

「脳を守る」

平成11年度採択研究代表者

金子 清俊

(国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部 部長)

「プリオン複製に関与する新しい因子の同定とプリオン病治療法開発への応用」

1. 研究実施の概要

当研究チームでは、プリオン病関連分子として、プリオン蛋白の立体構造変換に直接関与する分子シャペロン様分子（プロテインX）に着目した研究を展開している。また、正常型プリオン蛋白質（PrP^C）から複製される感染型（PrP^{Sc}）増殖抑制分子として、(1) 抗プリオン抗体、(2) ドミナントネガティブ効果を有する防御型プリオン蛋白質を同定し、治療法への応用を検討してきた。

(1) プリオン関連因子（プロテインX）の同定

PrP^{Sc}への変換に際し未同定の因子（プロテインX）の関与によりPrP^Cが一旦unfoldされる状態を経ると考えられることから、正常にfoldingされたPrP^Cを標的とするunfolding factorの存在が暗示される。一般的な分子シャペロンはmisfoldされた分子を標的とするのに対し、この分子は正常にfoldingを受けた分子を標的とする、いわば新しいクラスの分子シャペロン（unfolding chaperone）と言える。我々は、このような新規クラス分子を酵母で同定し、Unfoldinと命名した。現在、哺乳動物細胞においても同様の活性の存在を確認しており、これらの中からプロテインXを同定していく予定である。

(2) PrP^Cの代謝と生理機能の解明

現在までの研究にも関わらず、PrP^Cの生理機能は解明されていない。PrP^CからPrP^{Sc}への変換に関与する分子シャペロン様分子は、PrP^Cの生理的機能及び代謝にも密接に関係していることが想定されることから、PrP^Cの生理機能、並びに海綿状変性の生じるメカニズム解明に通じる成果も期待される。

(3) CJD治療法開発への応用

これまでのUCSFとの共同研究により、抗プリオン抗体やヒトプリオン蛋白219番のリジンのドミナントネガティブ体等による著名なPrP^{Sc}複製阻害効果を確認した。これらの項目は、異常プリオン複製阻害において最も効果的な標的と考えられ、これらを単独、あるいは組み合わせた治療・予防法の開発へ向け研究を進めている。

2. 研究実施内容

研究目的

- (1) 新しい分子シャペロン概念の確立に向けたプリオン関連分子(プロテインX)の同定
- (2) PrP^Cの代謝と生理機能の解明
- (3) リジン型219番プリオン蛋白質、抗プリオン抗体等のCJD治療法開発への応用
- (4) 特殊抗体によるリジン型219番プリオン蛋白質の検討
- (5) プロテインX候補遺伝子のノックアウトマウス作成
- (6) リジン型219番プリオン蛋白質を用いたプリオン病発症予防法の検討
- (7) 異常型プリオンタンパクの生成と蓄積に關与するタンパク質の探索

方法及び結論

- 1) 正常型PrP^Cから異常感染型PrP^{Sc}プリオンへの構造変換に重要な役割を果たしている新しい因子を同定する。Unfoldinの同定に際し、酵母において確立したunfolding assayを用い、プリオン蛋白質を基質として用い、哺乳動物細胞中から同様のunfolding因子を同定する。
- 2) GFP, DsRedなどによるdouble labeled PrP^Cを用い、PrP^Cの細胞内代謝経路をreal timeで詳細に追跡し、PrP^Cの分解経路及び輸送経路の詳細を明らかにする。
- 3) リジン型219番プリオン蛋白質、抗プリオン抗体、キナクリンといった標的が異なると考えられる分子を用い、それらの組み合わせによる(カクテル療法)効果増強と副作用低減の可能性について検討する。現在深刻な社会問題化している乾燥硬膜移植後プリオン病やBSEに代表されるプリオン病の治療法開発を目指す。プリオン病の治療法開発は、他の様々なコンフォメーション病治療の先駆モデルとしても重要である。
- 4) ヒトプリオン病患者がリジン型219番プリオン蛋白質をコードする遺伝子を持つ頻度、および同遺伝子を持つ患者におけるプリオン病表現型の特異性を評価し、リジン型219番プリオン蛋白質の発病抑制効果を評価する。
- 5) プロテインX候補蛋白質の同定、およびプロテインX蛋白質の同定を経て、プロテインX蛋白質遺伝子が単離された段階で、プロテインX蛋白質遺伝子ノックアウトマウスを作成し、プリオン感染に対する抵抗性を確認する。
- 6) リジン型219番プリオン蛋白質を発現するトランスジェニックマウスおよびノックインマウスを作成し、ヒトプリオン接種実験を行い、ヒトプリオンに対する抵抗性を評価する。
- 7) PrP^CからPrP^{Sc}への変換は、主として細胞膜のマイクロドメインであるラフト上起きる事が想定されており、プロテインXもラフトに存在することが予想される。さらに、PrP^{Sc}はラフトで合成された後に、プロテアーゼが多量に存在するリゾソームに蓄積する。研究では、proteomicsの手法を用いてラフト構成タンパクを網羅的に解析し、ラフト上でPrP^Cと相互作用をするタンパク質を同定することにより、プロテインXの実体をあきらかにすること及びPrP^{Sc}の蓄積がリゾソームのプロテアーゼ類の活性に及ぼす影響を検討する。

3. 研究実施体制

金子清俊グループ

① 研究分担グループ長名

金子 清俊 (国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部 部長)

② 研究項目

- ・ 新しい分子シャペロン概念の確立に向けたプロテインX候補蛋白質を含む正常に folding を受けた分子を unfold する因子の同定
- ・ 正常型プリオン蛋白質分解酵素の同定
- ・ 正常型プリオン蛋白質の代謝と生理機能の解明
リジン型219番プリオン蛋白質、抗プリオン抗体等の C J D 治療法開発への応用

村本環 グループ

① 研究分担グループ長名

村本 環 (東北大学大学院医学系研究課神経科学講座病態神経学分野助手)

② 研究項目

- ・ 特殊抗体によるリジン型219番プリオン蛋白の検討
- ・ プロテインX候補遺伝子のノックアウトマウス作成
- ・ リジン型219番プリオン蛋白を用いたプリオン病発症予防法の検討 (ヒトプリオン高感受性トランスジェニックマウスを用いたヒトプリオン感染モデルによる検討)

西島正弘 グループ

① 研究分担グループ長名

西島 正弘 (国立感染症研究所 細胞科学部 部長)

② 研究項目

- ・ 異常型プリオンタンパクの生成と蓄積に関するタンパク質の探索

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文

- Furuta M, Ito T, Eguchi C, Tanaka T, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K: Two-Dimensional Electrophoresis/Phage Panning (2D-PP): A Novel Technology for Direct Antibody Selection on 2-D Blots. *J Biochem (Tokyo)*. 132: 245-251, 2002
- Tanaka T, Ito T, Furuta M, Eguchi C, Toda H, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K: In Situ Phage Screening. A method for identification of subnanogram tissue components *in situ*. *J Biol Chem*. 277: 30382-30387, 2002
- Perrier V, Kaneko K, Safar J, Vergara J, Tremblay P, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB, Wallace AC: Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 13079-13084, 2002
- Sasaoka T, Imamura M, Araishi K, Noguchi S, Mizuno Y, Takagoshi N, Hama H,

Wakabayashi-Takai E, Yoshimoto-Matsuda Y, Nonaka I, Kaneko K, Yoshida M, Ozawa E: Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in gamma-sarcoglycan-deficient mice. *Neuromuscul Disord.* 13: 193-206, 2003

- 八谷如美, 金子清俊. プリオン病. *医学のあゆみ*, 200: 1241-1242, 2002
- 金子清俊. ヤコブ病. *医学最前線* 132, *健康な子ども*, 352: 38-39, 2002
- 逆瀬川裕二, 金子清俊. 分子レベルの最新疾患研究①プリオン病の分子病態と抗体を用いた治療法. *実験医学*, 2: 1344-1348, 2002
- 桜井総子, 金子清俊. プリオン蛋白質異常化の分子メカニズムと治療への応用. *ファルマシア*, 38: 645-648, 2002
- 金子清俊. プリオン病研究の現状と変異型CJD. *脳と精神の医学*, 13: 171-174, 2002
- 金子清俊. 牛海綿状脳症: BSEいわゆる狂牛病とは、どんな病気か? *武田薬報*, 430: 23-26, 2002
- 金子清俊. BSEによる人への感染の危険性と治療法. *食品衛生学雑誌*, 43: 221-227, 2002
- 逆瀬川裕二, 金子清俊. プリオン病とプリオン特異抗体を用いた治療法. *Cognition and Dementia*, 1: 33-38, 2002
- 金子清俊. 牛海綿状脳症 (BSE) と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD). *東京保険医新聞*, 1206: 3-4, 2002
- 金子清俊. 牛海綿状脳症 (BSE) と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD). *東京内科医会会誌*, 18: 21-24, 2002
- 金子清俊. プリオン病の分子生物学. *臨床検査*, 46: 1501-1508, 2002
- 金子清俊. Prion病発症のメカニズム. *神経内科*, 57: 377-383, 2002
- 金子清俊. プリオン蛋白関連疾患. *医学の歩み*, 203: 855-857, 2002
- 逆瀬川 (八谷) 如美, 金子清俊. プロテインX-異常プリオン増殖に関与するプレイヤー. *医学の歩み*, 203: 877-880, 2002
- 金子清俊. プリオン病の分子生物学. *臨床検査*, 46: 1501-1508, 2002
- 金子清俊. 牛海綿状脳症 (BSE) と変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD). *運動障害*, 12: 113-118, 2002
- 金子清俊. 牛海綿状脳症 (BSE) と変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD). *月刊保団連* 2002; 767: 49-53.
- 金子清俊. プリオン蛋白質異常化のメカニズム. *神経研究の進歩*, 47: 37-44, 2003
- 金子清俊. プリオン病の治療. *遺伝子医学*, 7: 86-89, 2003

(2) 特許出願

なし