

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659422

研究課題名(和文) HSP90と協同因子を用いた新規プリオン複製試験管内再構成系の構築

研究課題名(英文) Reconstitution of the cellular prion protein unfolding system using Hsp90 and its associated proteins

研究代表者

逆瀬川 裕二 (Sakasegawa, Yuji)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90418616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：正常型プリオン蛋白質(PrPC)の高次構造変換因子として、リコンビナントPrPCのプロテアーゼ感受性を指標に、マウス神経芽腫細胞から熱ショック蛋白質Hsp90を精製した。試験管内反応系を用いて、1) Hsp90はPrPCの分子中央部を部分変性すること、2) 活性はHsp90のC末側ドメインにあること、2) シャペロン活性にヌクレオチドを必要としないが、3) 銅イオンと結合したPrPCの部分変性にはADPなどのヌクレオチドが必要であることを見出した。また、4) 試験管内反応系を用いて新規に見出したシスプラチン誘導体や既存の阻害剤の一部が、プリオン感染細胞においてプリオンの複製を阻害することを確認した。

研究成果の概要(英文)：To find cellular components affecting the conformation of the cellular prion protein (PrPC), we constructed an assay system measuring trypsin susceptibility of a recombinant cellular prion protein (rPrP). Consequently, we purified heat shock protein 90 (hsp90) from mouse neuroblastoma Neuro-2a cells. Hsp90 is a 90-kDa chaperone protein abundantly expressed in the cytosol, nuclear and extracellular space. In the in vitro assay, 1) Hsp90 unfolded the central region of rPrP, 2) the Hsp90 C-terminal chaperon domain is necessary for the unfolding activity; 3) any nucleotides such as ATP were not necessary for the unfolding activity; 3) Hsp90, however, unfolded the copper-loaded rPrP, which is more resistant to trypsin digestion, in the presence of ATP or ADP, but not AMP. In addition, we obtained novel Hsp90 C-terminal chaperon domain inhibitors, cisplatin derivatives, and confirmed that these inhibitors suppressed the prion formation in prion-infected neuroblastoma cells.

研究分野：生化学

キーワード：プリオン 高次構造変換 Hsp90

### 1. 研究開始当初の背景

プリオン病は感染性蛋白粒子プリオンによって引き起こされる人獣共通の致死性神経変性疾患である。プリオンの複製は、神経細胞に高発現している正常型プリオン蛋白質 (PrPC) をプリオンが次々に自らの高次構造に変換することによって起こると考えられる。しかし、プリオンの複製過程の詳細は不明であり、関与する分子についても、PrPC とプリオン以外見出されていない。そのため、治療薬のターゲット分子は主にプリオンに限定されることになるが、プリオンの高次構造は現在も不明のままであり、プリオン病の治療法・予防法の開発は遅れている。

### 2. 研究の目的

プリオン複製のメカニズムを分子レベルで明らかにするために、プリオン複製、特に PrPC の高次構造変換 (部分変性) に関わる細胞因子の同定し、プリオン複製の初期段階を試験管内で再構成することを試みた。

### 3. 研究の方法

PrPC の高次構造変換因子を探索するために、リコンビナント PrPC (rPrP) のトリプシン消化に対する感受性を指標した試験管内アッセイ系を構築した。構造変換反応、トリプシン消化反応の 2 段階の反応を行った後、rPrP を SDS-PAGE によって分離し、PVDF 膜上に転写した後、抗プリオン抗体によって検出した。この検出系では、構造変換を受けてトリプシン感受性になった rPrP は消化を受け検出できない。このアッセイ系を利用して、マウス神経芽腫細胞 Neuro2a の破砕液を出発材料に、PrPC の高次構造変換を促進する因子を探索した。

さらに、上記アッセイ系を利用して、PrPC の構造変換を抑制する低分子化合物について探索を行った。阻害活性をもつ低分子化合物については、プリオン感染細胞を用いて抗プリオン作用を検証した。細胞破砕液中のプリオンは、プロテアーゼ耐性ポリペプチドとして検出した。プロテイナーゼ K 消化の後、SDS-PAGE によってプロテアーゼ耐性ポリペプチドを分離し、PVDF 膜に転写し、抗プリオン抗体にて検出した。PrPC はプロテアーゼによって消化されるが、プリオンはプロテアーゼ耐性のコアをもつため検出することができる。

### 4. 研究成果

大腸菌発現系にて合成した rPrP は封入体として発現するため、高濃度尿素によって可溶化した後、塩酸アルギニン存在下で酸化的に巻き戻すことによって、 $\alpha$ -ヘリックスに富む PrPC として調製した。得られた rPrP は低濃度トリプシンの消化に対して耐性をもつが、変性剤による部分変性を受けるとトリプシン消化に対して感受性となる。そこで、この rPrP の部分トリプシン耐性を利用して、

PrPC の構造変換を促進する細胞因子の探索を試みた。

出発材料として用いた Neuro2a 細胞は複数のプリオン株に感染することができることから、プリオン複製に関与する細胞因子を豊富に含むことが予想される。そこで、この細胞破砕液より、上記試験管内アッセイ系を用いて PrPC の構造変換活性を探索したところ、サイトソル分画に強い構造変換活性を検出することに成功した。rPrP はサイトソル分画とインキュベートしただけでは分解されず、トリプシン処理をしてはじめて消化を受けた。したがって、単純にサイトソル分画中のプロテアーゼに消化されたのではなく、破砕液中の細胞因子によってトリプシン感受性に構造変換を受けたと考えられた。そこで、サイトソル分画から 3 つのカラムクロマトグラフィーによって活性成分を精製したところ、分子量 90 kDa の単一のポリペプチドを得ることに成功した。このポリペプチドを TOF-MS-MS によって質量分析したところ、Hsp90 と Hsp90 アイソフォームの混合物であることが明らかとなった。

次に、Hsp90、Hsp90、Grp94 などの関連シャペロン蛋白質について、マウス cDNA ライブラリーにより各遺伝子をクローニングし、His タグ蛋白質として大腸菌で発現し、金属アフィニティークロマトグラフィーなどを用いて精製した。各リコンビナントシャペロン蛋白質について PrPC 高次構造変換を調べたところ、Hsp90 の両アイソフォームに加えて、小胞体内腔に局在する Grp94 も同等の活性を保持することが明らかとなった。一方、Hsp90 と同じくサイトソルに多量に発現するシャペロン分子、Hsc70、Hsp70 は活性を示さなかった。

高次構造変換を受けた rPrP はトリプシン消化後、分子中央部を認識する抗体では検出されなかった。しかし、N 末側、C 末側を認識する抗体によって検出したところ、それぞれ、ほぼ完全な N 末断片、C 末断片として検出することができた。N 末、C 末断片はいずれもトリプシン切断可能部位を複数もつことから、Hsp90 は PrPC の分子中央部だけが部分変性を受け、その結果、特異的にこの部位がトリプシン消化を受け、N 末側、C 末側断片として検出されたと考えられた。この分子中央部は、塩基性アミノ酸と疎水性ドメインを含み、生理的条件下の培養細胞でも PrPC はこの部分で切断を受けることが知られている。この結果は、Hsp90 は PrPC の生理的な代謝過程に関与する可能性を示すものである。

Hsp90 はサイトソル、核に局在するが、近年、細胞外スペースにも存在することが報告されている。一方、PrPC は細胞膜外に GPI 糖脂質によって細胞膜上に係留されているが、一部分は、細胞内の小胞体やゴルジ体、分泌顆粒などの膜内腔に局在している。そこで、PrPC と Hsp90 の細胞局在を調べるため、間接

蛍光抗体法による顕微鏡観察を行ったところ、PrPC、Hsp90 のいずれも細胞外からの抗体の添加によって細胞膜上にドット状に局在し、その一部は共局在することが明らかとなった。この結果は、Hsp90 と PrPC が細胞膜上で相互作用できる可能性を示している。

Hsp90 は N 末側と C 末側に独自のシャペロンドメインをもっており、前者は ATP の加水分解活性をもつものに対し、後者はヌクレオチドの加水分解活性はもたず ATP 以外に GTP、CTP などの複数のヌクレオチドと結合することが知られている。そこで、Hsp90 の高次構造変換活性にヌクレオチド依存性があるか調べたところ、構造変換活性には特定のヌクレオチドは必要としないことが明らかとなった。

一方、PrPC は N 末側に銅イオンなどの 2 価の陽イオンと結合できる 8 アミノ酸からなる繰り返し構造をもつことが知られている。そこで、2 価の銅イオン存在下において構造変換活性測定を行ったところ、この条件下では Hsp90 は rPrP の部分変性することができなかった。また、銅イオン存在下では rPrP はトリプシン消化に対してより強い抵抗性をもつことがわかった。そこで、銅イオン存在下での構造変換活性にヌクレオチド依存性があるか調べてみたところ、Hsp90 はヌクレオチド依存的に銅イオンと結合した rPrP の分子中央部を部分変性させた。ヌクレオチドは ATP だけでなく、GTP も促進効果を示し、やや効果は低い、CTP や UTP も促進効果を示した。もっとも促進効果を示したのは ADP であった。また、加水分解しないヌクレオチドアナログ ATP S や AMP-PNP も促進効果を示すことから、Hsp90 の rPrP に対する部分変性作用にはヌクレオチド結合が重要で、加水分解は必要ないことが示唆された。

Hsp90 が示す特徴的なヌクレオチド依存性は、Hsp90 の構造変換活性の本体が N 末側シャペロンドメインではなく、C 末側シャペロンドメインであることを示唆している。そこで、Hsp90、Hsp90 について C 末側シャペロンドメインを含む小断片を作成したところ、より多くの用量が必要となるものの、この断片のみで rPrP の構造変換と、銅イオン存在下でのヌクレオチド依存性を再現できることが明らかとなった。したがって、Hsp90 の PrPC に対する高次構造変換活性の本体は C 末側断片であると考えられる。

試験管アッセイ系を用いて、Hsp90 の高次構造変換活性を阻害する化合物の探索を行った。ゲルダナマイシンなどの Hsp90 の N 末側シャペロンドメインの阻害剤は rPrP に対する部分変性活性を抑制しなかった。一方、既存の C 末側シャペロンドメインの阻害剤も阻害活性を示さないか、あるいは直接 rPrP と相互作用することから rPrP に対する部分変性活性への影響は評価できなかった。しかし、C 末側シャペロンドメインの阻害剤であるシスプラチンの誘導体の中に rPrP に対す

る部分変性活性を阻害する化合物を見出した。シスプラチンそのものは活性阻害を示さない。シスプラチン誘導体について、プリオン持続感染細胞で抗プリオン作用を評価したところ、用量依存的にプリオン産生を抑制した。既存の Hsp90 の C 末側シャペロンの阻害剤の中には、エピガロカテキンガラートのように強い抗プリオン作用を示す場合もあったが、逆にノボピオシンは弱くプリオン産生を促進した。興味深いことに、ノボピオシンはプリオン非感染細胞では、PrPC の分子中央部の切断を強く促進するとともに、細胞膜上から PrPC の消失を誘導した。この結果は、ノボピオシンは PrPC 分子中央部の部分変性を促進することを示しており、この作用を通してプリオン産生を促進しているのかもしれない。

本研究課題では、PrPC の構造変換因子の一つとして、分子シャペロン Hsp90 見いだすことに成功した。Hsp90 は、試験管内において、高濃度の銅イオン存在下の PrPC の分子中央部をヌクレオチド依存的に部分変性することができる。PrPC の分子中央部は、培養細胞や脳組織において生理的に切断を受ける部位であること、PrPC は銅イオンが濃縮されているシナプス間隙に強く発現していることを考えると、Hsp90 が神経シナプスにおける PrPC の生理機能や代謝に積極的に関与する可能性は十分にあるように思われる。また、本研究課題で見出した Hsp90 の新規阻害剤は、プリオン感染細胞にてプリオン複製を強く抑制すること、既存の Hsp90 の C 末側シャペロンの阻害剤の中にもプリオン複製に影響を与えるものを複数確認することができた。この結果は、分子シャペロン、Hsp90 が新たなプリオン病治療薬の分子ターゲットの一つになりうることを示している。

## 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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

1. Sakai E, Sakasegawa Y, Doh-ura K, "A platinum compound enhances the protease sensitivity of PrPres in cell lysates," Asia Pacific Prion Symposium 2014 (APPS2014), International Convention Center Hotel in Jeju Island, Jeju-do, South Korea, July 6-7, 2014.
2. 逆瀬川裕二, 西澤桂子, 堂浦克美 「プリオン複製に関わる宿主因子の細胞生物学的および生化学的な探索アプローチ」(招待講演), 第 86 回日本生化学会, 横浜グランドインターコンチネンタルホテル, 横浜市, 9 月 11-13 日, 2013.

3. Sakasegawa Y and Doh-ura K,  
“Extracellular heat shock protein 90  
enhances PrPres production in  
prion-infected neuroblastoma N2a  
cells,” Asia Pacific Prion Symposium  
2012 (APPS2012), Pacifico Yokohama,  
Yokohama, Japan, July 29-30, 2012.

〔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

逆瀬川 裕二 (SAKASEGAWA YUJI)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：90418616

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：