

学 位 論 文 題 名

Characterization of Soluble Oligomers of Prion Protein by Fluorescence Correlation Spectroscopy

(プリオンタンパク質の可溶性オリゴマーの蛍光相関分光法による評価)

学位論文内容の要旨

プリオン病は、伝播可能な致死性の神経変性疾患である。孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease) に代表されるように、ヒトのプリオン病の大半は孤発性である。孤発性プリオン病では、正常型プリオン蛋白質 (PrP^{C}) から偶発的に異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) オリゴマーが形成されることが病気の始まりと考えられているが、 $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ オリゴマーの形成機序は明らかでない。これまで、組換え PrP (recPrP) を用いた試験管内の実験系により PrP^{Sc} 形成機構の解析が試みられているが、そのほとんどが、高濃度の recPrP (μM オーダー) を出発材料としている、あるいは、高濃度の変性剤で処理した recPrP が出発物質として用いられており、非変性条件で保持されている低濃度の recPrP (nM オーダー) を出発材料として PrP^{Sc} オリゴマーの形成機構を解析した例は殆どない。本研究では、非変性条件で保持された低濃度の recPrP に、低濃度のドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulphate、以下 SDS) を添加することにより recPrP のオリゴマー化を誘導し、そのオリゴマー形成過程を蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy) により解析した。

改変した緑色蛍光蛋白質 (enhanced green fluorescent protein、以下 EGFP) を付加したプリオン蛋白融合体 (EGFP-tagged prion protein、以下 EGFP- PrP) を発現する N2a マウス神経芽腫細胞 (Neuro2a mouse neuroblastoma) の培養上清から EGFP- PrP を精製した。精製 EGFP- PrP はリン酸緩衝液 (80 mM、pH 7.3) 中で保存した。添加する SDS 濃度を検討したところ、低濃度 (10 nM) の EGFP- PrP を含む溶液に、SDS を終濃度 0.0075~0.01% となるように加えることで、可溶性 PrP オリゴマーが形成されることを見出した。可溶性 PrP オリゴマーの性質を FCS により詳細に解析したところ、EGFP- PrP 分子が溶液中で 3、6、9 量体として安定に存在することが示唆された。次に、EGFP- PrP のオリゴマー形成に伴う立体構造変化を、蛍光相互相関分光法 (fluorescence cross-correlation spectroscopy) と抗 PrP 抗体パネルを組み合わせで解析した。オリゴマー化に先立って

P r P分子のN末端領域部分に構造変化が、またオリゴマー化に伴ってC末端領域部分に構造変化が生じることが分かった。さらに、抗P r P抗体パネルを用いたオリゴマー形成の阻害実験では、N末端領域部分を認識する抗体がオリゴマー形成を著しく阻害する一方で、C末端領域部分を認識する抗体はオリゴマー形成を阻害しなかった。この結果から、P r PのN末端部分が可溶性P r Pオリゴマー形成の初期段階に関与することが示唆された。

結果として、P r Pオリゴマー基本ユニットが3量体のP r Pでありうること、およびP r PのN末端とC末端に構造変化が生じることを見出した。さらに、P r PのN末端が、オリゴマー形成に関与する可能性を見出した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 金 城 政 孝
副 査 教 授 出 村 誠
副 査 教 授 幸 田 敏 明

学 位 論 文 題 名

Characterization of Soluble Oligomers of Prion Protein by Fluorescence Correlation Spectroscopy

(プリオンタンパク質の可溶性オリゴマーの蛍光相関分光法による評価)

プリオン病は、蛋白質だけで伝播可能な致死性の神経変性疾患である。孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease) に代表されるように、ヒトのプリオン病の大半は孤発性である。孤発性プリオン病では、正常型プリオン蛋白質 (PrP^C) から偶発的に異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) オリゴマーが形成されることが病気の始まりと考えられているが、PrP^C→PrP^{Sc}オリゴマーの形成機序は明らかでない。これまで、組換えPrP (recPrP) を用いた試験管内の実験系によりPrP^{Sc}形成機構の解析が試みられているが、そのほとんどが、高濃度のrecPrP (?Mオーダー) を出発材料としている、あるいは、高濃度の変性剤で処理したrecPrPが出発物質として用いられており、非変性条件で保持されている低濃度のrecPrP (nMオーダー) を出発材料としてPrP^{Sc}オリゴマーの形成機構を解析した例は殆どない。

本研究では、非変性条件で保持された低濃度のrecPrPに、低濃度のドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulphate、以下SDS) を添加することによりrecPrPのオリゴマー化を誘導し、そのオリゴマー形成過程を蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy) により解析した。

改変した緑色蛍光蛋白質 (enhanced green fluorescent protein、以下EGFP) を付加したプリオン蛋白融合体 (EGFP-tagged prion protein、以下EGFP-PrP) を発現するN2aマウス神経芽腫細胞 (Neuro2a mouse neuroblastoma) の培養上清からEGFP-PrPを精製した。精製EGFP-PrPはリン酸緩衝液 (80 mM、pH 7.3) 中で保存した。添加するSDS濃度を検討したところ、低濃度 (10 nM) のEGFP-PrPを含む溶液に、SDSを終濃度0.0075~0.01%となるように加えることで、可溶性PrPオリゴマーが形成されることを見出した。可溶性PrPオリゴマーの性質をFCSにより詳細に解析したところ、EGFP-PrP分子が溶液中で3、6、9量体として安定に存在することが示唆された。

次に、EGFP-PrPのオリゴマー形成に伴う立体構造変化を、蛍光相互相関分光法 (fluorescence cross-correlation spectroscopy) と抗PrP抗体パネルを組み合わせで解析した。オリゴマー化に先立ってPrP分子のN末端領域部分に構造変化が、またオリゴマー化に伴ってC末端領域部分に構造変化が生じることが分かった。さらに、抗PrP抗体パネルを用いたオリゴマー形成の阻害実験では、N末端領域部分を認識する抗体がオリゴマー形成を著しく阻害する一方で、C末端領域部分を認識する抗体はオリゴマー形成を阻害しなかった。

この結果から、PrPのN末端部分が可溶性PrPオリゴマー形成の初期段階に関与することが示唆された。

結果として、PrPオリゴマー基本ユニットが3量体のPrPでありうること、およびPrPのN末端とC末端に構造変化が生じることを見出した。さらに、PrPのN末端が、オリゴマー形成に関与する可能性を見出した。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。