遺伝子の発現抑制は PrP^{Sc} 量をほとんど変化させなかった。

今回、PrP^C と Stm2 の相互作用は確認されたが、Stm2 が PrP^{Sc} 生成に関与しているデータは得られなかった。しかしながら、Stm2 は神経細胞に発現していることが知られており、またプリオン病の患者またはプリオン感染 GT1 細胞で Stm2 の発現が減少していることが報告されている。これは、プリオン病の病態形成に Stm2 が関与している可能性をしている可能性があり、今後プリオン病の病態形成に果たす Stm2 の役割について、検討を継続する必要があると考えられた。

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 2 件)

- ① Iwamaru Y, Takenouchi T, Imamura M, Shimizu Y, Miyazawa K, Mohri S, Yokoyama T, Kitani H. Prion replication elicits cytopathic changes in differentiated neurosphere cultures. *J Virol.* (査読有) 2013 Jun 5. [Epub ahead of print]
- ② Iwamaru Y, Takenouchi T, Murayama Y, Okada H, Imamura M, Shimizu Y, Hashimoto M, Mohri S, Yokoyama T, Kitani H. Anti-prion activity of Brilliant Blue G. *PLoS One.* (査読有) 2012;7(5):e37896. doi: 10.1371/journal.pone.0037896.

[学会発表] (計 1 件)

岩丸祥史, 竹之内敬人, 今村守一, 毛利資郎,
木谷裕, 横山隆、Exploration of
PrP-interacting molecules on the cell surface
using the enzyme-mediated activation of radical
sources reaction. 第 35 回日本分子生物学会、
2012 年 12 月 14 日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩丸祥史 (IWAMARU YOSHIFUMI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・動物衛生研究所・プリオン病研究セン
ター・主任研究員

研究者番号：20355142