

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291011

研究課題名(和文) マイクロ流路超高速パルスラベルNMR装置の開発及びプリオン自己複製過程の解明

研究課題名(英文) Development of the micro-flow ultra-rapid pulse label NMR apparatus and elucidation of the prion self-replication process.

研究代表者

桑田 一夫 (Kuwata, Kazuo)

岐阜大学・大学院連合創薬医療情報研究科・教授

研究者番号：00170142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：高速混合をNMR内で行い、蛋白質の構造形成反応、あるいは凝集反応の超早期過程を原子分解能で観測する装置を作成した。2液(変性蛋白質溶液、及び巻き戻り溶液)をNMRチューブ内で混合し、連続フローで観測するための装置を作成した。廃液は、3本目のチューブから除去するため、連続観測が可能となった。磁化率を均一にした混合用のチューブを独自に作成したため、磁場の不均一性に起因すると思われるピークを取り除くことが可能となった。また、A状態が細胞型プリオン(Pr<sup>PC</sup>)とプリオン凝集体との分岐点を形成することを明らかにし、プリオン蛋白質の凝集体(アミロイド)形成を天然構造が非競合的に抑制することを見出した。

研究成果の概要(英文)：To perform the rapid mixing in the NMR magnet and to observe the folding or aggregation reaction of a protein in the atomic resolution, we devised an apparatus for the mixing of two solutions. Denatured protein solution goes through a first tubing and refolding buffer second tubing, and both tubing are connected to a carefully designed mixer in a NMR tube in the magnet. Waste solution is removed from the third tubing thereby enabling the observation in a continuous flow in the NMR tube. We reformed the apparatus used for in cell NMR using the glass material with homogeneous magnetic susceptibility with the aqueous solution. Thus we could remove the false peaks originated from the inhomogeneous magnetic susceptibility that was observed in the previous version of the apparatus. Also we found the 'A-state' which corresponds to the branching point between the cellular form and the aggregate, and that the cellular form itself inhibits the aggregate formation uncompetitively.

研究分野：構造生物学

キーワード：NMR 混合器 パルスラベル プリオン 自己複製

## 1. 研究開始当初の背景

独自に開発したカイネティック NMR を用い、これまでプリオン立体構造の進化過程を原子分解能で観測してきた結果、感染性プリオンはオリゴマーとして感染個体内に存在するが、オリゴマーに至る前の「プレ凝集状態」として、モノマーの形でも一時的に存在することが、分かった。このプレ凝集構造にあるモノマー同士が、極めて特異的な分子間相互作用による自己複製を行う。

我々は、この状態におけるプリオン蛋白質の立体構造を原子分解能で調べるため、「超高速パルス NMR 装置」を開発し、プリオンの自己複製過程を解明しようと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では「マイクロ流路超高速パルスラベル NMR 装置」を開発し、「プレ凝集状態」における特異的な分子間相互作用をアミノ酸レベルで解析し、自己複製のメカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

高速混合を NMR マグネット内で行い、蛋白質の構造形成反応、あるいは凝集反応の超早期過程を原子分解能で観測する装置を作成する。これを実現するため、最終年度は 2 液(変性蛋白質溶液、及び巻き戻り溶液)を NMR チューブ内で混合し、連続フローで観測するための装置を作成した。廃液は、3 本目のチューブから除去するため、連続観測が可能となった。2 年目で使用した既存の MICCS 装置と異なり、In Cell NMR 装置を改変し、磁化率を均一にした混合用のチューブを独自に作成したため、磁場の不均一性に起因すると思われるピークを取り除くことが可能となった。

## 4. 研究成果

プリオン蛋白質のフォールディング・凝集実験においては、プリオン蛋白質にモルテングロビュール状態(A 状態)が存在し、それが細胞型プリオン(PrP<sup>C</sup>)とプリオン凝集体との分岐点を形成することを明らかにした(Honda et al., Structure, 2015; Honda et al., J. Biol. Chem. 2014)。

また、CD ストップト・フローを用い、プリオン蛋白質の凝集体(アミロイド)形成

をプリオン蛋白質の天然構造が非競合的に抑制することを見出した(Honda & Kuwata, Sci. Rep. 2017)。

また、独自に開発したカイネティック NMR 装置を用い、プリオン蛋白質の凝集体形成反応速度が、ミカエリス・メンテン式で記述できることが分かった(論文投稿中)。

また、キネティック NMR 装置を用い、プリオンタンパク質の異常化反応が開始される部位を解明することができた(論文投稿中)。また、現在開発中の抗プリオン物質が、異常化反応のどの段階で、どの部位に、どのような作用機序で、作用するのかを明らかにした(論文投稿中)。

天然構造と凝集体とのこのような相互作用は、プリオン感染の基盤をなすものであり、超高速パルス NMR 装置を用い、プリオン感染現象を原子レベルで観測する計画である。

## 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 12 件)

1. Amin Tahoun, Hisayoshi Masutani, Hanem El-Sharkawy, Trudi Gillespie, Ryo P. Honda, Kazuo Kuwata, Mizuho Inagaki, Tomio Yabe, Izumi Nomura, and Tohru Suzuki corresponding. Capsular polysaccharide inhibits adhesion of Bifidobacterium longum 105-A to enterocyte-like Caco-2 cells and phagocytosis by macrophages. Gut pathogens. 査読有 2017 May 1;9:27. doi: 10.1186/s13099-017-0177-x. eCollection 2017
2. Ryo P. Honda & Kazuo Kuwata, The native state of prion protein (PrP) directly inhibits formation of PrP-amyloid fibrils in vitro, Scientific Reports 7, Article number: 562, 査読有 2017 Apr 3;7(1):562 doi:10.1038/s41598-017-00710-x
3. Satoshi Endo, Sayaka Takada, Ryo P. Honda, Kathrin Müller, Jochen H. Weishaupt, Peter M. Andersen, Albert C. Ludolph, Yuji O. Kamatari,

- Toshiyuki Matsunaga, Kazuo Kuwata, Ossama El-Kabbani, Akira Ikari, Instability of C154Y variant of aldo-keto reductase 1C3, *Chemico-Biological Interactions* 査読有 2016 Dec 23. pii: S0009-2797(16)30758-X. doi: 10.1016/j.cbi.2016.12.018. [Epub ahead of print] (2017)
4. Kabir Aurangzeb, Satoshi Endo, Naoki Toyooka, Mayuko Fukuoka, Kazuo Kuwata, and Yuji O. Kamatari. Evaluation of compound selectivity of aldo-keto reductases using differential scanning fluorimetry. *Journal of Biochemistry* 査読有 2017 Feb 161(2):215-222. doi:10.1093/jb/mvw063.
  5. Kabir Aurangzeb, Ryo P. Honda, Yuji O. Kamatari, Satoshi Endo, Mayuko Fukuoka, and Kazuo Kuwata, Effects of ligand binding on the stability of aldo-keto reductases (AKR), *Protein Science*, 査読有 2016 Sep 6. 25(12): 2132-41 doi: 10.1002/pro.3036.
  6. Ferdausi Ali, Keiichi Yamaguchi, Mayuko Fukuoka, Abdelazim Elsayed Elhelaly, and Kazuo Kuwata, Logical design of an anti-cancer agent targeting the Plant Homeodomain (PHD) in *Pygopus2*, 査読有 *Cancer Science*, 2016 Sep;107(9):1321-8 doi: 10.1111/cas.12995.
  7. Nongluk Sriwilaijaroen, Sadagopan Magesh, Akihiro Imamura, Hiromune Ando, Hideharu Ishida, Miho Sakai, Erika Ishitsubo, Takanori Hori, Setsuko Moriya, Takeshi Ishikawa, Kazuo Kuwata, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Hiroaki Hiramatsu, Kenji Tsukamoto, Taeko Miyagi, Hiroaki Tokiwa, Makoto Kiso, and Yasuo Suzuki, A Novel Potent and Highly Specific Inhibitor against Influenza Viral N1-N9 Neuraminidases: Insight into Neuraminidase-Inhibitor Interactions, 査読有 *Journal of medicinal chemistry*, 2016 May 26;59(10):4563-77 doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01863.
  8. Biao Ma, Keiichi Yamaguchi, Mayuko Fukuoka, Kazuo Kuwata, Logical design of anti-prion agents using NAGARA. 査読有 *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jan 22;469(4):930-5 doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.106.
  9. Junji Hosokawa-Muto, Kei-ichi Yamaguchi, Yuji O. Kamatari & Kazuo Kuwata. Synthesis of double-fluorescent labeled prion protein for FRET analysis. *Bioscience Biotechnology And Biochemistry*. 査読有 2015 Nov;79(11):1802-9 doi: 10.1080/09168451.2015.1050991.
  10. Ryo P. Honda, Ming Xu, Kei-ichi Yamaguchi, Heinrich Roder and Kazuo Kuwata, A native-like intermediate serves as a branching point between the folding and aggregation pathways of the mouse prion protein. 査読有 *Structure*. 2015 Sep 1;23(9):1735-42. doi: 10.1016/j.str.2015.07.001.
  11. Oroguchi Tomotaka, Sekiguchi Yuki, Kobayashi Amane, Masaki Yu, Fukuda Asahi, Hashimoto Saki, Nakasako Masayoshi, Ichikawa Yuichi, Kurumizaka Hitoshi, Shimizu Mitsuhiro, Inui Yayoi, Matsunaga Sachihiko, Kato Takayuki, Namba Keiichi, Yamaguchi Keiichi, Kuwata Kazuo, Kameda Hiroshi, Fukui Naoya, Kawata Yasushi, Kameshima Takeshi, Takayama Yuki, Yonekura Koji, Yamamoto Masaki. Cryogenic coherent X-ray diffraction imaging biological non-crystalline particles using the KOTOBUKI-1 diffraction apparatus at SACLA. *Journal Of Physics B: Atomic Molecular And Optical Physics*. 査読有 2015 48(18)184003. <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0953-4075/48/18/184003/meta>
  12. Ryo P. Honda, Kei-ichi Yamaguchi, and Kazuo Kuwata. Acid-induced Molten Globule State of a Prion Protein: Crucial Role of Strand 1-Helix

1-Strand 2 Segment. The Journal of biological chemistry. 査読有 2014 Oct 31;289(44):30355-63. doi: 10.1074/jbc.M114.559450. 363,2014

〔学会発表〕(計 35 件)

1. 桑田一夫、論理的創薬法によるプリオン病治療薬の開発、プリオン病に対する低分子シャペロン治療薬の開発、口頭、2016 年度難治性疾患実用化研究合同成果報告会、2017/2/10 イイノホール&カンファレンスセンター
2. Keiichi Yamaguchi, Yuji O. Kamatari, Ryo P Honda, Kazuo Kuwata, Real-Time In vitro Conversion of Prion Protein Detected, NMR, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, ポスター, 2016/8/21-26, Kyoto International Conference Center.
3. 桑田一夫、プリオン病治療薬の開発、口頭、日本アミロイドシス研究会学術集会、2016/8/19、KKR ホテル東京
4. Satoshi Endo, Sayaka Takada, Ryo Honda, Kathrin Müller, Yuji O. Kamatari, Toshiyuki Matsunaga, Kazuo Kuwata, Jochen Weishaupt, Akira Ikari, Instability of C154Y variant of aldo-keto reductase 1C3 found in familial amyotrophic lateral sclerosis, ポスター, 18th International Workshop on the Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, 2016/7/12-17, Costa Brava, Spain,
5. Kei-ichi Yamaguchi, Ryo Honda, Abdelazim Elsayed Elhelaly, Kazuo Kuwata Continuous ultrasonic irradiation induces rapid aggregations of MoPrP depending on pH, 口頭, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016/6/7-9, 福岡国際会議場
6. Motomasa Tanaka, Yumiko Ohhashi, Yoshiki Yamaguchi, Yuji O. Kamatari, Kazuo Kuwata, Latent structural variation in a yeast prion monomer determines strain phenotypes, ポスター, PRION 2016 Tokyo, 2016/5/10-13, 一ツ橋ホール 東京
7. Yuji O. Kamatari, Kazuo Kuwata, Classification of anti-prion compounds based on the binding properties to prion proteins, ポスター, PRION 2016 Tokyo, 2016/5/10-13, 一ツ橋ホール 東京
8. Baio Ma, Kei-ichi Yamaguchi, Mayuko Fukuoka, Kazuo Kuwata, Discovery of anti-prion agents using PyMOL plugin-based logical drug design platform NAGARA, ポスター, PRION 2016 Tokyo, 2016/5/10-13, 一ツ橋ホール 東京.
9. Junji Hosokawa-Muto, Yuji O. Kamatari, Kazuo Kuwata, Calibration of ultrasonic power and conformational analysis of MoPrP amyloid fibrils, ポスター, Kei-ichi Yamaguchi, PRION 2016 Tokyo, 2016/5/10-13 国内.
10. Toshinobu shida, Yuji O. Kamatari, Kazuo Kuwata, Motomasa Tanaka, A local conformation of natively disordered yeast prion monomer determines interspecies prion transmissibility, 口頭, PRION 2016 Tokyo, 2016/5/10-13, 一ツ橋ホール 東京.
11. Ryo P. Honda, Kei-ichi Yamaguchi, Kazuo Kuwata, Folding and misfolding pathways of prion protein, 口頭, PRION 2016 Tokyo, 2016/5/10-13, 一ツ橋ホール 東京.
12. Kazuo Kuwata, Logical design of a therapeutic agent for prion diseases, 口頭, PRION 2016 Tokyo, 2016/5/10-13, 一ツ橋ホール 東京.
13. 桑田一夫、統合創薬ソフト NAGARA の開発、論理的創薬機医学の創始、及び論理的医療の実践、口頭、インシリコ創薬の展望セミナー、2016/4/15、神戸臨床研究情報センター。(招待講演)
14. 桑田一夫、プリオン病治療薬の開発 口頭 第 5 回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究シンポジウム 2016 年 3 月 10 日 岐阜薬科大学、岐阜
15. 桑田一夫、PB2 を標的とする新規抗インフルエンザウイルス薬の開発 口頭 第 9 回中部橋渡し研究支援シンポジウム

- △ 2015年12月17日 名古屋大学、愛知
16. Kazuo Kuwata, Therapeutic approaches to prion disease and other neurodegenerative conditions associated with protein misfolding. 口頭 Toward a first in human trial of a medical chaperone for prion diseases. Cold Spring Harbor Laboratory, America. Sep15-18,2015
  17. Kei-ichi Yamaguchi, Ryo P. Honda, Abdelazim Elsayed Elhelaly, Kazuo Kuwata, Continuous ultrasonication induces the rapid formation of mPrP aggregates. ポスター APPS 2015 9月4日~5日 石川音楽堂、石川
  18. Ryo P. Honda, Kazuo Kuwata 'A-state' of PrP a branching point between the folding and misfolding pathways. ポスター APPS 2015 9月4日~5日 石川音楽堂、石川
  19. Yuji O. Kamatari, Junji Hosokawa-Muto, Kei-ichi Yamaguchi, Kazuo Kuwata, Strategy for elucidating abnormal structure of prion proteins using the double-fluorescent labeling method and FRET analysis. ポスター APPS 2015 9月4日~5日 石川音楽堂、石川
  20. Toshinobu Shida, Yuji Kamatari, Yoshiki Yamagushi, Kazuo Kuwata, Motomasa Tanaka, Structural Characterization of Two Distinct Yeast Prion Protein Interaction ポスター 第15回日本蛋白質科学会年会 2015年6月24日~26日 あわぎんホール、徳島
  21. Kei-ichi Yamaguchi, Ryo P. Honda, Kazuo Kuwata, Molten globule state and misfolding of a prion protein ポスター 第15回日本蛋白質科学会年会 2015年6月24日~26日 あわぎんホール、徳島
  22. Kazuo Kuwata, Elucidation of the pathogenic conversion mechanism of a prion protein diagnosis and treatment ポスター 第15回日本蛋白質科学会年会 2015年6月24日~26日 あわぎんホール、徳島
  23. 桑田一夫, Toward the First in Human Clinical Trial of Medical Chaperone for Prion Diseases 口頭 第56回日本神経学会学術大会 2015年5月20日~23日 朱鷺メッセ、ホテル日航新潟、新潟
  24. 桑田一夫, 本田諒: プリオン蛋白質のミスフォールディング過程におけるモルテングロビュール状態 ポスター 第四回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム 2015年3月5日 岐阜薬科大学
  25. 桑田一夫, プリオン病治療体制の整備 革新的医療研究開発で挑む神経変性疾患 プリオン病治療体制の確立に向けて 口頭 2015年2月14日 名古屋国際会議場、愛知
  26. 真崎悠、小林周、関口優希、苮口友隆、中迫雅由、山口圭一、桑田一夫、亀田啓、福井直也、河田康志、高山裕貴、山本雅貴: XFEL 低温コヒーレント X線回折イメージングによるアミロイド繊維凝集体の構造研究 ポスター 第28回日本放射光学会年会・放射光化学合同シンポジウム 2015年1月12日
  27. 小栗 弘成、遠藤 智史、宮城 菜未希、胡 大イ、荒井 裕貴、松永 俊之、五十里 彰、桑田一夫、原 明、合田 浩明、豊岡 尚樹: カルボニル還元酵素 ( CBR1 ) 阻害活性を有する 8-Hydroxy-2-imino-2H-chromene-3-carboxamide 誘導体の創製 ポスター 第32回メディスナルシンポジウム 2014 11月26日~28日 神戸国際会議場
  28. 桑田一夫、山口圭一、Understanding the Prion Diseases and Logical Design of a Medical Chaperon / ポスター 二国間交流事業セミナー「蛋白質異常凝集の原理と制御 ( Mechanism and regulation of aberrant protein aggregation )」 2014 11月19日 大阪大学蛋白質研究所
  29. 桑田一夫、山口圭一、キネティック NMR によるタンパク質の 'かたち' の進化の観測 ポスター 第53回 NMR 討論会 2014 11月4日 大阪大学コンベンションセンター
  30. 桑田一夫 (招待講演)、プリオン病に対

するメディカルシャペロンの医師主導  
治験に向けて 2014 9月18日 国立精  
神・神経医療研究センター

31. 桑田一夫、Toward the First in Human  
Clinical Trial of Medical Chaperone  
口頭 APPS2014 2014 7月6日-7日 濟  
州, 大韓民国
32. 桑田一夫、山口圭一、CXDI によるアミロ  
イド線維の一分子構造解析 ポスター  
第 14 回日本蛋白質科学会年会 2014 6  
月27日 ワークピア横浜/横浜産貿ホー  
ル
33. 鎌足雄司、桑田一夫、Sup35 天然変性領  
域のアミロイド構造多形形成機構の解  
明 ポスター 第 14 回日本蛋白質科学  
会年会 2014 6月27日 ワークピア横  
浜/横浜産貿ホール
34. 本田諒、山口圭一、桑田一夫、プリオン  
蛋白質のモンテグロビュール状態の発  
見とオリゴマー形成との関連 ポスタ  
ー 第 14 回日本蛋白質科学会年会  
2014 6月27日 ワークピア横浜/横浜産  
貿ホール
35. 桑田一夫(招待講演)、論理的創薬から  
GMP 製造へ 日本薬学会東海支部 特別  
講演会 2014 4月16日 岐阜薬科大  
学・本部

〔図書〕(計 3 件)

1. 桑田一夫：プリオン病治験体制の整備  
臨床評価 Clinical Evaluation 2016  
Vol.44, No.4, Feb. p680-687
2. 桑田一夫：研究と臨床をつなぐ プリオン  
病治療薬開発における基礎から前臨  
床まで 医薬品医療機器レギュラト  
リーサイエンス 2015 Vol.46 No.7  
p428-432
3. 桑田一夫：神経変性疾患と‘かたち’の  
制御. Clinical Neuroscience 月刊 臨  
床神経科学 言語の起源と脳の進化  
2015 Vol.33 8 p962-963

1. 〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

【報道】

1. (学内取材、新聞掲載)「プリオン病新  
薬開発桑田シニア教授着々」朝日新聞朝  
刊 2017 年5月4日
2. (新聞掲載)「認知症起こす「プリオン  
病」 岐阜大が新薬治験へ」毎日新聞  
2015 年2月22日
3. (学内取材、新聞掲載)「プリオン病薬、  
治験段階に 岐阜大が医薬品製造施設  
を公開」中日新聞 2015 年2月13日
4. (学内取材、新聞掲載)「プリオン病治  
験体制テーマ 岐阜大が 14 日シンポ」  
岐阜新聞 2月12日
5. (学内取材、新聞掲載)「プリオン病抑  
制新薬、岐阜大が世界初の治験」読売新  
聞 2015 年2月11日
6. (学内取材、新聞掲載)「岐阜大、治験  
薬製造へ ヤコブ病、来月に設備完成」  
岐阜新聞朝刊 2015 年2月3日
7. (学内事前取材及び当日番組出演)「“先  
制医療”で防げ! アルツハイマー病に  
挑む」 2014 年8月1日 NHK 総合「ナビ  
ゲーション」

ホームページ

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~ceid/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

桑田 一夫 (KUWATA, Kazuo)

岐阜大学・大学院連合創薬医療情報研究  
科・教授

研究者番号：00170142

### (2)研究分担者

鎌足 雄司 (KAMATARI, Yuji)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センタ  
ー・助教

研究者番号：70342772

### (3)連携研究者

福岡 万佑子 (FUKUOKA, Mayuko)

岐阜大学・大学院連合創薬医療情報研究  
科・特任助教

研究者番号：60790988

### (4)研究協力者

本田 諒 (HONDA, Ryo)

Ferdousi Ali

Kabir Aurangazeb