

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「プリオン複製に關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」

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名 (研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者 金子 清俊 (国立精神・神経センター神経研究所 部長)

主たる研究参加者

村本 環 (東北大学附属創生応用医学研究センター 助教授)

西島 正弘 (国立感染症研究所細胞化学部 部長)

3. 研究内容及び成果:

### 金子グループ

プリオン病は、人獣共通感染症であり、プリオンと称される感染性病原体に起因すると考えられている。プリオンの本体は、正常型プリオンタンパク質 (PrP<sup>C</sup>)を基に複製される感染型プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>)であるとのプリオン説が有力である。両者のアミノ酸配列に違いは見られないが、その立体構造に大きな違いが認められ、PrP<sup>C</sup>に比べるとPrP<sup>Sc</sup>は非常にベータ構造に富んでいる。プリオン病の発症機構として、PrP<sup>Sc</sup>を鋳型としたPrP<sup>C</sup>からPrP<sup>Sc</sup>への高次構造変換がその基盤にあるとされているが、その過程の中で、いったんPrP<sup>C</sup>が解きほぐされる段階を経ると考えられている。金子チームはこの解きほぐし分子(X因子)の同定を第一の目標として研究を進めた。X因子の同定は、正常にfoldingされたPrP<sup>C</sup>を標的とする解きほぐし活性の同定と言い換えることができるが、この活性は従来から知られているmisfoldingタンパク質を標的とする一般的な分子シャペロンの範疇には該当しない。

このような性質を有する新しいシャペロンを出芽酵母の系から同定し、アンフォルジンと命名した。試験管内においては、アンフォルジンの活性には基質特異性がなく、正常にfoldingされた分子を標的にし得るのみならず、プリオンタンパク質、アミロイド ペプチド(1-42)、 $\alpha$ -シヌクレインなどの異常凝集体の高次構造を解きほぐす活性を有していた。また、その細胞内局在とその活性が、細胞周期によって変化していることを見出し、その活性にはATPの結合が関与してい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、タンパク質凝集病における新しい治療法開発につながる可能性がある。

治療法に限らず、アンフォルジンの高度な解きほぐし活性は、様々な分野に応用が可能である。LC-MS/MS解析を例に取れば、膜タンパク質等の可溶化、断片化の困難なタンパク質群の効率的な解析が可能となることで、タンパク質の網羅的解析(プロテオーム解析)における飛躍的な進展が期待されるであろう。また、種々の疾患における難溶性異常凝集体の構成成分を、アンフォルジンにより解明することができれば、疾患の本体に迫る大きな手がかりとなる。予備実験の結果、実現可能性はかなり高いと考えている。またX因子の同定に向けて、現在哺乳動物細胞からアンフォルジンアッセイ系を応用し、新規解きほぐし活性の同定を行っている。

プリオンタンパク質の代謝機構の解明に関連して、(1)PrP<sup>C</sup>の細胞内輸送、(2)プリオンタンパク質過剰発現によって生じる細胞死機構について検討した。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、プリオンタンパク質の順行性並びに逆行性輸送の詳細を明らかにした。

プリオン感染における神経細胞死には、PrP<sup>Sc</sup>のみならず、PrP<sup>C</sup>の存在が必須であることが知られている。プリオンタンパク質過剰発現による細胞死機構として加齢に伴うミトコンドリアアポトーシスの関与を示し、その詳細を明らかにすることができた。また、プリオン病のモデル系としてY145STOP変異を用い、実際にミトコンドリアアポトーシスが、プリオン病の神経細胞死、ひいては海綿状変化に、関連している可能性を示した。今後さらにPrP<sup>C</sup>と神経細胞死との関連に関する理解を深めることができれば、例えPrP<sup>Sc</sup>の増殖が防ぎきれなくとも、神経細胞死を抑制し生存させるという全く新しい治療戦略を構築することが可能となるであろう。

他のプリオン病治療開発の試みとしては、ドミナントネガティブ効果を持つ防御型プリオンタンパ

ク質、抗プリオン抗体などを検討し、その有用性を確認した。さらに、これらの方法の組み合わせによる併用療法が、プリオン複製阻止効果増強と副作用低減をもたらすことを確認した。

#### 村本グループ

GPIアンカー欠損プリオンタンパク発現トランスジェニックマウスの解析等により、GPIアンカー欠損プリオンタンパクがプリオンを形成・伝播しうることを実証した。しかし、GPIアンカー欠損タンパクが蓄積した脳に神経変性は認められなかった。さらにGPIアンカー欠損プリオンタンパクがどこに局在しているかを解析し、プリオンタンパクの異常化におけるラフトの役割について検討している。ヒト・プリオン病症例の研究から、硬膜移植後クロイツフェルト・ヤコブ病の2つのサブタイプを確立した。

#### 西島グループ

プリオン病の発症過程でPrP<sup>Sc</sup>の蓄積と相関して変動するタンパク質群を解析することにより、PrP<sup>Sc</sup>が神経細胞 / 組織に及ぼす影響を明らかにすることや、X因子を検索することなどを目的として、スクレーパー病原体を接種し、マウス脳のタンパク質の変動を経時的、網羅的に解析した。PrP<sup>Sc</sup>の蓄積に伴って量的・質的に変化する幾つかの抗酸化ストレスタンパクを同定することができた。しかし、X因子の検索は技術的な問題もあって期間中に目立った進展が無かった。現在、Tagを付したプリオンタンパクを神経芽細胞N2aに発現させ、これと相互作用をする物質を分離する試みを行っている。

### 4. 事後評価結果

#### 4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表は海外で28件掲載されたが、研究後半期に集中しており、研究を軌道に乗せるのに苦労した跡をしのばせる。特許は国内2件、海外1件を出願した。いずれも高効率で多数の蛋白抗体をスクリーニングする方法に関するものである。うち国内の1件は新規性が高く早期に特許査定となった。このチームの主目的はシャペロン様分子(X因子)の同定を目指すことであった。有力な候補は同定されなかったものの、出芽酵母細胞からこのような解きほぐし活性をもつ分子を精製しアンフォルジンと命名した。このアンフォルジンの発見は分子細胞生物学の研究にとって重要な成果と云えよう。膜タンパク質等の可溶化、断片化の困難なタンパク質群の効率的な解析が可能となることで、タンパク質の網羅的解析(プロテオーム解析)の進展が期待される。現在、アンフォルジンの哺乳動物細胞におけるホモログの解析中であり、哺乳動物における異常プリオン生成との関連は今後の課題である。

研究の過程でプリオンタンパク質の順行性並びに逆行性輸送の詳細を明らかにしたこと、神経細胞死にはPrP<sup>C</sup>の存在が必須であり、プリオンタンパク質過剰発現による細胞死機構として加齢に伴うミトコンドリアアポトーシスの関与を示したこと等の成果が得られた。

#### 4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

この課題が採択されて間もなく、日米で狂牛病が発見されたため、日本では牛肉の前頭検査が行われたり、牛肉の輸入を巡って貿易摩擦になる等、深刻な状況が続いており、本研究課題の進展は強い注目を浴びることになった。本課題の主目的は正常型プリオンPrP<sup>C</sup>を基に感染型プリオンPrP<sup>Sc</sup>に高次変換する際、シャペロン様分子(X因子)が関与していることを想定してその分子の同定を目指すことであった。このX因子が同定されれば、プリオン病の治療や予防に大きな役割を果たすことが期待される。X因子についてはいくつかの候補物質は探索したものの、残念ながら研究期間内には有力な候補物質は同定されなかった。しかし、出芽酵母細胞から、このX因子に相当する解きほぐし活性を持つ分子アンフォルジンを解明したので、タンパク質の網羅的解析等に役立つことが期待される。

#### 4 - 3. その他の特記事項(受賞歴など)

特になし。