

「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

金子グループは、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。

村本グループは、各種プリオン病に罹患した患者脳組織に含まれる異常型プリオン蛋白および感染因子プリオンの特徴と病型の関係を詳細に検討した。

西島グループでは、プロテオミックス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の実体及び異常型への変換のメカニズムを明らかにすることを目的とする検討を行ってきた。

2. 研究実施内容

研究目的

金子グループ：

- (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

村本グループ：

- (1) 各種プリオン病に罹患した患者脳組織に含まれる異常型プリオン蛋白および感染因子プリオンの特徴と病型の関係を明らかにする。

西島グループ：

- (1) プロテインXの候補タンパクを同定することを目的として、大腸菌で発現させた精製リコンビナントプリオンタンパク (Wild-rPrP, PrP^{218K}) と特異的に結合する脳タンパク質の免疫学的精製を試みた。

方法及び結論

金子グループ：

- (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。酵母由来の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。昨年度までの努力により、複数の候補蛋白質の精製法の目処が立ちつつあるため、今後はこれらの候補蛋白質のアミノ酸配列を同定していく。

- (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。我々は、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した。プリオンタンパク質 (PrP^C) とGFPとのキメラタンパク質を培養細胞に強制発現し、デルタビジョン蛍光顕微鏡によりPrP^Cの微小管依存性の細胞内traffickingを観察した結果、Kinesin依存性の順行性輸送 (140-180 nm/sec, PrP(53-91)が関与) とDynein依存性の逆行性輸送 (1-1.2 μm/sec, PrP(23-33)が関与) を初めて明らかにすることが出来た。神経機能分子と蛍光性タンパク質のキメラタンパク質は機能分子の動態・構造変化をリアルタイムで観察するうえで極めて有効であり、この方法によって従来は見落とされていた現象として、プリオン蛋白質の順行性並びに逆行性輸送の詳細を明らかにすることが出来た。今年度は、さらに詳細に検討を加え、プリオン蛋白質の生理機能の解明を目指していく。

- (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

てきたが、今年度は硬膜移植後プリオン病のマウスモデルを開発し、ドミナントネガティブ効果を有するMoPrP218Kの組み換え型の変異型プリオン蛋白質の効果を確認した。また、Unfoldinはプリオン蛋白質、アミロイドβペプチド(1-42)、α-synucleinの高次構造を試験管内で解きほぐし、トリプシン感受性を上げる事ができた。酵母細胞内においては、細胞周期依存性にアンフォルジン活性調節機構が存在することを明らかにした。これらのアンフォルジン活性調節機構を踏まえることで、プリオン病のみならず、いわゆる蛋白質凝集病における新しい治療法開発の可能性が示唆された。現在、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。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感想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。

村本グループ：

- (1) 各種プリオン病に罹患した患者脳組織中の異常型プリオン蛋白質のタイプをウエスタンブロット法で解析した。また、患者脳組織をヒトプリオン高感受性マウスに接種し、マウスの症候、発病までの潜伏期間、脳病理所見の評価を行った。その結果、ヒト乾燥硬膜の移植を受けた後に発生するクロイツフェルト・ヤコブ病には、プリオン蛋白質遺伝子型には違いが無いにも拘わらず、病理学的にアミロイド斑の無いタイプ（比較的高頻度）とアミロイド斑の有るタイプ（比較的低頻度）が存在することが示唆されていたが、本年度の研究により、両群には臨床的に、ミオクローヌスや典型的異常脳波所見の出現頻度、および無動性無言状態（高度の神経機能障害を示す状態）に至るまでの期間の長さに有意な差のあることが判明した。また、病理学的にも脳萎縮の程度、異常プリオン蛋白質沈着の形態パターン等に差が認められた。異常型プリオン蛋白質の解析では、アミロイド斑のないタイプでは11-12 kDaのプリオン蛋白質カルボキシル末端断片が検出されたが、アミロイド斑のあるタイプでは同断片は検出されなかった。マウスへの接種実験では、各種のプリオン病患者脳乳剤を接種されたマウスが、各病型にユニークな潜伏期間の後に発病し、マウス脳組織内の異常プリオン蛋白質沈着の形態パターン、異常型プリオン蛋白質のタイプにも病型毎の特徴が認められた。結論として、ヒト乾燥硬膜移植後クロイツフェルト・ヤコブ病には臨床所見、病理所見、異常型プリオン蛋白質分子サイズ分布の異なる2つのサブタイプが存在することが確立された。また、ヒトのプリオン病では、病型毎に特徴的な性質を持つプリオンが脳組織内で増殖していることが明らかとなった。

西島グループ：

- (1) プロテインG-磁気ビーズにプリオン抗体 (P8) を結合せしめた免疫吸着体に、リコンビナント・プリオンタンパク (rPrP^{wild}及びrPrP218^K) をそれぞれ結合せしめ、正常マウス脳1%トライトン可溶性画分と反応させた。磁気ビーズを回収し、常法により良く洗浄した後にリジン及び抗原P8ペプチド

[94THNQWNKPSKPKTNLK108] で結合タンパク質を段階的に溶出しSDS-電気泳動でタンパク質を分離した。タンパク質はトリプシンでゲル内消化を行い、ペプチドマスフィンガープリント法 (質量分析) により同定した。

免疫吸着体からは、plasminogen, Tubulin tyrosine ligase-like protein及びLamininが主成分として回収され、これらのタンパク質がPrPと相互作用することが示唆されたが、微量で同定出来なかったものも数種存在する。現在それらについて検討中である。同定されたタンパク質のうちplasminogenはrPrP218^Kをリガンドとした場合にのみPrPに結合し、リジンで特異的に溶出された。このような特異性はプロテインXが持つべき生化学的性質の一部ではあるが満たしている。現在 plasminogenを過発現させた神経芽細胞を作成しつつあり、plasminogenの異常型プリオン産生に及ぼす影響について検討する予定である。最近、我々とは全く異なる方法 (phage display法) でrPrPがプラスミノゲンのクリングルドメインと結合することが見出されている (C. Ryou et al., J. Mol. Biol. 2003, 329, 323-333)。プラスミノゲンは線溶に関わる血漿プロテアーゼであるが、脳においては神経細胞の栄養因子の一つとして機能していることが近年の研究により明らかとなっており、plasminogenがPrPと相互作用する事実はこれらのタンパク質の機能を考える上で興味深い。

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CJD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科附属創生応用医学研究センター)

助教授)

② 研究項目

- ・ 脳組織の病理学的解析
- ・ プリオン病症例の遺伝子解析
- ・ 脳組織標本の作製
- ・ 脳組織標本の染色
- ・ 脳組織の生化学的解析
- ・ マウスの遺伝子解析
- ・ マウスの接種実験

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 細胞化学部 部長)

② 研究項目

- ・ プリオン結合タンパクの分離

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文発表

- Korth C, Kaneko K, Groth D, Heye N, Telling G, Mastrianni J, Parchi P, Gambetti P, Will R, Ironside J, Heinrich C, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB: Abbreviated incubation times for human prions in mice expressing a chimeric mouse-human prion protein transgene. PNAS. 100: 4784-4789, 2003
- Yamazaki K, Yamada E, Kanaji Y, Yanagisawa T, Kato Y, Sato K, Takano K, Sakasegawa Y, Kaneko K: Stimulation of cellular prion protein expression by TSH in human thyrocytes. Biochem Biophys Res Commun. 305: 1034-1039, 2003
- Sekijima M, Motono C, Yamasaki S, Kaneko K, Akiyama Y: Molecular dynamics simulation of dimeric and monomeric forms of human prion protein: insight into dynamics and properties. Biophys J. 85: 1176-1185, 2003
- Sakasegawa Y, Hachiya NS, Tsukita S, Kaneko K: Ecml0p localizes in yeast mitochondrial nucleoids and its overexpression induces extensive mitochondrial DNA aggregations. Biochem Biophys Res Commun. 309: 217-221, 200
- Ohkubo T, Sakasegawa Y, Asada T, Kinoshita T, Goto Y, Kimura H, Mizusawa H, Hachiya NS, Kaneko K: Absence of association between codon 129/219 polymorphisms of the prion protein gene and Alzheimer's disease in Japan.

Ann Neurol. 54: 553-554, 2003

- Hachiya NS, Sakasegawa Y, Kaneko K: Therapeutic approaches in prion disease. J Health Sci, 49: 267-272, 2003
- Sakasegawa Y, Kishida H, Sakurai M, Asada T, Kinoshita T, Goto Y, Kimura H, Kuroiwa Y, Hachiya NS, Kaneko K: Lack of association between TrkA single nucleotide polymorphisms and sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. Neurosci Lett, 353: 49-52, 2003
- Hachiya NS, Watanabe K, Sakasegawa Y, Kaneko K: Microtubules-associated intracellular localization of the NH₂-terminal cellular prion protein fragment. Biochem Biophys Res Commun., 313:818-823, 2004
- Tremblay P, Ball HL, Kaneko K, Groth D, Hegde RS, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB, Safar SJ: Mutant PrP^{Sc} Conformers Induced by a Synthetic Peptide and Several Prion Strains. J Virol, 78: 2088-2099, 2004
- Hachiya NS, Watanabe K, Yamada M, Sakasegawa Y, Kaneko K: Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein. Biochem Biophys Res Commun. 315: 802-807, 2004
- Kishida H, Sakasegawa Y, Watanabe K, Yamakawa Y, Nishijima M, Kuroiwa Y, Hachiya NS, Kaneko K: Non-glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored recombinant prion protein with dominant-negative mutation inhibits PrP^{Sc} replication *in vitro*. Amyloid, in press
- 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. 病原体プリオンに強い遺伝子. Medical Technology, 31: 351-352, 2003
- 金子清俊. プリオン説. 脳の科学, 25: 365-368, 2003
- 金子清俊. プリオン病研究の歴史と最近の進歩. 最新医学, 58: 959-964, 2003
- 八谷如美, 金子清俊. リコンビナント抗体によるプリオン複製阻止効果および感染細胞からの異常プリオン除去効果. Brain and Nerve, 12: 4, 2003
- 逆瀬川裕二、八谷如美、金子清俊. プリオン病とラフト. 生体の科学, 54: 316-320, 2003
- 金子清俊: 蛋白質のフォールディングとプリオン病. 炎症と免疫. 11: 30-36, 2003
- 八谷如美、金子清俊: プリオン病 最近の知見: 老年精神医学雑誌 14: 12, 2003
- 大久保卓哉、水澤英洋、金子清俊: 変異型Creutzfeldt-Jakob病: 日本臨床 62巻 (増刊号1)、痴呆症学2: 252-256, 2004
- Paul Brown、Rainer Seitz、水澤英洋、Henry Baron、金子清俊: プリオンに関する

日本と欧米の現状と今後—特に血漿分画製剤に関連して—. JAMA 2: 120-121, 2004

- 金子清俊 : BSE—最新の知見. 日本医事新報 4165: 46-51, 2004
- 八谷如美、金子清俊. プリオン病の現況と将来. Current Concepts in Infectious Disease, 23: 18-19, 2004
- 金子清俊. BSE、SARS、鳥インフルエンザ等の感染症とつきあう方法. 環境会議, 21: 214-217, 2004
- 八谷如美、金子清俊. プリオン病治療の新たな可能性. バイオインダストリー, 21:60-66, 2004
- Satoh K, Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, Ironside JW, Nagashima K, Yamada M, Sato T, Mohri S, Kitamoto T: Association of an 11-12 kDa protease-resistant prion protein fragment with subtypes of dura graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease and other prion diseases. J Gen Virol 2003, 84 (10): 2885-2893
- Taguchi Y, Mohri S, Ironside JW, Muramoto T, Kitamoto T: Humanized knock-in mice expressing chimeric PrP showed varied susceptibility to different human prions. Am J Pathol 2003 163 (6): 2585-2593
- T. Oishi, K. Hagiwara, T. Kinumi, Y. Yamakawa, M. Nishizima, K. Nakamura and H. Arimoto: Effects of β -sheet breaker peptide polymers on scrapie-infected mouse neuroblastoma cells and their affinities to prion protein fragment PrP (81-145).Org. Biomol. Chem., 1, 2626-2629 (2003)
- Y. Yamakawa, K.Hagiwara, K. Nohtomi, Y. Nakamura, M. Nishizima, Y. Higuchi., Y. Sato, T. Sata and the Expert Committiee for BSE Diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare Japan: Atypical Protease Resistant Prion Protein (PrP^{res}) observed in an apparently healthy 23-Month-Old Holstein Steer. Jpn. J. Infect. Dis., 56, 221-222, (2003)

(2) 特許出願

なし